

张秀清,刘娟,刘斌,等. LncRNA FAM83A-AS1 调控 FAM83A 表达对乳腺癌细胞增殖、侵袭与迁移的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 1-11.

Zhang XQ, Liu J, Liu B, et al. Effects of lncRNA FAM83A-AS1 in regulating the expression of FAM83A and proliferation, invasion and migration by breast cancer cells [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 1-11.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.001

## LncRNA FAM83A-AS1 调控 FAM83A 表达对乳腺癌细胞增殖、侵袭与迁移的影响

张秀清<sup>1</sup>, 刘娟<sup>1</sup>, 刘斌<sup>1</sup>, 刘平<sup>2\*</sup>

(1.滕州市中心人民医院甲乳外科, 山东 滕州 277500; 2.贵州医科大学学报编辑部, 贵州 贵阳 550004)

**【摘要】** 目的 探讨长链非编码 RNA 序列相似家族 83 成员 A-反义核糖核酸 1(lncRNA FAM83A-AS1)在乳腺癌(breast cancer, BC)中的作用及潜在机制。方法 免疫组织化学(IHC)染色检测 BC 组织中 FAM83A 的表达;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 BC 组织/细胞中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A mRNA 表达水平;Pearson 法分析 BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A mRNA 表达水平的相关性。细胞转染建立基因过表达和沉默 MDA-MB-231 细胞模型,qRT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A mRNA 表达水平;CCK-8 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖活力;Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭能力;Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞中 FAM83A、ERK1/2 及其磷酸化蛋白、Ki-67、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白表达;核质分离实验检测 lncRNA FAM83A-AS1 的亚细胞分布,lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A 之间的相互作用通过 RNA pull-down、RNA 免疫沉淀(RIP)和 qRT-PCR 测定进行验证;裸鼠成瘤实验检测 lncRNA FAM83A-AS1 沉默对 MDA-MB-231 细胞体内生长的影响;IHC 染色检测肿瘤内 Ki-67、FAM83A 的表达。**结果** 在 BC 组织和细胞中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 的表达显著上调( $P<0.05$ );Pearson 分析显示,BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.885, P<0.05$ )。lncRNA FAM83A-AS1 沉默降低 MDA-MB-231 细胞增殖活力,抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移与侵袭,促进 E-cadherin 表达,抑制 FAM38A、Ki-67、MMP-9 表达和 ERK1/2 活化,并抑制裸鼠体内移植瘤的生长( $P<0.05$ );上调 FAM83A 的表达,可明显减弱 lncRNA FAM83A-AS1 的沉默对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用( $P<0.05$ )。lncRNA FAM83A-AS1 在细胞核与细胞质中均有分布,能够通过 RNA 结合蛋白 FBL 与 FAM83A 结合以增加 FAM83A 的表达。**结论** lncRNA FAM83A-AS1 可以通过上调 FAM83A 来促进 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移与侵袭。

**【关键词】** 乳腺癌;lncRNA FAM83A-AS1;增殖;迁移;侵袭;FAM83A

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0001-11

## Effects of lncRNA FAM83A-AS1 in regulating the expression of FAM83A and proliferation, invasion and migration by breast cancer cells

ZHANG Xiuqing<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>, LIU Ping<sup>2\*</sup>

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, China.

2. Editorial Department of Journal of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(61775128)。

**【作者简介】** 张秀清(1973—),女,本科,副主任,研究方向:乳腺甲状腺疾病。E-mail:3389362441@qq.com

**【通信作者】** 刘平(1980—),女,编审,研究方向:医学心理学,出版学。E-mail:172586428@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role and potential mechanism of long non-coding RNA sequence similarity family 83 member A-antisense ribonucleic acid 1 (lncRNA FAM83A-AS1) in breast cancer (BC). **Methods** The expression of FAM83A in BC tissue was detected by immunohistochemistry, and lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in BC tissues/cells was detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). Pearson method was employed to test the correlation between lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA expression levels in BC tissues. Cell transfection silencing of MDA-MB-231 was used to study gene overexpression. The expression levels of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in MDA-MB-231 cells were detected by qRT-PCR. MDA-MB-231 cell proliferation activity was detected via the CCK-8 method. MDA-MB-231 cell migration and invasion abilities were detected by Transwell experiment. The protein expression of FAM83A, ERK1/2 and its phosphorylated protein Ki-67, E-cadherin and matrix metalloproteinase 9 in MDA-MB-231 cells was detected by Western blot. The subcellular distribution of lncRNA FAM83A-AS1 was detected by nucleocytoplasmic separation experiments, and the interaction between lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A was verified by RNA pull-down, RNA immunoprecipitation (RIP) and qRT-PCR assays. Nude mice were used in a tumorigenesis experiment to detect the effect of lncRNA FAM83A-AS1 silencing on the growth of MDA-MB-231 cells *in vivo*. We employed immunohistochemistry staining to detect the expression of Ki-67 and FAM83A in tumors. **Results** The expression of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in BC tissues and cells was significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Pearson analysis showed that the expression levels of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in BC tissues were positively correlated ( $r = 0.885$ ,  $P < 0.05$ ). lncRNA FAM83A-AS1 silencing reduced the proliferation of MDA-MB-231 cells; inhibited the migration and invasion of MDA-MB-231 cells; promoted E-cadherin expression; inhibited FAM38A, Ki-67 and matrix metalloproteinase 9 expression and ERK1/2 activation; and inhibited the growth of transplanted tumors in nude mice ( $P < 0.05$ ). Up-regulating the expression of FAM83A significantly reduced the inhibitory effects of lncRNA FAM83A-AS1-silencing on proliferation, migration, and invasion by MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ). lncRNA FAM83A-AS1 is present in both the nucleus and cytoplasm and can bind to FAM83A through the RNA-binding protein FBL to increase the expression of FAM83A. **Conclusions** lncRNA FAM83A-AS1 can promote proliferation, migration, and invasion by MDA-MB-231 cells by up-regulating FAM83A expression.

**【Keywords】** breast cancer; lncRNA FAM83A-AS1; proliferation; migration; invasion; FAM83A

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是全球女性中常见的恶性肿瘤之一, 尽管在诊断和联合治疗方面取得了进步, 但 BC 患者的预后仍不令人满意<sup>[1-2]</sup>。据报道, 序列相似性家族 83 成员 A (sequence similarity family 83 member A, FAM83A), 一种在 BC 中上调的蛋白质, 其过表达可导致细胞侵袭性增加<sup>[3-4]</sup>。因此, 靶向 FAM83A 可能对 BC 患者有益。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 nt 且没有蛋白质编码功能的转录物。大量研究证实, lncRNAs 参与多种生物学过程的调控, 其表达失调会导致多种恶性肿瘤的发生, 包括 BC、肺癌<sup>[5]</sup> 和食管癌<sup>[6]</sup>。位于 8q24 的 lncRNA 序列相似家族 83 成员 A-反义核糖核酸 1 (lncRNA sequence similarity family 83 member A-antisense ribonucleic acid 1, lncRNA FAM83A-AS1) 是一种天然的反义转录 RNA。已有的研究表明, 在肺癌<sup>[7-8]</sup>、肝细胞癌<sup>[9]</sup> 中, lncRNA FAM83A-AS1 可增加 FAM83A 的表达并促进癌变, 但是尚未有研究报道其在 BC 中的作用。因此, 有必要进一

步研究 lncRNA FAM83A-AS1 在 BC 中的生物学功能和潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 临床组织

于 2018 年 1 月~2020 年 1 月从医院收集 48 例接受乳房切除术的 BC 患者的癌组织标本 (BC 组织) 和邻近正常组织标本 (非肿瘤组织)。所有组织标本均经病理证实, 术前未接受放疗或化疗。切除后, 将组织液氮冷冻, 并立即保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  用于后续的 RNA 提取。所有患者均签署知情同意书。研究方案经医院伦理委员会批准 (2017018)。

#### 1.1.2 细胞

三种 BC 细胞系 MCF7 (CL-0149)、SKBR3 (CL-0211)、MDA-MB-231 (CL-0150) 和人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A (CP-H017) 以及 McCoy's 5A 培养基 (SKBR3 细胞专用培养基, CM-0211) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.1.3 实验动物

SPF 级 BALB/c 雌性裸鼠 ( $n=10$ , 4 周龄, 体重 16~20 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京)2021-0011]。所有裸鼠都饲养在贵州医科大学(毒性检测中心) [SYXK(黔)2021-0007] 专用的 SPF 设施中, 温度 ( $22\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ; 湿度 ( $50\pm 10$ )%; 光/暗循环, 12 h:12 h, 配备标准实验室食物和水。动物实验研究经贵州医科大学伦理委员会批准 (IACUC20210215003)。本研究符合实验动物的 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清 (批号:164210-500)、DMEM 培养基 (批号: BH-S3208)、RPMI-1640 培养基 (批号: CD-100043GM) (美国 Gbico 公司); Lipofectamine 3000 转染试剂 (批号: L3037) (Sigma-Aldrich); FAM83A 过表达载体质粒 (pcDNA3.1-FAM83A) 及其阴性对照空载体质粒 (pcDNA3.1-NC)、用于 lncRNA FAM83A-AS1 敲低的 siRNA (si-FAM83A-AS1) 及其阴性对照 (si-NC) 以及 qRT-PCR 所用引物均由上海 GenePharma 合成; TRIzol 试剂 (批号: RR420A)、PrimeScript RT 试剂盒 (批号: RR037A)、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒 (批号: RR390A) (日本 TaKaRa 公司); CCK-8 试剂盒 (批号: C00038)、BCA 试剂盒 (批号: P0010)、RIPA 裂解液 (批号: P0013B) (碧云天生物科技公司); Transwell 小室 (批号: 3413) (美国 Corning 公司); 人工重构基底膜胶 (Matrigel, 批号: 356234) (美国 BD 公司); PARIS 核质分离试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号: AM1921); Millipore Magna RIP<sup>™</sup> RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒 (批号: 17-700) (美国 EMD Millipore 公司); 兔源一抗 FAM83A (批号: bs-16014R) (北京 Bioss 公司); E-cadherin (批号: ab40772)、Ki-67 (批号: ab16667)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) (批号: ab76003) 和山羊抗兔 IgG (批号: ab205718) (英国 abcam 公司); 兔源一抗 p-ERK1/2 (批号: #4377) 和 ERK1/2 (批号: #4695) (美国 Cell Signaling Technology 公司)。多功能酶标仪 (型号: iMark680, 美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (型号: FACSCanto II, 美国 BD 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (型号: ABI Prism<sup>®</sup> 7300, 美国应用生物系统公司); 倒置荧光显微镜 (型号: IX73, 日本 Olympus 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

MCF7 和 MDA-MB-231 细胞在含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中, SKBR3 细胞培养在 McCoy's 5A 培养基中, MCF-10A 细胞培养在 RPMI-1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。在达到 80%~90% 汇合时收集细胞, 每 48~72 h 更换 1 次培养基。

#### 1.3.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 法检测

将来自 BC 患者的组织标本用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 3  $\mu\text{m}$  切片。在二甲苯中脱蜡, 并用 100%、85% 和 75% 乙醇再水化。置于抗原修复溶液中, 在 100 $^{\circ}\text{C}$  下煮沸 15 min, 随后与抗 FAM83A (1:800) 在 4 $^{\circ}\text{C}$  下过夜, 然后与二抗在室温下孵育 2 h。用 DAB 观察抗体染色。技术人员根据染色强度和染色阳性细胞比例对 IHC 结果进行评估和评分。阳性细胞比例定义如下: <5%, 0 分; 5%~30%, 1 分; 31%~70%, 2 分; >71%, 3 分。染色强度评分如下: 无染色, 0 分; 浅棕色染色, 1 分; 褐色染色, 2 分; 深褐色染色, 3 分。染色结果通过阳性细胞比例的分数的分数乘以染色强度的分数来确定。FAM83A 的表达分为“阴性”(0~3 分) 和“阳性”(4~9 分)。

#### 1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

使用 TRIzol 试剂提取 BC 患者组织/细胞 (MCF7、SKBR3、MDA-MB-231 和人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A) 中的总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒合成 cDNA。然后将所得 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增。循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 40 个循环。使用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  方法进行定量, GAPDH 用作内部对照。所用引物序列见表 1。

#### 1.3.4 细胞转染与分组

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 以每孔  $3\times 10^5$  个的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 待细胞融

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
lncRNA FAM83A-AS1	F: CCCAGAGCACTTCCTTAGC
	R: CAGGGCCGTCTGTGTTTACT
	F: CTCGGACTGGAGATTTGTCC
FAM83A	R: GGAACCTCCTCGTCAAACAGC
	F: CTGGGCTACACTGAGCACC
GAPDH	R: AAGTGGTCTGTGAGGGCAATG

合到 80% 时,于每个细胞孔加入带有 FITC 荧光标记的转染试剂进行转染。实验分为:对照组(对照组,不进行任何转染)、si-NC 组(转染 si-FAM83A-AS1 阴性对照)、FAM83A-AS1 沉默组(转染 si-FAM83A-AS1)、FAM83A-AS1 沉默 + pcDNA3.1-NC 组(si-FAM83A-AS1 和 pcDNA3.1-FAM83A 阴性对照空载体质粒共转染)、FAM83A-AS1 沉默 + FAM83A 过表达组(si-FAM83A-AS1 和 pcDNA3.1-FAM83A 载体质粒共转染)。转染按照 Lipofectamine 3000 试剂说明进行。转染后在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。转染 48 h 后,于荧光显微镜下观察并计算转染效率(视野内荧光细胞数量与细胞总数的比值),并提取 RNA,通过 qRT-PCR 检测各组细胞中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 的表达水平,验证转染效果。检测方法同 1.3.3。

### 1.3.5 细胞增殖实验

将 MDA-MB-231 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞的密度接种在 96 孔板中,然后按照 1.3.4 项下进行分组和转染,分别于转染 0、24、48、72 h 时,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ L,37℃ 孵育 1 h。在 450 nm 波长处检测(A)值(A<sub>450</sub> 值)。

### 1.3.6 细胞迁移和侵袭实验

Transwell 迁移实验:在转染后 24 h 收获 MDA-MB-231 细胞,并用不含血清的培养基将细胞重悬,然后将 200  $\mu$ L 细胞悬液( $1 \times 10^3$  个细胞)加入上室,同时将 600  $\mu$ L 含有 10% 胎牛血清的培养基加入下室,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h 后,将细胞用 4% 多聚甲醛固定并用 0.1% 结晶紫染色,用棉签去除仍在在上室中的细胞,在倒置荧光显微镜下对迁移的细胞进行拍照和计数。侵袭实验同上,不同之处在于上室膜包被 Matrigel,细胞接种于上室中培养 48 h。

### 1.3.7 Western blot 检测

使用含磷酸酶和蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解 MDA-MB-231 细胞获取总蛋白质。使用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒检测蛋白质浓度后,使用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白质(30  $\mu$ g),然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。使用 5% 脱脂牛奶封闭,并与一抗(FAM83A、p-ERK1/2、ERK1/2、E-cadherin、Ki-67、MMP-9, 1:1000;GAPDH, 1:2000)在 4℃ 下孵育过夜。洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的

二抗(1:4000)在室温下一起孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂使蛋白质表达可视化。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件测量各目的蛋白条带的灰度值,通过与内参的灰度值比,得出目的蛋白的相对表达水平。

### 1.3.8 亚细胞分布分析

使用核和细胞质提取试剂盒将 MDA-MB-231 细胞的细胞质与细胞核部分分离。使用 TRIzol 试剂分离细胞质和核 RNA,然后进行 qRT-PCR,检查细胞质和细胞核中的 lncRNA FAM83A-AS1 含量。U6 和 GAPDH 分别是细胞核和细胞质的内参。

### 1.3.9 RNA pull-down

体外分别从载体 pSPT19-FAM83A-AS1 和 pSPT19-FAM83A-AS1-mut 转录 FAM83A-AS1 或 FAM83A-AS1-mut,并用生物素标记 RNA 混合物和 T7 RNA 聚合酶,用 RNase-free DNase I 处理,用 RNeasy Mini Kit 进行纯化。将 1 mg 的 MDA-MB-231 细胞全细胞裂解液与 3  $\mu$ g 纯化的生物素化转录产物在 25℃ 下孵育 1 h,然后用链霉亲和素琼脂糖珠分离复合物。在裂解缓冲液中洗涤珠子 6 次,通过蛋白质印迹分析检测 RNA-蛋白质复合物。

### 1.3.10 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)

按照 Millipore Magna RIP™ RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒的说明处理 MDA-MB-231 细胞。简而言之,收集 MDA-MB-231 细胞并与 RIP 裂解缓冲液一起孵育。随后,将 1  $\mu$ g FBL 和 IgG 抗体与细胞裂解物在 4℃ 下孵育过夜,蛋白 A/G 珠与细胞裂解物一起孵育以捕获 RNA 蛋白抗体。然后用 TRIzol 试剂提取 RNA 并使用 qRT-PCR 分析 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A 水平。

### 1.3.11 裸鼠异种移植模型

将裸鼠随机分为 2 组:si-NC 组、si-FAM83A-AS1 组( $n=5$ )。用慢病毒载体系统构建稳定沉默 FAM83A-AS1 的 MDA-MB-231 细胞,将  $5 \times 10^6$  个转染后的 MDA-MB-231 细胞注射到裸鼠左侧第二个乳房下的脂肪垫中。然后,从注射后第 2 周开始,每周用卡尺监测肿瘤生长,计算肿瘤体积:肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times (\text{长径}) \times (\text{短径})^2$ 。在注射后 5 周处死裸鼠并解剖,称重肿瘤块,然后固定在福尔马林中进行 IHC 染色。

### 1.3.12 IHC 染色检测肿瘤内 Ki-67、FAM83A 表达

将来自裸鼠体内模型的肿瘤用 4% 多聚甲醛固

定,石蜡包埋,切成 3 μm 切片。将切片与抗 Ki-67 (1 : 100)、FAM83A(1:50)抗体在 4℃ 下孵育过夜,然后与二抗孵育 2 h。随后,DAB 显色,观察组织中 Ki-67、FAM83A 的阳性表达(棕黄色),并拍照。

### 1.4 统计学方法

采用统计软件 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析,应用 Kolmogorov-Smirnov 检验和配对样本 *t* 检验来比较 BC 组织样本和邻近正常组织中 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 的表达差异。Pearson 法分析 BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 表达水平的相关性。使用单因素方差分析和独立样本 *t* 检验评估体外和体内实验数据的统计显著性。结果以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A 在 BC 组织和细胞中高表达

图 1 和表 2 结果显示,FAM83A 在 BC 组织中的阳性表达明显高于非肿瘤组织。qRT-PCR 结果显示,与非肿瘤组织相比,lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 在 BC 组织中的表达显著上调( $P < 0.05$ ;表 3);与人正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞相比,3 种 BC 细胞系 MCF7、SKBR3、MDA-MB-231 中均观察到 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA

的高表达( $P < 0.05$ ),其中 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 的表达最高(表 4),因此,选择 MDA-MB-231 细胞进行后续实验。

表 2 FAM83A 在 BC 组织/非肿瘤组织中的表达比较( $n=48$ )

**Table 2** Comparison of FAM83A expression in BC tissue/non-tumor tissue

组织 Tissue	FAM83A 表达 FAM83A expression	
	阴性表达 Negative	阳性表达 Positive
非肿瘤组织 Non-tumor tissue	41 (85.42)	7 (14.58)
BC 组织 BC tissue	13 (27.08)	35 (72.92)
$\chi^2$	30.857	
<i>P</i>	0.000	

表 3 BC 组织/非肿瘤组织中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 的表达( $n=48$ )

**Table 3** Expression of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in BC tissue/non-tumor tissue

组织 Tissue	LncRNA FAM83A-AS1	FAM83A mRNA
非肿瘤组织 Non-tumor tissue	1.00±0.00	1.00±0.00
BC 组织 BC tissue	1.52±0.18	1.39±0.16
<i>t</i>	17.641	20.237
<i>P</i>	<0.01	<0.01

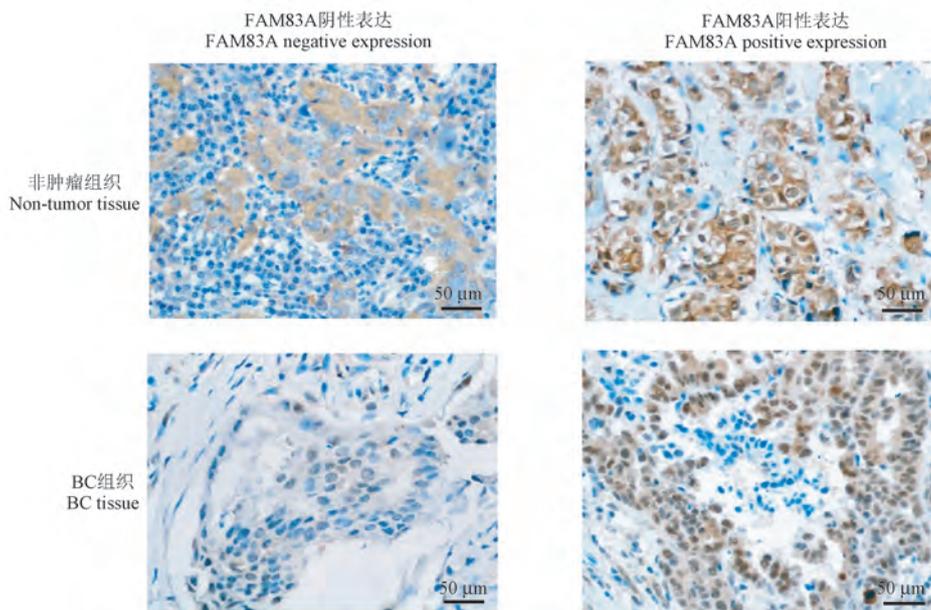


图 1 FAM83A 在 BC 组织/非肿瘤组织中的表达

Figure 1 Expression of FAM83A in BC tissue/non-tumor tissue

## 2.2 BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 表达水平的相关性

由图 2 显示可知,BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 的表达呈正相关( $r=0.885$ ,  $P<0.05$ )。

## 2.3 转染后各组 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A 的表达

图 3 结果显示,转染 48 h 后,除对照组外,其余各组的转染效率约为 70%~80%;图 4 结果显示,与对照组相比,FAM83A-AS1 沉默组细胞中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A 的 mRNA 和蛋白表达显著降低( $P<0.05$ );与 FAM83A-AS1 沉默组相比,FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组细胞中 FAM83A 的 mRNA 和蛋白表达显著升高( $P<0.05$ )。

## 2.4 各组 MDA-MB-231 细胞增殖活力

根据图 5 结果显示,在 48、72 h 时,与对照组相比,FAM83A-AS1 沉默组细胞增殖活力显著降低( $P<0.05$ );与 FAM83A-AS1 沉默组相比,FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组细胞增殖活力显著升高( $P<0.05$ )。

## 2.5 各组 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭能力

图 6 结果显示,与对照组相比,FAM83A-AS1 沉默组迁移细胞数和侵袭细胞数显著减少( $P<0.05$ );与 FAM83A-AS1 沉默组相比,FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组迁移细胞数和侵袭细胞数显著增

加( $P<0.05$ )。

表 4 MCF-10A 细胞和 BC 细胞系中 lncRNA FAM83A-AS1 和 FAM83A mRNA 的表达( $n=6$ )

Table 4 Expression of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA in MCF-10A cells and BC cell lines

细胞 Cells	lncRNA FAM83A-AS1	FAM83A mRNA
MCF-10A	1.00±0.00	1.00±0.00
MCF7	1.67±0.18 <sup>#</sup>	1.42±0.16 <sup>#</sup>
SKBR3	1.54±0.17 <sup>#</sup>	1.31±0.15 <sup>#</sup>
MDA-MB-231	1.93±0.20 <sup>#&amp;△</sup>	1.65±0.17 <sup>#&amp;△</sup>

注:与 MCF-10A 细胞相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 MCF7 细胞相比,<sup>&</sup> $P<0.05$ ;与 SKBR3 细胞相比,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with MCF-10A cell, <sup>#</sup> $P<0.05$ . Compared with MCF7 cell, <sup>&</sup> $P<0.05$ . Compared with SKBR3 cell, <sup>△</sup> $P<0.05$ .

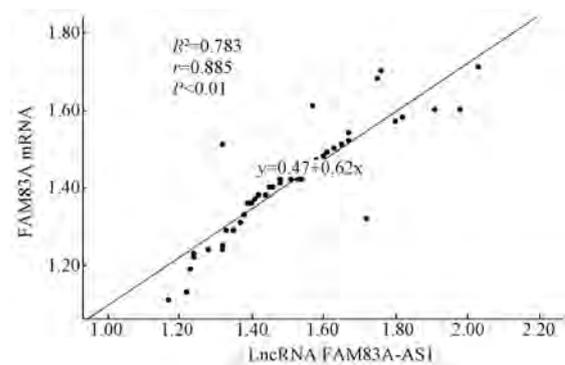
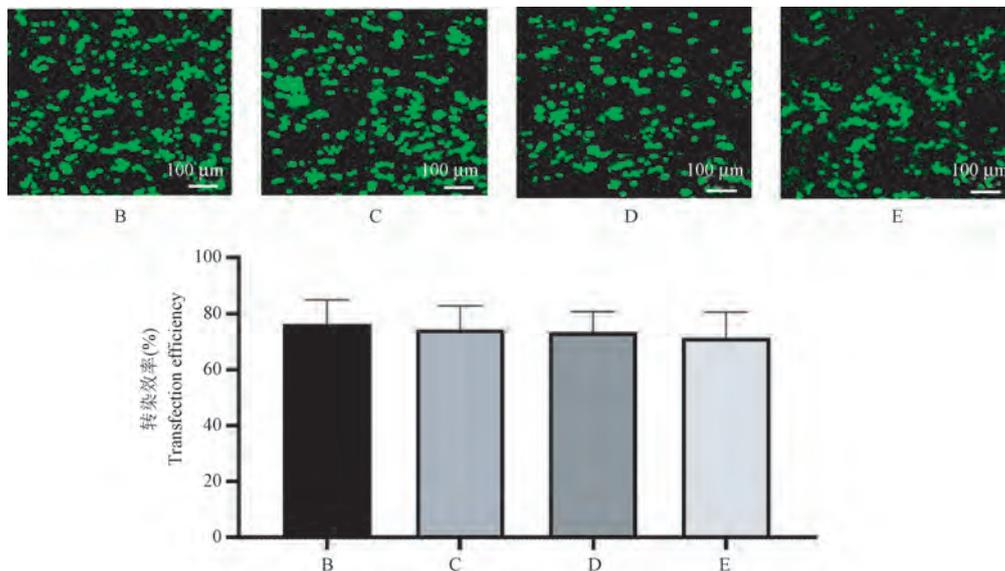


图 2 Pearson 法分析 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A mRNA 表达水平的相关性

Figure 2 Pearson method analysis of the correlation between lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A mRNA expression levels

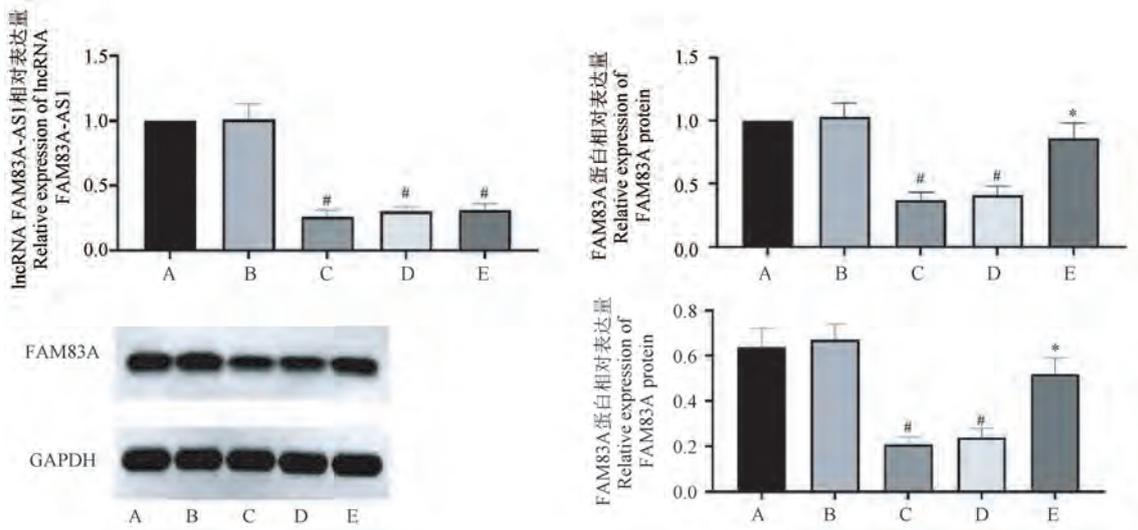


注:B; si-NC 组;C; FAM83A-AS1 沉默组;D; FAM83A-AS1 沉默+pcDNA3.1-NC 组;E; FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组。

图 3 各组 MDA-MB-231 细胞转染效率

Note. B, si-NC group. C, FAM83A-AS1 silent group. D, FAM83A-AS1 silent + pcDNA3.1-NC group. E, FAM83A-AS1 silent + FAM83A overexpression group.

Figure 3 Transfection efficiency of MDA-MB-231 cells in each group

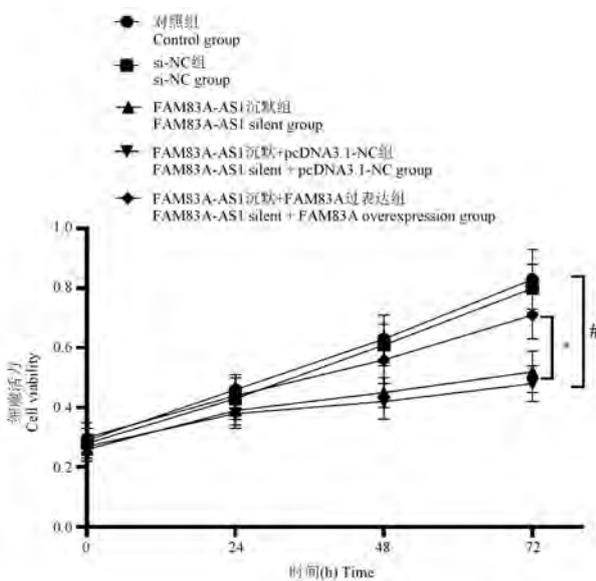


注: A: 对照组; B: si-NC 组; C: FAM83A-AS1 沉默组; D: FAM83A-AS1 沉默+pcDNA3.1-NC 组; E: FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组。与对照组相比, # $P < 0.05$ ; 与 FAM83A-AS1 沉默组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 4 各组 MDA-MB-231 细胞中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A 的 mRNA 和蛋白表达 ( $n = 6$ )

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, FAM83A-AS1 silent group. D, FAM83A-AS1 silent + pcDNA3.1-NC group. E, FAM83A-AS1 silent + FAM83A overexpression group. Compared with the control group, # $P < 0.05$ . Compared with the FAM83A-AS1 silent group, \* $P < 0.05$ .

Figure 4 FAM83A protein expression in MDA-MB-231 cells in each group



注: 与对照组相比, # $P < 0.05$ ; 与 FAM83A-AS1 沉默组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 5 各组 MDA-MB-231 细胞不同时间点增殖能力比较 ( $n = 6$ )

Note. Compared with the control group, # $P < 0.05$ . Compared with the FAM83A-AS1 silent group, \* $P < 0.05$ .

Figure 5 Comparison of the proliferation ability of MDA-MB-231 cells at different time points in each group

## 2.6 各组 MDA-MB-231 细胞中 ERK1/2、Ki-67、E-cadherin、MMP-9 蛋白表达

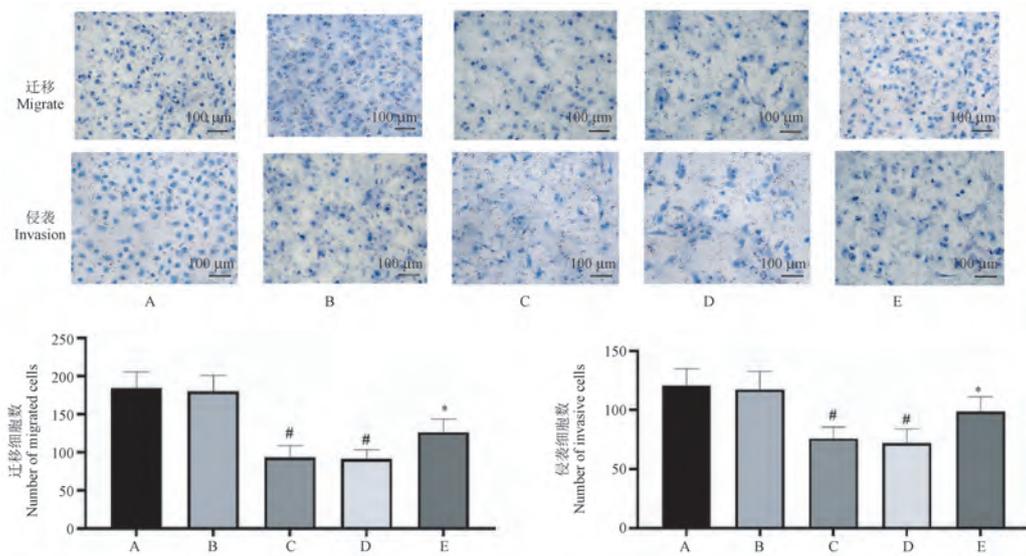
图 7 结果显示,与对照组相比,FAM83A-AS1 沉默组细胞中 Ki-67、MMP-9 蛋白表达和 p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著降低,E-cadherin 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 FAM83A-AS1 沉默组相比,FAM83A-AS1 沉默+FAM83A 过表达组细胞中 Ki-67、MMP-9 蛋白表达和 p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著升高,E-cadherin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。

## 2.7 lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A 相互作用

核质分离分析结合 qRT-PCR 分析显示,lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A 在细胞核与细胞质中均有分布,其中 lncRNA FAM83A-AS1 大约 40% 位于细胞核中,而 60% 位于细胞质中(图 8A)。RNA pull-down 分析的结果表明 FAM83A-AS1 可以与 FBL 结合(图 8B)。RIP 检测结果显示,FAM83A-AS1 和 FAM83A 均可被抗 FBL 抗体富集(图 8C)。

## 2.8 沉默 lncRNA FAM83A-AS1 对裸鼠移植瘤生长的影响

图 9 结果显示,在第 4 和 5 周时,与 si-NC 组相比,si-FAM83A-AS1 组裸鼠肿瘤体积和瘤重显著降低 ( $P < 0.05$ ); 且免疫组织化学检测显示 Ki-67、FAM83A 表达也明显降低。

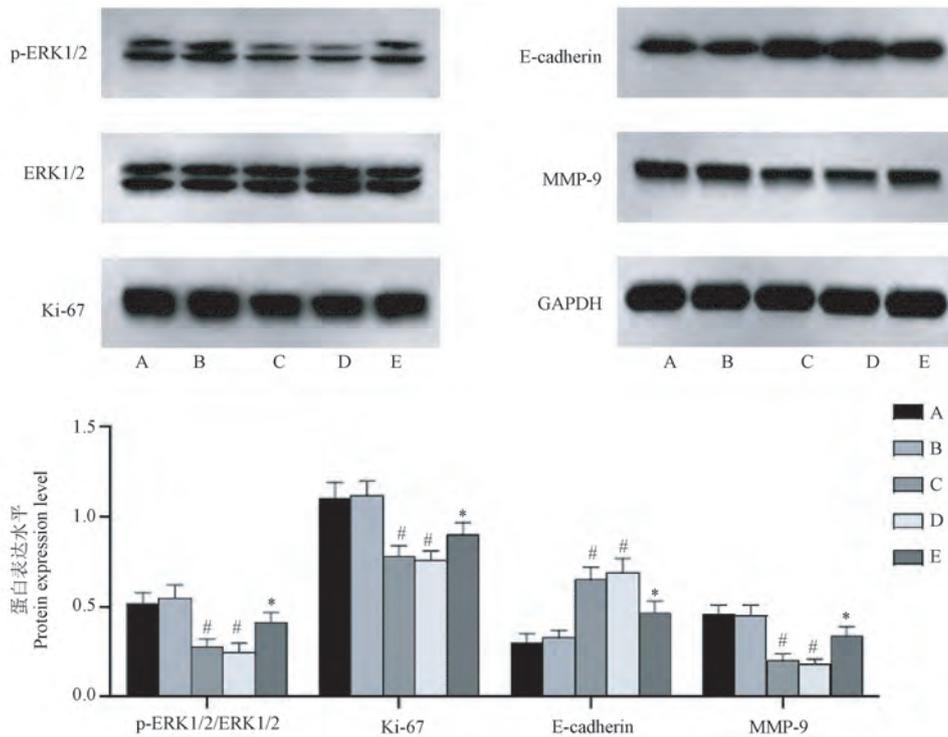


注:A:对照组;B:si-NC组;C:FAM83A-AS1沉默组;D:FAM83A-AS1沉默+pcDNA3.1-NC组;E:FAM83A-AS1沉默+FAM83A过表达组。与对照组相比, $^{\#}P<0.05$ ;与FAM83A-AS1沉默组相比, $^*P<0.05$ 。

图6 各组MDA-MB-231细胞迁移、侵袭情况比较( $n=6$ )

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, FAM83A-AS1 silent group. D, FAM83A-AS1 silent+pcDNA3.1-NC group. E, FAM83A-AS1 silent+FAM83A overexpression group. Compared with the control group,  $^{\#}P<0.05$ . Compared with the FAM83A-AS1 silent group,  $^*P<0.05$ .

Figure 6 Comparison of MDA-MB-231 cell migration and invasion in each group

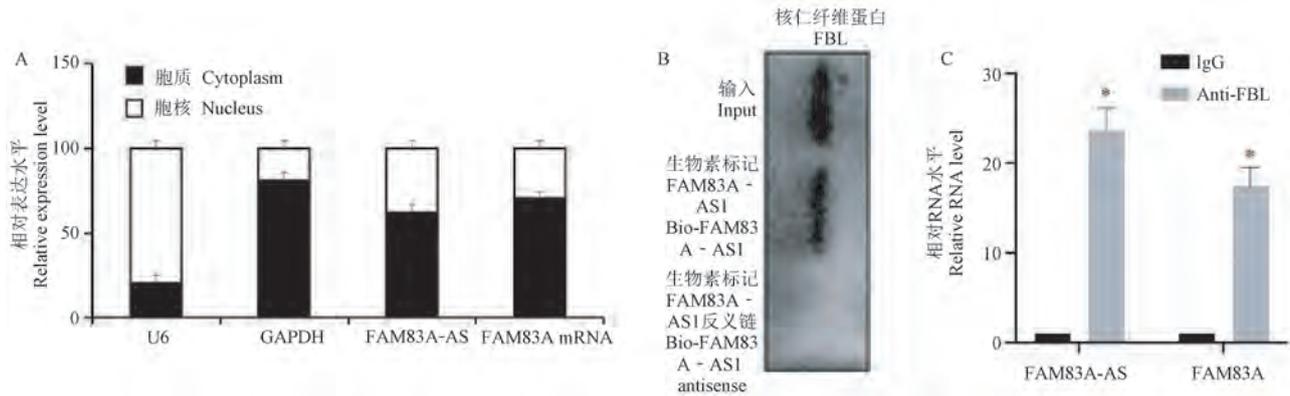


注:A:对照组;B:si-NC组;C:FAM83A-AS1沉默组;D:FAM83A-AS1沉默+pcDNA3.1-NC组;E:FAM83A-AS1沉默+FAM83A过表达组。与对照组相比, $^{\#}P<0.05$ ;与FAM83A-AS1沉默组相比, $^*P<0.05$ 。

图7 各组MDA-MB-231细胞中ERK1/2、Ki-67、E-cadherin、MMP-9蛋白表达( $n=6$ )

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, FAM83A-AS1 silent group. D, FAM83A-AS1 silent+pcDNA3.1-NC group. E, FAM83A-AS1 silent+FAM83A overexpression group. Compared with the control group,  $^{\#}P<0.05$ . Compared with the FAM83A-AS1 silent group,  $^*P<0.05$ .

Figure 7 ERK1/2, Ki-67, E-cadherin, MMP-9 protein expression in MDA-MB-231 cells in each group

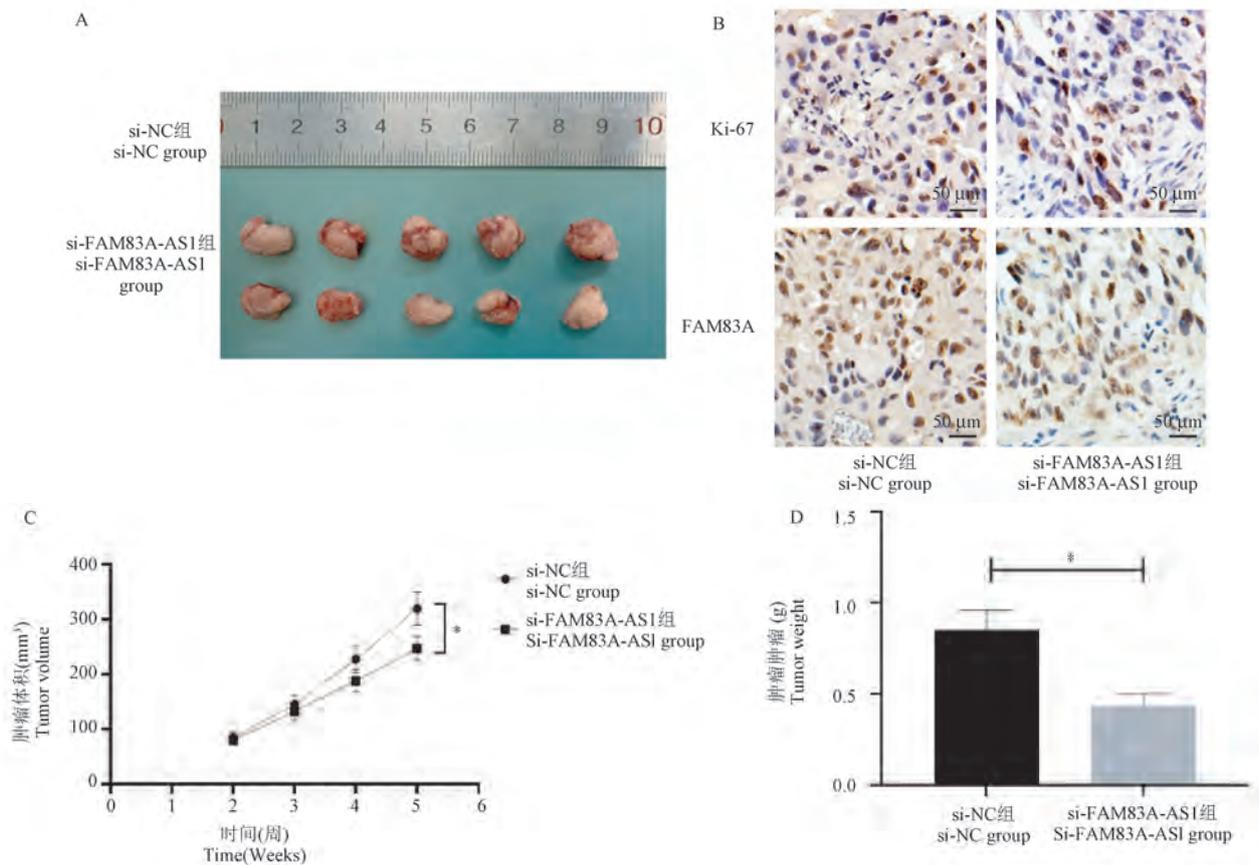


注:A:进行核质分离实验以评估 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A mRNA 在 MDA-MB-231 细胞中的分布,GAPDH 用作细胞质标志物,U6 用作核标志物;B:RNA pull-down 和蛋白质印迹分析用于确定 FAM83A-AS1 和 FBL 之间的结合关系;C:RIP 实验和 qRT-PCR 检测免疫沉淀物中 lncRNA FAM83A-AS1、FAM83A 表达水平。与 IgG 组相比, \*  $P < 0.05$ 。

**图 8** lncRNA FAM83A-AS1 通过与 FBL 结合增强 FAM83A 表达

Note. A, Nucleocytoplasmic separation assay was performed to evaluate the distribution of lncRNA FAM83A-AS1 in MDA-MB-231 cells, GAPDH was used as cytoplasmic marker. U6 was used as nuclear marker. B, RNA pull-down and Western blot analysis used to determine the binding relationship between FAM83A-AS1 and FBL. C, RIP experiment and qRT-PCR detection of lncRNA FAM83A-AS1 and FAM83A expression levels in immunoprecipitates. Compared with IgG group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 8** The lncRNA FAM83A-AS1 enhances FAM83A expression by binding to FBL



注:A:肿瘤大小;B:Ki-67、FAM83A 的 IHC 染色;C:肿瘤体积;D:肿瘤重量。与 si-NC 组相比, \*  $P < 0.05$ 。

**图 9** 沉默 lncRNA FAM83A-AS1 对裸鼠移植瘤生长的影响 ( $n = 5$ )

Note. A, Tumor size. B, IHC staining of Ki-67 and FAM83A. C, Tumor volume. D, Tumor weight. Compared with the si-NC group, \*  $P < 0.05$ .

**Figure 9** Effect of silencing lncRNA FAM83A-AS1 on the growth of transplanted tumor in nude mice

### 3 讨论

尽管 BC 已成为世界上诊断最广泛的癌症之一,但其治疗效果远不令人满意。接受传统治疗后,BC 患者常出现复发或远端转移<sup>[10]</sup>。因此,靶向特定基因以改变癌症进展是 BC 治疗的重要手段。

lncRNA 已被报道可调节 BC 进展。例如,lncRNA ZFPM2-AS1 促进 BC 细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[11]</sup>;lncRNA HAND2-AS1 在 BC 进展中发挥抑制作用<sup>[12]</sup>。在本研究中,笔者发现 lncRNA FAM83A-AS1,一种靶向 FAM83A 的天然反义转录物,在 BC 组织和细胞中被上调;而沉默 lncRNA FAM83A-AS1 抑制了 BC 细胞的增殖、迁移、侵袭和肿瘤生长;表明 lncRNA FAM83A-AS1 在 BC 中发挥了致癌基因的作用。此外,lncRNA FAM83A-AS1 在非小细胞肺癌<sup>[8]</sup>、肝细胞癌<sup>[9]</sup>的进展中也充当癌基因作用,lncRNA FAM83A-AS1 过表达可促进癌细胞增殖和转移,与本研究结果一致。在本研究中,lncRNA FAM83A-AS1 的致癌功能在 BC 中首次被探索。

笔者首先通过 IHC 检测了 FAM83A 在 BC 组织和邻近正常组织中的表达,结果显示,FAM83A 在 BC 组织中的阳性表达明显高于癌旁非肿瘤组织;而蛋白定位显示,其阳性表达在细胞核和细胞质中均有染色,此外,亚细胞分离分析显示,FAM83A mRNA 在细胞质与细胞核中均有分布,对比既往的研究,在其他组织癌细胞(如宫颈癌)的胞质和胞核中也均有表达。因此,笔者推测 FAM83A 在细胞核和细胞质中的差异表达对癌症可能发挥相同或不同的作用,在未来的研究中将对此展开分析。

研究显示,许多蛋白质编码 mRNA 具有天然的反义转录物,这些非编码 RNA 占每个 mRNA 的大部分长度,可以通过与其同源有义 mRNA 相互作用形成双链 RNA 结构来调节有义转录物的稳定性<sup>[7-8]</sup>。天然反义转录物 RNA 与癌症的发生发展密切相关<sup>[13-14]</sup>,例如:lncRNA EPHA2-AS1/2 通过调节 EPHA2 mRNA 水平,有助于三阴性乳腺癌细胞的肿瘤发生<sup>[15]</sup>;lncRNA NKX2-1-AS1 上调癌基因 NKX2-1 并促进肺癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>。lncRNA FAM83A-AS1 起源于 FAM83A 基因的基因间区域,为 FAM83A 的天然反义转录物,与 FAM83A 在相同的 DNA 位置转录,但方向相反<sup>[8]</sup>。天然反义转录物与其同源有义 mRNA 之间有两种调节类型,即不一致或一致<sup>[17]</sup>。为了探索 BC 中 lncRNA FAM38A-

AS1 和 FAM38A 之间的关系,使用了 Pearson 相关系数分析,结果显示 BC 组织中 lncRNA FAM83A-AS1 表达水平与 FAM83A mRNA 水平呈正相关,这与肝细胞癌和肺癌中的研究结果相似。lncRNA FAM83A-AS1 与 FAM83A 前体 mRNA 形成双链结构,并通过增强 lncRNA FAM83A-AS1 前体 mRNA 的稳定性来增加 FAM83A 的表达;相反,lncRNA FAM83A-AS1 的下调降低了 FAM83A 表达<sup>[8]</sup>。本研究采用小分子干扰技术(siRNA)敲低 lncRNA FAM83A-AS1 的表达后,FAM83A 的 mRNA 和蛋白表达均降低,且在敲低 lncRNA FAM83A-AS1 的基础上过表达 FAM83A 后,lncRNA FAM83A-AS1 沉默对 BC 细胞增殖、迁移与侵袭的抑制作用被明显减弱。表明在 BC 中,lncRNA FAM83A-AS1 正调控 FAM83A。

RNA 结合蛋白可以直接与 RNA 结合,并在 mRNA 稳定、剪接、翻译和定位中发挥重要作用。据报道,lncRNA FAM83A-AS1 可通过与 NOP58 结合来增强 FAM83A mRNA 的稳定性,促进肝细胞癌进展<sup>[9]</sup>;且 lncRNA FAM83A-AS1 可通过 RNA 结合蛋白 FBL 增强 FAM83A 的前体 mRNA 稳定性促进非小细胞肺癌进展<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,FBL 可以与 FAM83A-AS1 和 FAM83A 结合以增加 FAM83A 的表达,与以往的研究结果一致。提示,FAM83A-AS1 可能通过 FBL 与 FAM83A 前体 mRNA 结合以增强其表达。

FAM38A 在真核细胞中广泛表达,其表达失调会导致多种组织类型的癌症,例如肺<sup>[7-8]</sup>、乳腺<sup>[3,18]</sup>和胃<sup>[19]</sup>组织;并且已经将 FAM83A 鉴定为能够通过 ERK 通路和 PI3K/AKT/mTOR 途径增强癌细胞增殖和侵袭性的候选癌基因<sup>[20]</sup>。有报道称,FAM38A 通过增加 ERK 的磷酸化来增强癌细胞的增殖和侵袭性<sup>[7-8]</sup>。本研究结果显示,lncRNA FAM83A-AS1 可显著增加 FAM38A 表达水平并诱导 ERK1/2 磷酸化,从而促进 BC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述,lncRNA FAM83A-AS1 可以通过上调 FAM83A 来促进 BC 细胞的增殖、迁移与侵袭。lncRNA FAM83A-AS1 可能作为一种新的致癌基因参与 BC 的发生和进展,是一个有前景的预后和治疗靶点。然而,lncRNA FAM83A-AS1 对 BC 进展的分子调控机制是否涉及其他信号通路或基因,仍需进一步的完善。

#### 参考文献:

- [1] Cali Daylan AE, Leone JP. Targeted therapies for breast cancer

- brain metastases [J]. *Clin Breast Cancer*, 2021, 21(4): 263–270.
- [ 2 ] Jokar N, Velikyan I, Ahmadzadehfar H, et al. Theranostic approach in breast cancer: A treasured tailor for future oncology [J]. *Clin Nucl Med*, 2021, 46(8): 410–420.
- [ 3 ] Lee SY, Meier R, Furuta S, et al. FAM83A confers EGFR-TKI resistance in breast cancer cells and in mice [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3211–3220.
- [ 4 ] 朱秋民, 徐岷. FAM83A 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18(31): 50–53.
- [ 5 ] 刘浪, 王海存, 刘广麟, 等. 肿瘤中 HAGLR 反义长链非编码 RNA 的表达与机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(5): 102–106.
- [ 6 ] Jia J, Li H, Chu J, et al. LncRNA FAM83A-AS1 promotes ESCC progression by regulating miR-214/CDC25B axis [J]. *J Cancer*, 2021, 12(4): 1200–1211.
- [ 7 ] Shi R, Jiao Z, Yu A, et al. Long noncoding antisense RNA FAM83A-AS1 promotes lung cancer cell progression by increasing FAM83A [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10505–10512.
- [ 8 ] Wang W, Zhao Z, Xu C, et al. LncRNA FAM83A-AS1 promotes lung adenocarcinoma progression by enhancing the pre-mRNA stability of FAM83A [J]. *Thorac Cancer*, 2021, 12(10): 1495–1502.
- [ 9 ] He J, Yu J. Long noncoding RNA FAM83A-AS1 facilitates hepatocellular carcinoma progression by binding with NOP58 to enhance the mRNA stability of FAM83A [J]. *BioSci Rep*, 2019, 39(11): BSR20192550–BSR20192558.
- [ 10 ] Saha T, Solomon J, Samson AO, et al. Invasion and metastasis as a central hallmark of breast cancer [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(16): 3498–3509.
- [ 11 ] Zhao YF, Li L, Li HJ, et al. LncRNA ZFPM2-AS1 aggravates the malignant development of breast cancer via upregulating JMJD6 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(21): 11139–11147.
- [ 12 ] Xing L, Tang X, Wu K, et al. LncRNA HAND2-AS1 suppressed the growth of triple negative breast cancer via reducing secretion of MSCs derived exosomal miR-106a-5p [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(1): 424–436.
- [ 13 ] Zhou T, Wu L, Ma N, et al. SOX9-activated FARSAs-AS1 predetermines cell growth, stemness, and metastasis in colorectal cancer through upregulating FARSAs and SOX9 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1071–1085.
- [ 14 ] Liu B, Xiang W, Liu J, et al. The regulatory role of antisense lncRNAs in cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 459–473.
- [ 15 ] Okuyama T, Sakamoto R, Kumagai K, et al. EPHA2 antisense RNA modulates EPHA2 mRNA levels in basal-like/triple-negative breast cancer cells [J]. *Biochimie*, 2020, 179(1): 169–180.
- [ 16 ] Kathuria H, Millien G, McNally L, et al. NKX2-1-AS1 negatively regulates CD274/PD-L1, cell-cell interaction genes, and limits human lung carcinoma cell migration [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14418–14432.
- [ 17 ] Balbin OA, Malik R, Dhanasekaran SM, et al. The landscape of antisense gene expression in human cancers [J]. *Genome Res*, 2015, 25(7): 1068–1079.
- [ 18 ] Cipriano R, Miskimen KL, Bryson BL, et al. Conserved oncogenic behavior of the FAM83 family regulates MAPK signaling in human cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(8): 1156–1165.
- [ 19 ] Cheng Y, Yan Z, Liu Y, et al. Analysis of DNA methylation patterns associated with the gastric cancer genome [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(4): 1021–1026.
- [ 20 ] Grant S. FAM83A and FAM83B: candidate oncogenes and TKI resistance mediators [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3048–3051.

[ 收稿日期 ] 2022-04-08

张娜,刘学芳,冯妍妍,等. 肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内生长及转移特性的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 12-17.

Zhang N, Liu XF, Feng YY, et al. Study on the growth and metastasis characteristics of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 12-17.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.002

## 肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内生长及转移特性的研究

张娜<sup>1</sup>,刘学芳<sup>2</sup>,冯妍妍<sup>3</sup>,郭凤悦<sup>3</sup>,冯素香<sup>2\*</sup>

(1.河南中医药大学医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046;  
3.河南中医药大学药学院,郑州 450046)

**【摘要】** 目的 研究肺转移灶源性 Lewis 肺癌在 C57BL/6 小鼠体内成瘤及转移情况。方法 取发生肺转移的 Lewis 肺癌荷瘤小鼠,解剖并分离肺转移灶制成细胞悬液,右前肢腋窝皮下接种于 C57BL/6 小鼠体内,制备肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型,记为肺癌组。同时设皮下移植瘤传代小鼠,记为皮下组。定期测量各组小鼠肿瘤直径,计算肿瘤体积;绘制生存曲线;解剖观察肺和肝的病变;HE 染色检测肺和肝的病理变化;透射电镜观察肿瘤细胞的超微结构。结果 肺癌组小鼠肿瘤体积小于皮下移植瘤组 ( $P>0.05$ );观察期内肺癌组小鼠存活率较皮下组高;解剖可见肺癌组肺转移率为 37.5%,肝转移率为 25.0%,皮下组肺转移率为 20.0%,无肝转移;HE 染色显示肺癌组肺和肝转移灶体积大,染色深,外观近似圆形,与周围组织分界明显,皮下组肺转移灶体积小,无典型肝转移;透射电镜下可见转移灶内肿瘤细胞出现典型的奇异型核和病理性核分裂象。结论 肺癌源性小鼠较皮下移植瘤小鼠肿瘤生长缓慢,在相同观察期内存活率更高,在小鼠体内表现出更强的远处转移特性。

**【关键词】** Lewis 肺癌;肺转移灶;皮下接种;形态学观察

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0012-06

### Study on the growth and metastasis characteristics of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice

ZHANG Na<sup>1</sup>, LIU Xuefang<sup>2</sup>, FENG Yanyan<sup>3</sup>, GUO Fengyue<sup>3</sup>, FENG Suxiang<sup>2\*</sup>

(1. College of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Academy of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.

3. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**【Abstract】** **Objective** To study the tumorigenesis and metastasis of Lewis lung cancer derived from lung metastases in C57BL/6 mice. **Methods** Lewis lung cancer tumor-bearing mice with lung metastasis were dissected, and lung metastases were isolated to prepare a cell suspension, which was inoculated subcutaneously into the axilla of the right forelimbs of C57BL/6 mice. A mouse model of Lewis lung cancer derived from lung metastases was established and designated as the lung tumor group. Subcutaneously transplanted tumor passaged mice were used as the subcutaneous group. The tumor diameter of mice was measured periodically, the tumor volume was calculated, and a survival curve was

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (82003986)。

**【作者简介】** 张娜 (1982—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤动物模型研究。E-mail: 616621312@qq.com

**【通信作者】** 冯素香 (1971—),女,教授,博士生导师,研究方向:中药新药研究。E-mail: fengsx221@163.com

drawn. Anatomical observation was performed on lung and liver lesions, and HE staining was used to detect pathological changes in the lungs and liver. The ultrastructure of tumor cells was observed by transmission electron microscopy. **Results** The tumor volume of the lung tumor group was less than that of the subcutaneous group ( $P>0.05$ ). The survival rate of the lung tumor group was higher than that of the subcutaneous group during the observation period. Anatomic observation showed the lung and liver metastasis rates to be 37.5% and 25% in the lung tumor group and 20% and no liver metastasis in the subcutaneous group, respectively. In HE staining, lung and liver metastases in the lung tumor group were large, darkly stained, approximately round in appearance, and demarcation from surrounding tissues was obvious. Lung metastases in subcutaneous group were small, and no typical liver metastases were seen. Tumor cells in the metastases showed typical bizarre nuclei and pathological mitosis under transmission electron microscopy. **Conclusions** Compared with subcutaneous tumor mice, lung tumor mice showed slower tumor growth, a higher survival rate within the same observation period, and stronger distant metastatic properties.

**【Keywords】** Lewis lung cancer; lung metastases; subcutaneous transplant; morphologic observation

肺癌目前是中国发病率和死亡率最高的肿瘤性疾病<sup>[1]</sup>,随着中国人口老龄化加剧、污染环境暴露、吸烟等众多癌症危险因素的累加,肺癌发病率与死亡率呈现上升的趋势<sup>[2]</sup>,针对早中期肺癌患者,根治性手术切除是最佳治疗手段,但仍有约 30%~55% 的患者术后出现复发转移,而且发生在对侧肺、淋巴结、肝等器官的远处转移比例高于同侧胸壁、同侧胸膜或同侧肺等局部复发的比例<sup>[3]</sup>,因此研究肺癌远处转移具有重要意义。

Lewis 肺癌 C57BL/6 小鼠模型是肺癌研究的常用模型,以“小鼠 Lewis”和“肺癌”为主题词在中国知网检索,可搜索出 2590 余条文献,以“Lewis lung cancer”为检索词在 Pubmed 网站检索,可搜索出 571 余条文献,该模型广泛应用于肿瘤学<sup>[4]</sup>、免疫学<sup>[5]</sup>、药理学<sup>[6]</sup>、中药学<sup>[7]</sup>等领域。Lewis 细胞最早是从小鼠肺腺癌中分离得到的体外培养株,Lewis 细胞皮下接种 C57BL/6 小鼠体后仍具有高致瘤性<sup>[8]</sup>,随着生存周期的延长,也表现出肺转移性。但关于肺转移发生率,目前没有统一的标准,肺转移灶能否再次皮下成瘤,也无明确的定论。鉴于肺癌易发生远处转移的特点,故建立具有高转移性的 Lewis 肺癌小鼠模型具有重要的研究价值,本研究采集肺转移灶源性的 Lewis 肿瘤细胞皮下接种于 C57BL/6 小鼠,观察皮下成瘤和肺转移情况,结合解剖学和病理学方法对肺转移灶源性的 Lewis 肿瘤的远处转移情况进行评估,以为肺癌抗转移研究提供更加理想的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,5 周龄,体重 18~

19 g,30 只,购自河南省华兴实验动物养殖场[SCXK(豫)2019-0002],饲养于河南中医药大学动物实验中心[SYXK(豫)2020-0004]。饲养环境温度( $20\pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度约 40%,昼夜各半循环照明,饲料、垫料、饮水均为无菌处理,动物实验方案符合 3R 原则,获得河南中医药大学实验动物伦理委员会的批准(DWLL202003222)。

#### 1.1.2 细胞

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(Lewis lung cancer cell line, LLC)购自中国科学院生命科学研究院细胞库,细胞目录号:TCM 7。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(20120705)购自中国四季青公司;DMEM 培养液(AE29005267)购自美国 Hyclone 公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(20200906)购自中国 Solarbio 公司;4%多聚甲醛固定液(21342511)购自中国 Biosharp 公司;2.5%戊二醛固定液(20210911)购自中国 Solarbio 公司;其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

游标卡尺购自中国美奈特公司;CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Thermo 公司;微量移液器购自德国 Eppendorf 公司;超净工作台购自中国苏州苏洁公司;分析天平购自瑞士 Mettler toledo 公司;石蜡包埋机、病理组织切片机、光学显微镜购自德国 Leica 公司;透射电子显微镜购自日本电子公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 首代荷瘤鼠 Lewis 皮下移植瘤模型制备

取体对数生长期的 Lewis 细胞,用 PBS 调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^7$  个,取 10 只 C57BL/6 小鼠,右前肢腋下沿右腋前线斜行刺入皮下,每只注射 0.1 mL 细胞悬液,制备首代 Lewis 皮下移植瘤荷瘤鼠。

### 1.3.2 肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型制备

选取发生典型肺转移的荷瘤鼠,解剖分离双肺,生理盐水清洗至无血污,解剖镜下使用手术刀片精准分离肺转移灶,组织匀浆,生理盐水悬浮,400 目细胞网筛过滤,细胞计数,调整细胞浓度为每毫升  $1 \times 10^7$  个,右腋前线斜行刺入小鼠皮下,每只注射 0.1 mL,共 8 只,制备肺转移灶源性 Lewis 肺癌小鼠模型,简称为肺瘤组。

### 1.3.3 皮下移植瘤 Lewis 肺癌小鼠模型制备

选取皮下移植瘤直径在 1.0~1.4 cm 左右的首代荷瘤鼠,解剖分离皮下移植瘤,生理盐水清洗至无血污,称重、剪碎、匀浆,按 1:3 的比例用生理盐水悬浮,400 目细胞网筛过滤,调整细胞浓度为每毫升  $1 \times 10^7$  个,小鼠接种方法同 1.3.2,共 10 只,制备皮下移植瘤 Lewis 肺癌小鼠模型,简称为皮下组。

### 1.3.4 皮下移植瘤体积计算

使用游标卡尺每周定期测量小鼠腋下肿瘤直径,包括长径(L)和短径(W),根据公式:瘤体积 =  $(L \times W^2 / 2)$ ,计算瘤体积。

### 1.3.5 生存曲线的绘制

记录各组小鼠发生死亡的时间点,观察周期至接种后 35 d,绘制生存曲线。

### 1.3.6 解剖学与病理学观察

将自然死亡的小鼠解剖观察肺和肝的病变,将生存期大于 35 d 的小鼠脱颈椎处死,快速分离双肺和肝,生理盐水冲洗血污,观察并记录双肺和肝转移灶的形成情况,后用 4% 多聚甲醛中固定,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、HE 染色及封片等常规步骤处理,显微镜下观察肺和肝的病理学变化。同时取 2 只正常小鼠,作为空白组。

### 1.3.7 透射电镜标本处理及观察

肺瘤组选取出现典型肺转移的小鼠,快速分离双肺,生理盐水冲洗血污,解剖镜下使用手术刀片精准分离肺转移灶,修成体积约为  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  的组织块,快速置于 2.5% 戊二醛固定液中,固定时间 4 h 以上,经 1% 锇酸后固定,梯度乙醇脱水,渗透、环氧树脂 812 包埋等步骤处理后,进行超薄切片,使用饱和醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后,透射电镜观察拍照。

## 1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 5 软件统计处理,计量数据用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间数值比较采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$

差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肿瘤体积比较

肺瘤组和皮下组小鼠在接种后 7 d,接种部位均可触及体积较小的肿瘤包块,成瘤率 100%,接种后 14~21 d,两组皮下肿瘤生长迅速;28 d 时肺瘤组肿瘤体积( $4.62 \pm 2.00$ )  $\text{cm}^3$ ,皮下组( $5.45 \pm 2.46$ )  $\text{cm}^3$ ,组间差异不显著( $P > 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 生存周期比较

肺瘤组和皮下组小鼠的生存曲线如图 2 所示,结果显示,截至接种后 35 d,肺瘤组死亡 3 只,存活率 62.5%;皮下组死亡 7 只,存活率 30.0%。

### 2.3 肺转移形态学观察

解剖学观察显示,肺瘤组小鼠出现 3 例肺转移,转移率 37.5%,小鼠肺表面可见多个直径约 2~4 mm 的圆形半透明转移灶,周围有出血,与周围组织界限清晰;皮下组出现 2 例肺转移,转移率 20.0%,皮下组肺转移灶小,呈点状;空白组小鼠肺结构纹理正常,呈现粉红色外观。病理学结果显示肺瘤组小鼠肺内可见典型转移灶,转移灶体积大,外观近

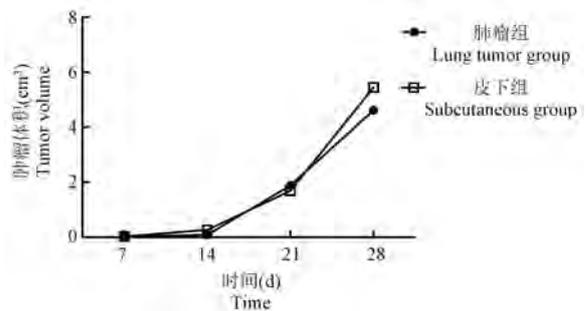


图 1 小鼠肿瘤生长曲线图

Figure 1 Tumor growth curve in mice

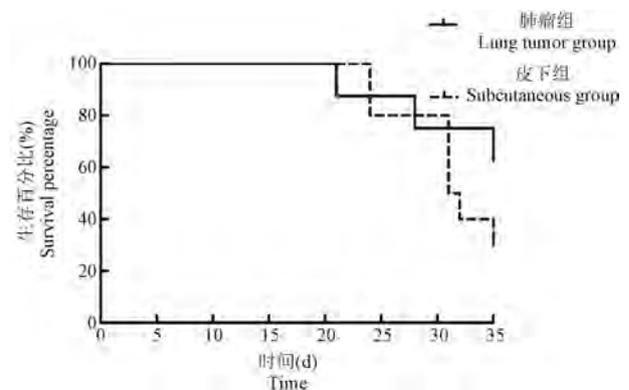


图 2 小鼠生存曲线图

Figure 2 Survival curve in mice

似圆形,边缘多有突起,向周围肺结构延伸,转移灶呈深蓝色着染,内部肿瘤细胞排列紧密;皮下组小鼠肺转移灶体积小,多分布于小气道周边;空白组小鼠肺组织结构清晰,形态正常(图 3)。

### 2.4 肝转移形态学观察

解剖学观察显示肺癌组小鼠出现 2 例肝转移,转移率 25.0%,小鼠肝表面出现多个直径约 2 mm 的圆形白色转移灶,与周围组织界限清晰;皮下组无肝转移,皮下组与空白组小鼠肝外观无明显差异。病理学结果显示肺癌组小鼠肝内可见转移灶,

转移灶外观近似圆形,染色深,与周围肝组织界限清楚;皮下组与空白组小鼠肝组织结构正常(图 4)。

### 2.5 肺转移灶超微结构观察

肺转移灶超微形态显示,其内部肿瘤细胞具有显著的异型性,细胞核体积大、核质比高,核多形性明显,可观察到奇异型核(图 5A),核内染色质呈粗颗粒状,分布不均匀,同时可观察到病理性核分裂象,肿瘤细胞核呈不对称分裂(图 5B),肿瘤细胞胞质内线粒体数量多,同时可见粗面内质网和糖原颗粒。

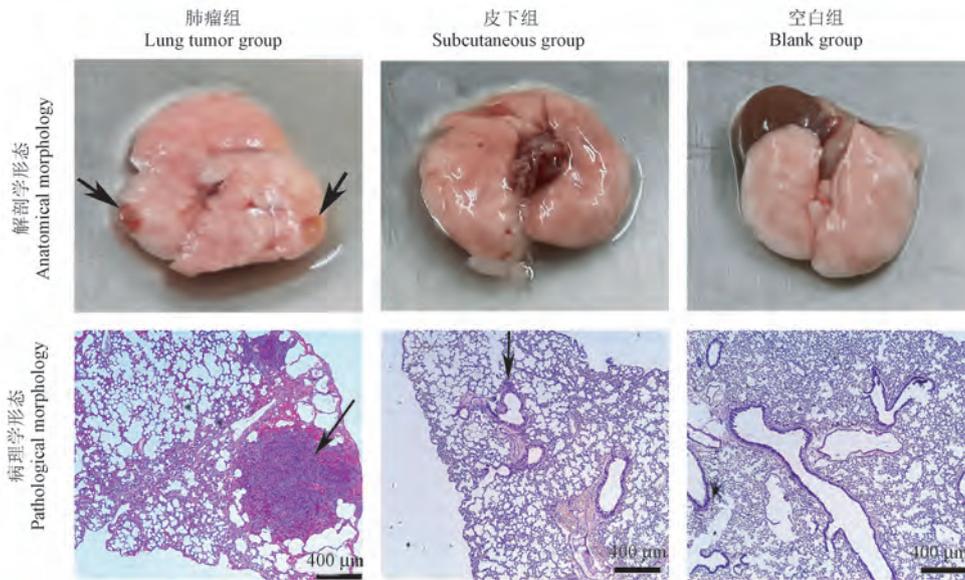


图 3 小鼠肺解剖学与病理学观察

Figure 3 Anatomical and pathological observation of lung in mice

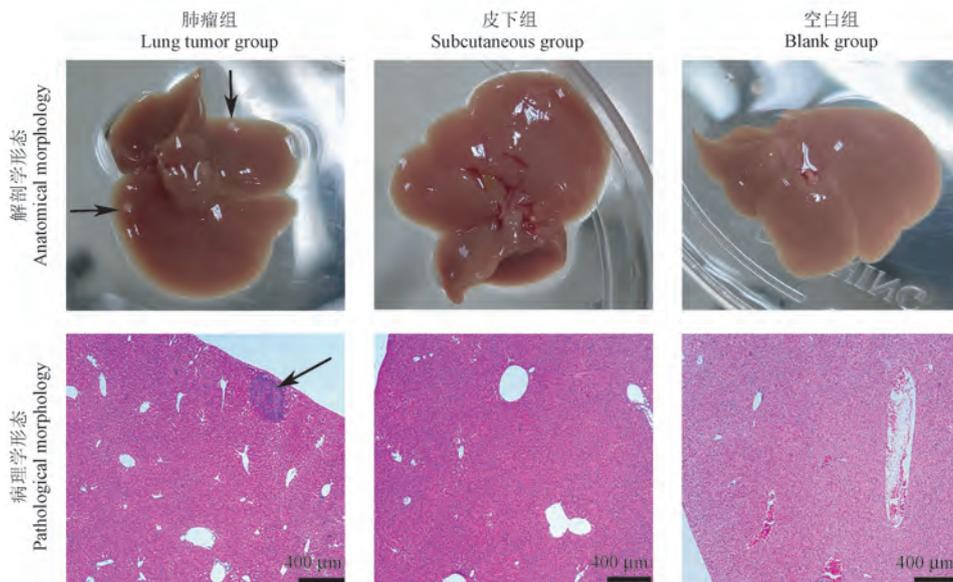
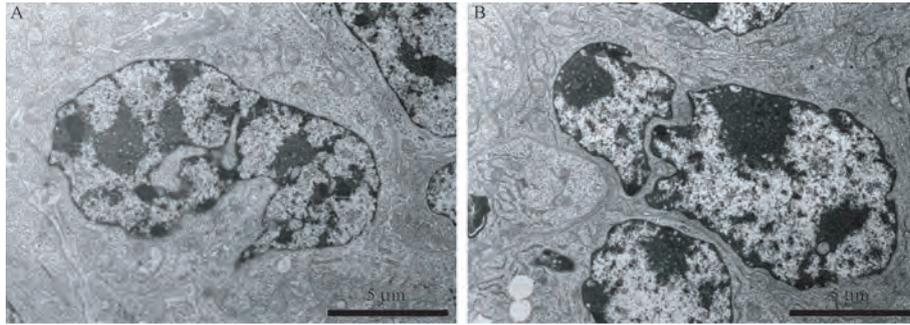


图 4 小鼠肝解剖学与病理学观察

Figure 4 Anatomical and pathological observation of liver in mice



注:A:肿瘤细胞内可见奇异型细胞核;B:肿瘤细胞核呈不对称分裂。

图5 小鼠肿瘤细胞透射电镜观察

Note. A, Bizarre nuclei can be seen in tumor cell. B, The nuclei of tumor cell divide asymmetrically.

Figure 5 Transmission electron microscope observation of cancer cells in mice

### 3 讨论

皮下注射、胸腔原位种植、左心室注射、颈内动脉注射、尾动脉注射都是建立肺癌小鼠模型的常用方法<sup>[9]</sup>。其中皮下注射法操作最为简单、方便观察成瘤情况,但皮下移植瘤生长速度较快,易在皮下形成纤维性包膜,虽然可自然发生肺转移,但转移率低,时间长。大部分荷瘤小鼠由于荷瘤体积过大,还未发生转移而死亡<sup>[10]</sup>。胸腔原位种植是将肿瘤细胞经胸腔注射的方法进行原位建模,该方法能够模拟肿瘤的形成和发展过程,但是小鼠易出现气胸、血胸及胸腔广泛种植等不良反应,平均4~6周出现恶液质,转移发生在胸腔,如肋骨、胸膜,无肝、脑、肾转移<sup>[11]</sup>。左心室注射和颈内动脉注射都可以很好的模拟肿瘤细胞经血道转移的过程,该模型用于制备肺癌脑转移模型,该小鼠模型3周开始体重下降,开始出现恶液质,病理检测显示脑转移灶明显,而无肺转移灶<sup>[12]</sup>。尾动脉注射是将肺癌细胞经尾动脉注射进入小鼠体内,注射后30 min即可在后肢骨髓中检测到荧光,7 d后肺癌骨转移病灶数目的增加,小鼠生存超过32 d,该方法多用于制备肺癌骨转移模型<sup>[13]</sup>。研究报道显示,皮下注射仍是Lewis肺癌小鼠模型最常用的接种方法<sup>[14]</sup>,肺转移率是一个重要的检测指标<sup>[4]</sup>。因此建立一种操作方便、成瘤率高、肺转移明显、给药窗口期长并且便于观察的Lewis肺癌小鼠模型是非常必要的。

姚明等<sup>[10]</sup>使用NOD/SCID小鼠,通过“肺转移灶-皮下移植-肺转移灶-皮下移植”的方式进行鼠间反复筛选,建立了一个人肺癌细胞株SPC-A-1皮下移植瘤高转移模型,随着筛选次数的增加,发生肺转移的动物数也随之增加,而且成瘤的时间相应

缩短。鉴于以上思路,本实验以C57BL/6小鼠Lewis肺癌模型为研究对象,采用肺转移灶再次皮下接种的方法验证皮下成瘤的可行性,并与传统的皮下移植瘤模型进行对比。鉴于NOD/SCID小鼠是T、B、NK细胞联合免疫功能缺陷小鼠<sup>[15]</sup>,肺转移灶皮下移植成功概率高,而C57BL/6小鼠是免疫功能正常的小鼠,肺转移灶肿瘤细胞能否再次皮下成瘤,目前并无相关报道。本实验结果显示肺癌组小鼠皮下移植瘤生长速度较常规传代的皮下组慢,但小鼠存活率较皮下组高;解剖学观察显示肺癌组肺转移率为37.5%,肝转移率为25%;皮下组小鼠肺转移率为20%,无肝转移。

肺转移灶肿瘤细胞是从皮下移植瘤原发位点脱落下来的肿瘤细胞,经血道或者淋巴道转移至肺,在此过程中形成外周血中循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)<sup>[16]</sup>,Fitzgerald等<sup>[17]</sup>使用了一种名为“弥散体内流式细胞术”(Diffusion *in vivo* flow cytometry, DiFC)的新技术来动态检测小鼠皮下注射Lewis肺癌模型中CTC的数量,结果显示只有其中3/11(27.27%)的小鼠表现出“高脱落”(high shedding),CTC数量随时间和皮下瘤体积增加而增加,但对于大多数小鼠8/11(72.73%)而言,CTC数量并未表现出随时间和肿瘤体积的增加而增加,并且CTC数量与肿瘤体积的相关性较差。这与本实验结果基本吻合,皮下组小鼠肺转移率为20%,而肺癌组的肺转移率(37.5%)略高于文献中的肺转移率(27.27%),肺转移灶内的肿瘤细胞再次接种到皮下表现出较强的转移性。Alino等<sup>[18]</sup>将Lewis肿瘤细胞注射到C57BL/6小鼠尾静脉或脾内,分别产生实验性肝和肺转移,本实验采用皮下注射的方法也可以形成肝转移,肺癌组的肝转移率

为 25%, 肺转移灶内的肿瘤细胞表现出向多器官转移的特性。

综上所述, 肺转移灶源性的肿瘤细胞再次皮下接种于 C57BL/6 小鼠腋下, 小鼠可 100% 成瘤, 在相同时间内, 肺癌组小鼠的存活率较皮下组高, 肺癌组表现出更高的向远器官的转移的特点, 综上所述, 使用“肺转移灶-皮下移植-肺转移灶-皮下移植”的方案在 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型是可行的, 后续继续传代观察, 以期获得一株可以实现皮下接种操作并且具有较高远处器官转移率的 Lewis 肺癌细胞瘤株。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 赫捷, 李霓, 陈万青, 等. 中国肺癌筛查与早诊早治指南 [J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(3): 243-268.
- [ 2 ] 陈宏达, 郑荣寿, 王乐, 等. 2019 年中国肿瘤流行病学研究进展 [J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(4): 373-379.
- [ 3 ] 刘显平, 李晓, 杨帆. 非小细胞肺癌根治性切除术后复发转移模式研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(1): 26-33.
- [ 4 ] Chumak AV, Fedosova NI, Cheremshenko NL, et al. Macrophage polarization in dynamics of Lewis lung carcinoma growth and metastasis [J]. *Exp Oncol*, 2021, 43(1): 15-20.
- [ 5 ] Orlandi P, Banchi M, Ali G, et al. Active metronomic vinorelbine schedules decrease plasma interleukin-2 levels in mice with Lewis lung carcinoma [J]. *J Chemother*, 2021, 33(3): 198-202.
- [ 6 ] Xiao X, Li Y, Wang Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits Lewis lung carcinoma progression by inducing macrophages M1 polarization via AKT/mTOR pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 103: 108427.
- [ 7 ] Zhang Z, Wang J, Duan H, et al. Traditional chinese medicine xihuang wan inhibited Lewis lung carcinoma in a syngeneic model, equivalent to cytotoxic chemotherapy, by altering multiple signaling pathways [J]. *In Vivo*, 2021, 35(4): 2005-2014.
- [ 8 ] Bertram JS, Janik P. Establishment of a cloned line of Lewis lung carcinoma cells adapted to cell culture [J]. *Cancer Lett*, 1980, 11(1): 63-73.
- [ 9 ] 张娜, 田燕歌, 刘学芳, 等. 小鼠移植性肺癌转移模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 557-562.
- [ 10 ] 姚明, 闫明霞, 刘蕾, 等. 人肺癌高转移动物模型的筛选及其细胞系的建立 [J]. *肿瘤*, 2007, 27(11): 866-869.
- [ 11 ] 陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 等. 胸腔原位种植与经左心室注射建立肺癌脑转移动物模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 490-494.
- [ 12 ] 陈愉生, 涂洵崑, 俞梅娥, 等. 裸鼠肺癌脑转移模型中血脑屏障超微结构的观察 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(5): 494-498.
- [ 13 ] Kuchimaru T, Kataoka N, Nakagawa K, et al. A reliable murine model of bone metastasis by injecting cancer cells through caudal arteries [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2981.
- [ 14 ] Gao Q, Jiang Y, Li X, et al. Intratumoral injection of anlotinib hydrogel combined with radiotherapy reduces hypoxia in Lewis lung carcinoma xenografts; assessment by micro fluorine-18-fluoromisonidazole positron emission tomography/computed tomography hypoxia imaging [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 628895.
- [ 15 ] Miao M, Masengere H, Yu G, et al. Reevaluation of NOD/SCID mice as NK cell-deficient models [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8851986.
- [ 16 ] Chong Y, Jung YC, Hwang E, et al. Circulating tumor cell detection in lung cancer animal model [J]. *J Chest Surg*, 2021, 54(6): 460-465.
- [ 17 ] Fitzgerald JE, Byrd BK, Patil RA, et al. Heterogeneity of circulating tumor cell dissemination and lung metastases in a subcutaneous Lewis lung carcinoma model [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(7): 3633-3647.
- [ 18 ] Alino SF, Rodeno E, Simon J, et al. Morpho-functional study of vascular fluorochrome delivery to lung and liver metastases of Lewis lung carcinoma (3LL) [J]. *Tumori*, 1991, 77(3): 206-211.

[ 收稿日期 ] 2022-04-08

沈宝玉,任雁明,杨根梦,等.大麻二酚减轻甲基苯丙胺诱导的大鼠单胺类神经递质改变[J].中国比较医学杂志,2022,32(11):18-25.

Shen BY, Ren YM, Yang GM, et al. Cannabidiol attenuates methamphetamine-induced changes in monoamine neurotransmitters in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 18-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.003

## 大麻二酚减轻甲基苯丙胺诱导的大鼠单胺类神经递质改变

沈宝玉,任雁明,杨根梦,于浩,董文娟,洪仕君\*,张瑞林\*

(昆明医科大学法医学院,国家卫生健康委员会毒品依赖和戒治重点实验室,昆明 650500)

**【摘要】** 目的 探索大麻二酚(cannabidiol, CBD)在甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)依赖大鼠中对中枢神经系统单胺类神经递质的影响,阐释CBD对METH依赖的治疗机制,为毒品依赖戒治药物的研发提供参考。**方法** 通过METH(2 mg/kg)重复腹腔注射和条件位置偏爱(conditioned place preference, CPP)建立METH依赖大鼠模型;提取大鼠伏隔核(nucleus accumbens, NAc)、额叶皮质(frontal cortex, FC)、中脑腹侧被盖(ventral tegmental area, VTA)、纹状体(caudate putamen, CPu)和海马(hippocampus, Hip)等五个奖赏系统相关脑区,高效液相色谱法分离多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)三种单胺类神经递质;质谱分析定量三种单胺类神经递质水平。**结果** METH(2 mg/kg)重复给药可在大鼠NAc、FC、VTA、CPu和Hip中显著上调DA水平和下调5-HT水平,并伴随着NAc和VTA中NE水平上调;而CBD(10、20、40、80 mg/kg)前干预可剂量依赖性地削弱METH对上述单胺类神经递质的影响。**结论** CBD可能通过维持大鼠奖赏脑区中单胺类神经递质的稳态水平,削弱METH依赖导致的奖赏效应。

**【关键词】** 大麻二酚;甲基苯丙胺;毒品依赖;神经精神障碍;单胺类神经递质

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)11-0018-08

## Cannabidiol attenuates methamphetamine-induced changes in monoamine neurotransmitters in rats

SHEN Baoyu, REN Yanming, YANG Genmeng, YU Hao, DONG Wenjuan, HONG Shijun\*, ZHANG Ruilin\*  
(School of Forensic Medicine, Key Laboratory of Drug Addiction Medicine of National Health Commission (NHC), Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**【Abstract】 Objective** This work was aimed at investigating the intervention effects of cannabidiol (CBD) on the monoamine neurotransmitter in a rat model of methamphetamine (METH) dependence, and we revealed the potential mechanism underlying the therapeutic effects of CBD. Our research will benefit the treatment of drug dependence in humans. **Methods** We constructed an animal model based on METH (2 mg/kg) exposure and the conditioned place preference procedure. We dissected the nucleus accumbens (NAc), frontal cortex(FC), ventral tegmental area (VTA), caudate putamen(CPu), and hippocampus(Hip). The dopamine, 5-hydroxytryptamine, and norepinephrine contents were separated using high-performance liquid chromatography and quantified with mass spectrometry. **Results** Repeated METH (2 mg/kg) exposure significantly increased dopamine content and decreased 5-hydroxytryptamine content in the NAc,

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81760337, 82002002);云南省教育厅科学研究基金项目(2019Y0343)。

**【作者简介】** 沈宝玉(1995—),男,博士研究生,研究方向:毒品依赖机制与戒断干预。E-mail: baoyu19950629@163.com

**【通信作者】** 洪仕君(1974—),男,教授,博士生导师,研究方向:毒品依赖机制与戒断干预。E-mail: kmhongshijun@126.com

张瑞林(1986—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:有毒物质快速筛查与检测。E-mail: zrlorg@126.com

\* 共同通信作者

frontal cortex, VTA, caudate putamen, and hippocampus but increased norepinephrine content in the NAc and VTA of rats. Pretreatment of rats with CBD (10, 20, 40, 80 mg/kg) dose-dependently reduced the impact of METH on these monoamine neurotransmitters. **Conclusions** CBD may attenuate the reward effect of METH by maintaining the homeostasis of monoamine neurotransmitters in the reward-related brain regions of rats.

**【 Keywords 】** cannabidiol; methamphetamine; drug dependence; neuropsychiatric disorder; monoamine neurotransmitter

甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)依赖是一种苯丙胺相关障碍<sup>[1]</sup>,具有毒品依赖的普遍特性,即复发性和强迫性,涉及了多种神经回路和递质系统<sup>[2]</sup>。其中,包括多巴胺(dopamine, DA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine/serotonin, 5-HT)和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的单胺类神经递质(monoamine neurotransmitters)在毒品依赖中扮演重要角色<sup>[3]</sup>。DA信号的长期激活在毒品依赖形成和强化中起主要作用<sup>[4]</sup>,而DA能神经元的信号传递受到NE能神经元的正向调控<sup>[5]</sup>和5-HT神经元的负向调控<sup>[6]</sup>,它们共同构成了毒品依赖的神经网络结构。因此,系统地研究单胺类神经递质有助于阐明METH依赖机制。

大麻二酚(cannabidiol, CBD)是植物大麻中主要的非精神活性大麻素,不具备滥用药物特性<sup>[7]</sup>,且在神经精神障碍疾病治疗方面具有可观的潜力<sup>[8]</sup>。目前的证据表明,CBD可削弱METH的奖赏特性<sup>[9]</sup>、METH诱导的神经毒性<sup>[10]</sup>和神经炎症<sup>[11]</sup>。然而,CBD治疗METH依赖的分子机制尚不清楚,进一步研究CBD治疗METH依赖的分子机制是必需且迫切的。此外,CBD在许多神经精神障碍疾病中对单胺类神经递质起到有益的调节作用<sup>[12]</sup>。因此,全面研究CBD在METH依赖中对中枢神经系统单胺类神经递质的影响是研究CBD治疗机制的关键。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

70只SPF级雄性SD大鼠(180~220g,5~7周龄),购于昆明医科大学实验动物中心[SCXK(滇)K2020-0004]。动物饲养条件为:12h/12h的光/暗交替、湿度(50%±10%)、温度(22±1)℃,可自由获得食物和饮水,饲养环境为清洁环境,饲养于昆明医科大学[SYXK(滇)K2020-0006]。所有动物程序均按照美国国立卫生研究院(NIH)实验动物护理和使用指南进行,严格遵循实验动物使用的3R原则,并经昆明医科大学动物护理和使用委员会批准(kmmu2020249)。

### 1.2 主要试剂与仪器

盐酸甲基苯丙胺(#171212-200603,中国食品药品监督管理局,中国北京);CBD(#13956-29-1,河北范章堂商贸有限公司,中国河北);5%二甲苯亚砷(#D2650, Sigma-Aldrich, 美国密苏里州);5% Tween-80(#T8360,北京索莱宝科技有限公司,中国北京);氯化钠(#A501218-0001,上海生工股份有限公司,中国上海);甲醇(#34860, Sigma-Aldrich, 美国密苏里州);甲酸(#F0507, Sigma-Aldrich, 美国密苏里州);L-半胱氨酸(#C0012,北京索莱宝科技有限公司,中国北京);乙腈(#34851, Sigma-Aldrich, 美国密苏里州)等。动物建模使用CPP检测装置(#XR-XT401,上海欣软信息科技有限公司,中国上海),单胺类神经递质检测使用三重四极杆液质联用仪(#LCMS-8040, Shimadzu, 日本京都);色谱柱(#227-32021-03, Shimadzu, 日本京都)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型建立

样本来源于我们之前建立的动物模型<sup>[13]</sup>,采用条件位置偏爱(conditioned place preference, CPP)检测装置建立METH诱导CPP动物模型,行为学数据参见文献<sup>[13]</sup>。CPP装置由等大的黑色或白色箱体和中间较小的缓冲箱体构成,通过监控设备可追踪大鼠的停留时间和运动轨迹,主要分为CPP前检测和CPP后检测。CPP前检测主要通过监测大鼠在黑白箱体的停留时间,确定大鼠对黑白箱体的天然偏爱箱,对侧则为METH伴药箱;大鼠在天然偏爱箱中接受生理盐水给药、在伴药箱中接受METH给药,通过重复给药形成奖赏记忆;给药程序完成后,通过CPP后检测再次监测大鼠在黑白箱体的停留时间,结合CPP前检测数据进行统计分析。具体实验流程如下:实验开始前,大鼠适应CPP装置3d,在第4天测量大鼠对两个实验箱的偏好,将偏好较高的实验箱指定为天然偏爱箱,并将偏好较低实验箱指定为伴药箱;大鼠在天然偏爱箱中接受生理盐水腹腔注射,在伴药箱中接受METH(2mg/kg)腹腔注射。对于CBD干预组而言,METH给药前1h腹腔注射CBD,剂量分别为10、20、40或80mg/

kg。在第 5、7、9、11 和 13 天,大鼠接受 METH 注射,并限制于伴药箱中 30 min;在第 6、8、10、12 和 14 天,大鼠接受生理盐水注射,并限制于天然偏爱箱中 30 min。最后,在第 15 天再次测量大鼠对两个试验箱的偏好;第 16 天取材,取出大脑,在冰上解剖出伏隔核(nucleus accumbens, NAc)、额叶皮质(frontal cortex, FC)、中脑腹侧被盖(ventral tegmental area, VTA)、纹状体(caudate putamen, CPu)和海马(hippocampus, Hip),并立即置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

### 1.3.2 样本预处理

样品预处理参照其他实验室的研究进行<sup>[14]</sup>。将大鼠 FC (30 mg)、NAc (25 mg)、CPu (50 mg)、VTA (30 mg) 和 Hip (30 mg) 样品置于含 0.1% 甲酸和 0.1 g/L L-半胱氨酸的冰甲醇中超声破碎,并震荡 30 s。然后在  $4^{\circ}\text{C}$  下以 15000 r/min 离心 15 min。将上清液转移至蒸发器皿中,于氮气流下挥干,并溶解于 1 mL 含 0.1% 甲酸和 0.1 g/L L-半胱氨酸的蒸馏水中,最后经液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)系统分析。

### 1.3.3 色谱及质谱条件

使用三重四极杆液质联用仪对样本中单胺类神经递质进行检测,分析物在色谱柱中进行分离,并在质谱仪中进行检测。进样体积为 10  $\mu\text{L}$ ,流动相由溶剂 A (含 0.1% 甲酸的蒸馏水) 和溶剂 B (含 0.1% 甲酸的乙腈) 组成,并使用以下程序进行梯度洗脱:0~1 min, 5% 溶剂 B; 1~4 min, 50% 溶剂 B; 4~6 min, 5% 溶剂 B, 流速为 0.2 mL/min。质谱条件如下:雾化器流速 2.7 L/min, 干燥气体流速 15 L/min, 加热块温度  $400^{\circ}\text{C}$ , 毛细管温度  $250^{\circ}\text{C}$ , 碰撞诱导解离(CID)气压 230 kPa。三种单胺类神经递质分析参数如表 1 所示。

## 1.4 统计学方法

统计分析均采用 SPSS V26.0 统计软件进行,数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多个组的均值比较采用两因素方差分析(two-way analysis of variance, two-way ANOVA),自变量设计为“CBD 给药”和“METH 给药”,多重比较采用 Tukey HSD,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证

样品预处理中,选用含 0.1% 甲酸的冰甲醇进行简单的蛋白质沉淀,不仅操作简单,而且检测稳定。因为单胺类神经递质易氧化,在样本预处理和进样过程中均添加了 0.1 g/L 的 L-半胱氨酸作为抗氧化剂;由于 L-半胱氨酸的离子对与三种单胺类神经递质的检测离子对没有重合,故不会影响质谱仪对三种单胺类神经递质的检测。甲酸、乙腈组成的流动相和 Shim-pack Scepter PFPP 色谱柱为极性化合物提供了良好的分离条件。DA 标准品(图 1A)、FC 分析物(图 1B)、NAc 分析物(图 1C)、CPu 分析物(图 1D)、VTA 分析物(图 1E)及 Hip 分析物(图 1F)的保留时间均为 1.7 min;如图 2 所示,NE 标准品(图 2A)、FC 分析物(图 2B)、NAc 分析物(图 2C)、CPu 分析物(图 2D)、VTA 分析物(图 2E)及 Hip 分析物(图 2F)的保留时间均为 1.3 min;如图 3 所示,5-HT 标准品(图 3A)、FC 分析物(图 3B)、NAc 分析物(图 3C)、CPu 分析物(图 3D)、VTA 分析物(图 3E)及 Hip 分析物(图 3F)的保留时间均为 2.9 min。利用该分析条件可以成功地检测出大鼠几个脑区中的三种单胺类神经递质。对于三种单胺类神经递质的质谱分析而言,所有标准品的检测结果和实际浓度在 0~500 ng/mL 的浓度范围内均表现出良好的线性关系,所有分析物的相关系数( $r$ )均在 0.999 以上。表 2 总结了标准曲线的相关参数。

表 1 单胺类神经递质质谱分析参数

Table 1 Parameters of monoamine neurotransmitters for MS condition

分析物 Analyte	离子对 1 Q1 m/z	离子对 2 Q2 m/z	碰撞能量 Collision energy
多巴胺 Dopamine	154.10	91.10	25
去甲肾上腺素 Norepinephrine	170.15	107.10	25
5-羟色胺 5-hydroxytryptamine	177.15	160.20	25

表 2 不同单胺类神经递质的线性数据及定量范围

Table 2 Linearity data and quantitation ranges of different monoamine neurotransmitters

分析物 Analyte	线性回归方程 Linear regression equation	线性范围(ng/mL) Linear range	相关系数 Correlation coefficient
多巴胺 Dopamine	$y = 3958.69x - 2178.19$	0~500	0.9999929
去甲肾上腺素 Norepinephrine	$y = 1248.12x + 3389.69$	0~500	0.9998453
5-羟色胺 5-hydroxytryptamine	$y = 2206.92x + 8864.27$	0~500	0.9993994

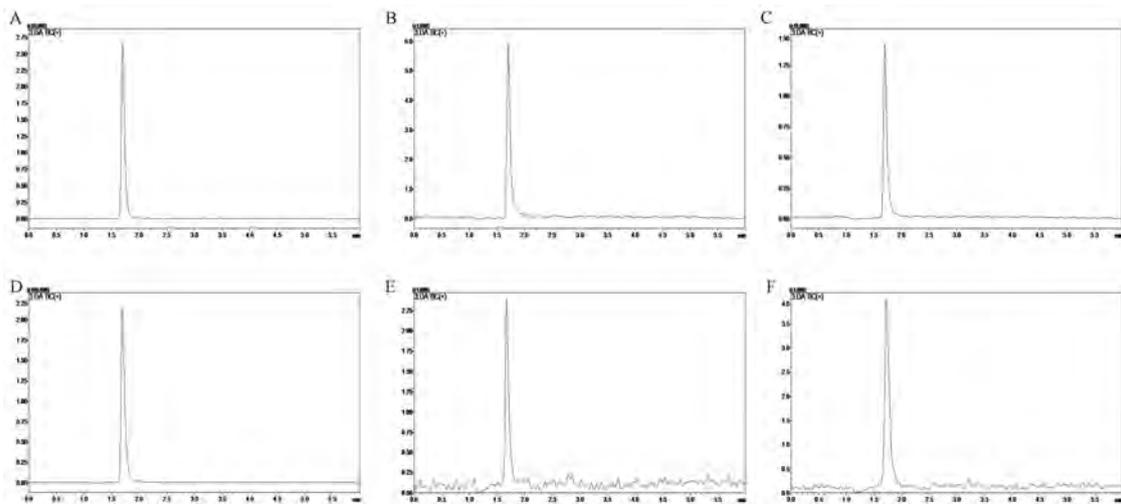


图 1 DA 标准品和检测物的色谱图

Figure 1 Chromatogram of DA standard and analytes

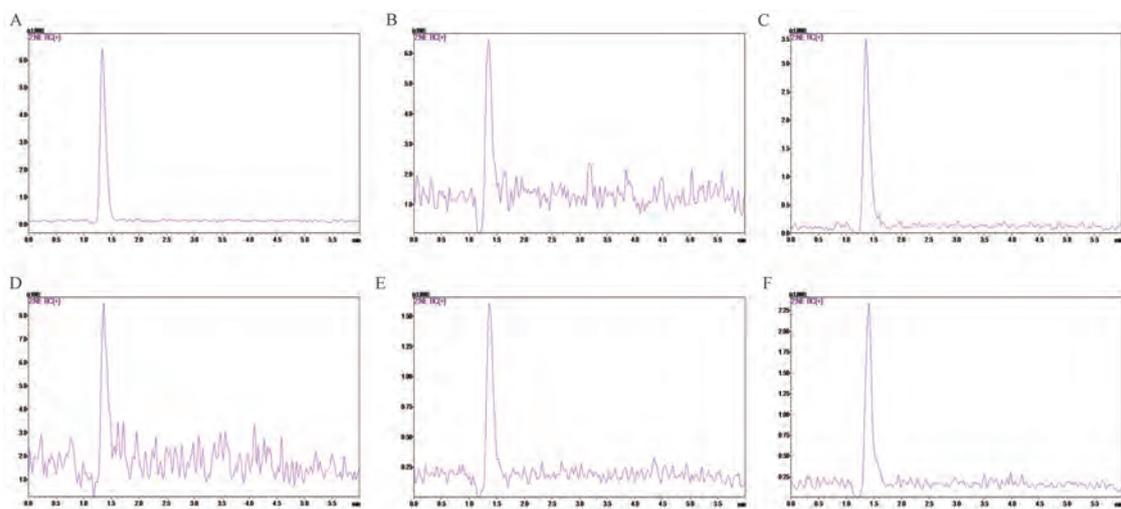


图 2 NE 标准品和检测物的色谱图

Figure 2 Chromatogram of NE standard and analytes

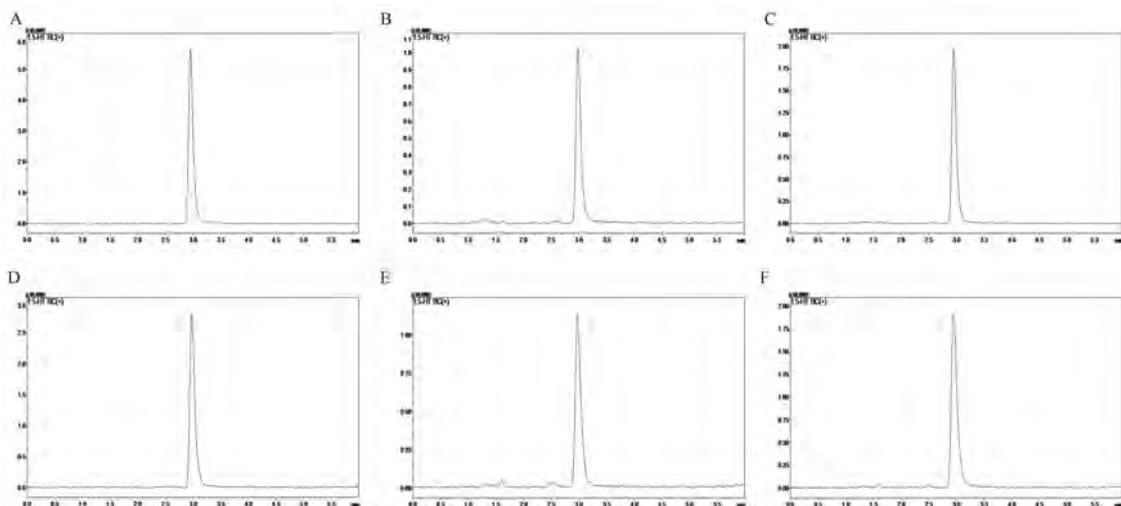


图 3 5-HT 标准品和检测物的色谱图

Figure 3 Chromatogram of 5-HT standard and analytes

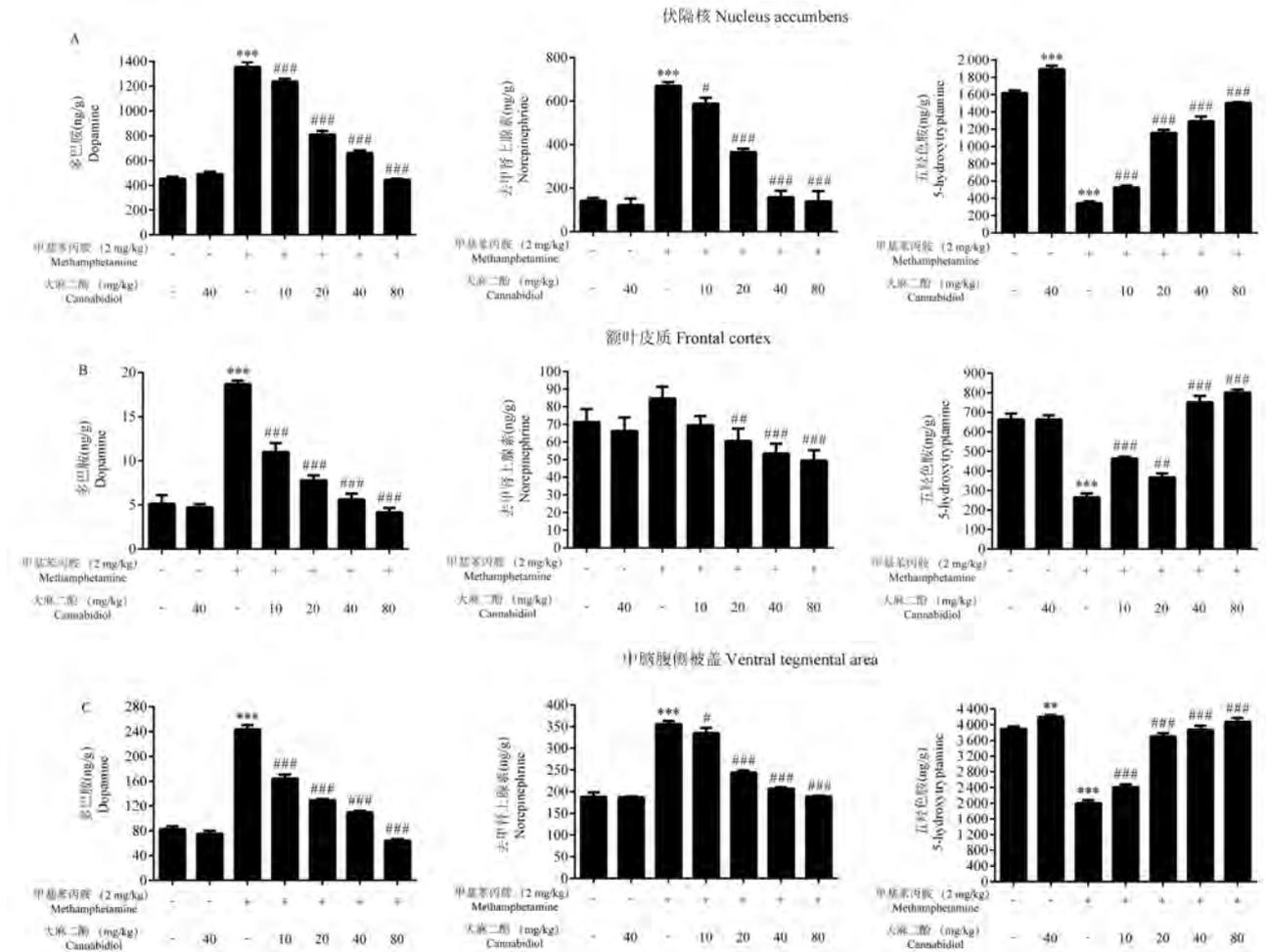
## 2.2 CBD 在大鼠 NAc、FC 和 VTA 中减轻三种单胺类神经递质的改变

由于 VTA 投射到 NAc 和 FC 中的 DA 信号分别在毒品依赖形成和强化中发挥重要作用<sup>[2]</sup>, 我们首先研究了 CBD 和/或 METH 在这些区域中对三种单胺类神经递质的影响(图 4)。与对照组相比, METH(2 mg/kg) 在 NAc、FC 和 VTA 中均显著诱导了 DA 上调( $P<0.001$ ); 而 CBD(10、20、40 和 80 mg/kg) 在 NAc、FC 和 VTA 中剂量依赖性地减弱了 DA 的高水平( $P<0.001$ ); CBD(40 mg/kg) 单独作用对 DA 水平没有明显影响( $P>0.05$ )。此外, 伴随着 DA 在 METH 组中的上调, NE 水平也在 NAc( $P<0.001$ ) 和 VTA( $P<0.001$ ) 中表现出不同程度的上调趋势; 而 METH(2 mg/kg) 在 FC 中对 NE 没有统计学意义的上调作用( $P>0.05$ ); CBD(10、20、40 和 80 mg/kg) 前干预也呈剂量依赖性地削弱了 NE 的

上调( $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ ); CBD(40 mg/kg) 单独作用对 NE 水平没有明显影响( $P>0.05$ )。相反, 与对照组相比, METH 在 NAc、FC 和 VTA 中均显著诱导了 5-HT 上调( $P<0.001$ ); CBD 前干预也有效上调了 5-HT 的低水平( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ ); 此外, 在 NAc 和 VTA 中, CBD(40 mg/kg) 单独作用也能一定程度地上调 5-HT 水平( $P<0.01$ 、 $P<0.001$ ); 而在 FC 中, CBD(40 mg/kg) 单独作用对 5-HT 水平没有明显影响( $P>0.05$ )。总之, CBD 在大鼠 NAc、FC 和 VTA 中剂量依赖性地阻断了 METH 诱导的三种单胺类神经递质的改变。

## 2.3 CBD 在大鼠 CPu 和 Hip 中恢复 DA 和 5-HT 的改变

除了 NAc、FC 和 VTA 三个主要的多巴胺信号投射区域外, CPu 和 Hip 在毒品奖赏效应中也发挥重要作用<sup>[2]</sup>。如图 5 所示, 我们进一步研究了 CBD 和/或

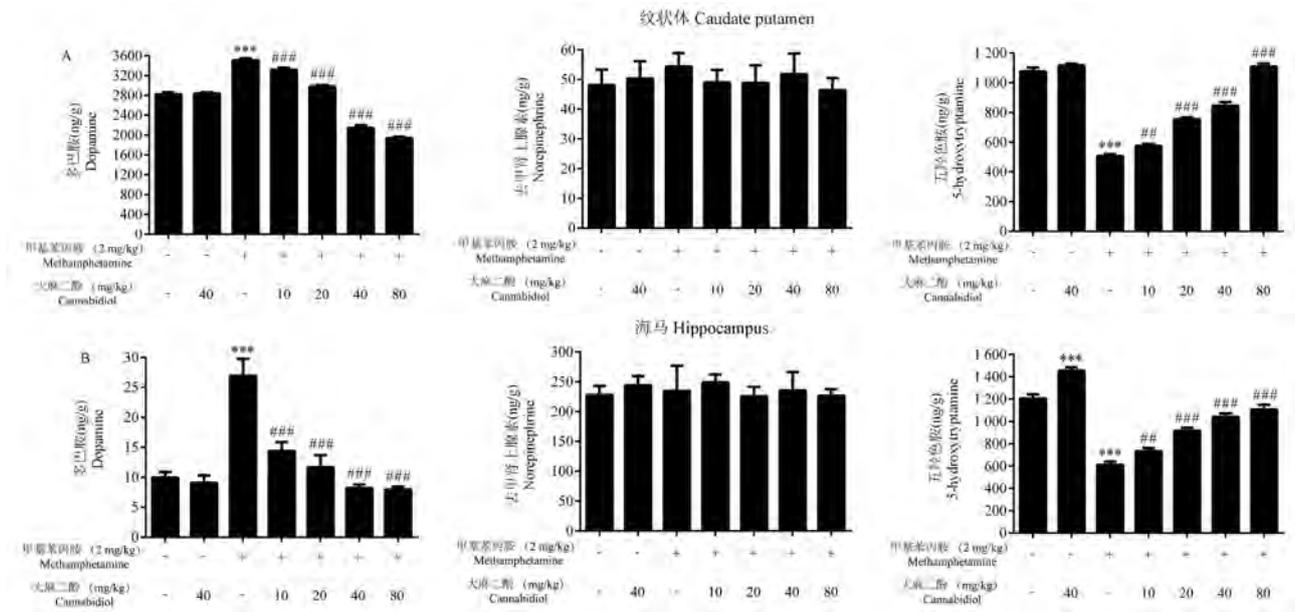


注: A: NAc; B: FC; C: VTA。与对照组相比, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ ; 与 METH 组相比, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$ 。

图 4 NAc、FC 和 VTA 中单胺类神经递质水平

Note. A, NAc. B, FC. C, VTA. Compared with control group, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ . Compared with METH group, #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$ .

Figure 4 Monoamine neurotransmitters levels in NAc, FC and VTA



注: A: CPu; B: Hip。与对照组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 METH 组相比, ##  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ 。

图 5 CPu 和 Hip 中单胺类神经递质水平

Note. A, CPu. B, Hip. Compared with control group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with METH group, ##  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ .

Figure 5 Monoamine neurotransmitters levels in CPu and Hip

METH 在 CPu 和 Hip 中对三种单胺类神经递质的影响。与对照组比, METH (2 mg/kg) 在 CPu 和 Hip 中也有效诱导了 DA 上调 ( $P < 0.001$ ); 而 CBD (10、20、40 和 80 mg/kg) 在 CPu 和 Hip 中也呈剂量依赖性地减弱了 DA 的高水平 ( $P < 0.001$ ); CBD (40 mg/kg) 单独作用对 DA 水平没有明显影响 ( $P > 0.05$ )。然而, CBD 和/或 METH 在 CPu 和 Hip 中对 NE 水平并没有明显的影响 ( $P > 0.05$ )。此外, 伴随着 DA 在 METH 组的高水平, 与对照组比, METH 组 5-HT 水平在 CPu 和 Hip 中表现出明显下调 ( $P < 0.001$ ); 而 CBD 也呈剂量依赖性地上调了 5-HT 水平 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); 在 Hip 中, CBD (40 mg/kg) 单独作用也能有效上调 5-HT 水平 ( $P < 0.001$ ); 而在 CPu 中, CBD (40 mg/kg) 单独作用对 5-HT 水平没有明显影响 ( $P > 0.05$ )。因此, CBD 在大鼠 CPu 和 Hip 中剂量依赖性地阻断了 METH 诱导的 DA 和 5-HT 的改变。

### 3 讨论

我们的研究发现, METH 可在大鼠 NAc、FC、VTA、CPu 和 Hip 中显著上调 DA 水平、下调 5-HT 水平, 并伴随着 NAc 和 VTA 中 NE 的上调; 这些改变可被 CBD 前干预有效逆转。我们以往的研究表明, CBD 前干预可有效削弱 METH 诱导的 CPP 效应<sup>[13]</sup>, 而本研究发现 CBD 前干预显著阻断了 METH

诱导的单胺类神经递质改变, 这可能部分解释了 CBD 对 METH 奖赏特性的抑制作用。

DA 主要在 SN 和 VTA 中合成, 以相位性神经放电的形式从 VTA 释放到 NAc、FC、CPu 和 Hip 中发挥生理作用<sup>[15]</sup>。我们的研究发现, METH 可显著诱导大鼠 NAc、FC、VTA、CPu 及 Hip 中 DA 水平出现不同程度的上调, 该上调作用可被 CBD 前干预有效地削弱。而 METH 诱导的 DA 释放涉及许多分子机制, 包括 DA 转运体 (DA transporters, DAT)<sup>[16]</sup>、囊泡单胺转运体-2 (vesicular monoamine transporter-2, VMAT-2)<sup>[17]</sup>、脑源性神经营养因子-酪氨酸受体激酶 B (brain-derived neurotrophic factor-tyrosine receptor kinase B, BDNF-TrkB) 信号通路<sup>[18]</sup>、sigma-1 受体<sup>[19]</sup>、细胞色素 P450 2D (cytochrome P450 2D, CYP2D)<sup>[20]</sup> 和  $Ca^{2+}$  信号<sup>[21]</sup>。CBD 对 sigma-1 受体的调节作用可能解释了其对 DA 释放的抑制效果<sup>[22]</sup>。因此, CBD 靶点分子的研究有助于解释 CBD 对 METH 奖赏特性的干预作用。

然而, 单胺类神经递质系统之间存在着复杂的相互作用。NE 系统对 DA 系统具有重要的协同作用, NE 神经元的损伤可降低 NAc 中 DA 的释放<sup>[23]</sup>, 而 NE 神经元的激活可上调 VAT 中 DA 神经元的活性<sup>[24]</sup>。我们的研究发现, 伴随着 METH 对 DA 水平的上调作用, NE 在 NAc 和 VTA 中出现不同程度的

上调,而 CBD 削弱 DA 上调的同时,也减轻了 METH 诱导的 NE 上调。但是,在 CPu 和 Hip 中,我们并没有观察到明显 NE 变化。因为 NE 对 DA 的促进作用主要是  $\alpha$ 1-肾上腺素能受体 ( $\alpha$ 1-adrenergic receptors) 介导的<sup>[25]</sup>,NE 在不同脑区的差异调节作用可能与  $\alpha$ 1-肾上腺素能受体在脑内的分布相关联。DA 和 5-HT 也存在着密切的联系。增强 5-HT 作用可显著降低 VTA 中 DA 神经元的放电率,导致 NAc 中 DA 水平降低<sup>[26]</sup>;相反,减弱 5-HT 作用可导致 NAc 中 DA 的释放增加<sup>[27]</sup>。总之,脑内 5-HT 水平对 DA 释放具有重要的抑制作用。该抑制作用可能是  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 神经元介导的<sup>[28]</sup>。我们的研究发现,METH 可在大鼠 NAc、FC、VTA、CPu 及 Hip 中不同程度地下调 5-HT 水平,而 CBD 前干预可减轻该下调作用。CBD 对  $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体 ( $\gamma$ -amino butyric acid A receptor, GABA<sub>A</sub>R) 和 5-HT<sub>1A</sub> 受体的调节作用可能是 CBD 阻止 5-HT 降低的原因<sup>[22]</sup>,CBD 作为 5-HT 受体的变构调节剂,并对 5-HT<sub>1A</sub> 受体具有激动性,CBD 可以通过对突触后 5-HT<sub>1A</sub> 受体的激动作用来阻止 METH 的奖励特性<sup>[29]</sup>。

METH 依赖是具有复发性和强迫性的复合闭环,METH 强迫性复吸是治疗的最大难点<sup>[30]</sup>,目前针对 METH 依赖的治疗方式主要有:相关蛋白靶向药物、抗精神病药物、天然药物、免疫疗法、运动疗法以及物理疗法等<sup>[31]</sup>。然而,在临床试验中,仍没有一种药物或疗法具有显著的治疗效果,一些临床前研究的天然药物和新型疗法可能更具前景,但同样面临着实践转化和临床试验的挑战<sup>[31]</sup>。最近的研究发现,CBD 作为潜在神经精神疾病治疗药物,在毒品依赖中具有抗复发、作用持久等特点<sup>[32]</sup>,可能的干预机制有:预防毒品引起的神经适应性变化、作用于不同的神经递质系统和细胞内信号通路、逆转毒品诱导的神经炎症、减轻毒品相关记忆的整合、逆转毒品诱导的认知缺陷及精神障碍等<sup>[29]</sup>。但 CBD 对 METH 依赖的干预研究较少,其背后的分子机制还有待进一步研究。总之,我们的研究表明 METH 可显著诱导大鼠脑内单胺类神经递质改变,而 CBD 前干预可有效地削弱这些变化。未来的研究将集中于不同神经细胞系在 METH 依赖中的相互作用以及基因表达变化,而研究 METH 依赖机制及药物干预治疗将有助于攻克毒品依赖这一世界性难题。

#### 参考文献:

- [1] 沈宝玉,杨根梦,刘鹏亮,等. Mecp2 与物质相关障碍的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 115-121.
- [2] Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction [J]. Neuropsychopharmacology, 2010, 35(1): 217-238.
- [3] 莫志贤,刘晔,陈晋. 两种吗啡依赖大鼠模型脑内单胺神经递质水平的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(3): 6-9, 24.
- [4] Chen W, Nong Z, Li Y, et al. Role of dopamine signaling in drug addiction [J]. Curr Top Med Chem, 2017, 17(21): 2440-2455.
- [5] Zhu MY. Noradrenergic modulation on dopaminergic neurons [J]. Neurotox Res, 2018, 34(4): 848-859.
- [6] Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, et al. Serotonin control of central dopaminergic function: Focus on *in vivo* microdialysis studies [J]. Prog Brain Res, 2008, 172: 7-44.
- [7] Viudez-Martínez A, García-Gutiérrez MS, Medrano-Relinque J, et al. Cannabidiol does not display drug abuse potential in mice behavior [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(3): 358-364.
- [8] Elsaid S, Kloiber S, Le Foll B. Effects of cannabidiol (CBD) in neuropsychiatric disorders: A review of pre-clinical and clinical findings [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2019, 167: 25-75.
- [9] Hay GL, Baracz SJ, Everett NA, et al. Cannabidiol treatment reduces the motivation to self-administer methamphetamine and methamphetamine-primed relapse in rats [J]. J Psychopharmacol, 2018, 32(12): 1369-1378.
- [10] Razavi Y, Keyhanfar F, Haghparast A, et al. Cannabidiol promotes neurogenesis in the dentate gyrus during an abstinence period in rats following chronic exposure to methamphetamine [J]. Metab Brain Dis, 2021, 36(6): 1381-1390.
- [11] Karimi-Haghighi S, Dargahi L, Haghparast A. Cannabidiol modulates the expression of neuroinflammatory factors in stress- and drug-induced reinstatement of methamphetamine in extinguished rats [J]. Addict Biol, 2020, 25(2): e12740.
- [12] Renard J, Norris C, Rushlow W, et al. Neuronal and molecular effects of cannabidiol on the mesolimbic dopamine system: Implications for novel schizophrenia treatments [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2017, 75: 157-165.
- [13] Yang G, Liu L, Zhang R, et al. Cannabidiol attenuates methamphetamine-induced conditioned place preference via the  $\sigma$ 1r/akt/gsk3- $\beta$ /creb signaling pathway in rats [J]. Toxicol Res (Camb), 2020, 9(3): 202-211.
- [14] Huang F, Li J, Shi HL, et al. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by lc-ms/ms [J]. J Neurosci Methods, 2014, 229: 8-14.
- [15] Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction [J]. Annu Rev Psychol, 2020, 71: 79-106.
- [16] Schmitt KC, Reith ME. Regulation of the dopamine transporter: Aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1187: 316-340.

- [17] Guillot TS, Shepherd KR, Richardson JR, et al. Reduced vesicular storage of dopamine exacerbates methamphetamine-induced neurodegeneration and astrogliosis [J]. *J Neurochem*, 2008, 106(5): 2205–2217.
- [18] Ren Q, Ma M, Yang C, et al. Bdnf-trkb signaling in the nucleus accumbens shell of mice has key role in methamphetamine withdrawal symptoms [J]. *Transl Psychiatry*, 2015, 5(10): e666.
- [19] Sambo DO, Lebowitz JJ, Khoshbouei H. The sigma-1 receptor as a regulator of dopamine neurotransmission: A potential therapeutic target for methamphetamine addiction [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 152–167.
- [20] Stocco MR, El-Sherbeni AA, Zhao B, et al. The role of CYP2D in rat brain in methamphetamine-induced striatal dopamine and serotonin release and behavioral sensitization [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2021, 238(7): 1791–1804.
- [21] Yorgason JT, Hedges DM, Obray JD, et al. Methamphetamine increases dopamine release in the nucleus accumbens through calcium-dependent processes [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2020, 237(5): 1317–1330.
- [22] Vitale RM, Iannotti FA, Amodeo P. The (poly)pharmacology of cannabidiol in neurological and neuropsychiatric disorders: Molecular mechanisms and targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4876.
- [23] Grenhoff J, Nisell M, Ferré S, et al. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat [J]. *J Neural Transm Gen Sect*, 1993, 93(1): 11–25.
- [24] Lategan AJ, Marien MR, Colpaert FC. Effects of locus coeruleus lesions on the release of endogenous dopamine in the rat nucleus accumbens and caudate nucleus as determined by intracerebral microdialysis [J]. *Brain Res*, 1990, 523(1): 134–138.
- [25] Drouin C, Darracq L, Trovero F, et al.  $\alpha$ 1B-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(7): 2873–2884.
- [26] Prisco S, Pagannone S, Esposito E. Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: An electrophysiological study *in vivo* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 271(1): 83–90.
- [27] Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, et al. SB 242084, a selective serotonin<sub>2c</sub> receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system [J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38(8): 1195–1205.
- [28] Howell LL, Kimmel HL. Monoamine transporters and psychostimulant addiction [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(1): 196–217.
- [29] Calpe-López C, García-Pardo MP, Aguilar MA. Cannabidiol treatment might promote resilience to cocaine and methamphetamine use disorders: A review of possible mechanisms [J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2583.
- [30] Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis [J]. *Lancet Psychiatry*, 2016, 3(8): 760–773.
- [31] 洪仕君, 沈宝玉, 孙荣基, 等. 甲基苯丙胺滥用现状及相关研究进展 [J]. *法医学杂志*, 2021, 37(6): 763–775.
- [32] Gonzalez-Cuevas G, Martin-Fardon R, Kerr TM, et al. Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to drug use: Preclinical proof of principle [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(10): 2036–2045.

〔收稿日期〕2022-02-28

张柏生,郭萍萍,叶晨雨,等. 基于细胞和动物实验的新疆5种阿魏抗结肠癌的作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 26-33.

Zhang BS, Guo PP, Ye CY, et al. Cell and animal studies on the anti-colon cancer effects of five species of *Ferula* from Xinjiang [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 26-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.004

# 基于细胞和动物实验的新疆5种阿魏抗结肠癌的作用研究

张柏生<sup>1</sup>, 郭萍萍<sup>2</sup>, 叶晨雨<sup>2</sup>, 张海英<sup>1,3\*</sup>

(1.新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000;  
3.新疆中药炮制研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

**【摘要】** 目的 体外细胞实验研究新疆5种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制、促凋亡作用, 体内研究新疆5种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的影响。方法 新疆5种阿魏及不同极性部位干预人结肠癌 HCT 116 细胞, 采用 MTT 比色法检测吸光度 OD 值, 计算增殖抑制率, 应用流式细胞术检测细胞凋亡率。建立 BALB/c 结肠癌 CT-26 小鼠肿瘤模型, 随机分为正常组、模型组、顺铂组和5种阿魏低、高剂量组。连续灌胃给药 10 d, 第 11 天处死小鼠, 取出肿瘤、脾、肾与胸腺, 计算各组小鼠的脏器指数与抑瘤率。结果 对于人结肠癌 HCT 116 细胞, 多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的乙醇提取物抑制作用较好,  $IC_{50}$  分别为 26.06、28.31、42.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 托里阿魏抑制作用较弱,  $IC_{50}$  为 131.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 圆锥茎阿魏作用最弱,  $IC_{50}$  为 261.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 准噶尔阿魏石油醚部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的抑制作用均很明显, 水饱和正丁醇部位抑制作用较弱, 而水提部位几乎没有作用。新疆5种阿魏中, 准噶尔阿魏对于人结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用较好。对于结肠癌 CT-26 小鼠, 与正常组相比, 新疆5种阿魏给药组小鼠的脾重、肾重、胸腺重及其脏器指数均有降低趋势, 与阳性药物顺铂组作用趋势一致; 从抑瘤效果来看, 准噶尔阿魏高低剂量组抑瘤率分别为 61.73%、67.40%。结论 准噶尔阿魏抗结肠癌作用较好, 值得更进一步的深入研究。

**【关键词】** 结肠癌; 增殖抑制; 凋亡; 准噶尔阿魏

**【中图分类号】**      **【文献标识码】**      **【文章编号】**1671-7856(2022) 11-0026-08

## Cell and animal studies on the anti-colon cancer effects of five species of *Ferula* from Xinjiang

ZHANG Bosheng<sup>1</sup>, GUO Pingping<sup>2</sup>, YE Chenyu<sup>2</sup>, ZHANG Haiying<sup>1,3\*</sup>

(1. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China.  
2. the Fourth College of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000. 3. Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000)

**【Abstract】 Objective** In vitro cell experiments were conducted to study the proliferation-inhibition and apoptosis effects of five species of *Ferula* from Xinjiang and several polar regions on human colon cancer HCT 116 cells, and an *in vivo* study examined the effects of five species of *Ferula* from Xinjiang on colon cancer CT-26 mice. **Methods** Human

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82060734)。

[作者简介] 张柏生(1980—), 男, 主管中药师, 研究方向: 中药合理用药。E-mail: 236398128@qq.com

[通信作者] 张海英(1973—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药药理学研究。E-mail: 1030737878@qq.com

colon cancer HCT 116 cells were treated with five species of *Ferula* from Xinjiang and several polar regions. The optical density absorbance was measured by MTT method, the proliferation-inhibiting rate was calculated, and the cell apoptosis rate was measured by flow cytometry. A BALB/c colon cancer CT-26 mice tumor model was established and randomly divided into a normal, model, cisplatin and *Ferula* species high-dose and low-dose groups. On the 11<sup>th</sup> day, the mice were sacrificed, the tumor, spleen, kidneys, and thymus were removed, and the organ index and tumor inhibition rate of each group were calculated. **Results** For HCT 116 cells, the inhibitory IC<sub>50</sub> values of *Ferula ferulaeoides*, *F. songorica*, and *F. sinkiangensis* were 26.06, 28.31 and 42.27 μg/mL, respectively, while the inhibitory effect of *F. krylovii* was weak, with an IC<sub>50</sub> of 131.61 μg/mL. *F. conocaula* had the weakest inhibitory effect, with an IC<sub>50</sub> of 261.77 μg/mL. Petroleum ether, methylene chloride, and ethyl acetate extracts of *F. songorica* had obvious inhibitory effect on HCT 116 cells, but the water-saturated n-butanol extract had only a weak inhibitory effect, and the water extract had almost no inhibitory effect. Among the five species of *Ferula* found in Xinjiang, *F. songorica* had the best apoptotic effect on HCT 116 cells. Compared with the normal group, colon cancer CT-26 mice treated with *Ferula* tended to have decreased spleen, kidney, and thymus weights and organ index, which is consistent with the positive-control cisplatin drug group. In terms of tumor inhibition effect, the tumor inhibition rates of *F. songorica* high- and low-dose groups were 61.73% and 67.40%, respectively. **Conclusions** The anti-tumor effect of *F. songorica* is promising and worthy of further study.

**[Keywords]** colon cancer; inhibiting proliferation; apoptosis; *Ferula songorica*

随着人们生活水平的提高,结直肠癌的发病率呈上升趋势,在恶性肿瘤里面位列第三;结肠癌早期无明显症状,发现时多为晚期,且与周围脏器无明显界限,易于转移及复发,手术治疗效果不理想,严重危害人们身体健康及生命安全。因此,开发具有多种化学结构和药理作用的天然抗肿瘤药物具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

《中国药典》(2020年版)收录的阿魏为伞形科植物新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)、阜康阿魏(*Ferula fukanensis* K. M. Shen)两种,具消积、散痞、杀虫等作用,临床上主治肉食积滞、腹中痞块、虫积腹痛等病症<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究发现新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis*)各极性部位对结肠癌细胞均有一定的抑制作用,其中乙酸乙酯部位抑制效果最好<sup>[3]</sup>。体外实验研究发现新疆阿魏可显著抑制结肠癌细胞的迁移、侵袭,动物实验表明新疆阿魏可抑制结肠癌小鼠肿瘤的生长<sup>[4-5]</sup>。

《中国药典》品种的新疆阿魏、阜康阿魏均已濒临灭绝,据文献记载阿魏属植物中还有圆锥茎阿魏、多伞阿魏、托里阿魏、准噶尔阿魏在民间作为药典品种阿魏的代用品,且资源分布较广。因此,本研究以课题组前期的研究结果作为基础,考察新疆5种阿魏体外对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制、促凋亡作用。体内考察新疆5种阿魏抗结肠癌小鼠的作用。通过系统研究新疆5种阿魏,筛选出抗肿瘤活性较强的阿魏品种,为充分开发利用新疆特色药阿魏属植物资源奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

人结肠癌 HCT 116、鼠结肠癌 CT-26 细胞:购于上海中国科学研究院细胞研究所,实验使用 3~5 代细胞。

#### 1.1.2 实验动物

BALB/c 小鼠:130 只,SPF 级,体重 18~22 g(3 周龄),雌雄各半,由新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2018-0002]提供。动物饲养环境符合标准(室温 20℃~25℃,湿度 55%±5%,12 h 照明/12 h 黑暗),动物房人流物流通道分开,动物自由进食进水,动物饲养、实验操作在新疆医科大学实验动物中心[SYXK(新)2018-0003]进行。研究人员通过实验室的相关培训,对实验动物给予人道主义关怀,遵循 3R 原则。研究获得新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-20220301-40),符合动物伦理的相关要求。

### 1.2 主要试剂与仪器

青霉素/链霉素溶液(J170016,美国 Hyclone 公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS)(AC10257442,美国 Hyclone 公司);胎牛血清(FBS)(F160123,美国 Hyclone 公司);RPMI-1640 培养基(AD16192263,美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)(67685TT,美国 Sigma 公司);MTT(EZ2811D347,美国 Sigma 公司);FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒(8012947,美国 BD 公司)。

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司);TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂);AL 204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);酶标仪(美国 Thermo 公司);-80℃ 低温冰箱(海尔集团);流式细胞仪(FACScanto™,BD 美国);移液枪各型号枪头(美国 COSTAR 公司);25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶(美国 COSTAR 公司);96 孔细胞培养板(美国 COSTAR 公司);0.22 μm 微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 新疆 5 种阿魏的来源及采集

圆锥茎阿魏(*Ferula conocaula* Korov)、托里阿魏(*Ferula krylovii* Korov)、新疆阿魏(*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen)、多伞阿魏(*Ferula ferulaeoides* (Steud. Korov)、准噶尔阿魏(*Ferula songorica* Pall. ex Spreng)分别采集于喀什乌恰县、托里县周边、伊宁县拜石墩、石河子南山、塔城市周边等地。经新疆医科大学附属中医医院李永和主任中药师鉴定以上药材均符合《新疆植物志》中的记载。

#### 1.3.2 新疆 5 种阿魏乙醇提取物及不同极性部位的制备

将新疆 5 种阿魏根切碎,置于阴凉处干燥,用 5 倍量的 95%乙醇进行回流提取,时间为 2 h,过滤后将残渣继续用相同方法重复提取 2 次,最后合并滤液,并浓缩为稠浸膏,即得乙醇提取物。

然后进行不同极性部位的制备,应用中药化学的极性分离法,取 5 种阿魏乙醇提取物加硅藻土拌匀,加入 5 倍体积石油醚(30℃~60℃),超声 30 min,用布氏漏斗过滤抽干,重复以上操作 3 次,合并滤液,滤液减压回收得石油醚部位;残渣挥散至无醚味,称重,加入 5 倍体积二氯甲烷,超声 30 min,用布氏漏斗过滤抽干,重复以上操作 3 次,合并滤液,滤液减压回收得二氯甲烷部位;残渣挥干,称重,依照上述步骤依次加入乙酸乙酯、水饱和正丁醇、水;即得到乙酸乙酯部位、水饱和正丁醇部位、水提部位。

#### 1.3.3 MTT 比色法检测新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖的影响

取处于对数生长期的人结肠癌 HCT 116 细胞,调整细胞混悬液浓度为  $2 \times 10^5$  cells/mL。加入 96 孔板中,CO<sub>2</sub> 培养箱贴壁培养,24 h 后取新疆 5 种阿魏乙醇提取物及不同极性部位,细胞培养液分别稀释成 300、150、75、37.5、18.75、

9.375 μg/mL 6 个浓度;小心弃去 96 孔板上上清液,分别加入药物 100 μL,每组设 6 个复孔;正常组加 100 μL 不含药物的细胞培养液,作用 24 h 后,显微镜下观察细胞的形态变化。弃去上清液,将 MTT 检测试剂加至 96 孔板中,每孔 100 μL,孵育 3~4 h,然后每孔加入 150 μL DMSO,振摇 15 min,用酶标仪(490 nm)检测吸光度<sup>[6-7]</sup>,计算新疆 5 种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制率及 IC<sub>50</sub>。

增殖抑制率(%) = (正常组 OD - 给药组 OD) / (正常组 OD - 空白组 OD) × 100%

#### 1.3.4 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用

收集对数生长期的人结肠癌 HCT 116 细胞,调整细胞混悬液浓度为  $2 \times 10^5$  cells/mL。加入 6 孔板中,CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 使贴壁,将新疆 5 种阿魏乙醇提取物配制为 75 μg/mL 浓度,于 6 孔板中每孔加 2 mL。给药 24 h 后,收集 6 孔板中的人结肠癌 HCT 116 细胞,用 PBS 缓冲液将细胞稀释,加入 5 μL Annexin V-FITC 试液,避光 37℃ 反应 15 min,然后加入 5 μL PI 染液,流式细胞仪检测,计算总凋亡率<sup>[8-9]</sup>。总凋亡率 = (早期凋亡率 + 晚期凋亡率)。

#### 1.3.5 结肠癌 CT-26 小鼠分组和建模

将体重为 18~22 g 的 BALB/c 小鼠 130 只,雌雄各半,适应性喂养 3 d,随机数字表法进行分组,分别为正常组、模型组、顺铂对照组、新疆 5 种阿魏低剂量、高剂量组。将处于指数生长期的鼠结肠癌 CT-26 细胞,以生理盐水配制为  $1 \times 10^7$  cells/mL 的细胞混悬液,用 1 mL 注射器每只小鼠左前肢腋下接种 0.2 mL,细胞混悬液新鲜配制,在 30 min 内完成接种,次日给药,阿魏组高、低剂量分别为 1.5 g/kg 生药、0.75 g/kg 生药每天灌胃给药;顺铂给药剂量为 5 mg/kg,每隔 3 d 腹腔注射 1 次;正常组和模型组分别灌胃含同等比例浓度的相应溶媒,连续灌胃给药 10 d,记录肿瘤生长情况<sup>[10-11]</sup>。根据动物伦理的相关规定,模型对照组的平均瘤重重要小于 1 g。

#### 1.3.6 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠抑瘤作用的研究

各组小鼠给药 10 d 后,末次给药 1 h 后,将小鼠异氟烷麻醉,进行颈动脉采血。采集的血液静置 30 min,4000 r/min 离心,吸取血清备用。剥离各组小鼠肿瘤组织,摘取脾、肾、胸腺等,分析天平称取重量,计算小鼠脏器指数、抑瘤率,并进行统计分析。

抑瘤率% = (模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 × 100%

脾指数 = 脾重 / 体重 × 100%

肾指数 = 肾重 / 体重 × 100%

胸腺指数 = 胸腺 / 体重 × 100%

1.4 统计学方法

实验数据使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 定量资料用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 首先对数据进行正态性、方差齐性检验, 若方差不齐需要进行数据转换, 然后再进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 新疆 5 种阿魏及不同极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖抑制的结果

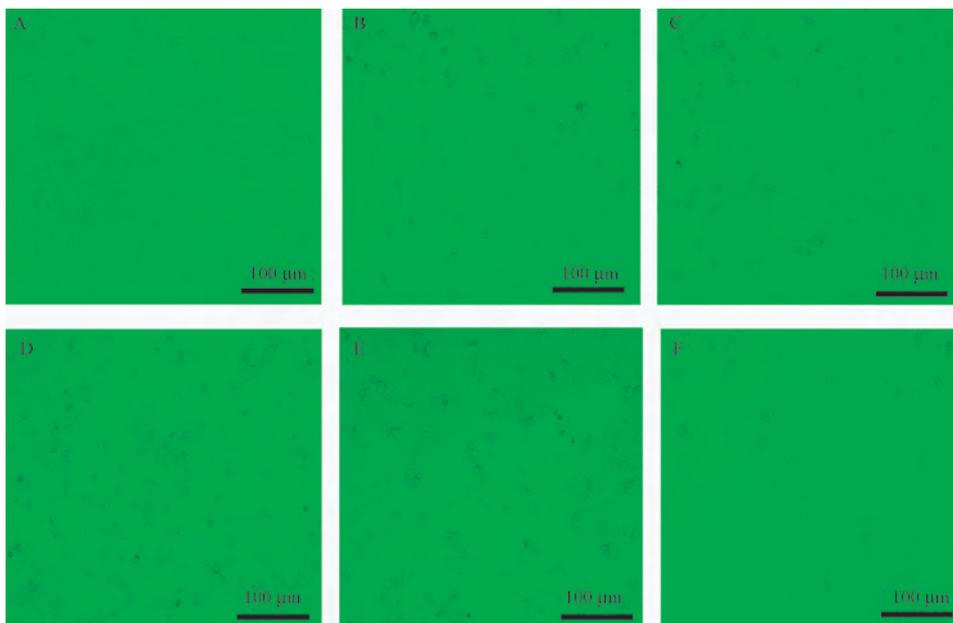
新疆 5 种阿魏 MTT 比色法检测结果如表 1、图 1, 多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的乙醇提取物抑制作用较好,  $IC_{50}$  分别为 26.06、28.31、42.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 托里阿魏抑制作用较弱  $IC_{50}$  为 131.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 圆锥茎阿魏作用最弱  $IC_{50}$  为 261.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。显微镜下观察可知, 新疆阿魏、多伞阿魏、准噶尔阿魏组的细胞形态不完整呈圆形、排列疏松, 有聚团趋势, 部分细胞漂浮、死亡; 托里阿魏、圆锥茎阿魏组的细胞形态清晰、排列紧密、贴壁生长、细胞生长状态较好。

准噶尔阿魏不同极性部位 MTT 比色法检测结果显示如表 2, 石油醚部位、二氯甲烷部位、乙酸乙酯部位对人结肠癌 HCT 116 的抑制作用均很明显, 水饱和和正丁醇部位作用较弱, 水提部位几乎没有抑制作用。

表 1 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞增殖抑制结果 (%)

Table 1 The inhibiting proliferation of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) Concentration	多伞阿魏 <i>F. ferulaeoides</i>	准噶尔阿魏 <i>F. songorica</i>	新疆阿魏 <i>F. sinkiangensis</i>	托里阿魏 <i>F. krylovii</i>	圆锥茎阿魏 <i>F. conocaula</i>
300	98.02	99.45	99.77	89.26	74.52
150	99.51	98.96	99.19	51.64	22.96
75	97.60	88.75	95.50	24.75	15.43
37.5	32.34	37.91	28.53	14.30	12.06
18.75	16.11	19.16	0.45	-6.14	11.81
9.375	19.58	18.28	4.30	-0.98	6.14
$IC_{50}$	26.06	28.31	42.27	131.61	261.77



注: A: 正常对照; B: 多伞阿魏; C: 准噶尔阿魏; D: 新疆阿魏; E: 托里阿魏; F: 圆锥茎阿魏。

图 1 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的增殖抑制形态图

Note. A, Normal control. B, *F. ferulaeoides*. C, *F. songorica*. D, *F. sinkiangensis*. E, *F. krylovii*. F, *F. conocaula*.

Figure 1 The inhibiting proliferation of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

## 2.2 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的凋亡作用研究

新疆 5 种阿魏乙醇提取物对人结肠癌 HCT 116 细胞均有一定的凋亡作用,如图 2 所示,促凋亡率分别是新疆阿魏 18.92%,多伞阿魏 22.48%,托里阿魏 11.02%,准噶尔阿魏 28.50%,圆锥茎阿魏 5.94%,其中准噶尔阿魏的促凋亡作用最强。

表 2 准噶尔阿魏各极性部位对人结肠癌 HCT 116 细胞抑制增殖结果(%)

Table 2 The inhibiting proliferation of *F. songorica* various polar sites on colon cancer HCT 116 cells

浓度(μg/mL) Concentration	乙醇部 Ethanol part	石油醚部 Petroleum ether part	二氯甲烷部 Dichloro methane part	乙酸乙酯部 Ethyl acetate part	正丁醇部 N-butyl alcohol part	水部 Water part
300	99.45	97.76	94.24	92.28	78.62	32.61
150	98.96	98.07	95.89	91.29	17.46	32.18
75	88.75	99.48	99.17	92.78	16.03	29.97
37.5	37.91	37.17	53.92	40.21	14.88	29.66
18.75	19.16	40.24	30.80	19.91	31.57	24.47
9.375	18.28	18.88	21.36	4.16	17.49	20.91
IC <sub>50</sub>	28.31	20.46	20.33	41.92	396.18	12395.51

表 3 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠瘤重及脏器的影响

Table 3 Effects of five species of *Ferula* in Xinjiang on tumor weight and organs of colon cancer CT-26 mice

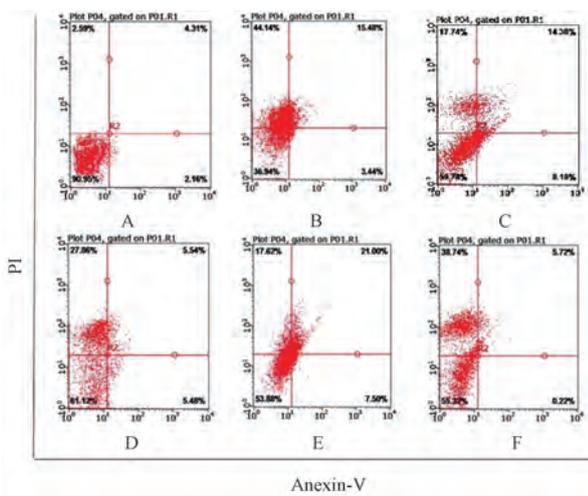
组别 Groups	<i>n</i>	平均体重(g) Body weigh	瘤重(mg) Tumor weigh	脾重(mg) Spleen weigh	肾重(mg) Renal weigh	胸腺重(mg) Thymus weigh
正常组 Normal group	10	24.07±2.68	/	93.33±0.01	157.99±0.02	42.90±0.02
模型组 Model group	11	21.83±2.31	370.48±0.16	74.63±0.01*	186.57±0.23	36.12±0.02
顺铂组 Cisplatin group	4	19.66±1.21*	5.94±0.01 <sup>##</sup>	17.30±0.01 <sup>**</sup>	106.20±0.02	1.42±0.01 <sup>**</sup>
圆锥茎高剂量组 <i>F. conocaula</i> high dose group	10	22.90±2.46	506.58±0.16 <sup>#</sup>	72.65±0.01*	123.96±0.03	25.01±0.01*
圆锥茎低剂量组 <i>F. conocaula</i> low dose group	10	23.12±1.76	447.34±0.16	63.58±0.01*	118.08±0.03	34.00±0.01
托里阿魏高剂量组 <i>F. krylovii</i> high dose group	10	21.25±1.74	435.20±0.13	47.83±0.02*	114.51±0.03	22.69±0.02*
托里阿魏低剂量组 <i>F. krylovii</i> low dose group	9	20.29±0.90	316.71±0.23	49.74±0.02*	110.63±0.04	19.33±0.01*
新疆阿魏高剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> high dose group	10	23.82±2.34	416.66±0.32	63.19±0.02*	121.28±0.02	26.69±0.01*
新疆阿魏低剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> low dose group	10	22.65±2.08	269.77±0.08	51.68±0.01*	116.89±0.03	24.54±0.12*
多伞阿魏高剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> high dose group	10	21.82±1.65	246.76±0.14	56.57±0.02*	116.68±0.03	23.75±0.01*
多伞阿魏低剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> low dose group	10	23.40±2.16	235.28±0.09 <sup>#</sup>	59.16±0.02*	125.58±0.04	28.00±0.01
准噶尔阿魏高剂量组 <i>F. songorica</i> high dose group	9	19.68±1.96*	141.77±0.08 <sup>##</sup>	13.94±0.004 <sup>**</sup>	68.16±0.01*	11.55±0.03 <sup>**</sup>
准噶尔阿魏低剂量组 <i>F. songorica</i> low dose group	10	19.87±1.31*	120.78±0.06 <sup>##</sup>	18.12±0.01 <sup>**</sup>	83.68±0.01*	3.48±0.03 <sup>**</sup>

注:与正常组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . Compared with the model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ .

## 2.3 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的作用和影响

实验结果如表 3、表 4、图 3 所示。在体重方面,结果表明准噶尔阿魏高低剂量组小鼠体重与正常组相比较明显减轻( $P<0.05$ ),差异具有统计学意义;其它 4 种阿魏给药组小鼠体重与正常组相比较无明显变化( $P>0.05$ )。



注:A:正常对照;B:多伞阿魏;C:准噶尔阿魏;D:新疆阿魏;E:托里阿魏;F:圆锥茎阿魏。

图 2 新疆 5 种阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞的凋亡作用图

Note. A, Normal control. B, *F. ferulaeoides*. C, *F. songorica*. D, *F. sinkiangensis*. E, *F. krylovii*. F, *F. conocaula*.

Figure 2 The apoptosis rate of five species of *Ferula* in Xinjiang on colon cancer HCT 116 cells

表 4 新疆 5 种阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠脏器指数及抑瘤率的影响

Table 4 Effects of five species of *Ferula* in Xinjiang on organ index and tumor inhibition rate of colon cancer CT-26 mice

组别 Groups	n	抑瘤率 (%) Tumor inhibition rate	脾指数 (mg/g) Spleen index	肾指数 (mg/g) Renal index	胸腺指数 (mg/g) Thymus index
正常组 Normal group	10	/	3.88±1.00	6.56±0.46	1.78±0.62
模型组 Model group	11	/	3.42±0.67	8.55±1.49	1.65±0.70
顺铂组 Cisplatin group	4	98.40	0.88±0.65**	5.40±0.82	0.07±0.05**
圆锥茎高剂量组 <i>F. conocaula</i> high dose group	10	-36.74	3.17±0.78	5.41±0.87	1.09±0.26
圆锥茎低剂量组 <i>F. conocaula</i> low dose group	10	-20.75	2.75±0.36*	5.11±1.02	1.47±0.40
托里阿魏高剂量组 <i>F. krylovii</i> high dose group	10	-17.47	2.25±0.70*	5.39±0.92	1.07±0.69*
托里阿魏低剂量组 <i>F. krylovii</i> low dose group	9	14.51	2.45±0.91*	5.45±2.02	0.95±0.41*
新疆阿魏高剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> high dose group	10	-12.47	2.65±0.90*	5.09±0.80	1.12±0.28
新疆阿魏低剂量组 <i>F. sinkiangensis</i> low dose group	10	27.18	2.28±0.53*	5.16±1.41	1.08±0.77
多伞阿魏高剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> high dose group	10	33.39	2.59±0.85*	5.35±1.13	1.09±0.37
多伞阿魏低剂量组 <i>F. ferulaeoides</i> low dose group	10	36.49	2.53±0.64*	5.37±1.30	1.20±0.42
准噶尔阿魏高剂量组 <i>F. songorica</i> high dose group	9	61.73	0.71±0.18**	3.46±0.99*	0.59±0.19**
准噶尔阿魏低剂量组 <i>F. songorica</i> low dose group	10	67.40	0.91±0.30**	4.21±0.68*	0.18±0.13**

注:与正常组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

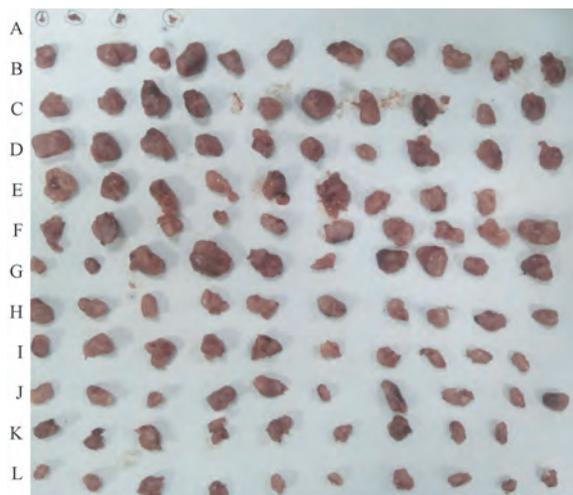
Note. Compared with the normal group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

在脾重、脾指数方面,结果表明 5 种阿魏高低剂量组小鼠脾重、脾指数与正常组相比较明显减轻( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),差异具有统计学意义,其中准噶尔阿魏的减轻更为显著。

在肾重、肾指数方面,结果表明准噶尔阿魏高低剂量组小鼠肾重、肾指数与正常组相比较明显减轻( $P<0.05$ ),差异具有统计学意义;其它 4 种阿魏给药组小鼠肾重、肾指数与正常组相比较无明显变化( $P>0.05$ )。

在胸腺重、胸腺指数方面,结果表明托里阿魏、准噶尔阿魏高低剂量组小鼠胸腺重、胸腺指数与正常组相比较明显减轻( $P<0.05$ ),差异具有统计学意义;其它 3 种阿魏给药组小鼠胸腺重、胸腺指数与正常组相比较无明显变化( $P>0.05$ )。

在抑瘤率方面,从实验结果可知,托里阿魏低剂量组、新疆阿魏低剂量组、多伞阿魏高低剂量组、准噶尔阿魏高低剂量组抑瘤率分别为 14.51%、27.18%、33.39%、36.49%、61.73%、67.40%。其中准噶尔阿魏对结肠癌 CT-26 小鼠的抑制作用最强。



注:A:顺铂组;B:模型组;C:圆锥茎阿魏高剂量组;D:圆锥茎阿魏低剂量组;E:托里阿魏高剂量组;F:托里阿魏低剂量组;G:新疆阿魏高剂量组;H:新疆阿魏低剂量组;I:多伞阿魏高剂量组;J:多伞阿魏低剂量组;K:准噶尔阿魏高剂量组;L:准噶尔阿魏低剂量组。

图3 结肠癌 CT-26 小鼠肿瘤生长情况

Note. A, Cisplatin group. B, Model group. C, *F. conocaula* high dose group. D, *F. conocaula* low dose group. E, *F. krylovii* high dose group. F, *F. krylovii* low dose group. G, *F. sinkiangensis* high dose group. H, *F. sinkiangensis* low dose group. I, *F. ferulaeoides* high dose group. J, *F. ferulaeoides* low dose group. K, *F. songorica* high dose group. L, *F. songorica* low dose group.

Figure 3 The tumor growth of colon cancer CT-26 mice

### 3 讨论

阿魏属 *Ferula L.* 隶属于伞形科芹亚科 *Apiioideae* *Drude.* 前胡族 (*Peucedaneae* *Drude.*) 阿魏亚族 *Ferulinae* *Drude.* 植物。全世界该种植物较多,主要以地中海地区、非洲北部、西亚和中亚地区为主要生长地。根据《新疆植物志》记载,我国约有 25 种及 1 变种,分布于我国新疆、东北、山西、西藏等地。新疆以伊宁、阜康、托里、塔城及乌恰等地为主要生长区<sup>[12-13]</sup>。该属植物大都有刺鼻的蒜臭味,常称为“臭阿魏”;无该气味的则称为“香阿魏”。臭阿魏类分泌的树脂大都被用来入药,最早记载于中国的《新修本草》,其后历代本草均有记载,具有悠久的历史。

据记载,阿魏的油胶树脂常被用来治疗结肠癌、子宫癌和胃癌等恶性肿瘤,并且发现其具有一定的治疗作用。Kasaian 等<sup>[14]</sup>从 *Ferula oopoda* 中分离的倍半萜内酯化合物 dehydrooopodin 作用于人乳腺癌细胞 MCF7 和人白血病细胞 K562,均具有显著的抑制作用。Matin 等<sup>[15]</sup>从羊食阿魏 (*Ferula ovina*) 中分离出的萜类化合物 Ferutin,对人乳腺癌 MCF7

细胞与膀胱移行细胞癌 TCC 产生快速凋亡作用。王飒等<sup>[16]</sup>提取多伞阿魏挥发油、水提、乙醇、石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯等不同极性部位,研究表明对人胃癌 SGC-7901 细胞均有一定抑制作用,其中三氯甲烷提取部位活性最强;发现应用水蒸气蒸馏法与微波萃取法两种不同提取方法,其挥发油对 SGC-7901 细胞的抑制作用最为明显。

MTT 法的原理是活细胞可使 MTT 还原为蓝紫色结晶甲臜,而死细胞没有这个作用,用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解细胞中的甲臜,细胞呈现的蓝紫色与细胞活性正相关,死细胞未染色,通过测定 OD<sub>490</sub>,可反映细胞的活性。该法操作简单、快捷、稳定,能够准确测定细胞的增殖情况,且价格适中。虽 CCK-8 法具有检测速度快、灵敏度高、重复性好等优点,但其适用于检测悬浮细胞,价格昂贵;故本实验采用 MTT 法检测细胞增殖情况<sup>[17-18]</sup>。

肿瘤细胞具有非常强的增殖能力,这是肿瘤在机体内发展迅速的重要原因,抑制肿瘤细胞的增殖能提高肿瘤患者的综合治疗效果。根据美国国立癌症研究所公布的天然药物抗肿瘤作用标准,植物的粗提物对肿瘤细胞 IC<sub>50</sub> < 30 μg/mL 或 100 μg/mL 抑制率在 80% 左右,可初步认为有一定的抗肿瘤作用,有进一步研究的价值根据本实验结果显示,可做出以下推断:对于人结肠癌 HCT 116 细胞:多伞阿魏、准噶尔阿魏、新疆阿魏的增殖抑制作用较好,托里阿魏、圆锥茎阿魏的增殖抑制作用较弱;其中抑制作用较强的部位多集中于石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯部位。植物粗提物中可能含有较多的杂质,离子,理化性质不稳定,本实验目前只是对 5 种阿魏的抗肿瘤作用进行初步的筛选,所以体外细胞实验部分并不能确定是否是药物的真实作用,其后将进行体内动物实验进行药效学验证。

肿瘤细胞结构功能和自身代谢异常导致肿瘤细胞无休止增殖是引起恶性肿瘤的主要原因,常采用细胞凋亡检测肿瘤细胞的结构功能、自身状态,其在控制细胞异常增殖,防止肿瘤的发生发展的研究中起重要作用。检测细胞凋亡的方法有形态学检测、线粒体膜势能的检测、流式细胞术等方法,其中流式法每次可以高速分析 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>7</sup> 个细胞,并能从一个细胞中测得许多数值,具有检测方便、速度快、精密度高、准确性高等多种优点<sup>[19]</sup>。

凋亡早期的细胞表现为磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻,Annexin-V 是一种磷脂结合蛋白,可以与 PS 结合。碘化丙啶 (PI) 为核酸染料,用来区分存活的早期、坏死或晚期凋亡细胞,可以通过晚调和死细胞

膜使其染上颜色。故将 Annexin V 与 PI 联合使用检测细胞凋亡情况<sup>[20]</sup>。本实验采用 Annexin V-FITC/PI 试剂检测,实验结果准噶尔阿魏乙醇提取物对于结肠癌 HCT 116 细胞的促凋亡作用较好,凋亡率为 28.50%。

《中国药典》品种的新疆阿魏、阜康阿魏已经濒临灭绝,其他品种阿魏资源较丰富,在新疆民间广泛使用。《新疆植物志》中记载:多伞阿魏 *F. ferulaeoides* 在新疆民间用作中药阿魏的代用品,准噶尔阿魏 *F. songorica* 在苏联哈萨克斯坦民间用来治疗头疼、感冒、胃病等。本课题拟从其他品种阿魏中寻找与药典阿魏药效相似的品种,验证其药用价值。结果表明新疆 5 种阿魏抗肿瘤实验中,准噶尔阿魏高低剂量组对结肠癌小鼠的抑瘤率为 61.73%、67.40%,且优于新疆、多伞阿魏等品种,托里阿魏与圆锥茎阿魏效果较差。在《抗肿瘤药效学指导原则》中要求,研究抗肿瘤药物时,天然药物对肿瘤的抑瘤率大于 40%时,可初步判定该药物具有一定的抗肿瘤作用,具有进一步的研究价值<sup>[21-22]</sup>。故从实验结果显示准噶尔阿魏对结肠癌的抑制作用较好,有待进一步的深入研究与开发。

综上所述,新疆 5 种阿魏中,准噶尔阿魏对人结肠癌 HCT 116 细胞具有增殖抑制、促凋亡作用,对结肠癌 CT-26 小鼠的抑瘤率较高,具有较高的药用价值,因此,本课题后期将以准噶尔阿魏为研究重点,进行 5 种阿魏肝、肾病理切片及生化指标的测定,对人肝、肾正常细胞的影响,从而明确准噶尔阿魏抗肿瘤的有效性及其安全性,为进一步深入研究奠定实验基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 赵嘉宁,梁惠玲,杨娟,等. 天门冬水提物对人结肠癌细胞增殖、凋亡、迁移的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 14-22.
- [ 2 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社; 2020.
- [ 3 ] Zhang HY, Lu J, Zhou LL, et al. Antioxidant and antitumor effects of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20845-20852.
- [ 4 ] 罗福祥,卢军,张海英,等. 新疆阿魏乙酸乙酯部位体内外对 CT-26. WT 细胞的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 238-243.
- [ 5 ] 罗福祥,卢军,张海英. 新疆阿魏乙酸乙酯分离部位对 HCT116 细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(12): 69-72.
- [ 6 ] 毛玉宁,柳森森,巩森森,等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 23-30.
- [ 7 ] 黄虹,黄蝶,王瑞杰,等. 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 31-37.
- [ 8 ] 宣伟军,黄力毅,宣毅,等. 复方健耳剂对抗老年性耳蜗神经细胞凋亡超微结构观察及上调 NeuN 和 BDNF 定位表达作用 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 338-344.
- [ 9 ] 刘友强,王贵英,胡冀陶,等. 洛铂对结肠癌细胞的抗肿瘤活性及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 89-94.
- [ 10 ] Guo B, Han X, Tkach D, et al. AMPK promotes the survival of colorectal cancer stem cells [J]. Animal Model Exp Med, 2018, 1(2): 134-142.
- [ 11 ] Oliveira RC, Abrantes AM, Tralhão JG, et al. The role of mouse models in colorectal cancer research-the need and the importance of the orthotopic models [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 1-8.
- [ 12 ] 杨秀伟. 阿魏属药用植物的物质基础 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(2): 123-144.
- [ 13 ] 黄雅婷,岳丽君,申翔宇,等. 新疆阿魏化学成分及药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(6): 495-499.
- [ 14 ] Kasaian J, Iranshahy M, Masullo M, et al. Sesquiterpene lactones from *Ferula oopoda* and their cytotoxic properties [J]. J Asian Nat Prod Res, 2014, 16(3): 248-253.
- [ 15 ] Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, et al. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from *Ferula ovina* [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2123-2128.
- [ 16 ] 王颀,盛萍,姚蓝,等. 维药多伞阿魏体外抗胃癌活性部位 GC-MS 指纹图谱的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2874-2879.
- [ 17 ] Feng F, Li X, Li R, et al. The multiple-kinase inhibitor lenvatinib inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 178-184.
- [ 18 ] 崔玮,丁玲强,曾巧英. 甘青虎耳草乙酸乙酯提取物对小鼠肝癌细胞及原位移植瘤的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 463-469.
- [ 19 ] Ypsilantis P, Meditskou S, Lambropoulou M, et al. Spontaneous pancreatic undifferentiated pleomorphic sarcoma in a laboratory rat: a case report [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(3): 222-225.
- [ 20 ] 金晶玉,朱成杰,权英实,等. 罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 88-92.
- [ 21 ] 吕建敏,龚金炎,刘士旺,等. 秀珍菇粉对 H22 荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 216-223.
- [ 22 ] 沙依拜·沙比提,丛媛媛,古丽尼歌尔·阿布都米吉提,等. 阿里红多糖体内抗肿瘤作用及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 197-203.

[收稿日期] 2022-05-19

王献珍,李毅,吴晓伟,等. 过表达 microRNA-26a 大鼠表皮干细胞来源外泌体对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 34-42, 56.

Wang XZ, Li Y, Wu XW, et al. Effect of microRNA-26a-overexpressed rat epidermal-stem-cell-derived exosomes on wound healing in rats with deep second-degree burns [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 34-42, 56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.005

## 过表达 microRNA-26a 大鼠表皮干细胞来源外泌体对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响

王献珍,李毅,吴晓伟,崔强\*

(青海大学附属医院,西宁 810000)

**【摘要】** 目的 探究过表达 microRNA-26a(miR-26a)的大鼠表皮干细胞(EPSC)来源外泌体(Exos)对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响。方法 体外培养大鼠 EPSC,用携带 miR-26a-绿色荧光蛋白(GFP)的慢病毒颗粒和阴性对照(NC-GFP)转染以上调 miR-26a 表达,并从未转染的 EPSC、NC-GFP 转染的 EPSC 或 miR-26a-GFP 转染的 EPSC 中分离 Exos,透射电子显微镜(TEM)和纳米粒子追踪分析(NTA)观察 Exos 形态和大小,蛋白质印迹(Western blot)检测 Exos 表面标志物 CD9、CD63 和 CD81 的表达,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 EPSC 及 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达,CCK-8 法检测 EPSC 的增殖活性;小管形成实验评估 miR-26a-EPSC-Exos 对血管生成的影响。建立大鼠深 II 度烧伤模型,分为对照组(control 组)、NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组,每组 30 只。NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠给予相应的 Exos 干预,control 组大鼠给予等体积的 PBS,每周 1 次,持续 3 周。分别在烧伤后第 7、14 和 21 天,观察各组大鼠烧伤创面状况,计算创面愈合率;HE 染色观察创面组织病理学变化,并进行组织学评分;免疫组织化学法检测创面 CD31 阳性表达,计算微血管密度(MVD)。结果 miR-26a 转染可显著升高 EPSC 及其 Exos 中 miR-26a 表达,促进 EPSC 细胞增殖( $P<0.05$ );TEM 和 NTA 分析结果显示,Exos 呈球形,直径范围在 40~150 nm,CD9、CD63 和 CD81 均呈阳性;小管形成实验结果显示,miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加管长度,促进内皮细胞血管生成( $P<0.05$ )。体内动物实验结果显示,miR-26a-EPSC-Exos 可显著加速深 II 度烧伤大鼠创面愈合和修复,增加组织学评分和 MVD( $P<0.05$ )。结论 过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可促进深 II 度烧伤大鼠创面愈合。

**【关键词】** 表皮干细胞;深 II 度烧伤;外泌体;microRNA-26a;血管生成

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0034-09

## Effect of microRNA-26a-overexpressed rat epidermal-stem-cell-derived exosomes on wound healing in rats with deep second-degree burns

WANG Xianzhen, LI Yi, WU Xiaowei, CUI Qiang\*

(Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810000, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of exosomes (Exos) derived from rat epidermal stem cells (EPSC) overexpressing microRNA-26a (miR-26a) on wound healing in rats with deep second-degree burns. **Methods** Rat EPSCs were cultured *in vitro* and transfected with lentiviral particles carrying miR-26a-green fluorescent protein (GFP)

[基金项目] 2018 年青海省卫生计生系统适宜技术推广项目(青卫科[2018]29 号)。

[作者简介] 王献珍(1973—),男,硕士研究生,研究方向:烧伤整形。E-mail:10062690@qq.com

[通信作者] 崔强(1973—),男,本科,研究方向:烧伤整形。E-mail:1181548413@qq.com

and negative control (NC-GFP) to up-regulate the expression of miR-26a. Exos were separated from untransfected, NC-GFP-transfected, NC-GFP-transfected and miR-26a-GFP-transfected EPSCs. Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis were performed to observe the shape and size of the Exos. Western blot was performed to measure the expression of Exo surface markers CD9, CD63 and CD81. Real-time fluorescent quantitative PCR was performed to measure the expression of miR-26a in EPSC and EPSC-Exos, and the CCK-8 method was applied to measure the proliferation activity of EPSC. A tubule formation experiment was performed to evaluate the effect of miR-26a-EPSC-Exos on angiogenesis. A rat model of deep second-degree burns was established and separated into control, NC-EPSC-Exos, and miR-26a-EPSC-Exos groups, with 30 rats in each group. The NC-EPSC-Exos and miR-26a-EPSC-Exos groups were given corresponding Exos intervention, and the control group was given an equal volume of PBS once a week for 3 weeks. On the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days after rats were burnt, the burn wound conditions of the rats in each group were observed and the wound healing rate was calculated. HE staining was performed to observe histopathological changes of the wounds, and histological scores were obtained. An immunohistochemical method was employed to measure the positive expression of CD31 on the wound and calculate the microvessel density. **Results** miR-26a transfection significantly increased the expression of miR-26a in EPSC and its Exos and promoted the proliferation of EPSCs ( $P < 0.05$ ). Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis result showed that Exos were spherical, with a diameter ranging from 40 nm to 150 nm, and positive for CD9, CD63, and CD81. The tubule formation experiments showed that miR-26a-EPSC-Exos was able to significantly increase the tube length and promote endothelial cell angiogenesis ( $P < 0.05$ ). The result of the in vivo experiments showed that miR-26a-EPSC-Exos significantly accelerated wound healing and repair in rats with deep second-degree burns and increased the histological score and microvessel density ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** EPSC-Exos overexpressing miR-26a can promote wound healing in rats with deep second-degree burns.

**[Keywords]** epidermal stem cells; deep second-degree burn; exosomes; microRNA-26a; angiogenesis

皮肤是身体中最大的器官,覆盖整个外表面,在世界范围内,数以百万计的患者出现皮肤烧伤,伴随着巨额的治疗费用,导致死亡和广泛的发病率<sup>[1]</sup>。在深 II 度烧伤中,患者缺乏足够的皮肤来覆盖他们的烧伤,且由于排斥反应,目前无法选择其他捐赠者的皮肤移植<sup>[2]</sup>。目前使用的皮肤替代品和上皮移植物效果有限。因此,迫切需要找到治疗深度烧伤的新方法。

干细胞疗法是一种在治疗深度烧伤领域和再生医学领域中有前景的新方法<sup>[3]</sup>。外泌体(exosomes, Exos)是干细胞的关键分泌产物之一,据报道,间充质干细胞及其 Exos 已被证明可促进烧伤伤口愈合,是一种有前景的促进皮肤伤口愈合的治疗方法<sup>[4-5]</sup>。除了间充质干细胞外,有报道显示,皮肤组织的自我更新和损伤修复主要依赖于表皮干细胞(epidermal stem cells, EPSC)的代偿性增殖和分化。EPSC 是一种多能细胞类型,在伤口愈合和组织再生中起着关键作用<sup>[6-8]</sup>,EPSC 已用于修复烧伤、急性创伤和某些疾病引起的皮肤损伤<sup>[9-10]</sup>。并且有报道称,EPSC 来源的 Exos(EPSC-Exos)在伤口愈合过程中可促进皮肤再生<sup>[11]</sup>;转染 miR-26a 的人 CD34<sup>+</sup>干细胞的 Exos 中 miR-26a 的表达显著升高,并可通过促进血管生成和成骨防止糖皮质激素诱

导的股骨头坏死<sup>[12]</sup>。而 miR-26a 已被证明可能是皮肤伤口愈合有希望的治疗靶点<sup>[13-15]</sup>。因此,本研究以 EPSC 为载体细胞,通过将 miR-26a 转染到 EPSC 中上调 EPSC-Exos 中 miR-26a 的含量以探究其对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

从中国科学院上海药物研究所[SCXK(沪)2020-0005]获得 90 只 SPF 级成年 Sprague Dawley (SD)雄性大鼠,体重(220±20)g,7~8 周龄。饲养在青海大学医学院高原医学研究中心[SYXK(青)2020-0001],所有大鼠都保持在受控环境条件下:温度(22±2)℃,湿度(55±5)%,12 h 光照/12 h 黑暗循环。本研究经青海大学医学院高原医学研究中心实验动物使用与管理委员会批准(IACUC:2021-008),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

#### 1.1.2 细胞

大鼠 EPSC 和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自上海晶抗生物工程有限公司(JK-R2987、JK-CS3528)。细胞在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血

清)中,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。当细胞密度达到 80%~90% 时进行传代,本研究使用第 3~5 代的细胞。

## 1.2 主要试剂与仪器

携带 miR-26a-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的慢病毒颗粒和阴性对照(NC-GFP)购自 Genechem Corporation(中国上海);CCK-8 试剂盒(cell counting kit-8,批号:C0038)、HE 染色试剂(批号:C0105)、RIPA 裂解液(批号:P0013B)和二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(批号:P0012S)购自碧云天生物科技公司;TRIzol 试剂(批号:15596018)、荧光定量<sup>®</sup> RNA 逆转录试剂盒(批号:AB-4366596)购自美国 Invitrogen 公司;SYBR Premix Ex Taq(批号:DRR041A,日本 TAKARA 公司);兔源一抗 CD31(批号:ab182981)和 HRP 偶联的 IgG 二抗(批号:ab6721)购自英国 Abcam 公司;兔源一抗 CD9(批号:MA5-31980)、CD63(批号:PA5-92370)和 CD81(批号:MA5-32333)购自美国 Thermo Scientific 公司。

Synergy LX 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司);IX 70 荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Coulter Optima TM L-80XP 超速离心机(美国 Beckman 公司);Hitachi H-600 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);Nanosight LM10 颗粒跟踪分析仪(英国 Malvern Panalytical 公司);YLS-5Q 超级控温烫伤仪(上海软隆科技发展公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 miR-26a 慢病毒转染 EPSC

将每毫升含  $1 \times 10^5$  个细胞的 EPSC 悬液与 50  $\mu$ L 慢病毒颗粒和 20  $\mu$ L 感染溶液(15  $\mu$ L HiTransB-1 和 5  $\mu$ L HiTransB-2)共孵育 12 h。72 h 后,使用荧光显微镜观察转染效率。实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time quantitative PCR, RT-qPCR)用于检测 2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素分选 20 d 后 EPSC 中 miR-26a 的稳定表达。

此外,CCK-8 试剂盒用于检测细胞活力。将未经转染或转染 NC-GFP、miR-26a-GFP 的 EPSC(5000 个/孔)接种到 96 孔板中,分别为对照组(Ctr 组)、NC-GFP 组、miR-26a-GFP 组,培养 24、48、72 h 后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液。孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测量光密度(optical density, OD)值,OD 值代表细胞活力。

### 1.3.2 Exos 的分离与鉴定

从不同培养组(未转染 EPSC、NC-GFP 转染的 EPSC 或 miR-26a-GFP 转染的 EPSC)的无血清培养基中分离 Exos(依次命名为 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos)。将培养基以 1644 r/min 离心 10 min 和 4245 r/min 离心 10 min 去除死细胞和细胞碎片。然后将上清液 9492 r/min 离心 30 min,然后在超速离心机中以 31480 r/min 离心 70 min 收集 Exos。将沉淀物重新悬浮在 2 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中,并在超速离心机中以 31480 r/min 再次超速离心 70 min。将沉淀的 Exos 重新悬浮在 200  $\mu$ L PBS 中,并储存在-80℃用于后续实验。

Exos 的鉴定:(1)透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察 Exos 形态:使用 TEM 观察 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos 的形态。(2)纳米粒子追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测 Exos 大小:分离后,将 Exos 用 700  $\mu$ L 无菌 PBS 稀释并混合均匀。NanoSight LM 10 分析 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos 的尺寸大小。(3)蛋白质印迹(Western blot)检测 Exos 特异性表面标志物的表达:使用 Western blot 检测 Exos 表面标志物 CD9、CD63 和 CD81 的表达。使用蛋白质分离试剂盒提取 Exos 的蛋白质。使用 BCA 法测定 Exos 的蛋白质浓度,然后在 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上电泳分离等量的总蛋白,然后转移至聚偏二氯乙烯膜(PVDF 膜),室温下用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,然后在 4℃下用指定的抗体 CD9、CD63 和 CD81 孵育过夜,然后在室温下与辣根过氧化物酶抗过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)偶联的 IgG 二抗(1:5000 稀释)一起孵育。使用 Quantity One 分析软件分析结果。

### 1.3.3 RT-qPCR 检测 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达

使用 TRIzol 试剂从 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos 中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒在 42℃下将总 RNA(1  $\mu$ g)转化为第一链互补 cDNA。然后,使用 SYBR Premix Ex Taq 进行 RT-qPCR,条件如下:在 95℃下初始变性 5 min,然后在 94℃下变性 30 s、60℃ 20 s、72℃ 25 s,进行 40 个循环。相对 miR-26a 表达被归一化为 U6。采

用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行定量。使用的引物序列如下: miR-26a 正向引物序列 (5' - 3'): CGTCCTCAAGTAATCCAGGA 和反向引物序列 (5' - 3'): GCAGGGTCCGAGGTATTC; U6 正向引物序列 (5' - 3'): GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT 和反向引物序列 (5' - 3'): CGCTTCACGAATTTGC GTGTCAT。

### 1.3.4 CCK-8 法检测 miR-26a-EPSC-Exos 对 EPSC 增殖的影响

将 EPSC 以每孔 5000 个细胞的密度置于 96 孔板中,用含 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos (终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的培养基分别处理。然后,在处理 24、48 和 72 h 向每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

### 1.3.5 小管形成实验

评估 miR-26a-EPSC-Exos 对血管生成的影响,使用 HUVEC 进行该测定。将 HUVEC 接种到 6 孔板中,并在无血清培养基中用 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理。然后将细胞接种到涂有 Matrigel 的 24 孔板上 (2.5  $\times$  10<sup>4</sup> 个/孔),在 5% CO<sub>2</sub> 中于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 12 h。然后用 1% 戊二醛-2% 多聚甲醛溶液固定。在光学显微镜下观察内皮细胞管状网络的图像并拍照,用 Image J 软件测量管长度。

### 1.3.6 大鼠深 II 度烧伤模型的建立和 EPSC-Exos 治疗

将大鼠用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后,脱去背部毛发并消毒。参考文献<sup>[16-17]</sup>方法采用烫伤仪在骶尾部拟造模区相同位置选取一直径为 2 cm 区域制备深 II 度烧伤大鼠模型,参数设置为:压力 0.03 MPa、温度 106 $^{\circ}\text{C}$  持续时间 5 s (以上造模条件已经病理切片证实)。伤口部位用无菌生理盐水清洗。造模后乳酸钠林格溶液 (5 mL) 腹腔注射抗休克。

造模后将大鼠分为:对照组 (control 组)、NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组,每组 30 只。NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠分别在伤口周围注射 100  $\mu\text{g}$  Exos (NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos,悬浮于 200  $\mu\text{L}$  PBS 中),control 组大鼠给予等体积的 PBS,每周 1 次,持续 3 周。

### 1.3.7 创面状况观察和创面愈合率

观察各组大鼠烧伤创面状况,包括皮肤颜色、

结痂状况、分泌物、愈合状况等。每 7 d 用照片记录一次皮肤损伤,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量和分析伤口大小。创面愈合率 = (1 - 伤口面积/原始面积)  $\times$  100%。重复 3 次,取平均值作为实验结果。

### 1.3.8 HE 染色

分别在烧伤后第 7、14 和 21 天每组随机选取 10 只大鼠,处死后取伤口周围皮肤 (4 mm<sup>2</sup>),并固定在 4% 多聚甲醛 (pH = 7.4) 中,脱水、石蜡包埋,切成 4  $\mu\text{m}$  切片,经 HE 染色后进行光学显微镜检查。根据以下参数:再上皮化、炎症反应、巨噬细胞、血管生成和肉芽组织形成,对每张切片进行 1~10 的伤口愈合组织学评分<sup>[18]</sup>。

### 1.3.9 免疫组织化学法

各组石蜡组织切片经二甲苯和分级乙醇脱蜡复水。使用蛋白酶 K 溶液 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下进行抗原修复 15 min。切片用山羊血清封闭 30 min,然后与一抗 CD31 (1:100) 在 4 $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜。洗涤后,将切片与荧光标记的二抗 (1:2000) 在室温下孵育 1 h。DAPI 染核,显微镜观察。每张切片随机选择 5 个区域计数 CD31 阳性细胞评估微血管密度 (microvessel density, MVD)。

## 1.4 统计学方法

数据统计分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件,以平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染效率和细胞活力

在荧光显微镜下成功观察到转染 NC-GFP 和 miR-26a-GFP 的 EPSC,见图 1;与 Ctr 组和 NC-GFP 组相比,miR-26a 转染可显著促进 EPSC 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ),见表 1;RT-qPCR 检测结果显示,与 Ctr 组和 NC-GFP 组相比,miR-26a-GFP 组 EPSC 中 miR-26a 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

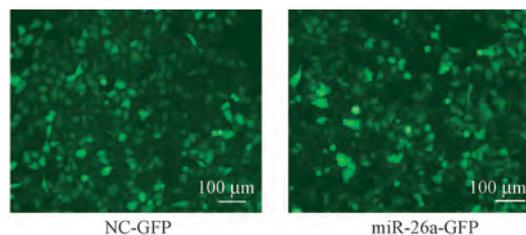


图 1 NC-GFP 和 miR-26a-GFP 的转染效率

Figure 1 Transfection efficiency of NC-GFP and miR-26a-GFP

## 2.2 EPSC-Exos 中 Exos 的表征和 miR-26a 表达

TEM 和 NTA 分析结果见图 2, Exos 呈球形, 直径范围在 40~150 nm 之间; Western blot 结果显示 Exos 的表面生物标志物 CD9、CD63 和 CD81 均呈阳性。RT-qPCR 结果显示, 与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 中 miR-26a 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

## 2.3 miR-26a-EPSC-Exos 对 EPSC 增殖的影响

与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加 EPSC 增殖活性 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

## 2.4 miR-26a-EPSC-Exos 对内皮细胞血管生成的影响

与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加管长度 ( $P < 0.05$ ), 见图 3 和表 3。

## 2.5 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响

烧伤后第 0 天, 所有烧伤组皮肤创面呈圆形, 灰白色, 边缘光滑。烧伤后第 7 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组大鼠创面有深色干痂, 且结痂厚度不均匀, 部分基底有黄色液体渗出; miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面呈淡红色, 边缘清晰, 烧伤部位覆盖有干痂; 烧伤后第 14、21 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组大鼠的烧伤面积缓慢减少, 仍可见红肿及少量分泌物, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面基本愈合, 痂已经脱落, 新的皮肤组织暴露出来, 见图 4。烧伤后第 14、21 天, 与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面愈合率显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 NC-EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面愈合率显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 4 和表 4。

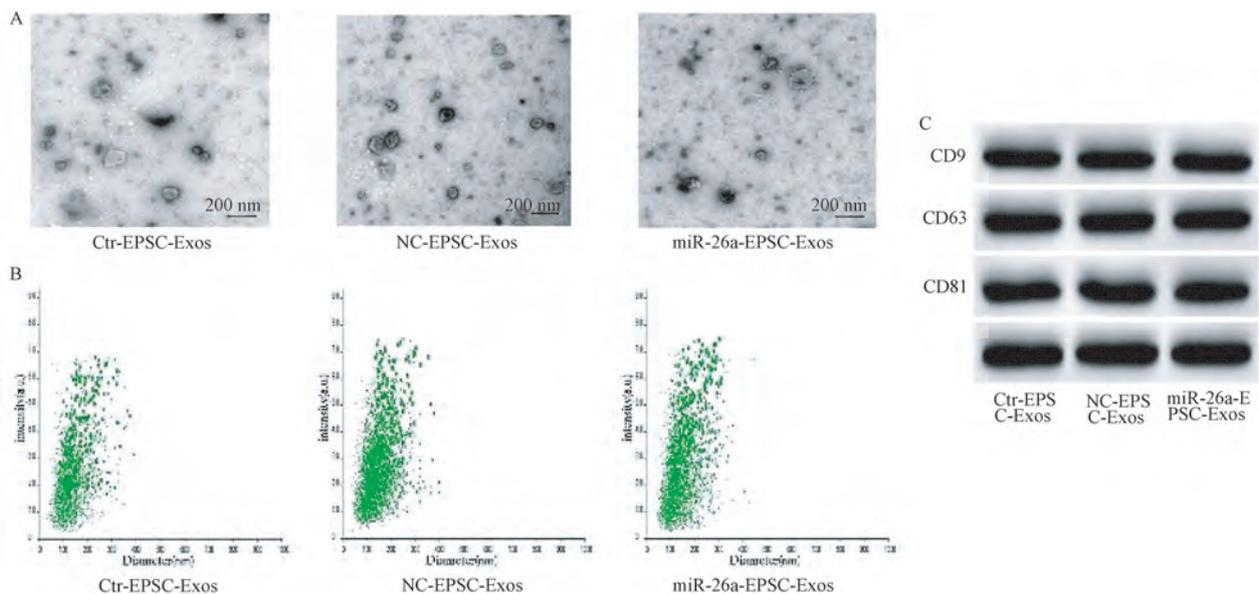
表 1 各组 EPSC 细胞活力和 miR-26a 水平比较 ( $n=3$ )

Table 1 Comparison of EPSC cell activity and miR-26a level in each group

组别 Groups	细胞活力 Cell activity (OD <sub>450</sub> )			miR-26a
	24 h	48 h	72 h	
对照组 Ctr group	0.35±0.06	0.50±0.07	0.63±0.08	1.00±0.00
NC-GFP	0.33±0.05	0.47±0.08	0.62±0.07	1.02±0.13
miR-26a-GFP	0.52±0.07 <sup>ab</sup>	0.73±0.09 <sup>ab</sup>	0.89±0.11 <sup>ab</sup>	3.49±0.37 <sup>ab</sup>

注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-GFP 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ctr group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with NC-GFP group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .



注: A: 外泌体形态; B: 外泌体尺寸; C: 外泌体表面标记物 CD9、CD63 和 CD81 的表达。

图 2 Exos 的表征

Note. A, Exos morphology. B, Exos size. C, Expression of Exos surface markers CD9, CD63 and CD81.

Figure 2 Characterization of Exos

### 2.6 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面组织病理学变化的影响

在烧伤后第 7、14 和 21 天 ( $n = 10$ ) 对大鼠进行了组织学评估。HE 染色结果显示, 烧伤后第 7 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组可见少量表皮细胞增殖, 新生肉芽较少, 坏死组织以及炎性细胞浸润较多; miR-26a-EPSC-Exos 组可观察到大量表皮细胞, 肉芽组织生长迅速, 毛细血管增生, 炎性细胞浸润减

表 2 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达比较 ( $n = 3$ )

Table 2 Comparison of miR-26a expression in EPSC-Exos

组别 Groups	miR-26a
Ctrl-EPSC-Exos	1.00±0.00
NC-EPSC-Exos	1.05±0.14
miR-26a-EPSC-Exos	3.21±0.35 <sup>ab</sup>

注: 与 Ctrl-EPSC-Exos 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ctrl-EPSC-Exos group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with NC-EPSC-Exos group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 3 各组 EPSC 增殖活性和管长度比较 ( $n = 3$ )

Table 3 Comparison of EPSC proliferation activity and tube length in each group

组别 Groups	细胞活力 Cell activity (OD <sub>450</sub> )			管长度 (μm/field) Tube length
	24 h	48 h	72 h	
Ctrl-EPSC-Exos	0.31±0.04	0.45±0.06	0.53±0.07	6357.29±758.44
NC-EPSC-Exos	0.32±0.05	0.47±0.05	0.56±0.06	6428.34±705.65
miR-26a-EPSC-Exos	0.45±0.06 <sup>ab</sup>	0.66±0.07 <sup>ab</sup>	0.78±0.08 <sup>ab</sup>	12049.56±962.18 <sup>ab</sup>

注: 与 Ctrl-EPSC-Exos 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Ctrl-EPSC-Exos group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with NC-EPSC-Exos group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

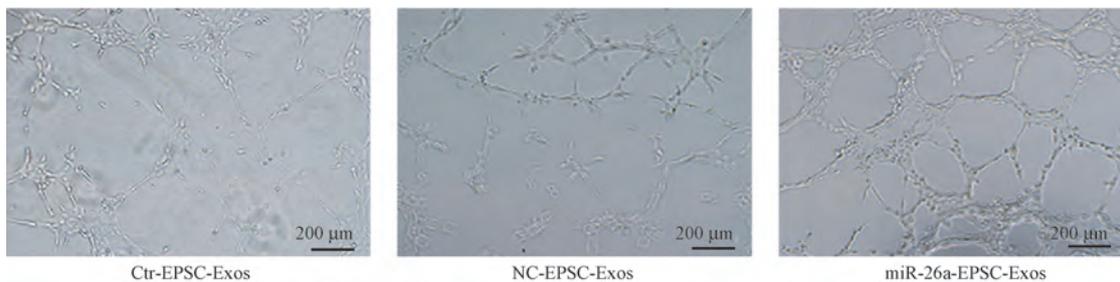


图 3 各组内皮细胞的管形成能力

Figure 3 Tube-forming ability of endothelial cells in each group

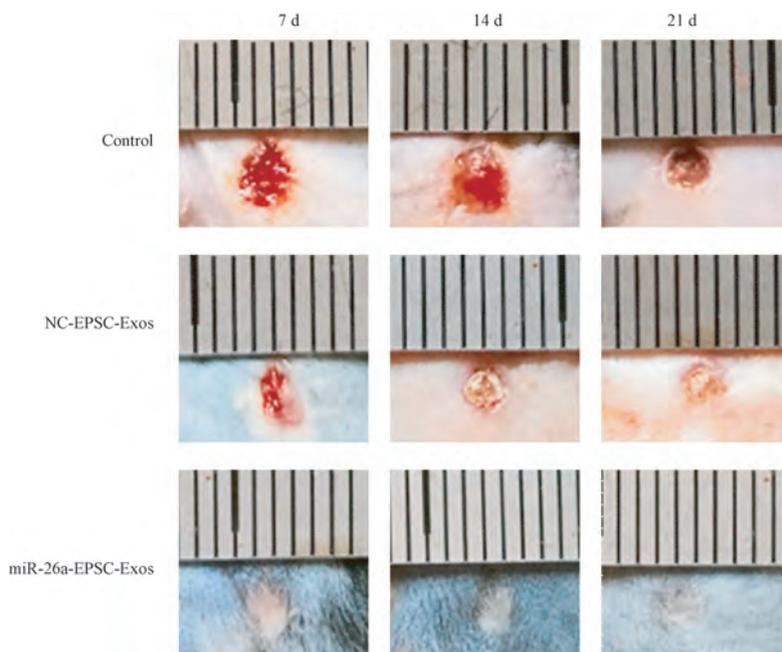


图 4 各组大鼠创面愈合情况

Figure 4 Wound healing of rats in each group

少;烧伤后第 14、21 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组创面出现较薄的新生上皮组织, 炎性细胞浸润减少; miR-26a-EPSC-Exos 组可见新生的表皮细胞基本覆盖了整个创面, 新生表皮组织向上、向创面方向生长, 可见大量新生肉芽组织, 毛细血管含量更丰富, 未见炎性细胞, 表现出显著增加的再上皮化, 见图 5。在烧伤后第 7、14 和 21 天, 与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面组织学评分显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 NC-

EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面组织学评分显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 5 和表 5。

## 2.7 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面血管生成的影响

与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面 CD31 表达呈强阳性, MVD 显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 NC-EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面 MVD 显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 6 和表 6。

表 4 各组大鼠创面愈合率比较 ( $n = 10$ )

Table 4 Comparison of wound healing rate of rats in each group

组别 Groups	创面愈合率 (%) Wound healing rate		
	7 d	14 d	21 d
Control	9.58±1.24	45.35±4.61	72.76±5.90
NC-EPSC-Exos	10.03±1.46	51.70±5.23 <sup>a</sup>	83.14±6.25 <sup>a</sup>
miR-26a-EPSC-Exos	28.20±1.75 <sup>ab</sup>	63.49±6.85 <sup>ab</sup>	95.23±6.36 <sup>ab</sup>

注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with NC-EPSC-Exos group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 5 各组大鼠创面组织学评分比较 ( $n = 10$ )

Table 5 Comparison of wound histological scores of rats in each group

组别 Groups	创面组织学评分 Wound histological scores		
	7 d	14 d	21 d
Control	2.49±0.35	4.08±0.50	5.11±0.64
NC-EPSC-Exos	3.15±0.39 <sup>a</sup>	4.72±0.55 <sup>a</sup>	5.90±0.67 <sup>a</sup>
miR-26a-EPSC-Exos	3.64±0.42 <sup>ab</sup>	6.59±0.61 <sup>ab</sup>	7.21±0.80 <sup>ab</sup>

注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with NC-EPSC-Exos group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

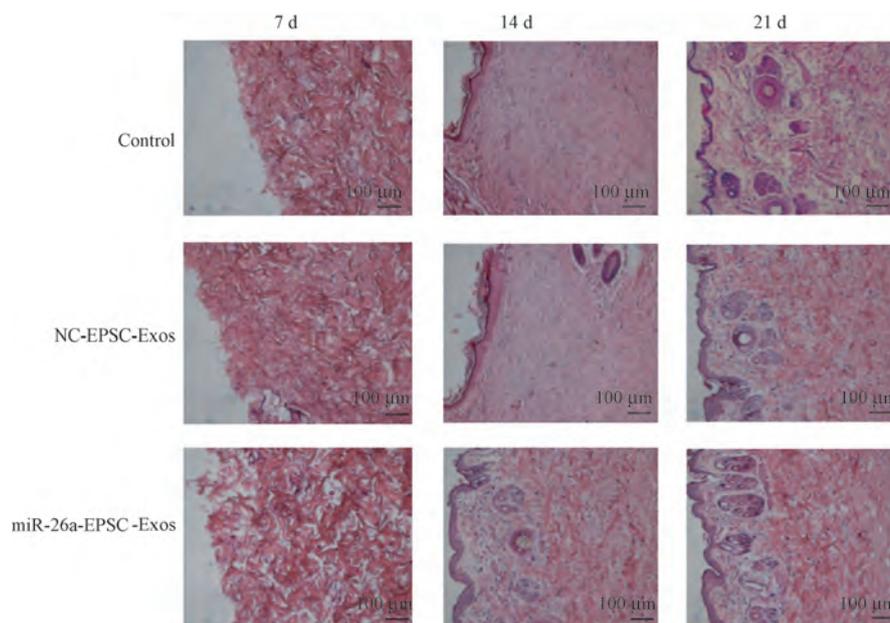


图 5 各组大鼠创面组织 HE 染色

Figure 5 HE staining of wound tissue of rats in each group

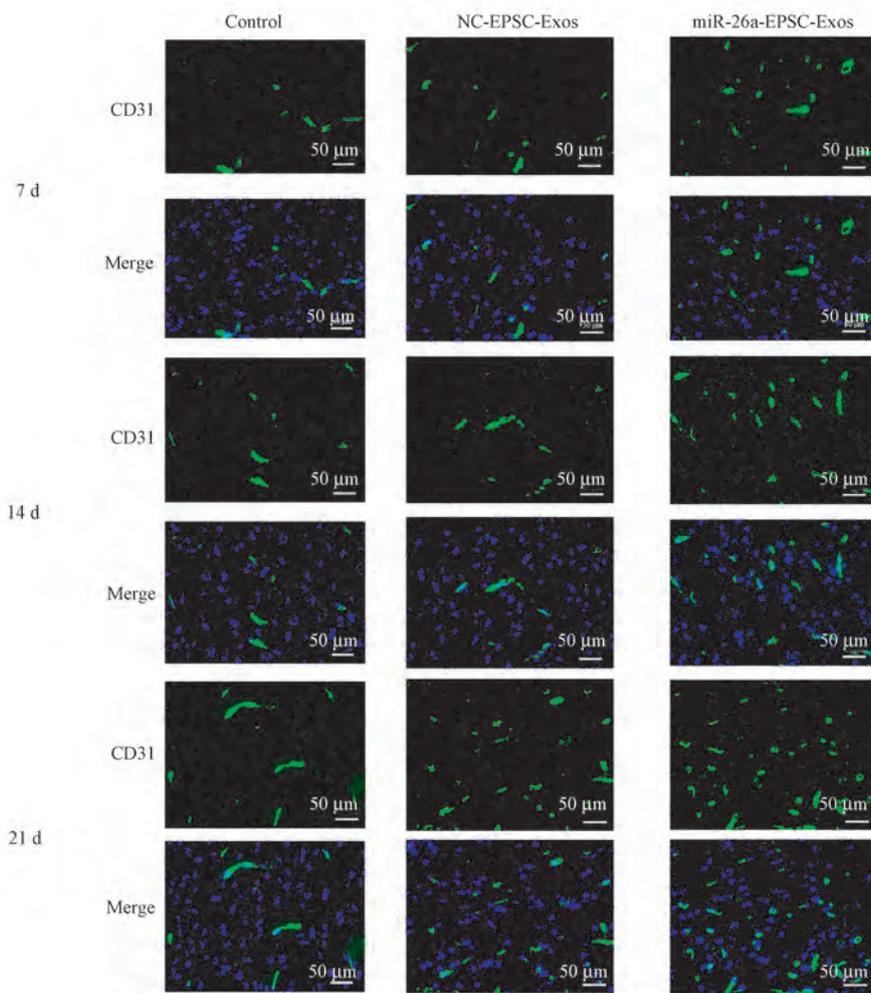


图 6 各组大鼠创面血管生成情况

Figure 6 The angiogenesis of the wound in each group of rats

表 6 各组大鼠创面 MVD 比较 (n = 10)

Table 6 Comparison of MVD in wounds of rats in each group

组别 Groups	微血管密度(高倍视野) MVD/HPF (high-power field)		
	7 d	14 d	21 d
Control	20.35±3.48	33.08±4.25	51.20±7.16
NC-EPSC-Exos	34.19±3.76 <sup>a</sup>	42.36±5.81 <sup>a</sup>	63.45±8.22 <sup>a</sup>
miR-26a-EPSC-Exos	51.60±5.35 <sup>ab</sup>	70.09±8.32 <sup>ab</sup>	85.61±8.91 <sup>ab</sup>

注:与对照组相比, <sup>a</sup>P<0.05;与 NC-EPSC-Exos 组相比, <sup>b</sup>P<0.05。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup>P<0.05. Compared with NC-EPSC-Exos group, <sup>b</sup>P<0.05.

### 3 讨论

烧伤是皮肤损伤的常见原因。如何有效促进创面愈合是烧伤创面治疗的一个重要问题。

微小 RNA (microRNA, miRNA 或 miR) 在血管生成和伤口愈合中发挥重要作用。据报道, miR-26a 可促进大鼠脑梗死模型和小鼠心肌梗死模型血管生成<sup>[13-14]</sup>, 并且可延长皮肤同种异体移植存活<sup>[15]</sup>; 提示, miR-26a 可能是皮肤伤口愈合有希望的治疗靶点。然而, 使用合成 miRNA 进行治疗的一

个主要挑战是, 外源性添加的 miRNA 会被血浆中高水平的核糖核酸酶迅速降解, 或者被吞噬作用、肾滤过或胆汁排泄迅速清除, 从而导致较小的组织积累和较小的治疗效果<sup>[19-20]</sup>。以上这些缺点可以通过使用 Exos 作为 miRNA 载体来克服<sup>[21]</sup>。由于 Exos 稳定表达 miRNA, 并且对受体无细胞毒性和致突变性, 因此, 与基于病毒或脂质体的基因递送载体相比, 它们的寿命更长。Exos 一旦进入细胞, 就可以介导细胞间信号转导, 发挥生物调节作用。

干细胞通过旁分泌信号发挥修复作用, 通过释

放生物活性因子影响细胞增殖和迁移<sup>[22]</sup>。Exos 是众多细胞类型分泌的重要旁分泌因子,也被认为是通过将功能性蛋白质或 miRNA 转运至相邻细胞的细胞间通讯介质,在组织修复和再生中起主导作用<sup>[23-24]</sup>。Exos 的膜与它们的亲代细胞高度相似<sup>[25]</sup>,稳定 Exos 膜内的 miRNA 可提供有效的细胞-靶标传递系统。在烧伤修复过程中,重新上皮化对于恢复表皮是必要的,而 EPSC 在促进上皮再形成方面发挥着关键作用。EPSC 具有高增殖和分化潜力,参与维持皮肤的正常结构和功能,改变 EPSC 增殖能力是促进皮肤伤口愈合的有效方法<sup>[10]</sup>。因此,我们将 miR-26a 慢病毒颗粒转染到 EPSC 以提高 EPSC-Exos 中 miR-26a 水平,并探究其对 EPSC 增殖活性的影响。结果显示,在 EPSC 中过表达 miR-26a 后,其 Exos 会诱导更高的 EPSC 增殖活性;此外,我们发现过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 促进了 HUVEC 细胞小管的形成,表明 EPSC-Exos 通过 miR-26a 对血管生成发挥促进作用。

基于这些体外实验结果,我们使用过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 治疗皮肤烧伤大鼠。在深 II 度烧伤大鼠中,我们发现,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可显著加速深 II 度烧伤大鼠创面愈合;组织学评估显示,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 促进了伤口的再上皮化,并增加了伤口评分,表明伤口愈合增强;最后,内皮蛋白 CD31 的免疫组织化学染色证实,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 增加了用 EPSC-Exos 治疗的伤口毛细血管密度。提示,EPSC 分泌的因子可以促进血管生成和伤口愈合。我们首次证明 EPSC-Exos 介导的 miR-26a 递送可能为深 II 度烧伤提供一种有前景的治疗策略。

综上所述,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可促进深 II 度烧伤大鼠创面愈合。本研究的主要关注点是过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 对伤口愈合的影响,未对其机制进行深入探索,在未来的研究中会结合体外细胞实验,分析其作用机制。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Wu Z, Zhu M, Mou XX, et al. Overexpressing of caveolin-1 in mesenchymal stem cells promotes deep second-degree burn wound healing [J]. *J Biosci Bioeng*, 2021, 131(4): 341-347.
- [ 2 ] Ayaz M. Scrub sponge as a wound debridement device [J]. *Bull Emerg Trauma*, 2021, 9(2): 96-100.
- [ 3 ] Costa de Oliveira Souza CM, de Souza CF, Mogharbel BF, et al. Nanostructured cellulose-gellan-xyloglucan-lysozyme dressing seeded with mesenchymal stem cells for deep second-degree burn treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16(1): 833-850.
- [ 4 ] Imbarak N, Abdel-Aziz HI, Farghaly LM, et al. Effect of mesenchymal stem cells versus aloe vera on healing of deep second-degree burn [J]. *Stem Cell Investig*, 2021, 8(1): 12-26.
- [ 5 ] Liu J, Yan Z, Yang F, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing by enhancing angiogenesis through delivering Angiopoietin-2 [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(2): 305-317.
- [ 6 ] Shi Y, Yang R, Tu L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes burn wound healing by regulating epidermal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 1811-1820.
- [ 7 ] Zhao X, Bian R, Wang F, et al. GDF-5 promotes epidermal stem cells proliferation via Foxg1-cyclin D1 signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 42-52.
- [ 8 ] Yang R, Liu F, Wang J, et al. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 229-242.
- [ 9 ] Li Y, Zhang J, Yue J, et al. Epidermal stem cells in skin wound healing [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2017, 6(9): 297-307.
- [ 10 ] Yang R, Wang J, Zhou Z, et al. Role of caveolin-1 in epidermal stem cells during burn wound healing in rats [J]. *Dev Biol*, 2019, 445(2): 271-279.
- [ 11 ] Duan M, Zhang Y, Zhang H, et al. Epidermal stem cell-derived exosomes promote skin regeneration by downregulating transforming growth factor- $\beta$ 1 in wound healing [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 452-462.
- [ 12 ] Zuo R, Kong L, Wang M, et al. Exosomes derived from human CD34<sup>+</sup> stem cells transfected with miR-26a prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis and osteogenesis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 321-334.
- [ 13 ] Liang Z, Chi YJ, Lin GQ, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [ 14 ] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. *Circ Res*, 2013, 113(11): 1231-1241.
- [ 15 ] Xie F, Chai J, Zhang Z, et al. MicroRNA 26a prolongs skin allograft survival and promotes regulatory T cell expansion in mice [J]. *Transpl Int*, 2015, 28(10): 1143-1151.
- [ 16 ] 李飞龙, 黄赵刚, 程钢, 等. 制痂酊对大鼠深 II 度烧伤的创面修复及作用机制 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(8): 1164-1168.
- [ 17 ] 浦春宁, 陈骅, 凌书建. 大蒜素对大鼠烧伤创面愈合的影响及其机制 [J]. *中国中医急症*, 2020, 29(11): 1971-1975.

(下转第 56 页)

王晓宏,孙凯,朴丽,等. 白藜芦醇通过 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 43-48.

Wang XH, Sun K, Piao L, et al. Protective effect and mechanism of resveratrol on hypoxic brain injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 43-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.006

# 白藜芦醇通过 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复

王晓宏<sup>1</sup>, 孙凯<sup>2</sup>, 朴丽<sup>1</sup>, 徐兆宁<sup>1</sup>, 于秀丽<sup>1</sup>, 林佳楠<sup>1</sup>, 周莉<sup>1</sup>, 夏美慧<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学第一医院, 长春 130021; 2. 北大荒集团总医院, 哈尔滨 150088)

**【摘要】** 目的 探讨白藜芦醇通过 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用机制。方法 利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统建立小鼠间歇性缺氧模型。检测小鼠缺氧耐受时间、呼吸频率和心率变化。组织病理学染色检测大鼠脑组织形态学改变。Western blot 方法检测小鼠脑组织中 HIF-1 $\alpha$ 、P53、BNIP3、Beclin 1、LC3、P62 的蛋白表达水平。结果 与缺氧组比, 白藜芦醇能够延长小鼠缺氧耐受时间, 增大缺氧小鼠的呼吸频率, 降低缺氧小鼠的心率, 缓解海马区脑组织损伤, 下调 HIF-1 $\alpha$ 、P53、Beclin 1、LC3 蛋白表达, 上调 P62 蛋白表达。结论 白藜芦醇下调 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 介导的自噬信号通路, 达到促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用。

**【关键词】** 缺氧性脑损伤; 白藜芦醇; HIF-1 $\alpha$ /BNIP3; 自噬

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0043-06

## Protective effect and mechanism of resveratrol on hypoxic brain injury in mice

WANG Xiaohong<sup>1</sup>, SUN Kai<sup>2</sup>, PIAO Li<sup>1</sup>, XU Zhaoning<sup>1</sup>, YU Xiuli<sup>1</sup>, LIN Jianan<sup>1</sup>, ZHOU Li<sup>1</sup>, XIA Meihui<sup>1\*</sup>

(1. the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China.

2. Beidahuang Group General Hospital, Herbin 150088)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of resveratrol on the repair of hypoxic brain injury through the HIF-1 $\alpha$ /BNIP3-mediated autophagy signaling pathway in mice. **Methods** A mouse model of intermittent hypoxia was established using the CQY-1 small animal hypoxia detection system. The hypoxia tolerance time, respiratory rate, and heart rate changes of the mice were detected. Histopathological staining was used to detect morphological changes to the mice brain. Western blot was used to detect the protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , P53, BNIP3, Beclin 1, LC3 and P62 in mice brain tissue. **Results** Compared with the findings in the hypoxia group, resveratrol prolonged the hypoxia tolerance time; increased the respiratory rate and reduced the heart rate of hypoxic mice; alleviate brain tissue damage in the hippocampus; down-regulated HIF-1 $\alpha$ , P53, Beclin 1 and LC3 protein expression; and up-regulated P62 protein expression. **Conclusions** Resveratrol down-regulates HIF-1 $\alpha$ /BNIP3-mediated autophagy signaling pathway gene expression to promote the repair of hypoxic brain injury in mice.

**【Keywords】** hypoxic brain injury; resveratrol; HIF-1 $\alpha$ /BNIP3; autophagy

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20210506020ZP); 吉林省卫生健康科技能力提升项目(2021JC008); 吉林大学第一医院青年发展基金(第十一届)(JDYY11202011)。

[作者简介] 王晓宏(1986—), 女, 本科, 研究方向: 临床护理。E-mail: wxh19861217lw@163.com

[通信作者] 夏美慧(1981—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 缺氧机制研究。E-mail: xiamh@jlu.edu.cn

临床上,缺氧是多种疾病导致组织病理改变的共同始发因素,而脑组织是机体对缺氧最为敏感的靶器官,在缺氧环境中很容易受到“伤害”<sup>[1]</sup>。脑缺氧损伤过程中,缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  起到关键的作用<sup>[2]</sup>。BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调<sup>[3]</sup>。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用<sup>[4]</sup>。还有报道显示,BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生<sup>[5]</sup>。白藜芦醇(resveratrol, Re)具有抗炎、抗氧化、抗癌、心血管保护等多种功能<sup>[6-8]</sup>。虽然有足够的证据表明白藜芦醇在许多相关的功能和途径中发挥作用,但白藜芦醇对缺氧暴露引起的脑损伤的作用机制还需要进一步的探索。本研究旨在研究白藜芦醇对小鼠间接性缺氧导致的脑损伤的保护作用机制,为临床治疗缺氧性脑损伤提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

20 只 SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,8 周龄,体重 20~22 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[SCXK(吉)2020-0002]。随机数字法将 20 只 BALB/c 小鼠分为对照组(Con)、缺氧组(Hypoxia)、白藜芦醇组(Re)、缺氧+白藜芦醇组(Re+Hypoxia),每组 5 只,用于研究白藜芦醇对小鼠缺氧性脑损伤作用机制研究。所有小鼠在建模前均适应性常规喂饲 1 周,屏障环境设施中每天 07:00~19:00 定时光照,昼夜规律。依据预实验结果,白藜芦醇组小鼠每日缺氧前 1 h 尾静脉注射 25 mg/kg 白藜芦醇溶液。本研究经吉林大学基础医学院实验动物福利伦理委员会批准((2021 年)研审第(197)号),在吉林大学基础医学院动物实验中心屏障动物实验设施进行[SYXK(吉)2018-0001]。

### 1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇购自北京索莱宝科技有限公司(中国);HIF-1 $\alpha$ 、P53、BNIP3、LC3、Beclin 1、P62、 $\beta$ -actin 一抗购自 Cell signaling technology 公司(美国);二抗购自碧云天生物公司(中国)。CQY-1 型小动物缺氧检测系统购自中国成都仪器厂。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小鼠间歇性缺氧模型的建立

利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统,将小鼠置

于缺氧瓶内,封闭好后,连接仪器,打开监测程序。初始氧含量为 21.21%,当氧含量降至 15%时,将小鼠取出,连续进行 7 d。

#### 1.3.2 指标检测

(1)小鼠缺氧耐受时间。记录每组小鼠从初始氧含量 21.21%降至 15%时所需的时间。

(2)小鼠呼吸频率。利用软件计算小鼠瞬时呼吸频率。

(3)小鼠心率。利用软件计算小鼠瞬时时心率。

#### 1.3.3 脑组织 HE 染色

实验结束后,二氧化碳吸入法对小鼠实施安乐死,迅速分离脑组织,福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色,显微镜下观察小鼠脑组织海马区病理情况。

#### 1.3.4 Western blot

取脑组织,RIPA 裂解液裂解脑组织。测定蛋白浓度后煮沸变性,SDS-PAGE 进行分离。湿法转膜 120 V,30 min。一抗、二抗孵育后使用 Syngene Bio Imaging ECL 发光成像系统检测蛋白表达检测和观察分析。

## 1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 25.0 软件处理。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。本研究中的所有测量值均表示为至少 3 个独立实验的平均值。使用 Student's *t* 检验或方差分析对组比较结果进行分析。如果  $P<0.05$ ,所有差异均具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白藜芦醇对小鼠体重的影响

以缺氧 7 d 建立的小鼠间歇性缺氧模型开展实验。动物分组为:对照组、缺氧组、白藜芦醇组、缺氧+白藜芦醇组。比较各组小鼠体重差异,结果如图 1 显示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的体重有所上升,提示白藜芦醇可能具有保护作用。

### 2.2 小鼠缺氧耐受时间的比较

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠缺氧耐受能力。结果如图 2 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的缺氧耐受时长明显提高。这提示,白藜芦醇可能提高了小鼠脑组织中氧的利用率。

### 2.3 小鼠呼吸频率的变化

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠呼吸频率的变化。利用软件分析缺氧组及缺氧+白藜芦醇组小鼠每次缺氧时呼吸频率的变化。结果如图 3 所

示,与缺氧组小鼠相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的呼吸频率显著降低。

### 2.4 小鼠心率的变化

比较缺氧组和缺氧+白藜芦醇组小鼠心率的差异。结果如图 4 显示,与缺氧组小鼠相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的心率明显增加。利用软件进行计算,缺氧+白藜芦醇组小鼠的平均心率为 333 bpm,明显高于缺氧 7 d 小鼠的平均心率为 298 bpm,但低于对照组平均心率为 353 bpm。

### 2.5 小鼠脑组织海马区病理学改变

为了更直观的观察白藜芦醇对小鼠脑组织海马区的影响。HE 染色结果比较各组海马区的形态。如图 5 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠的海马区的神经细胞明显增多,且水肿情况得到显著改善。神经细胞和胶质细胞间的细胞间隙明显变小,说明白藜芦醇对小鼠脑组织缺氧性损伤具有保护作用。

### 2.6 缺氧标志蛋白表达水平

Western blot 方法检测间歇性缺氧组小鼠缺氧标志蛋白 HIF-1 $\alpha$ 、P53 的表达水平。检测结果如图 6 所示,与缺氧组相比,缺氧+白藜芦醇组小鼠脑组织中的 HIF-1 $\alpha$ 、P53 的基因表达水平显著降低。

### 2.7 白藜芦醇通过 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 介导的自噬信号通路促进小鼠缺氧性脑损伤修复的机制

BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用。还有报道显示,

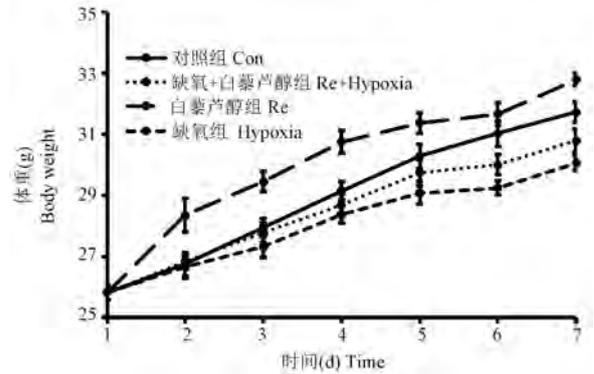


图 1 小鼠体重变化

Figure 1 Body weight of mice

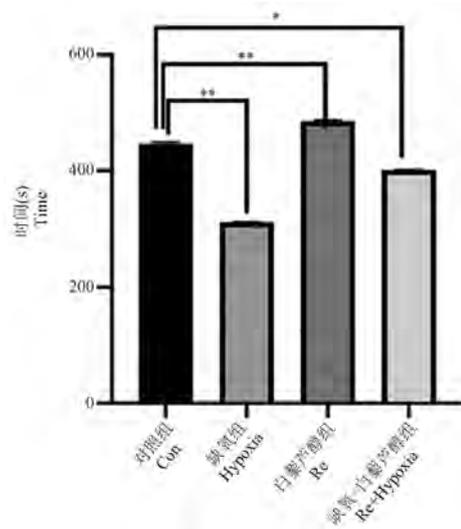


图 2 小鼠缺氧耐受时间

Figure 2 Hypoxia tolerance time of mice

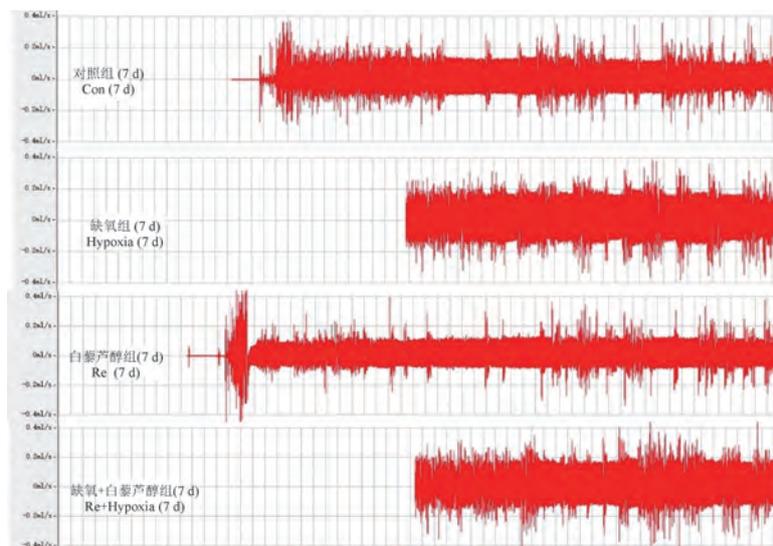


图 3 小鼠呼吸频率

Figure 3 The respiratory rate of mice

BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生。

为了分析白藜芦醇对小鼠间接性缺氧导致的脑损伤的保护作用,采用 Western blot 方法检测间歇性缺氧对小鼠脑组织中 BNIP3 及其介导的自噬相关蛋白表达的影响。检测结果如图 7 和图 8 显示,

与对照组相比,缺氧组中 BNIP3、Beclin 1、LC3 表达水平显著上调。加入白藜芦醇预处理,上述蛋白表达明显下调。与对照组相比,缺氧组中 P62 表达水平显著下调。加入白藜芦醇预处理,P62 蛋白表达明显上调。这与 BNIP3、Beclin 1 等蛋白的作用相一致。P62 作为自噬受体蛋白,在自噬过程中随着自

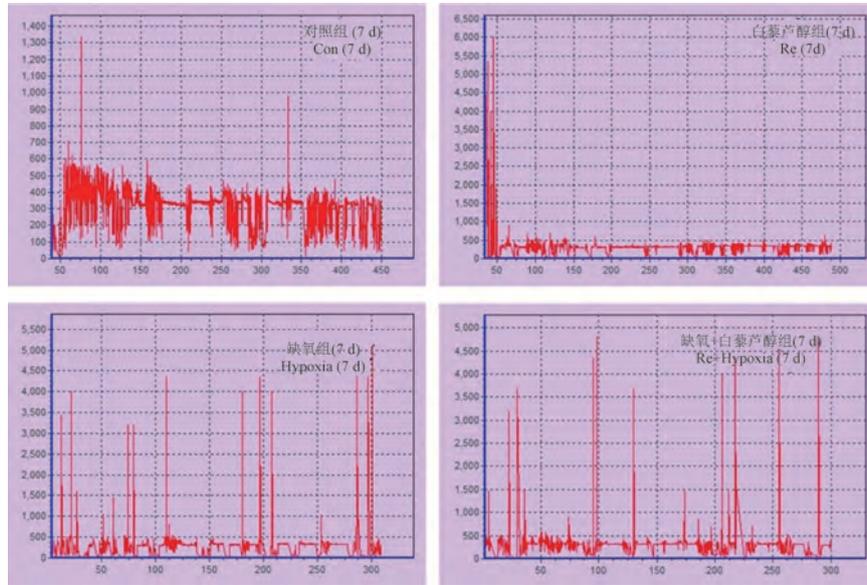


图 4 小鼠心率水平

Figure 4 Heart rate levels of mice

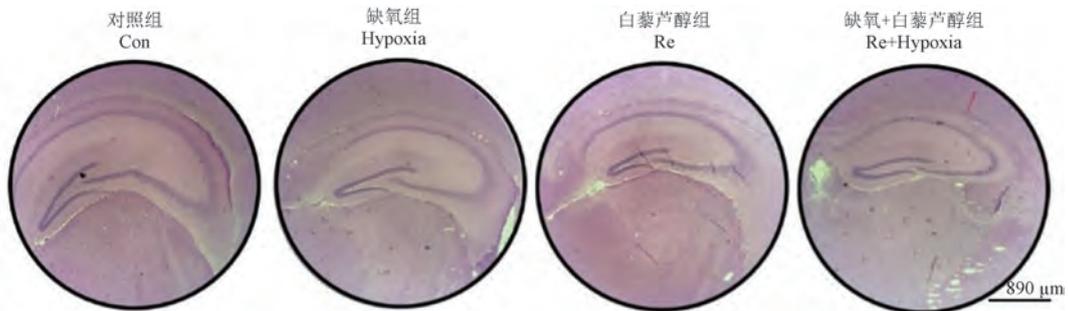


图 5 小鼠脑组织海马体形态

Figure 5 Morphology of hippocampus of mice brain tissue

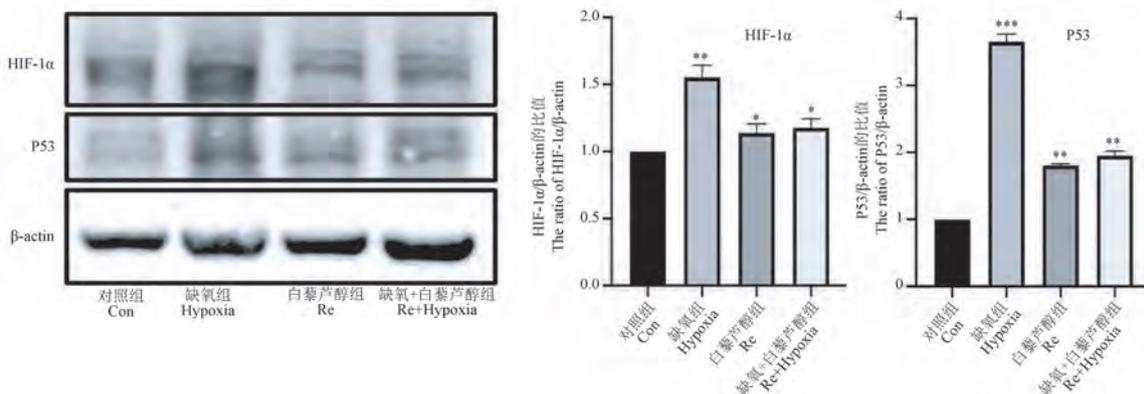


图 6 缺氧小鼠脑组织缺氧标志蛋白表达水平

Figure 6 Expression levels of hypoxia marker proteins in the brain tissue of hypoxic mice

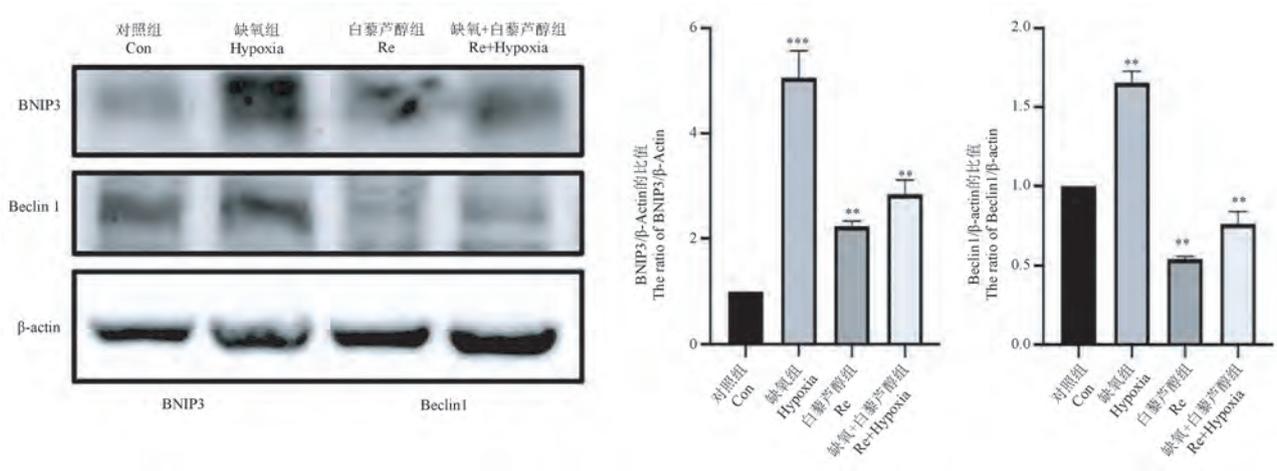


图 7 Western blot 方法检测 BNIP3、Beclin 1 蛋白表达水平  
Figure 7 Western blot analysis of expression levels of BNIP3 and Beclin 1

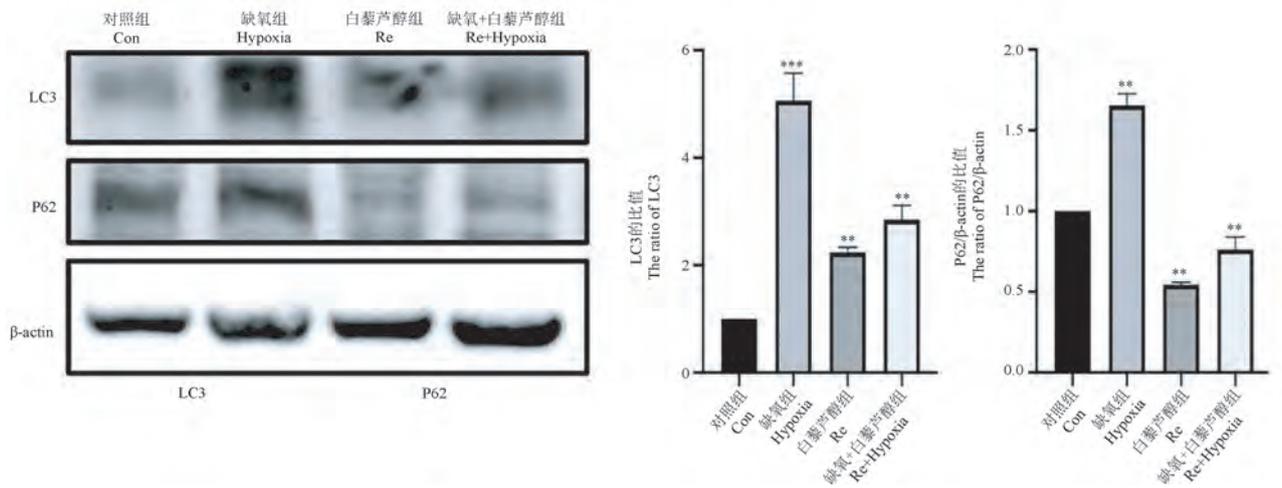


图 8 Western blot 方法检测 LC3、P62 蛋白表达水平  
Figure 8 Western blot analysis of expression levels of LC3 and P62 protein

噬被降解,因此在自噬过程中 P62 表达水平下调。以上结果说明,白藜芦醇可能通过 HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 途径影响缺氧损伤时小鼠脑组织中的自噬水平。

### 3 讨论

由于疫情的发展,长时间的佩戴口罩,导致吸入氧减少,动脉血氧分压降低,产生轻微的乏氧现象,严重者会出现明显身体上的不适。此外,高原游已成为近年来大家向往的旅游热点地区。当高原平均海拔在 4000 m 以上时,就会出现空气稀薄,含氧量低的状况,而脑组织是机体对缺氧最为敏感的靶器官,在缺氧环境中很容易受到“伤害”<sup>[9-10]</sup>。

本研究利用 CQY-1 型小动物缺氧检测系统,将小鼠置于缺氧瓶内,封闭后,连接仪器,打开监测程

序。初始氧含量为 21.21%,当氧含量降至 15%时,将小鼠取出,以建立小鼠间歇性缺氧模型。正常海平面氧浓度接近 21%,青海、西藏地区大约氧含量为海平面氧含量的 2/3,所以实验选择在氧浓度 15%时,停止实验,以模拟进入高原时的低氧环境。因系统中加入了钠石灰,可吸收缺氧过程中产生的二氧化碳,避免导致小鼠出现呼吸性酸中毒。

脑组织是缺氧最易受累的靶器官<sup>[11]</sup>。脑缺氧损伤过程中,缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  起到关键的作用<sup>[12]</sup>。在正常状态下,被脯氨酰羟化酶 (PHD) 调控的缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  不表达或低表达<sup>[13]</sup>。当组织细胞缺氧时,脯氨酰羟化酶调控被抑制,下游的 HIF-1 $\alpha$  进入细胞核与 HIF-1 $\beta$  相结合并进一步激活下游基因,调控包 EPO、NOS 等多种靶基因以

应对缺氧环境<sup>[14-15]</sup>。本次研究利用 Western blot 的方法检测脑组织中 HIF-1 $\alpha$ 、P53 蛋白表达情况发现,缺氧组 HIF-1 $\alpha$ 、P53 蛋白表达显著增高,提示小鼠间歇性缺氧模型建立成功。

BNIP3 作为缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  下游直接的靶分子,在缺氧状态下同样可以被诱导表达上调<sup>[3,16]</sup>。近年来的研究显示,BNIP3 在调控自噬体-溶酶体融合过程中发挥了关键作用<sup>[17]</sup>。还有报道显示,BNIP3 是线粒体自噬途径中的受体,可以直接与 LC3 相结合并诱导细胞自噬的发生<sup>[18-20]</sup>。Western blot 方法检测间歇性缺氧对小鼠脑组织中 BNIP3 及其介导的自噬相关蛋白表达的影响。与对照组相比,缺氧组中 BNIP3、Beclin 1、LC3 表达水平显著上调。加入白藜芦醇预处理,上述蛋白表达明显下调。与对照组相比,缺氧组中 P62 表达水平显著下调。加入白藜芦醇预处理,P62 蛋白表达明显上调。

综上所述,白藜芦醇具有抗缺氧性脑损伤的作用,其机制是通过下调 HIF-1 $\alpha$ 、P53 蛋白表达,抑制 BNIP3 途径下游自噬水平,达到促进小鼠缺氧性脑损伤修复的作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ejlersen M, Ilieva M, Michel TM. Superoxide dismutase isozymes in cerebral organoids from autism spectrum disorder patients [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2022, 129(5-6): 617-626.
- [ 2 ] Vetrovoy O, Sarieva K, Lomert E, et al. Pharmacological HIF1 inhibition eliminates downregulation of the pentose phosphate pathway and prevents neuronal apoptosis in rat hippocampus caused by severe hypoxia [J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(5): 635-646.
- [ 3 ] Macher-Goeppinger S, Keith M, Hatiboglu G, et al. Expression and functional characterization of the BNIP3 protein in renal cell carcinomas [J]. *Transl Oncol*, 2017, 10(6): 869-875.
- [ 4 ] Fu R, Deng Q, Zhang H, et al. A novel autophagy inhibitor berbamine blocks SNARE-mediated autophagosome-lysosome fusion through upregulation of BNIP3 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 243.
- [ 5 ] Zeng C, Zou T, Qu J, et al. Cyclovirobuxine D induced-mitophagy through the p65/BNIP3/LC3 Axis potentiates its apoptosis-inducing effects in lung cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5820.
- [ 6 ] Sarkaki A, Rashidi M, Ranjbaran M, et al. Therapeutic effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in the nervous system [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(12): 3085-3102.
- [ 7 ] Ren B, Kwah MX, Liu C, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2021, 515: 63-72.
- [ 8 ] Uddin MJ, Farjana M, Moni A, et al. Prospective pharmacological potential of resveratrol in delaying kidney aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8258.
- [ 9 ] Cai J, Ruan J, Shao X, et al. Oxygen Enrichment mitigates high-altitude hypoxia-induced hippocampal neurodegeneration and memory dysfunction associated with attenuated tau phosphorylation [J]. *High Alt Med Biol*, 2021, 22(3): 274-284.
- [ 10 ] Hoiland RL, Howe CA, Carter HH, et al. UBC-Nepal expedition: phenotypical evidence for evolutionary adaptation in the control of cerebral blood flow and oxygen delivery at high altitude [J]. *J Physiol*, 2019, 597(12): 2993-3008.
- [ 11 ] Kiyatkin E. Respiratory depression and brain hypoxia induced by opioid drugs: Morphine, oxycodone, heroin, and fentanyl [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 151: 219-226.
- [ 12 ] Vetrovoy O, Sarieva K, Galkina O, et al. Neuroprotective mechanism of hypoxic post-conditioning involves HIF1-associated regulation of the pentose phosphate pathway in rat brain [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(6): 1425-1436.
- [ 13 ] Minervini G, Masiero A, Moro S, et al. In silico investigation of PHD3 specific HIF1- $\alpha$  proline 567 hydroxylation: a new player in the VHL/HIF1- $\alpha$  interaction pathway? [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(18): 2996-3001.
- [ 14 ] Núñez-O' Mara A, Gerpe-Pita A, Pozo S, et al. PHD3-SUMO conjugation represses HIF1 transcriptional activity independently of PHD3 catalytic activity [J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(1): 40-49.
- [ 15 ] Millonig G, Hegedüs S, Becker L, et al. Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  under rapid enzymatic hypoxia: cells sense decrements of oxygen but not hypoxia per se [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(2): 182-191.
- [ 16 ] Park CW, Hong SM, Kim ES, et al. BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK [J]. *Autophagy*, 2013, 9(3): 345-360.
- [ 17 ] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1 $\alpha$  and BNIP3-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.
- [ 18 ] Sun LL, Shao YN, You MX, et al. ApostichopusROS-mediated BNIP3-dependent mitophagy promotes coelomocyte survival in response to infection [J]. *Zool Res*, 2022, 43(2): 285-300.
- [ 19 ] Zhang Y, Liu D, Hu H, et al. HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109464.
- [ 20 ] Lin Q, Li S, Jiang N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1 $\alpha$  and BNIP3-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.

[ 收稿日期 ] 2022-03-24

周高峰,肖静,周佳,等. 鹿茸多肽介导 TGF- $\beta$ /smads 对心梗后心肌缺血损伤大鼠保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 49-56.

Zhou GF, Xiao J, Zhou J, et al. Protective effect and mechanism of TGF- $\beta$ /smads mediation by antler polyskin on post-infarction myocardial ischemic injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 49-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.007

## 鹿茸多肽介导 TGF- $\beta$ /smads 对心梗后心肌缺血损伤大鼠保护作用及机制研究

周高峰<sup>1</sup>,肖静<sup>1,2</sup>,周佳<sup>1</sup>,刘俊秀<sup>1</sup>,律广富<sup>3</sup>,王雨辰<sup>1</sup>,林贺<sup>1\*</sup>,黄晓巍<sup>1\*</sup>

(1.长春中医药大学药学院,长春 130117;2.中国医学科学院药用植物研究所,北京 100094;  
3.长春中医药大学吉林省人参科学研究院,长春 130117)

**【摘要】** 目的 观察鹿茸多肽(velvet antler peptide,VAP)对冠状动脉左前降肢结扎后心肌梗死缺血及纤维化损伤大鼠的保护作用,阐明 VAP 介导 TGF- $\beta$ /smads 信号通路的作用机制。方法 60 只大鼠随机分为 6 组:假手术组(SHAM group)、模型组(MI group)、卡托普利阳性药对照组(KTPL group,30 mg/kg)、鹿茸多肽低、中、高剂量组(VAP group,100、200、300 mg/kg)。大鼠采用冠状动脉左前降肢结扎法复制大鼠心肌损伤模型,制备模型 3 d 后大鼠经口服(灌胃)给药,灌胃 1 mL/d,连续 28 d。末次给药 2 h 后,麻醉大鼠经腹主动脉无菌采血并离心取血清。心电图分析其心肌损伤程度。HE 染色法观察各组大鼠心脏切片病理形态学改变;ELISA 法检测各组大鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白(cTn)水平;Western blot 法检测各组大鼠心肌组织 Collagen I、Collagen III、TGF- $\beta$ 1、Smad7、Smad4、Smad2/3、p-Smad2/3 相关蛋白水平。结果 心电图分析表明,通过 ST 段抬高、T 波倒置、Q 波形成的变化提示心肌损伤。HE 染色发现,与 SHAM 组比较,MI 组大鼠心肌纤维排列紊乱、横向条纹消失,细胞肿胀破裂、坏死,细胞核变形移位;与 MI 组相比,KTPL 组和 VAP 组大鼠心肌病理学形态明显改善。ELISA 法检测,与 SHAM 组相比,MI 组大鼠的 CK-MB、cTnT 和 cTnI 含量被明显诱导( $P<0.01$ );与 MI 组相比,KTPL 组和 VAP 组大鼠心肌组织中 CK-MB、cTnT 和 cTnI 含量明显降低( $P<0.01$ )。Western blot 法检测,与 SHAM 组相比,MI 组大鼠通过上调 TGF- $\beta$ 1、Smad7、Smad4、Smad2/3、p-Smad2/3、Collagen I、Collagen III 蛋白表达水平及下调 Smad7 表达水平导致心肌损伤( $P<0.01$ );与 MI 组比较,KTPL 组和 VAP 组大鼠显著下调 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I、Collagen III 蛋白表达水平及升高 Smad7 蛋白表达量,改善纤维化( $P<0.01$ )。结论 心肌缺血梗死大鼠能激活 TGF- $\beta$ /smads 信号转导,通过卡托普利及鹿茸多肽给药后可抑制 TGF- $\beta$ 1、smads 蛋白改善心肌梗死后心肌纤维化。鹿茸多肽(VAP)可能通过调控 TGF- $\beta$ /smad 信号通路保护心肌梗死后心肌缺血及纤维化损伤。

**【关键词】** 鹿茸多肽;TGF- $\beta$ /smad 信号通路;心肌纤维化损伤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022) 11-0049-08

### Protective effect and mechanism of TGF- $\beta$ /smads mediation by antler polyskin on post-infarction myocardial ischemic injury in rats

**【基金项目】** 2020 年度吉林省卫生与健康委员会技术创新项目(2020J068);2021 年度吉林省发展和改革委员会创新能力建设项目(2021C011)。

**【作者简介】** 周高峰(1995—),女,硕士研究生,研究方向:心血管及内分泌药理,E-mail:zgf951001@163.com

**【通信作者】** 黄晓巍(1972—),女,博士,主任药师,研究方向:心血管及内分泌药理。E-mail:15948000740@163.com

林贺(1982—),男,博士,副教授,研究方向:中药药理学。E-mail:linhe@ccucm.edu.cn

\* 共同通信作者

ZHOU Gaofeng<sup>1</sup>, XIAO Jing<sup>1,2</sup>, ZHOU Jia<sup>1</sup>, LIU Junxiu<sup>1</sup>, LYU Guangfu<sup>3</sup>, WANG Yuchen<sup>1</sup>, LIN He<sup>1\*</sup>, HUANG Xiaowei<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China.

2. the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094.

3. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117)

**【Abstract】 Objective** To observe the protective effects of velvet antler peptide (VAP) on myocardial infarction (MI) ischemia and fibrosis injury in rats after coronary artery ligation and the mechanism of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway mediation by VAP. **Methods** 60 SPF male Wistar rats were randomly divided into six groups: Sham operation; MI; positive drug control (captopril, 30 mg/kg); low-, medium-, and high-dose (100, 200, and 300 mg/kg) VAP groups. The left anterior descending limb of the coronary artery was ligated to provide a model of myocardial injury in rats. Three days after the model was made, the rats were orally administered with 1 mL/d VAP for 28 days. Two hours after the last administration, we collected blood aseptically from the abdominal aorta of anesthetized rats and centrifuged the samples to obtain VAP serum. Electrocardiogram was used to analyze the degree of myocardial injury. HE staining was used to observe pathological changes in the myocardial tissue of rats. Serum creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and cardiac troponin (cTn) levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay ELISA. The levels of TGF- $\beta$ 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Smad7, Collagen I and Collagen III proteins in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results** HE staining in the MI group showed that myocardial fibers group were disordered; transverse stripes had disappeared; cells were swollen, cracked, and necrotic; and nuclei were deformed and displaced compared with the findings in the Sham group. The pathological morphology of myocardium in KTPL group and VAP group was significantly improved compared with that in the MI group. ELISA showed significantly higher CK-MB, cTnT (cardiac troponin T), and cTnI (cardiac troponin I) levels in the MI group compared with the findings in the Sham group ( $P < 0.01$ ). There were significantly lower CK-MB, cTnT, and cTnI contents in the myocardial tissue of positive drug control group KTPL and VAP groups compared with the findings in the MI group ( $P < 0.01$ ). The Western blot showed that myocardial injury was caused by the up-regulation of TGF- $\beta$ 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Collagen I and Collagen III and down-regulation of Smad7 protein expression in the MI group ( $P < 0.01$ ). Compared with the findings in the Sham group. The expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, Collagen I and Collagen III were significantly down-regulated and Smad7 was up-regulated in the KTPL group and VAP group, which improved fibrosis ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** MI rats activate TGF- $\beta$ /Smad signal transduction, and captopril and VAP inhibit TGF- $\beta$ 1 and Smad proteins to improve myocardial fibrosis after MI. VAP may protect against myocardial ischemia and fibrosis after MI by regulating the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

**【Keywords】** velvet antler peptide; transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling pathway; myocardial fibrosis

心血管疾病已严重威胁全球患者的健康,患病人群数全球最高且治疗效果不佳导致的死亡人数在我国也达到最高<sup>[1]</sup>。缺血性心脏病是以心肌组织、细胞缺血损伤为主要病理特点,临床上以胸闷心痛、心悸气短为主要症状,缺血严重时会导致急性心肌梗死;当心肌梗死发生时,人体心脏供血不足导致冠状动脉发生堵塞,心肌组织出现缺血、缺氧,直接导致细胞和组织炎性坏死,心肌代谢紊乱等病理生理反应<sup>[2]</sup>。为了使缺血心肌组织重新获得血液供应,目前对于心肌缺血梗死最主要的治疗方法为溶栓和经皮冠状动脉介入,而这类治疗方法通常导致缺血再灌注损伤且预后不良,如导致心肌钙化、纤维化损伤。心肌纤维化会导致心脏的收缩舒张功能受到影响导致心室重构,最终演变为心力衰竭。减轻心肌纤维化损伤可一定程度地改善心

肌梗死后严重后果,已有研究对心肌梗死纤维化进入更深层次的剖析并探究进一步<sup>[3]</sup>。

鹿茸为鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *Cervus elaphus* Linnaeus 的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角,药性甘、咸、温,归肾、肝经,是传统医学中经典的补阳益血药物,其显著特点为具有完全再生能力;生精补髓等功效常用于肾阳不足,精血亏虚等各类疾病导致的一切虚损<sup>[4]</sup>。鹿茸多肽(velvet antler peptide, VAP)是从梅花鹿茸中提取的一种多肽物质。经本课题组前期研究,鹿茸酸提醇沉法提取,对梅花鹿二杠茸(购自吉林省鸿宇鹿业科技有限公司)进行提取分离,经双缩脲法及蛋白质分子量检测最终得到其分子量为  $3.2 \times 10^3$ 、含有 17 种必需及非必需氨基酸。鹿茸多肽对心肌缺血梗死损伤、心肌缺血再灌注、冠心病、心绞痛等具有改善及

保护作用<sup>[5]</sup>。VAP 明显降低阿霉素诱导心肌损伤模型大鼠心肌组织中转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) 的蛋白表达水平,减少心肌细胞凋亡,保护心肌组织<sup>[6]</sup>。在本研究中,我们将大鼠采用冠状动脉左前降肢结扎法诱导心肌缺血后心肌纤维化损伤,探究鹿茸多肽对心肌缺血损伤大鼠的保护作用及潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠,60 只,均为雄性,体重(180 $\pm$ 20)g,来源于长春亿斯实验动物技术有限公司[SCXK(吉)2020-0002]。本研究所有动物实验操作完全遵守实验动物伦理保护法及 3R 原则,并经长春中医药大学动物实验伦理委员会批准通过(2020039)。实验动物的饲养给药及制备模型和给药后的组织取材均于长春中医药大学实验动物中心实验设施内进行[SYXK(吉)2018-0014],动物饲养条件:大鼠自由进食、饮水,12 h/12 h 光明/黑暗循环、恒温(21 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C)、恒湿(40%~60%),适应性饲养 3 d。

### 1.2 主要试剂与仪器

鹿茸多肽(velvet antler polypeptide, VAP):生药鹿茸每 28.9 g 可制备 1 g 鹿茸多肽,批号:20201120,制备于长春中医药大学药学院;卡托普利(上海普康药业有限公司,批号:201201);CK-MB、cTnT、cTnI ELISA 试剂盒(江苏酶免生物科技有限公司,批号:MM-0625R1、MM-0795R1、MM-61550R1);HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0105S);TGF- $\beta$ 1、Smad3、Smad4、Smad7、Smad2、Collagen I、Collagen III 一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:21898-1-AP、25494-1-AP、10231-1-AP、12570-1-AP、25840-1-AP、14695-1-AP、22734-1-AP);p-Smad2+3 抗体(北京索莱宝科技有限公司,批号:K009346P)。

HX-300S 小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);Multiskan FC 酶联免疫检测仪(美国赛默飞世尔科技公司);ML22 心电图仪(埃德仪器国际贸易有限公司);Centrifuge 5810R 4 $^{\circ}$ C 台式低温离心机(德国艾本德股份公司);DM250 生物显微镜(德国 LEICA 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型制备及分组

采用随机平行对照法将 60 只大鼠分为 6 组:假

手术组(SHAM group)、模型组(MI group)、卡托普利阳性药对照组(KTPL group,30 mg/kg)、鹿茸多肽低、中、高剂量组(VAP group,100、200、300 mg/kg)。健康雄性大鼠禁食 12 h,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉。麻醉固定大鼠,剪去颈部毛发,在气管处切一小口后插入导管再与小动物呼吸机相连接,进行辅助呼吸,待呼吸平稳后,左侧第 3、4 肋间用手术钳开胸固定,用手术钳挤出心脏后,等待 30 s 恢复心跳搏动正常,使用蚕丝不可降解的手术丝线穿过心脏左心耳下的冠状动脉左前降肢(LAD),用止血钳夹紧穿过丝线进行左前降肢的结扎,结扎后快速将心脏放回原位置,观察心电图情况,待自主呼吸平稳后为防止气胸将胸腔内气体排空后用 0 号线进行缝合胸口及气管伤口,并严密观察生命迹象<sup>[7]</sup>。术后 3 d 腹腔注射 10 万单位青霉素防感染。3 d 后进行心电图检测,观察到心电图 ST 段抬高 0.1 mV 以上或有病理性 Q 波迹象,表明心肌梗死缺血损伤大鼠模型制备成功。各组均口服灌胃给药,每日 1 次,连续给药 28 d,所有动物均自由饮食。

#### 1.3.2 大鼠一般状态观察及体重检测

给药后观察各组大鼠的体毛光泽度、精神状态、饮食饮水量等情况;并记录大鼠体重进行分析。

#### 1.3.3 心电图检测

造模和造模后 3 d,连接心电图仪观察 ST 段、T 波和病理性 Q 波等情况,比较各组大鼠心电图 ST 段等变化情况,观察有无缓解心肌损伤程度。

#### 1.3.4 ELISA 法检测各组大鼠心肌肌钙蛋白(cTnT、cTnI)、肌酸激酶同工酶 CK-MB 水平

按江苏酶免 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 表达水平,按说明书方法进行检验并用 Curve Expert 软件进行数据整理。

#### 1.3.5 HE 染色观察大鼠心肌组织病理变化

大鼠处死后,剥离大鼠的心肌组织,使用 4%多聚甲醛进行固定,24 h 之后将心脏进行脱水和石蜡包埋,切片后将心肌组织样本分别依次浸泡于二甲苯和乙醇,脱蜡脱水,染色后,在生物显微镜下察看各组心脏切片病理形态学改变。

#### 1.3.6 Western blot 检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7、Collagen I 和 Collagen III 的表达水平

-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱取出并解冻大鼠心肌组织,蛋白定量后配置好电泳液、转膜液后,进行制胶,每孔上样 20  $\mu$ L 蛋白进行凝胶电泳,90 min 后湿转至

PVDF 膜上,转膜 60 min,5%脱脂奶粉封闭液封闭 1 h, TBST 洗膜后加入兔抗 GAPDH、TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4 和 Smad7、Collagen I 和 Collagen III 一抗,孵育过夜,加二抗,后用发光显色液进行显色分析,以 GAPDH 为内参,进行灰度值分析,每个条带检测 3 次灰度值后取平均值。目的蛋白表达量为目的蛋白条带和 GAPDH 的比值。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。所有实验数据均采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。以  $P<0.05$  被认为差异显著,具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况观察

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠精神欠佳、毛发松软,体重增长较慢,进食及饮水量减少明显;与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽高、中、低剂量组大鼠精神尚可,体重增长较好,进食饮水量缓慢增加。各组大鼠体重显示:与 SHAM 组比较,MI 组大鼠体重明显降低( $P<0.01$ );与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠体重明显升高( $P<0.01$ )。见图 1。

### 2.2 各组大鼠心电图水平

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠心电图 ST 段明显升高,具有病理性 Q 波,结果表明心肌缺血损伤大鼠模型复制成功。见图 2。

### 2.3 各组大鼠血清 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平

与 SHAM 组比较,MI 组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平升高显著( $P<0.01$ );与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平显著降低,具有统计学意义( $P<0.01$ )。结果表明,VAP 能改善心肌缺血梗死后大鼠的心肌功能。见图 3。

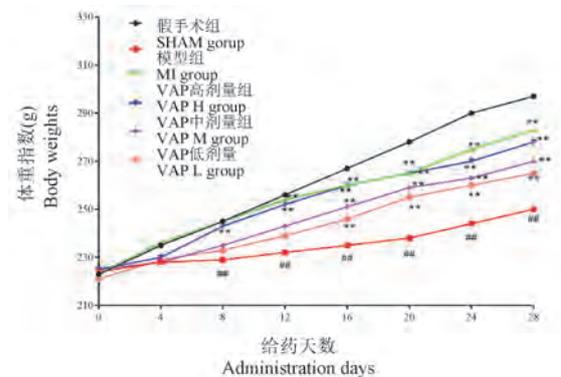
### 2.4 各组大鼠心肌组织 HE 染色

SHAM 组大鼠心肌组织结构正常,肌束完整且均匀,未见炎性细胞浸润、弥漫性水肿等病理现象发生。SHAM 组比较,MI 组大鼠心肌组织排列不均匀、多处肿胀破裂、坏死,炎性细胞浸润,横向条纹消失,细胞核变形移位。与 MI 组比较,TKPL 组、鹿茸多肽治疗组给药后的大鼠心肌组织肌束排列较均匀,未见明显细胞肿胀破裂坏死等病理情况。结

果表明,VAP 能改善大鼠梗死缺血心肌组织的病理损伤。见图 4。

### 2.5 各组大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7、Collagen I 和 Collagen III 的表达水平

与 SHAM 组相比,MI 组大鼠心肌组织 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平升高( $P<0.01$ ),Smad7 表达水平降低( $P<0.01$ );与 MI 组比较,KTPL 组和鹿茸多肽组大鼠 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Collagen I 和 Collagen III 蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ ),Smad7 表达水平升高( $P<0.01$ )。结果表明,VAP 能缓解大鼠心肌纤维化损伤。见图 5。

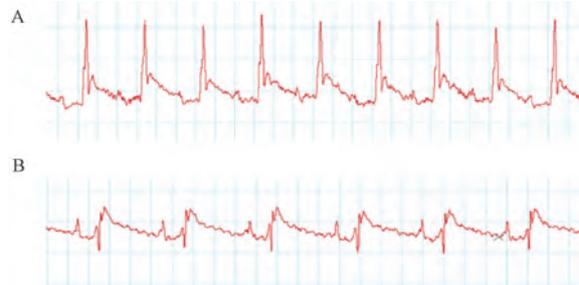


注:与模型组相比, \*\* $P<0.01$ ;与假手术组相比, ### $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠的体重指数变化( $n=6$ )

Note. Compared with MI group, \*\* $P<0.01$ . Compared with Sham group, ### $P<0.01$ .

Figure 1 Changes in body mass index of ischemic rats in each group

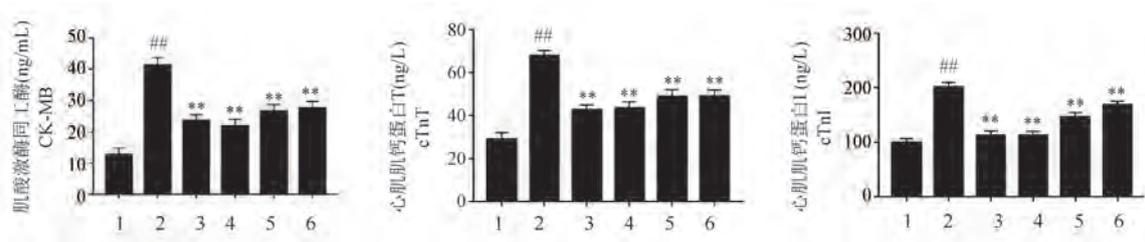


注:A:假手术组 SHAM 组大鼠的心电图(ECG)改变;B:模型 MI 组大鼠的心电图(ECG)改变。

图 2 冠脉结扎后大鼠心电图水平

Note. A, ECG changes of sham group of rats. B, ECG changes of rats in model group.

Figure 2 Electrocardiogram levels in rats after coronary artery ligation

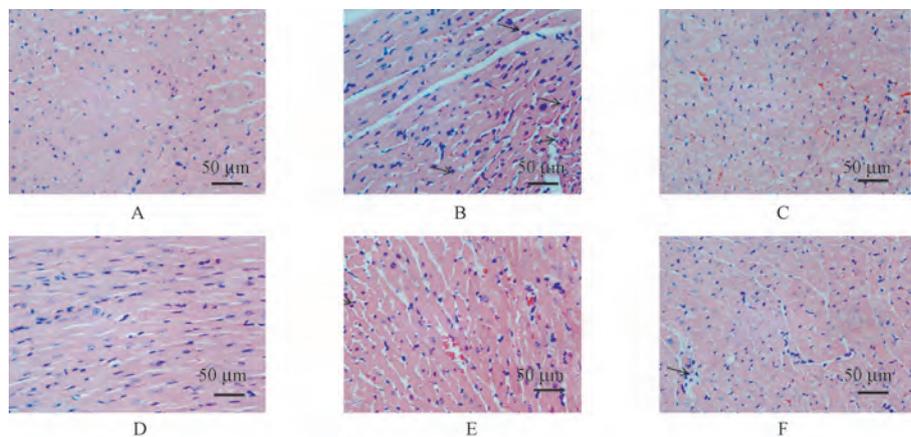


注:与模型组相比, \*\*  $P < 0.01$ ;与假手术组相比, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ 。1:假手术组;2:模型组;3:卡托普利阳性药对照组;4:鹿茸多肽高剂量组;5:鹿茸多肽中剂量组;6:鹿茸多肽低剂量组。

图3 各组大鼠血清中 CK-MB, cTnT 和 cTnI 水平 (n=6)

Note. Compared with MI group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with Sham group, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ . 1, Sham group. 2, MI group. 3, KTPL group. 4, VAP H group. 5, VAP M group. 6, VAP L group.

Figure 3 CK-MB, cTnT and cTnI levels in serum of rats in each group



注:A:假手术组;B:模型组;C:卡托普利阳性药对照组;D:鹿茸多肽高剂量组;E:鹿茸多肽中剂量组;F:鹿茸多肽低剂量组。黑色箭头向上表示细胞肿胀坏死,黑色箭头向下表示炎性细胞浸润。

图4 各组大鼠心肌组织的 HE 染色

Note. A, Sham group. B, MI group. C, KTPL group. D, VAP H group. E VAP M group. F, VAP L group. The black arrow upward indicates cell swelling and necrosis, and the black arrow downward indicates inflammatory cell infiltration.

Figure 4 HE staining of heart tissue of rats in each group

### 3 讨论

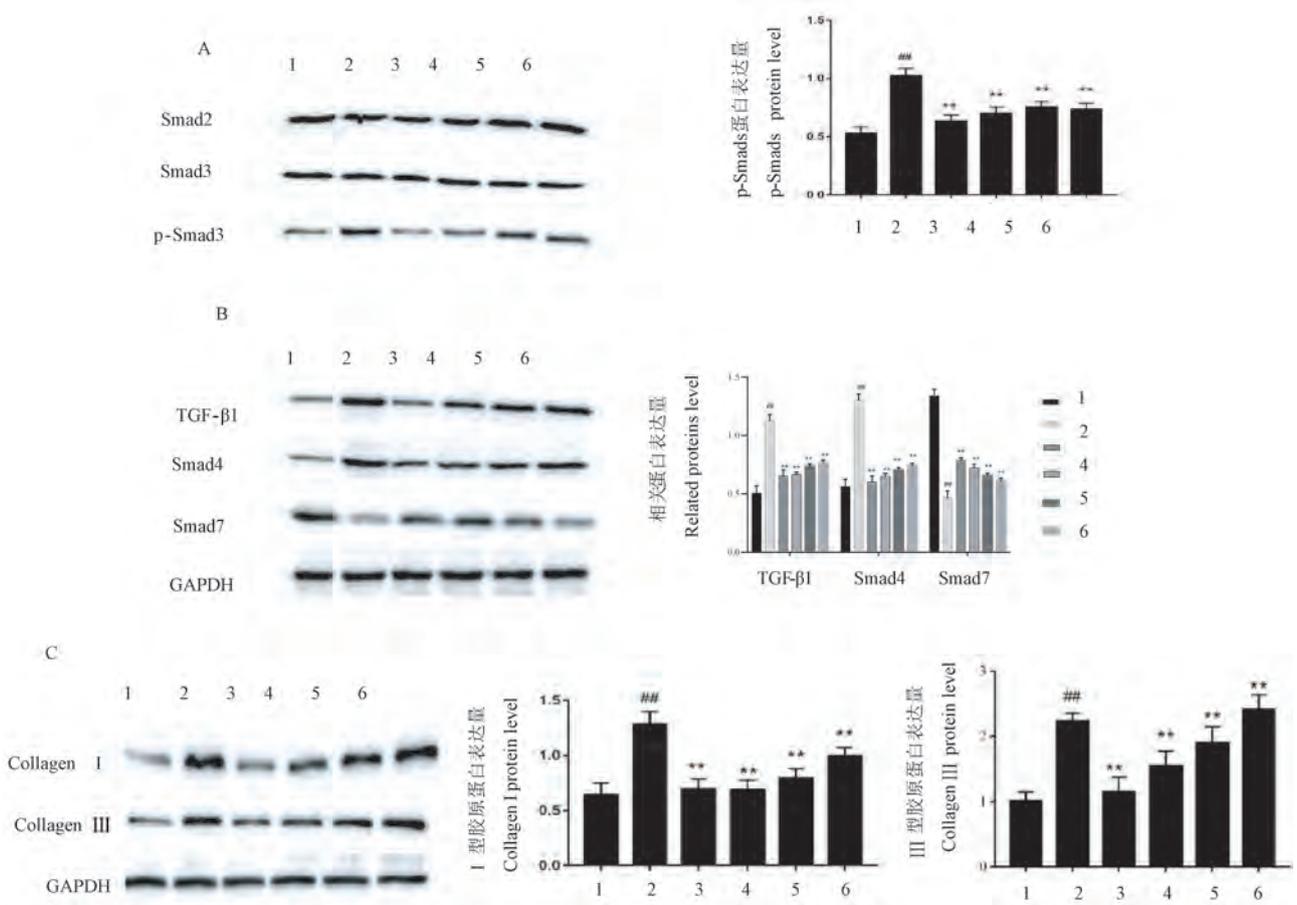
为观察鹿茸多肽对心肌缺血梗死损伤的影响,本研究采用结扎大鼠冠状动脉左前降支模拟心肌梗死病理过程,此法为心肌缺血损伤常用动物造模方法。经观察大鼠心电图改变,将模型制备成功大鼠分组后给药不同剂量鹿茸多肽,后检测相关生化指标,比较大鼠心肌组织病理形态学变化等,评价鹿茸多肽对 MI 引起的大鼠心肌损伤的保护作用。

心电图检测是反应人体心脏生理病理变化的重要检查方法之一,当人体发生心肌梗死、急性心绞痛等病理反应后,心电图特点为 ST 段会呈弓背样抬高, T 波倒置,病理性 Q 波出现等。因此通常采用心电图判断造模的成功与否。实验结果表明,结扎大鼠冠状动脉左前降支后大鼠心电图, ST 段立即

抬高, T 波倒置、Q 波形成,表明造模成功<sup>[7]</sup>。

心肌缺血梗死大鼠的心脏组织会发生心肌纤维排列不均匀;心肌纤维大量断裂;出现较多炎性细胞浸润;细胞核移位等<sup>[8]</sup>。因此,本研究对术后的心脏组织切片进行 HE 染色,观察心肌纤维化及炎性浸润情况。结果显示, MI 组大鼠心肌组织出现明显的病理形态学改变,而 KTPL 组、鹿茸多肽给药组均可减少 MI 组大鼠细胞的肌纤维断裂、炎性细胞浸润减少,提示鹿茸多肽能够改善心肌组织缺血损伤的病理学改变。

为进一步明确鹿茸多肽对 MI 大鼠心肌组织的保护作用,本研究检测了鹿茸多肽对 MI 大鼠血清中肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB),心肌肌钙蛋白 T (troponin T, cTnT) 和心肌肌钙蛋白 I (troponin I, cTnI) 的影响。cTnT 和 cTnI 在心肌组织



注:A:鹿茸多肽对 Smad2/3 蛋白表达量的影响;B:鹿茸多肽对 TGF-β, Smad4, Smad7 蛋白表达的影响;C:鹿茸多肽对 Collagen I、Collagen III 蛋白表达的影响。1:假手术组;2:模型组;3:卡托普利阳性药对照组;4:鹿茸多肽高剂量组;5:鹿茸多肽中剂量组;6:鹿茸多肽低剂量组。与模型组相比, \*\*  $P < 0.01$ ;与假手术组相比, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ 。

图 5 VAP 对 Smad2/3、Smad4、Smad7 蛋白表达量的影响( $n = 3$ )

Note. A, Effect of VAP on Smad2/3 protein expression. B, Effect of VAP on TGF-β1, Smad4, Smad7 protein expression. C, Effect of VAP on Collagen I and Collagen III proteins. 1, Sham group. 2, MI group. 3, KTPL group. 4, VAP H group. 5, VAP M group. 6, VAP L group. Compared with MI group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with Sham group, <sup>##</sup>  $P < 0.01$ .

Figure 5 Effect of VAP on the expression level of Smad2/3, Smad4 and Smad7

中的含量丰富,可作为心肌缺血或梗死损伤的标志物。研究表明,大鼠发生心肌缺血缺氧后诱导心肌细胞凋亡,引起血液中 cTnT 和 cTnI 含量升高,导致心肌功能不全,VAP 能降低 cTn 在血液中的含量,改善心肌功能<sup>[9-10]</sup>。肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB,CK-MB)是存在于心肌组织中高灵敏度的生化标志物,属凋亡指标,一旦有心肌损伤发生可释放到血液中,表明心肌细胞凋亡损伤<sup>[11]</sup>。卢迎宏等<sup>[12]</sup>发现,在缺血再灌注造模大鼠的心肌组织中,CK-MB 和 cTnI 水平显著升高,TGF-β 蛋白表达量水平明显上调。实验研究结果表明,与 MI 组比较,KTPL 组、鹿茸多肽各组大鼠血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平显著降低,示鹿茸多肽减轻心肌梗死导致的心肌损伤。

心肌纤维化是由于心肌缺血梗死,冠状动脉粥样硬化等原因导致,各种病因所引起的心肌纤维化损伤其发病机制不同<sup>[13]</sup>。心肌纤维化的发生发展涉及多种信号通路,心肌梗死缺血、钙化纤维化、心衰等导致如 TGF-β/Smad 信号通路等多种信号通路激活或抑制<sup>[14]</sup>。TGF-β/Smads 是经典的纤维化通路,信号转导异常会导致肿瘤、组织纤维化,心血管疾病等,在心肌梗死、纤维化损伤后心肌组织中高表达<sup>[15]</sup>。心肌缺血梗死纤维化损伤能激活 TGF-β1,使活化的 TGF-β1 与 Smad2/3、Smad4 相互作用,激活 Smad2、Smad3 和 Smad4 转录因子蛋白表达,构成异源三聚体,进而在细胞核内发生纤维化及炎症反应<sup>[16]</sup>。研究表明,对于阿霉素损伤大鼠模型,鹿茸多肽可降低 TGF-β1 的蛋白表达水平,保护心肌

组织<sup>[17]</sup>。

TGF- $\beta$  信号通路有较强的促纤维化作用,使纤维细胞明显上调 I (Collagen I)、III (Collagen III) 型胶原蛋白表达量,导致心肌纤维结缔组织产生缺损,程度严重可导致器官硬化进而衰竭;而敲除 Smad3 基因后能有效缓解心肌纤维化,缓解心室重塑导致心衰等不良后果,修复心功能<sup>[18]</sup>。心肌细胞外基质 (extracellular matrix) 大致由 Collagen I 和 Collagen III 组成,两种类型蛋白的比例保持相对平衡。心肌成纤维细胞分泌 Collagen I、Collagen III,其蛋白含量升高会导致引起导致心肌纤维化损伤<sup>[19]</sup>。心肌缺血损伤发生后 TGF- $\beta$ 1 过表达并进一步升高 Collagen I 和 Collagen III 蛋白的表达,导致心肌胶原沉积,表明心肌梗死后进一步发展为心肌纤维化损伤,影响心脏的泵血机能,使心输血量 and 动脉血压异常,不能满足机体所需,进而引起急慢性心衰<sup>[20]</sup>。

该项实验结果也与上述研究相呼应,Western blot 结果显示,与 MI 组比较,KTPL 组和 VAP 给药组降低心肌组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3、Smad4 蛋白表达水平,并进一步降低 Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达水平,示鹿茸多肽可通过 TGF- $\beta$ /smads 信号转导通路降低心肌胶原蛋白表达水平达到保护心肌细胞。

阳性药卡托普利为血管紧张素 I 转化酶抑制剂药,主要治疗高血压及心力衰竭,可通过降低 TGF- $\beta$ 1、CTGF 的表达,改善心肌纤维化作用,抗心肌细胞凋亡,达到逆转心室重塑、改善心功能;对心肌缺血损伤,卡托普利可作为阳性药物观察药物干预效果<sup>[21]</sup>;而鹿茸多肽作为保护心脏微血管的内皮细胞,可提高内皮祖细胞活力,进而修复其微血管损伤,还可直接保护心肌细胞,减少心肌细胞凋亡,减少心肌纤维化<sup>[22]</sup>。卡托普利使血液中血管紧张素水平下降并降低血管壁张力,以降低血压及治疗心脏衰竭,其主要应用于血压升高及心肌衰竭,鹿茸多肽则保护心肌细胞,避免心肌细胞进一步损伤及改善心肌组织纤维化损伤<sup>[23-24]</sup>。

综上所述,鹿茸多肽可以改善冠状动脉左前降肢结扎诱导的大鼠心肌梗死缺血后纤维化损伤。VAP 降低血清中 cTnT、cTnI 和 CK-MB 水平,达到增强心肌组织抗凋亡作用,调控 TGF- $\beta$ /samds 表达水平,降低心脏胶原蛋白 I、III 的表达以达到抗纤维化作用,改善心肌组织病理状态,缓解心肌组织损伤。

#### 参考文献:

[1] 任良强,侯晓晓,乔平,等. 脐血单个核细胞对急性心肌梗

死大鼠血管新生的促进作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 72-77.

- [2] 梁杏梅,刘喜华,黄建春,等. 玉朗伞查尔酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 35-41.
- [3] 陈慧洋,娄利霞,赵一舟,等. 芪丹利心丸对心肌梗死大鼠左心室心肌组织 miR-133a/TGF- $\beta$ 1/CTGF 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2018, 59(20): 1771-1776.
- [4] 李琳,叶彤,陈文凤,等. 鹿茸多肽功能的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(1): 54-56.
- [5] 肖响. 鹿茸蛋白修复缺血缺氧诱导的心肌细胞及心脏微血管损伤的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [6] Xu Y, Qu X, Zhou J, et al. Pilose antler peptide-3.2KD ameliorates adriamycin-induced myocardial injury through TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 659643.
- [7] 吕童,宫丽鸿,肖福龙,等. 搜风祛痰中药对大鼠心肌缺血再灌注损伤冠脉微循环内皮功能的保护作用 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(12): 2091-2094.
- [8] 黄汕梅,李畅,马梓珊,等. 含服硝石雄黄散保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 19-26.
- [9] Wang Q, An Y, Wang H, et al. The clinical significance of changes in cTnT, CRP and NT-proBNP levels in patients with heart failure [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 2947-2954.
- [10] 李鑫,律广富,韩冬,等. 鹿茸多肽对阿霉素诱导 H9c2 细胞损伤保护作用的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(10): 1089-1093.
- [11] 菲尔达吾斯·萨依然. 芪蒴强心胶囊联合曲美他嗪对冠心病心力衰竭患者左心室重构及血清 NT-proBNP、CK-MB、cTnI 水平的影响 [J]. 新疆医学, 2021, 51(10): 1145-1148.
- [12] 卢迎宏,王丹,井海云,等. 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23-30.
- [13] Nie L, Liu M, Chen J, et al. Hydrogen sulfide ameliorates doxorubicin-induced myocardial fibrosis in rats via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 299.
- [14] 张丹,惠菊,郭家娟. 解毒通络方通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 和 ROCK 通路对大鼠心肌纤维化的改善作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(4): 826-833.
- [7] 任建勋,史雅红,杨斌,等. 大鼠急性心肌梗死损伤后心脏结构和功能改变的超声心动图评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 17-23.
- [15] 牛欢,陈曼丽,杨波,等. 基于 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 63-70.
- [16] 马博,李建刚,王俊,等. miR-106b 靶向调控 TGF- $\beta$ /Smad 通路对结肠癌细胞侵袭和迁移的促进作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(3): 630-636.
- [17] 徐岩. 鹿茸多肽介导 TGF- $\beta$ /Smads/ERK 信号通路对阿霉素诱导心肌损伤的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020.
- [18] 代天,刘敏,杨萍,等. 乌梅有机酸基于 TGF- $\beta$ /Smad 信号

- 通路对高糖诱导心肌纤维化的保护作用 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(11): 1430-1435.
- [19] Zhang N, Sun Y. LncRNA ROR facilitates myocardial fibrosis in rats with viral myocarditis through regulating C-Myc expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2019, 23(24): 10982-10988.
- [20] 王璇. 曲古菌素 A 调控树突状细胞介导心肌梗死后成纤维细胞胶原表达的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2021.
- [21] 陈慧洋. 益气活血药对心肌梗死大鼠 miR-133a 表达和左室重构的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [22] 张国荣, 孙振山. 鹿茸多肽的药理作用研究进展 [J]. *吉林中医药*, 2021, 41(9): 1252-1255.
- [23] 许云红. 卡托普利的药理作用与临床应用 [J]. *中国医学创新*, 2010, 7(16): 189-190.
- [24] 胡艳红, 颜鑫, 雷燕, 等. 鹿茸的化学成分、药理作用与临床应用研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(9): 47-52.

〔收稿日期〕2022-04-29

## (上接第 42 页)

- [18] Tanideh N, Keshavarzi F, Hemat Zadeh A, et al. Healing effects of human amniotic membrane and burned wool on the second-degree burn in rats [J]. *Galen Med J*, 2020, 9(1): e1759-e1767.
- [19] Wang B, Zhang A, Wang H, et al. MiR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1864-1877.
- [20] Moraes FC, Pichon C, Letourneur D, et al. MiRNA delivery by nanosystems: state of the art and perspectives [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1901-1920.
- [21] Chen H, Wang L, Zeng X, et al. Exosomes, a new star for targeted delivery [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(1): 751079-751098.
- [22] Wang Z, Yan K, Ge G, et al. Exosomes derived from miR-155-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells prevent osteoarthritis via enhancing proliferation and migration, attenuating apoptosis, and modulating extracellular matrix secretion in chondrocytes [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2021, 37(1): 85-96.
- [23] 宋晓婉, 梁璐. 间充质干细胞来源的外泌体对肺损伤的治疗作用及其潜在机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(11): 2107-2112.
- [24] 晏子友, 魏志鑫, 罗富里, 等. 尿毒症毒素通过刺激巨噬细胞外泌体分泌 miR-22 促进心肌细胞自噬 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(6): 1014-1019.
- [25] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 328-334.

〔收稿日期〕2022-03-22

王江波,梁皓,陆允平. miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 57-67.  
Wang JB, Liang H, Lu YP. miR-218-5p inhibits proliferation migration and invasion by lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 57-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.008

# miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭

王江波<sup>1</sup>, 梁皓<sup>1\*</sup>, 陆允平<sup>2</sup>

(1.濮阳市人民医院心胸外科,河南 濮阳 457001;2.金华市中心医院心胸外科,浙江 金华 321000)

**【摘要】** 目的 微小 RNA (microRNAs, miRNA) 参与了多种癌症的发生发展,有研究证明微小 RNA-218-5p (microRNA-218-5p, miR-218-5p) 在癌症的发展中发挥着重要作用。然而,miR-218-5p 影响肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 发展的具体机制尚未明确。**方法** 通过癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据分析肺腺癌组织中 miR-218-5p 的表达情况,实时荧光定量 PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 miR-218-5p 和 EGLN3 在人肺正常细胞系和人肺腺癌细胞系中的表达。蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白表达的影响以及细胞中 EGLN3 的蛋白表达。使用生物信息学方法预测并通过荧光素酶报告基因检测证实 miR-218-5p 与 EGLN3 的靶向关系。细胞活力和细胞毒性检测 (cell counting kit-8, CCK-8)、细胞克隆形成、细胞划痕、Transwell 实验检测 miR-218-5p 与 EGLN3 对肺腺癌细胞功能的影响。**结果** miR-218-5p 在肺腺癌中低表达,过表达 miR-218-5p 可抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,并抑制 AKT/mTOR 信号通路的激活。miR-218-5p 的下游靶基因 EGLN3 在肺腺癌中高表达。过表达 EGLN3 减弱了 miR-218-5p 过表达对肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用。**结论** miR-218-5p 靶向下调 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭,这些结果为肺腺癌的新治疗方法和检测手段的开发提供了新的参考依据。

**【关键词】** miR-218-5p;EGLN3;肺腺癌;增殖;迁移;侵袭

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0057-11

## miR-218-5p inhibits proliferation, migration and invasion by lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3

WANG Jiangbo<sup>1</sup>, LIANG Hao<sup>1\*</sup>, LU Yunping<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Puyang People's Hospital, Puyang 457001, China.

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Jinhua Central Hospital, Jinhua 321000)

**【Abstract】 Objective** MicroRNAs are involved in the occurrence and development of many cancers, and microRNA-218-5p (miR-218-5p) has been proven to play an important role in cancer development. However, the specific mechanism of miR-218-5p's effect on the development of lung adenocarcinoma (LUAD) has not been clarified. **Methods** The expression of miR-218-5p in LUAD tissues was analyzed in TCGA data, and the mRNA expression of miR-218-5p and EGLN3 in human lung normal and human LUAD cell lines was detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of key AKT/mTOR signaling pathway proteins and EGLN3 in tumor cells. The microRNA-target relationship between miR-218-5p and EGLN3 was predicted by bioinformatics method and confirmed by luciferase reporter gene detection. The roles of miR-218-5p and EGLN3 in LUAD were measured by CCK-8, colony formation, scratch

[基金项目] 金华市科学技术局(2021-3-042)。

[作者简介] 王江波(1976—),男,本科,副主任医师,研究方向:肺腺癌的临床治疗。E-mail:wjb7148@163.com

[通信作者] 梁皓(1973—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肺腺癌的临床治疗。E-mail:kjajfj\_9824@163.com

healing, and Transwell assays. **Results** miR-218-5p was underexpressed in LUAD. Overexpression of miR-218-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of LUAD cells and the activation of the AKT/mTOR signaling pathway. EGLN3 was the downstream target gene of miR-218-5p, which was highly expressed in LUAD. Overexpression of EGLN3 weakened the inhibitory effect of miR-218-5p on proliferation, migration and invasion by LUAD cells. **Conclusions** miR-218-5p inhibited proliferation, migration, and invasion in LUAD cells by negatively affecting EGLN3 expression.

**【Keywords】** miR-218-5p; EGLN3; lung adenocarcinoma; proliferation; migration; invasion

在世界范围内,肺癌(lung cancer)是致死率最高的实体瘤之一,其中大约 95%的肺癌病例可以被分为非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)<sup>[1]</sup>。NSCLC 又进一步分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌三种类型<sup>[2]</sup>,其中肺腺癌是最常见的类型,大约占肺癌的 40%<sup>[2]</sup>。对早期肺腺癌患者来说,手术配合放化疗能显著提高患者的 5 年存活率(依据临床 stage 分期,IA 期、IB 期、IIA 阶段和 IIB 阶段患者的 5 年生存率分别为 83%、68%、60%、53%)<sup>[3]</sup>。但是晚期肺腺癌患者几乎难以以同种手段治疗,其 5 年生存率大约仅 10%<sup>[4]</sup>,因此近年来肺癌的免疫治疗、靶向治疗等手段成为研究热点。目前研究的重中之重在于找到安全高效的治疗方法,研究肺癌的发生和发展机制,以提供合适的治疗靶标。

微小 RNA(microRNAs, miRNAs)是一种短的非编码单链 RNA 分子,长度约为 22 个核苷酸序列,miRNAs 通过与转录本中的互补位点结合来调节靶基因的表达,从而导致翻译抑制或转录降解<sup>[5]</sup>。大量研究证明 miRNA 参与了细胞的增殖、发育、凋亡、代谢和形态发生,并且与多种癌症的发生相关<sup>[6]</sup>。例如,miR-216b 被证实通过沉默 KRAS 抑制胰腺癌细胞进展和促进胰腺癌细胞凋亡<sup>[7]</sup>;miR-518 通过靶向 MDM2 基因促进胃癌细胞凋亡和抑制胃癌细胞发展<sup>[8]</sup>;miR-451a 通过靶向 ATF2 抑制非小细胞肺癌的细胞迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。miR-218-5p 作为一种抑制肿瘤恶性进展的 miRNA,在多种肿瘤中低表达,miR-218-5p 在前列腺癌组织中低表达并且能够通过同时靶向 TRAF1、TRAF2 和 TRAF5 削弱前列腺癌细胞的侵袭和融合能力<sup>[10]</sup>;miR-218-5p 通过靶向结合 Cx43 参与乳腺癌细胞的细胞增殖和迁移过程<sup>[11]</sup>;miR-218-5p 可以抑制胶质瘤的发病机制和发展,降低细胞的增殖和侵袭能力以及阻碍 EMT(epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[12]</sup>;miR-218-5p 抑制人类视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)细胞的生存能力,以及抑制 AKT/mTOR 信号通

路<sup>[13]</sup>;miR-218-5p 在 LUAD 组织中低表达并且可能通过雌激素信号通路影响 LUAD 进程<sup>[14]</sup>。我们还发现 miR-218-5p 通过调控 EGFR 在非小细胞肺癌中发挥抑制肺癌细胞增殖和迁移的作用<sup>[15]</sup>。在非小细胞肺癌中 miR-218-5p 是一种潜在的肿瘤抑制因子<sup>[16]</sup>,但 miR-218-5p 影响 LUAD 进展的确切分子机制仍然需要进一步的研究。

在本研究中我们发现 miR-218-5p 在肺腺癌组织和细胞中低表达。结合前人在其他癌种的研究,我们推测 miR-218-5p 可能在肺腺癌的发生发展中也发挥着重要的抑癌作用,并且很有可能与 AKT/mTOR 信号通路相关。随后,我们进一步筛选了 miR-218-5p 下游靶基因并通过体外实验验证了 miR-218-5p 对其靶基因的调控机制。本研究为寻找肺腺癌的靶向诊断和治疗的新方法提供一定的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

研究所用的人肺上皮细胞系 BEAS-2B 细胞(BNCC254518)和人肺腺癌细胞 A549 细胞(BNCC290808)、A-427 细胞(BNCC263315)、Calu-3 细胞(BNCC294106)、PC-9(BNCC341852)均购自北纳生物(中国)。

### 1.2 主要试剂与仪器

10%胎牛血清(16140089,美国 Gibco 公司);1%的青霉素/链霉素(15140163,美国 Gibco 公司);BEGM(CC-3170,瑞士 Lonza 公司);F-12K(11765054,美国 Gibco 公司);EMEM(30-2003,美国 Model Culture Institute 公司);RPMI-1640(11875093,美国 Gibco 公司);TRIzol(15596026,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MiRNA 逆转录 PCR 试剂盒(RR047A,中国宝日医生物技术公司);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(RR820A,中国宝日医生物技术公司);CCK-8 试剂(C0038,中国生物技术有限公司);基质胶(356234,美国 Becton Dickinson 公司);RIPA 缓冲液(89900,美国 Thermo

Fisher Scientific 公司); BCA 蛋白检测试剂盒 (23225, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 超敏化学发光试剂 (WB7106, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK (VT1568, 中国友宝生物公司); Lipofectamine 2000 (11668019, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 双荧光素酶检测试剂盒 (HY-K1013, 美国 MCE 公司); EGLN3、AKT、P-AKT、MTOR、P-mTOR、GAPDH 及羊抗兔 IgG 均购于英国 Abcam 公司, 货号 ab184714、ab8805、ab81283、ab134903、ab109268、ab9485、ab6721。恒温培养箱、Nanodrop 2000 分光光度计、ABI 7500 实时 PCR 仪, 酶标仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 显微镜购自日本 Olympus 公司; 化学发光仪购自美国 General Electric 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

人肺上皮细胞系 BEAS-2B 细胞在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 BEGM 中培养; A549 细胞在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 F-12K 中培养, A-427 细胞系和 Calu-3 细胞系在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 EMEM 中培养; PC-9 细胞系在添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 中培养, 细胞均在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。

#### 1.3.2 生信分析

从 TCGA 数据库下载 TCGA-LUAD 的 miRNA 成熟体 (癌旁样本 46 个, 癌变样本 521 个) 和 mRNA (癌旁样本 59 个, 癌变样本 535 个) 的表达量数据, 从 GEO 数据库下载 LUAD 的 miRNA (数据集编号: GSE36681, 癌旁样本 103 个, 癌变样本 103 个) 的表达量数据。科研人员基于下载数据对 miR-218-5p 进行表达量分析。利用 EdgeR 对 mRNA 进行差异分析 ( $|\log_{2}FC| > 3.0, padj < 0.01$ ) 获得异常表达基因 (differentially expressed genes, DEGs)。利用 TargetScan、starBase、miRDIP 和 miRDB 数据库对目标 miR-218-5p 进行靶向预测并与上调 DEGs 取交集。将得到的候选基因与 miR-218-5p 进行 Pearson 相关性分析, 选取负相关性最高的 mRNA 作为研究对象。同时, 对靶标 mRNA 进行预后分析。

#### 1.3.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 TRIzol 试剂从培养的细胞中提取总 RNA。使用 Nanodrop 2000 分光光度计对总 RNA 进行质量评估和定量。使用 miRNA 逆转录 PCR 试剂盒和

mRNA 逆转录 PCR 试剂盒分别合成 DNA。使用 SYBR-Green PCR Master Mix 试剂盒分析不同基因的相对表达。qRT-PCR 反应使用 ABI 7500 Real-time PCR 系统。miRNA 以 U6 作为内参基因, mRNA 以 GAPDH 作为内参基因, 结果使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 值进行归一化处理。引物序列如下表 1 所示。

#### 1.3.4 CCK-8 分析

将制备好的肺腺癌单细胞悬液接种到 96 孔板中, 每个孔接种 2000 个细胞, 培养液体积 100 μL。放置在培养箱中培养, 分别在培养 0、24、48、72、96 h 时加入 10 μL 的 CCK-8 溶液并在 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下分别检测各时间点的吸光度。

#### 1.3.5 细胞克隆

转染后将细胞 (每毫升 500 个) 接种到 12 孔板中。培养 10~14 d 后, 使用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫染色 15 min, 显微镜下观察。统计每个孔的细胞数量, 进一步统计分析。

#### 1.3.6 划痕愈合实验

将制备好的肺腺癌单细胞悬液接种到 6 孔板中, 每孔接种细胞悬液 2 mL (每毫升 5×10<sup>5</sup> 个)。细胞生长到铺满孔底后, 用 200 μL 的枪头划出一条经过孔底中心的直线痕迹, 用 PBS 洗去刮擦下来的细胞, 拍照并记录划痕的宽度 (μm), 弃掉 PBS 并加入不含 FBS 的基础培养基, 然后将 6 孔板放置在细胞培养箱中 24 h。弃掉培养基加入 PBS 清洗。然后拍照记录 24 h 的划痕宽度 (μm)。统计 0 h 和 24 h 的划痕宽度并计算划痕愈合率。计算公式: 划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度。

#### 1.3.7 Transwell 侵袭实验

将胰蛋白酶消化下来的细胞经过 PBS 洗涤后, 用无血清培养基重悬。在底部涂有基质胶的小室中接种 1×10<sup>4</sup> 个细胞, 含有 10% FBS 的培养基添加到下室中。24 h 后, 用棉签轻轻将未侵袭的细胞从

表 1 qRT-PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因 Genes	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
miR-218-5p	F: CGCAGTTGTGCTTGATCT
	R: TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACATGCT
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCAC
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
EGLN3	F: TCAAGGAGAGGCTAAGGCAA
	R: ATGCAGGTGATGCACGA
GAPDH	F: CCCCTTCATTGACCTCAACTACAT
	R: CGCTCCTGGAAGATGCTGA

小室底膜的上表面去除, PBS 洗去残留的培养基后用 0.5% 结晶紫染色, PBS 洗涤。在显微镜下随机选取 5 个视野观察并拍照, 计数穿膜细胞数。

### 1.3.8 蛋白免疫印迹

向 RIPA 缓冲液中加入蛋白酶抑制剂, 进而裂解肺腺癌细胞。使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。将等量的蛋白用 10% SDS-PAGE 分离, 蛋白质电泳后转移到 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 在 4℃ 条件下兔抗 EGLN3 (1 : 2000)、AKT (1 : 500)、p-AKT (1 : 5000)、mTOR (1 : 10000)、p-mTOR (1 : 1000) 和 GAPDH (1 : 2500) 孵育过夜; TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入加辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG H&L (1 : 2000) 室温孵育 1 h; TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min, 在 PVDF 膜表面添加超敏化学发光试剂并在化学发光仪扫描显影。

### 1.3.9 双荧光素酶检测

由广州复能基因有限公司合成了含有野生型 (WT) EGLN3-3'-UTR 序列 (EGLN3-WT) 和突变型 (MUT) EGLN3-3'-UTR 序列 (EGLN3-Mut) 的质粒。海肾荧光素酶表达载体 pRL-TK 作为内参。将构建的质粒分别与 miR-218-5p mimic 或 mimic NC 共同转染到 PC-9 细胞中, 转染试剂为 Lipofectamine 2000。转染 36 h 后, 使用双荧光素酶检测试剂盒在化学发光仪上进行荧光素酶活性检测。

## 1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8.0 分析所有数据, 并将每个实验重复 3 次。结果以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )

的形式表示, 两组间的方差显著性采用 *t* 检验, 多组间的方差显著性采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

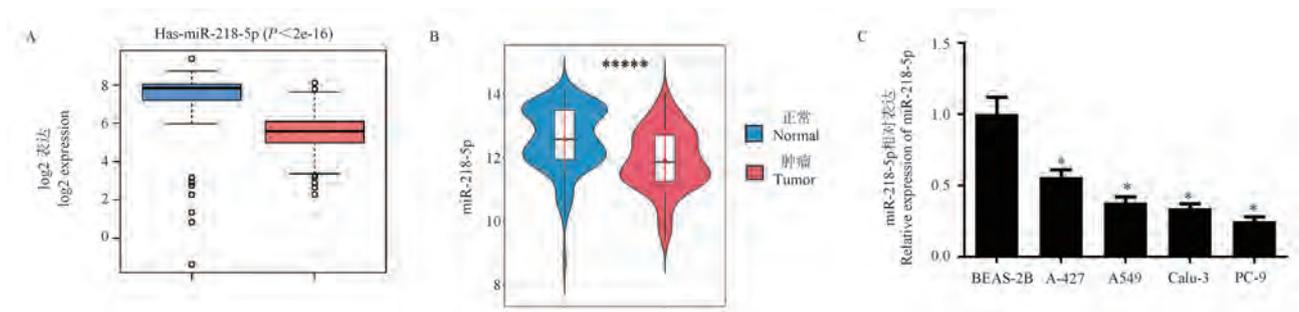
## 2 结果

### 2.1 miR-218-5p 在肺腺癌中显著低表达

从 TCGA 数据库和 GEO 数据库 (GSE36681) 下载 LUAD 的 miRNA 成熟体, 基于下载数据对 miR-218-5p 进行表达量的分析, 结果显示 miR-218-5p 在肺腺癌组织中显著低表达 (图 1A、图 1B)。随后我们研究了 miR-218-5p 在正常人肺上皮细胞系和肺腺癌细胞系中的表达情况, 结果显示相比于正常人肺上皮细胞系, 肺腺癌细胞系中的 miR-218-5p 的表达明显下降 ( $P < 0.05$ ) (图 1C)。这些结果表明 miR-218-5p 在肺腺癌中低表达, 同时在后续实验中我们将选择 miR-218-5p 表达相对较低的 PC-9 细胞系进行体外细胞实验的验证。

### 2.2 过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭

前面已经证实了 miR-218-5p 在肺腺癌中低表达, 随后为了进一步验证 miR-218-5p 对肺腺癌细胞功能的影响, 我们设计了一系列细胞功能实验。首先在肺腺癌 PC-9 细胞中分别转染 mimic NC 和 miR-218-5p mimic, 并用 qRT-PCR 检测转染效率, 结果显示相比于 mimic NC 组, miR-218-5p mimic 组细胞 miR-218-5p 表达明显上升 ( $P < 0.05$ ) (图 2A), 这说明 miR-218-5p mimic 可用于之后的实验。使用



注: A: miR-218-5p 在 TCGA 数据库癌旁组织和癌变组织中的表达情况, 蓝色代表癌旁组织, 红色代表癌变组织; B: miR-218-5p 在 GEO 数据库癌旁组织和癌变组织中的表达情况, 蓝色代表癌旁组织, 红色代表癌变组织; C: qRT-PCR 检测人肺上皮细胞系 BEAS-2B 和肺腺癌细胞 A-427、A549、Calu-3、PC-9 中 miR-218-5p 表达水平。与 BEAS-2B 组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与正常组相比, \*\*\*\*\*  $P < 0.001$ 。

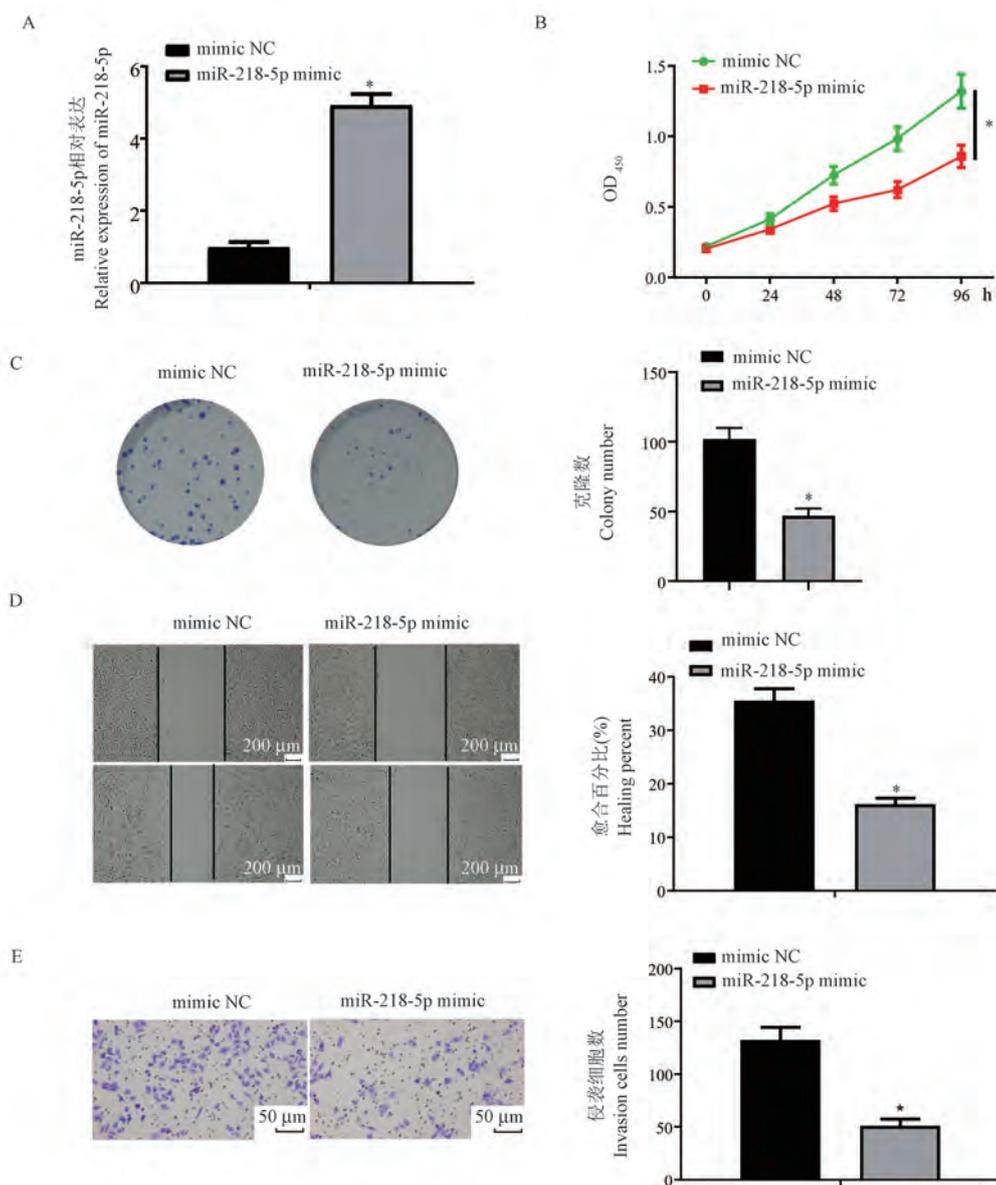
图 1 肺腺癌中 miR-218-5p 显著低表达

Note. A, Expression of miR-218-5p in adjacent and cancerous tissues in TCGA database, blue represented adjacent tissues, and red represented cancerous tissues. B, Expression of miR-218-5p in adjacent and cancerous tissues in GEO database, blue represented adjacent tissues, and red represented cancerous tissues. C, Expression levels of miR-218-5p in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cells A-427, A549, Calu-3 and PC-9 were detected by qRT-PCR. Compared with BEAS-2B group, \*  $P < 0.05$ . Compared with the normal group, \*\*\*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 1 miR-218-5p was significantly low expression in lung adenocarcinoma

CCK8 实验和细胞克隆形成实验检测细胞的增殖能力,结果显示过表达 miR-218-5p 后细胞增殖能力被显著抑制( $P<0.05$ ) (图 2B、图 2C)。细胞划痕实验和 Transwell 实验分别检测了过表达 miR-218-5p 对

细胞迁移和侵袭的影响,结果显示过表达 miR-218-5p 后细胞的迁移和侵袭能力显著减弱( $P<0.05$ ) (图 2D、图 2E)。由此,我们认为 miR-218-5p 在肺腺癌细胞 PC-9 的增殖和转移过程发挥抑制作用。



注:A:qRT-PCR 检测转染后各组肺腺癌细胞中 miR-218-5p 的表达量;B、C,CCK-8 增殖实验和克隆形成实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后增殖能力的变化;D:划痕实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后细胞迁移能力的变化;E: Transwell 实验检测 PC-9 细胞转染 mimic NC/miR-218-5p mimic 后细胞侵袭能力的变化。与 mimic NC 组相比,\* $P<0.05$ 。

图 2 过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

Note. A, qRT-PCR was used to detect the expression of miR-218-5p in each group of lung adenocarcinoma cells after transfection. B/C, CCK-8 proliferation assay and colony formation assay were used to detect the proliferation of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic. D, Changes of migration ability of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic was detected by scratch assay. E, Changes of invasion ability of PC-9 cells after transfection with mimic NC/miR-218-5p mimic was detected by Transwell assay. Compared with mimic NC group, \* $P<0.05$ .

Figure 2 Overexpression miR-218-5p inhibited the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells

### 2.3 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的 AKT/mTOR 通路的激活

已有的研究表明,miR-218-5p 通过调控 AKT/mTOR 信号通路调控多种疾病发展如肾细胞癌<sup>[17]</sup>、视网膜神经胶质瘤<sup>[13]</sup>等。为了确定在肺腺癌中 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路的影响,我们用 Western blot 检测了 AKT/mTOR 信号通路的关键蛋白的表达。结果显示 miR-218-5p mimic 显著降低了 AKT、mTOR 的磷酸化水平,miR-218-5p inhibitor 则发挥出相反的效果(图 3A、图 3B)。结果见图 5, miR-218-5p 抑制肺癌细胞中 AKT/mTOR 信号通路的激活。

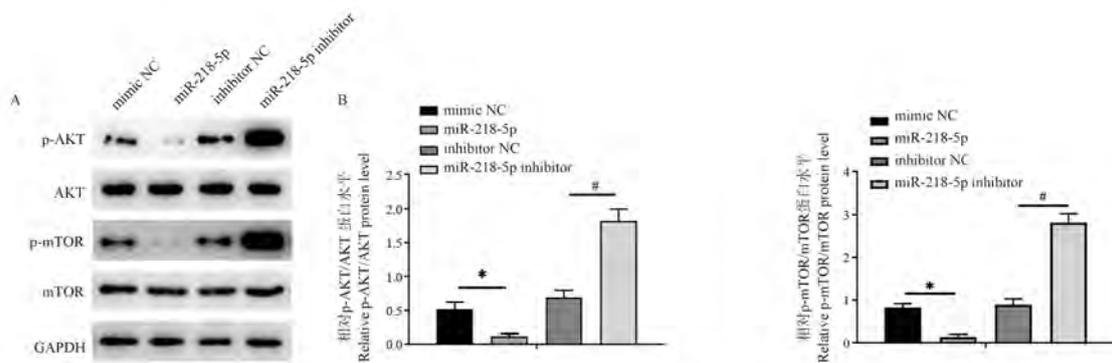
### 2.4 EGLN3 在肺腺癌细胞中显著高表达

为进一步研究 miR-218-5p 的功能机制,我们对其下游调控基因进行挖掘。首先利用 EdgeR 对 mRNA 进行差异分析,共获得 1217 个 DEGs,其中包括 1104 个上调基因,113 个下调基因(图 4A);然后利用 TargetScan、starBase、miRDIP 和 miRDB 共 4 个数据库预测 miR-218-5p 的靶基因,获得 ONECUT2、EGLN3、LHX1、SLCO5A1 和 CASKIN1 共 5 个候选基因(图 4B);再通过 Pearson 分析,最终选取负相关性最强的 EGLN3 作为靶标(图 4C、图 4D)。TCGA 数据库数据显示与癌旁组织相比,EGLN3 在肺腺癌癌变组织中显著高表达( $P < 0.05$ )(图 4E),且高表达 EGLN3 的肺腺癌患者总生存期相对较低(图 4F)。有报道证实 EGLN3 在肾细胞癌<sup>[18]</sup>、胰腺

癌<sup>[19]</sup>等癌种中上调,能调控肿瘤细胞的多种生物学功能。为了探讨 EGLN3 在肺腺癌进展中的潜在作用,我们首先检测了 EGLN3 在 BEAS-2B 和 PC-9 中的 mRNA 和蛋白表达情况。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果(图 4G、图 4H)显示,与人肺上皮细胞系(BEAS-2B)相比,PC-9 细胞中 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上升( $P < 0.05$ )。这些结果表明 EGLN3 是 miR-218-5p 的潜在下游靶标,且其在肺腺癌中高表达。

### 2.5 肺腺癌细胞中 miR-218-5p 靶向结合 EGLN3

为了明确 miR-218-5p 与 EGLN3 之间的调控关系,首先我们利用 starBase 数据库中预测 miR-218-5p 与 EGLN3 的结合位点,结果表明 miR-218-5p 和 EGLN3 之间存在靶向结合位点(图 5A),随后通过双荧光素酶报告基因检测实验验证 miR-218-5p 和 EGLN3 之间是否存在靶向结合关系。结果显示,含有 EGLN3 3' UTR 的双荧光素酶报告载体(EGLN3-WT)和 miR-218-5p mimic 共转染组荧光素酶活性显著降低( $P < 0.05$ ),而突变组的荧光素酶活性则无明显变化(图 5B)。接着我们还检测了 PC-9 细胞转染 mimic NC 和 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果发现,与对照组相比,过表达 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达下降( $P < 0.05$ )(图 5C、图 5D)。因此,我们认为 EGLN3 是 miR-218-5p 的直接靶点,并受 miR-218-5p 的负调控。

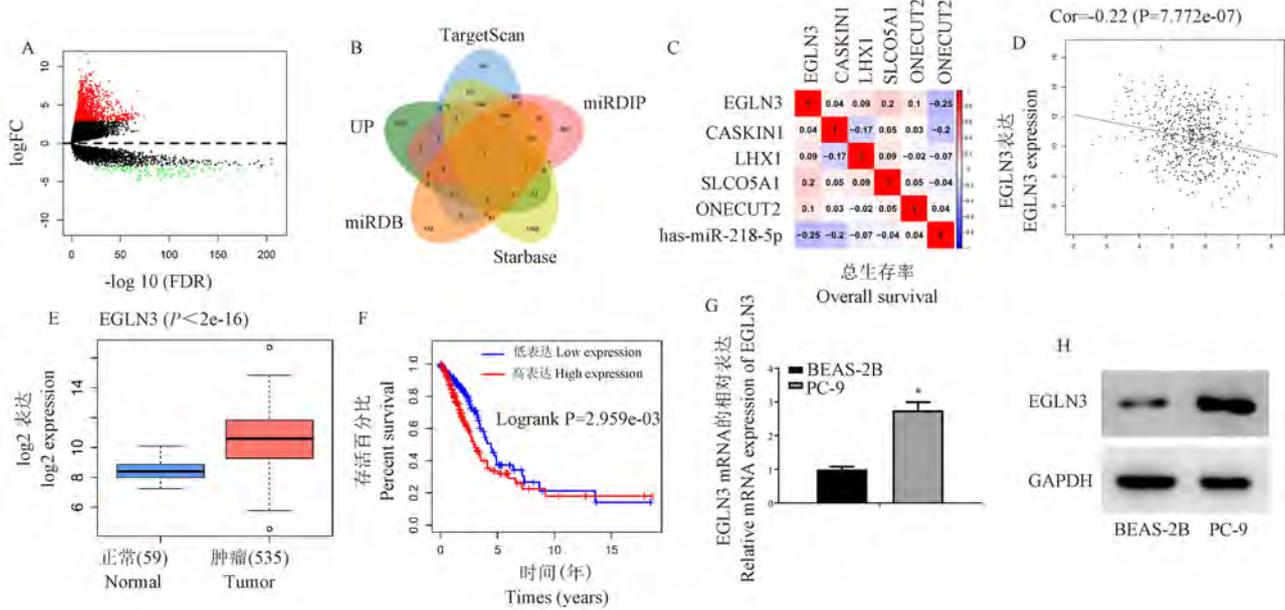


注:A:Western blot 检测 miR-218-5p 对 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白(AKT、p-AKT、mTOR 和 p-mTOR)表达的影响;B:柱状图显示蛋白的相对表达水平,包括 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR。mimic NC 组与 miR-218-5p mimic 组相比, \*  $P < 0.05$ ;inhibitor NC 组与 miR-218-5p inhibitor 组相比, #  $P < 0.05$ 。

图 3 miR-218-5p 抑制 AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的表达

Note. A, Western blot analysis of the effects of miR-218-5p on the expression of AKT/mTOR signaling pathway related proteins (AKT, p-AKT, mTOR and p-mTOR). B, Histogram showed the relative expression levels of proteins, including p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR. Compared between mimic NC group and miR-218-5p mimic group, \*  $P < 0.05$ . Compared between inhibitor NC group and miR-218-5p inhibitor group, #  $P < 0.05$ .

Figure 3 miR-218-5p suppressed the expression of AKT/mTOR signaling pathway related proteins

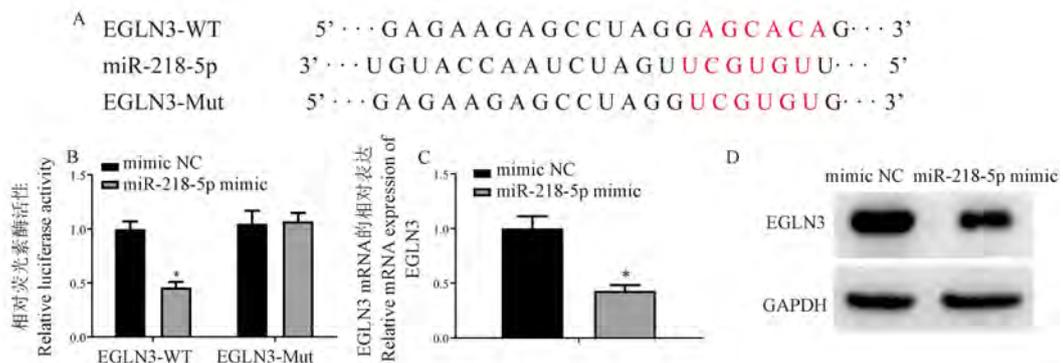


注:A:TCGA-LUAD的mRNA的差异基因火山图;B:利用TargetScan、miRDB、miDIP和starBase数据库预测miR-218-5p的靶基因与差异上调mRNA交集;C:miR-218-5p与5个预测基因Pearson相关性图;D:miR-218-5p与EGLN3基因Pearson相关性图;E:EGLN3在正常组织和癌症组织中的表达情况,蓝色代表癌旁组织,红色代表癌变组织;F:EGLN3基因的生存曲线,横坐标表示时间(年),纵坐标表示生存率,红色曲线表示高表达患者,蓝色曲线表示低表达患者;G:qRT-PCR检测人肺上皮细胞系BEAS-2B和肺腺癌细胞系PC-9中EGLN3的mRNA表达情况;H:Western blot检测人肺上皮细胞系BEAS-2B和肺腺癌细胞系PC-9中EGLN3蛋白表达情况。与BEAS-2B组相比,\*P<0.05。

**图4** 肺腺癌细胞中EGLN3高表达

Note. A, Volcano map of differential genes of TCGA-LUAD mRNA. B, Using TargetScan, miRDB, miDIP and starBase databases to predict the intersection of miR-218-5p target genes and different upregulated mRNAs. C, Pearson correlation diagram between miR-218-5p and five predicted genes. D, Pearson correlation diagram between miR-218-5p and EGLN3 gene. E, EGLN3 expression in normal and cancer tissues, blue represents adjacent tissues and red represents cancerous tissues. F, Survival curve of EGLN3 gene, the abscissa represents time (years), the ordinate represents survival rate, the red curve represents patients with high expression and the blue curve represents patients with low expression. G, qRT-PCR was used to detect mRNA expression of EGLN3 in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cell line PC-9. H, Western blot analysis of EGLN3 protein expression in human lung epithelial cell line BEAS-2B and lung adenocarcinoma cell line PC-9. Compared with BEAS-2B group, \*P<0.05.

**Figure 4** EGLN3 was highly-expressed in lung adenocarcinoma cells



注:A:starBase数据库预测miR-218-5p与EGLN3的靶向结合位点;B:双荧光素酶实验检测不同转染组PC-9细胞的荧光素酶活性;C:qRT-PCR检测肺腺癌细胞PC-9不同转染组中EGLN3的mRNA表达水平;D:Western blot检测肺腺癌细胞PC-9不同转染组中EGLN3蛋白的表达情况。与mimic NC组相比,\*P<0.05。

**图5** 肺腺癌中miR-218-5p靶向结合EGLN3

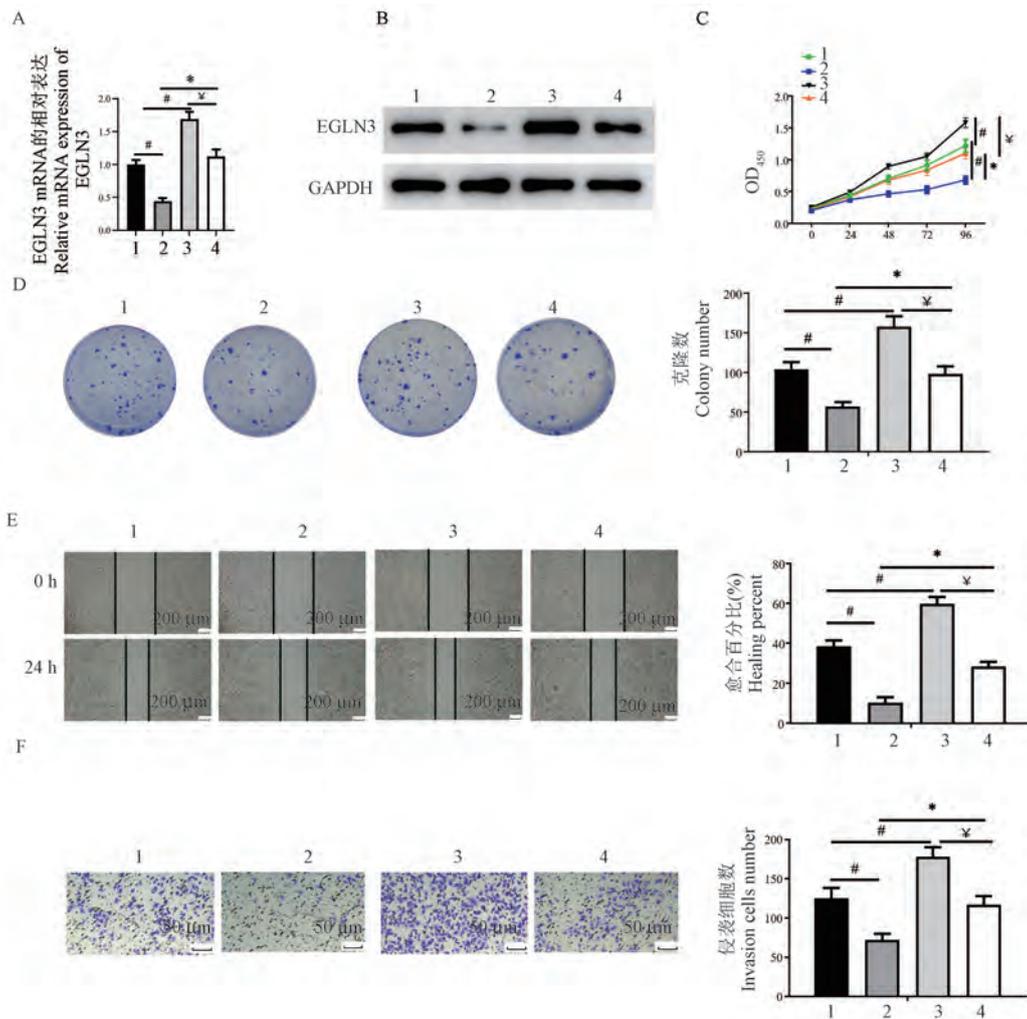
Note. A, starBase database predicted the targeted binding sites of miR-218-5p and EGLN3. B, Double luciferase assay was used to detect the luciferase activity of PC-9 cells in different transfection groups. C, qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of EGLN3 in PC-9 transfected groups. D, Western blot was used to detect the protein expression of EGLN3 in PC-9 transfected groups. Compared with mimic NC, \*P<0.05.

**Figure 5** miR-218-5p targeted binding to EGLN3 in lung adenocarcinoma

## 2.6 miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

为了进一步探究 miR-218-5p 靶向 EGLN3 在肺腺癌发生发展中的作用,我们进行了后续实验。首先,在肺腺癌细胞系 PC-9 中分别共转染 mimic NC+oe-NC、miR-218-5p mimic + oe-NC、mimic NC + oe-

EGLN3 和 miR-218-5p mimic+oe-EGLN3,并用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EGLN3 的表达效率。结果见图 6,与对照组相比,单独过表达 miR-218-5p 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达显著下调,单独过表达 EGLN3 后 EGLN3 的 mRNA 和蛋白表达显著上调( $P < 0.05$ ),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后细胞



注:A:qRT-PCR 实验检测不同转染组 PC-9 细胞中 EGLN3 mRNA 的表达水平;B:Western blot 实验检测不同转染组 PC-9 细胞中 EGLN3 蛋白的表达;C:CCK-8 实验检测不同转染组 PC-9 细胞的增殖能力;D:细胞克隆形成实验检测不同转染组 PC-9 细胞的克隆形成情况;E:划痕愈合实验检测不同转染组 PC-9 细胞的迁移能力;F:Transwell 实验检测不同转染组 PC-9 细胞的侵袭能力。1:mimic-NC+oe-NC;2:miR-218-5p mimic+oe-NC;3:mimic NC+oe-EGLN3;4:miR-218-5p mimic+oe-EGLN3。与 miR-218-5p mimic+oe-NC 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 mimic NC+oe-NC 组相比, # $P < 0.05$ ;与 mimic-NC+oe-EGLN3 组相比, † $P < 0.05$ 。

图 6 miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

Note. A, qRT-PCR assay was used to detect EGLN3 mRNA expression levels in PC-9 cells of different transfection groups. B, Western blot assay was performed to detect the expression of EGLN3 protein in PC-9 cells of different transfection groups. C, CCK-8 assay was used to detect the proliferation ability of PC-9 cells in different transfection groups. D, Cell colony assay was used to detect the clonogenesis of PC-9 cells in different transfection groups. E, The migration ability of PC-9 cells in different transfection groups was detected by scratch healing assay. F, Transwell assay detected the invasion ability of PC-9 cells in different transfection groups. 1, mimic-NC+oe-NC. 2, miR-218-5p mimic+oe-NC. 3, mimic NC+oe-EGLN3. 4, miR-218-5p mimic+oe-EGLN3. Compared with miR-218-5p mimic+oe-NC group, \* $P < 0.05$ . Compared with mimic NC+oe-NC group, # $P < 0.05$ . Compared with mimic-NC+oe-EGLN3 group, † $P < 0.05$ .

Figure 6 miR-218-5p inhibited proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting EGLN3

中 EGLN3 的表达水平回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6A、图 6B)。CCK-8 和细胞克隆形成实验的结果显示转染 miR-218-5p mimic 的 PC-9 细胞增殖能力显著下降,转染 oe-EGLN3 的 PC-9 细胞增殖能力显著增强( $P < 0.05$ ),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后癌细胞的增殖能力回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6C、图 6D)。划痕和侵袭实验结果显示,与对照组相比 miR-218-5p 过表达组细胞的迁移与侵袭能力显著降低,EGLN3 过表达组细胞的迁移与侵袭能力显著升高( $P < 0.05$ ),同时过表达 miR-218-5p 和 EGLN3 后癌细胞的迁移与侵袭能力回复至 mimic NC+oe-NC 组水平(图 6E、图 6F)。这些实验结果说明,miR-218-5p 通过靶向 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

### 3 讨论

本研究的目的是探讨 miR-218-5p 在肺腺癌发展中的具体调控机制。在本研究中,我们发现 miR-218-5p 在 LUAD 组织和细胞中表达下调。细胞学研究表明,过表达 miR-218-5p 可以抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制 AKT/mTOR 通路的激活。机制研究表明,EGLN3 是 miR-218-5p 的直接靶点,miR-218-5p 靶向调控 EGLN3 表达抑制 LUAD 细胞的增殖、迁移和侵袭。

miRNAs 作为一种重要的非编码小 RNA,已被证实广泛参与多种生物学功能的调控,包括细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡等<sup>[20-23]</sup>。关于 miR-218-5p,研究显示其在前列腺癌、肝细胞癌等<sup>[24]</sup>多个癌种中表达下调,且能够抑制多种癌症的发生,有作为预后标志物的潜力。在本研究中,我们基于 TCGA 数据库分析发现 miR-218-5p 在肺腺癌组织中显著低表达,qRT-PCR 验证得到 miR-218-5p 在肺腺癌细胞系中低表达,这与其在前列腺癌、肝细胞癌等<sup>[24]</sup>肿瘤中的研究结果一致。细胞功能实验表明过表达 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭能力。这与以前在肺癌中的研究结论相似<sup>[25]</sup>。

AKT/mTOR 信号通路作为维持细胞基本功能的主要信号通路之一,已被证明在肿瘤发生和发育中发挥重要作用,能够促进肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[26-27]</sup>。目前这一途径的组成基因已被广泛研究,发现在人类癌症中普遍被激活<sup>[28]</sup>。而 miR-218-5p 已被证明能在多种癌症中如视网膜母细胞

瘤、结肠癌、口腔癌<sup>[13,29-30]</sup>等通过影响 AKT/mTOR 信号通路调控细胞活力。为了阐明 miR-218-5p 抑制肿瘤进展的机制,我们检测了 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白的表达水平,结果表明过表达 miR-218-5p 可以抑制 AKT 和 mTOR 的磷酸化,这说明 miR-218-5p 抑制肺腺癌细胞中 AKT/mTOR 信号通路的激活。而我们的研究中,miR-218-5p 对 AKT/mTOR 通路的抑制表现,从某种程度上能说明其与肿瘤发展的相关性,这与前人的研究结果相一致。

miRNAs 可以通过靶向癌基因或抑癌基因来影响肿瘤的发生发展。目前已发现 miR-218-5p 具有多个靶基因,分布在不同的信号通路中<sup>[13,31-32]</sup>。通过靶基因预测软件 starBase 的分析,我们发现 EGLN3 可能是 miR-218-5p 的下游靶点。双荧光素酶报告基因实验和分子实验结果进一步验证 miR-218-5p 能够靶向下调 EGLN3 的表达。EGLN3 也称 PHD3,是脯氨酸羟化酶的一种亚型,与癌症的发展密切相关。研究发现 EGLN3 在透明细胞肾细胞癌、乳腺癌<sup>[11,33-34]</sup>中高表达,在胰腺癌低表达。在本研究中我们发现 EGLN3 在肺腺癌细胞系中高表达,回复实验进一步证明了过表达 EGLN3 可以减弱过表达 miR-218-5p 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响。

综上所述,我们的结果表明 miR-218-5p 作为肺腺癌的肿瘤抑制因子,能够抑制 AKT/mTOR 信号通路激活。EGLN3 是 miR-218-5p 的下游靶点,miR-218-5p 靶向下调 EGLN3 抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究为 LUAD 的分子靶向治疗提供了新的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, et al. Lung cancer [J]. Lancet, 2021, 398(10299): 535-554.
- [2] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3): 288-300.
- [3] Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(1): 39-51.
- [4] Gelsomino F, Lamberti G, Parisi C, et al. The evolving landscape of immunotherapy in small-cell lung cancer: A focus on predictive biomarkers [J]. Cancer Treat Rev, 2019,

- 79: 101887.
- [ 5 ] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [ J ]. *Brief Bioinform*, 2019, 20 ( 5 ): 1836–1852.
- [ 6 ] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [ J ]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 ( 4 ): dmm047662.
- [ 7 ] Wu X, Chen W, Cai H, et al. MiR-216b inhibits pancreatic cancer cell progression and promotes apoptosis by down-regulating KRAS [ J ]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(6) : 1321–1332.
- [ 8 ] Feng C, Xian Q, Liu S. MicroRNA-518 inhibits gastric cancer cell growth by inducing apoptosis via targeting MDM2 [ J ]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1595–1602.
- [ 9 ] Shen YY, Cui JY, Yuan J, et al. MiR-451a suppressed cell migration and invasion in non-small cell lung cancer through targeting ATF2 [ J ]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 ( 17 ): 5554–5561.
- [ 10 ] Peng P, Chen T, Wang Q, et al. Decreased miR-218-5p levels as a serum biomarker in bone metastasis of prostate cancer [ J ]. *Oncol Res Treat*, 2019, 42(4) : 165–185.
- [ 11 ] Xia C, Jiang H, Ye F, et al. The multifunction of miR-218-5p-Cx43 axis in breast cancer [ J ]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 8319–8328.
- [ 12 ] Li Z, Qian R, Zhang J, et al. MiR-218-5p targets LHFPL3 to regulate proliferation, migration, and epithelial-mesenchymal transitions of human glioma cells [ J ]. *Biosci Rep*, 2019, 39 ( 3 ): BSR20180879.
- [ 13 ] Li L, Yu H, Ren Q. MiR-218-5p suppresses the progression of retinoblastoma through targeting NAC1 and inhibiting the AKT/mTOR signaling pathway [ J ]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6959–6967.
- [ 14 ] Peng Z, Pan L, Niu Z, et al. Identification of microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma using integrating genomics analysis [ J ]. *Oncotarget*, 2017, 8 ( 38 ): 64143–64156.
- [ 15 ] Zhu K, Ding H, Wang W, et al. Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer [ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7(19) : 28075–28085.
- [ 16 ] Zarogoulidis P, Petanidis S, Kioseoglou E, et al. MiR-205 and miR-218 expression is associated with carboplatin chemoresistance and regulation of apoptosis via Mcl-1 and Survivin in lung cancer cells [ J ]. *Cell Signal*, 2015, 27(8) : 1576–1588.
- [ 17 ] Mu L, Guan B, Tian J, et al. MicroRNA218 inhibits tumor angiogenesis of human renal cell carcinoma by targeting GAB2 [ J ]. *Oncol Rep*, 2020, 44(5) : 1961–1970.
- [ 18 ] Lin L, Cai J. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation [ J ]. *J Cell Biochem*, 2020, 121 ( 11 ): 4377–4385.
- [ 19 ] Chiba N, Sunamura M, Nakagawa M, et al. Overexpression of hydroxyproline via EGLN/HIF1A is associated with distant metastasis in pancreatic cancer [ J ]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(8) : 2570–2581.
- [ 20 ] Ma J, Li N, Lin Y, et al. Circulating neutrophil MicroRNAs as biomarkers for the detection of lung cancer [ J ]. *Biomark Cancer*, 2016, 8: 1–7.
- [ 21 ] Xiao H, Yu L, Li F, et al. MiR-340 suppresses the metastasis by targeting EphA3 in cervical cancer [ J ]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(9) : 1115–1123.
- [ 22 ] Jiang YC, Ma JX. The role of miR-324-3p in polycystic ovary syndrome ( PCOS ) via targeting WNT2B [ J ]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11) : 3286–3293.
- [ 23 ] Zhu S, Song W, Sun Y, et al. MiR-342 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting MAPK1 expression [ J ]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2020, 47 ( 8 ): 1448–1454.
- [ 24 ] Zhang G, He X, Ren C, et al. Long noncoding RNA PCA3 regulates prostate cancer through sponging miR-218-5p and modulating high mobility group box 1 [ J ]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8) : 13097–13109.
- [ 25 ] 陈平, 赵云龙, 李英杰. MiR-218 通过抑制 Robo1 的表达影响肺癌细胞迁移侵袭 [ J ]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(7) : 452–458.
- [ 26 ] Riquelme I, Tapia O, Espinoza JA, et al. The gene expression status of the PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer tissues and cell lines [ J ]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22(4) : 797–805.
- [ 27 ] Cheng TC, Din ZH, Su JH, et al. Sinulariolide suppresses cell migration and invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in human bladder cancer cells [ J ]. *Mar Drugs*, 2017, 15 ( 8 ): 238.
- [ 28 ] Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside [ J ]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 125–132.
- [ 29 ] Meng X, Zhang Y, Hu Y, et al. LncRNA CCAT1 sponges miR-218-5p to promote EMT, cellular migration and invasion of retinoblastoma by targeting MTF2 [ J ]. *Cell Signal*, 2021, 86: 110088.
- [ 30 ] Zhao Y, Yao R. Long non-coding RNA HOXA-AS3 promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma through sponging microRNA miR-218-5p [ J ]. *Bioengineered*, 2021, 12 ( 1 ): 8724–8737.
- [ 31 ] Wang H, Zhan M, Xu SW, et al. miR-218-5p restores sensitivity to gemcitabine through PRKCE/MDR1 axis in gallbladder cancer [ J ]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5) : e2770.
- [ 32 ] Gu J, Ge X, You A, et al. miR-218-5p inhibits the malignant progression of glioma via targeting TCF12 [ J ]. *Tumori*, 2022, 108(4) : 338–346.

- [33] Yue Y, Cui J, Zhao Y, et al. Circ\_101341 deteriorates the progression of clear cell renal cell carcinoma through the miR-411/EGLN3 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 13513-13525.
- upregulation promotes pancreatic cancer progression by mediating miR-218-5p/LASP1 signaling axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 347.
- [34] Wang A, Dai H, Gong Y, et al. ANLN-induced EZH2 [收稿日期]2022-02-21

## COVID-19 动物模型的特点

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是 2019 年冠状病毒病 (COVID-19) 的病原体, 新冠疫情的全球大流行是当今世界最大的安全威胁。在历次传染病疫情流行时, 动物模型研究在阐明发病机制和传播机制、筛选有效疫苗和药物方面做出突出贡献。在 SARS-CoV 和 MERS-CoV 大流行期间开发的动物模型构建技术被迅速应用于 COVID-19 动物模型的建立中。

目前为止, 研究者建立了多物种 COVID-19 的动物模型, 包括小鼠、仓鼠、貂和非人灵长类动物等。感染性疾病根据病原体的特点和感染方式的不同而产生独特的表现形式。本文围绕 SARS-CoV-2 的感染途径对动物模型资源进行了分类, 汇总了通过经鼻、定位、模拟传播途径感染构建的动物模型的特点。根据动物的解剖结构及生理学特征, 为直接模拟新冠肺炎的疾病特征, 针对非人灵长类等大动物研究者一般使用气管感染的方式以制备肺炎模型。除此之外, 为探究 SARS-CoV-2 的传播机制, 研究者利用小鼠、水貂、猫、非人灵长类等动物资源建立了模拟传播方式的动物模型。

综上所述, 本文从感染途径方式入手, 汇总了目前建立的新冠动物模型特点, 并指出虽然目前没有 SARS-CoV-2 感染动物模型能够完全复制严重 COVID-19 的所有关键特征, 但人源化/基因敲除一体化以及病毒可持续复制但不诱发严重病理的动物模型的建立和探索, 有助于开展对 COVID-19 发病机制的多维分析, 并为新药开发及安全性评价提供支持。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 8(5)401-409; <https://doi.org/10.1002/ame2.12278>)。

侯玉娇,张杰,赵超阳,等. 甘参复方抗肝纤维化作用机制的代谢组学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 68-74, 112.

Hou YJ, Zhang J, Zhao CY, et al. Metabolomic study on the mechanism of anti-hepatic fibrosis of glycyrrhiza uralensis-salvia miltorrhiza prescription [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 68-74, 112.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.009

## 甘参复方抗肝纤维化作用机制的代谢组学研究

侯玉娇,张 杰,赵超阳,徐天娇,李美谦,洪 博\*,李文静\*

(齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**【摘要】** 目的 该研究旨在从内源代谢物的角度阐明甘参复方 (*Glycyrrhiza Uralensis and Salvia Miltorrhiza*, GUSM) 抗肝纤维化的作用机制。**方法** 皮下注射  $\text{CCl}_4$  溶液建立肝纤维化大鼠模型。通过肝形态学指标和 HE 染色评价 GUSM 的疗效。利用超高效液相色谱-飞行时间质谱技术,通过主成分分析、正交偏最小二乘判别分析法对正常组、模型组、GUSM 组和阳性对照组大鼠的代谢物谱进行分析、筛选和鉴定。**结果** 共筛选和鉴定出 16 个与肝纤维化相关的潜在生物标志物。其中,牛磺胆酸、亚油酸、花生四烯酸等对肝纤维化进程影响较大。**结论** 甘参复方主要通过调节亚油酸和花生四烯酸的代谢,发挥抗 HF 作用。本研究有助于从代谢组学角度了解和分析 GUSM 抗 HF 的作用机制。

**【关键词】** 甘参复方剂;代谢组学;超高效液相色谱-飞行时间质谱;肝纤维化

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0068-07

## Metabolomic study on the mechanism of anti-hepatic fibrosis of glycyrrhiza uralensis-salvia miltorrhiza prescription

HOU Yujiao, ZHANG Jie, ZHAO Chaoyang, XU Tianjiao, LI Meiqian, HONG Bo\*, LI Wenjing\*

(School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

**【Abstract】 Objective** The purpose of this study is to comprehensively elucidate the anti-hepatic fibrosis mechanism of (*Glycyrrhiza Uralensis and Salvia Miltorrhiza*, GUSM) from the perspective of endogenous metabolites. **Methods** Hepatic fibrosis rat model was established by subcutaneously injecting  $\text{CCl}_4$  solution. The efficacy of GUSM was evaluated by liver morphological indexes and HE method. We analyzed, screened and identified the metabolic profiles of rats from Normal group, Model group, GUSM group and Positive group by PCA and OPLS-DA method using UPLC-TOF-MS. **Results** A total of 16 potential biomarkers in both positive and negative mode associated with hepatic fibrosis were screened and identified. The metabolomics analysis revealed that Taurocholic acid, Glycocholic acid, Arachidonic acid, and so on were greatly disturbed. **Conclusions** GUSM prescription showed anti fibrosis effect on rats through regulating metabolic pathways, mainly about Arachidonic acid metabolism. This study is useful to better understand and analyze the anti hepatic fibrosis mechanism of GUSM prescription on HF rats using metabolomics.

**【Keywords】** glycyrrhiza uralensis-salvia miltorrhiza prescription; metabolomics; UPLC-TOF-MS; hepatic fibrosis

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是一种发病机制 有一些显著进展,但仍有近一半的患者会发展为肝 复杂的慢性流行性肝病<sup>[1-2]</sup>。虽然肝纤维化的治疗 硬化<sup>[3]</sup>。中医在逆转肝纤维化的发展中显示出一

**【基金项目】** 齐齐哈尔医学科学院青年博士专项科研基金项目(QMSI2020B-03)。

**【作者简介】** 侯玉娇(1997—)女,硕士,研究生,研究方向:药物代谢动力学。E-mail:3126345256@qq.com

**【通信作者】** 洪博(1983—),女,副教授,博士,研究方向:药物代谢组学研究。E-mail:bohong200630174@163.com

李文静(1983—),男,讲师,博士,研究方向:中药药理学。E-mail:lwj022325@163.com \*共同通信作者

定优势<sup>[4-5]</sup>。越来越多的研究者利用中医药的整体性、多组分、多靶点的特点来治疗肝纤维化<sup>[6-8]</sup>。

甘参复方 (*Glycyrrhiza Uralensis and Salvia Miltorrhiza*, GUSM) 是由丹参与甘草组成的益气、和血、柔肝方剂<sup>[9-11]</sup>。其主要活性成分为芍药内酯苷、芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、迷迭香酸、苯甲酰芍药苷、甘草酸、丹参素、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II A、丹酚酸 B 等<sup>[12-15]</sup>。临床研究表明, GUSM 广泛应用于肝纤维化的预防性治疗<sup>[16-17]</sup>。作为传统的中药, 甘草常用于急、慢性肝炎的治疗<sup>[18-19]</sup>; 丹参用于慢性肝炎的治疗<sup>[20-21]</sup>。GUSM 的疗效评价主要集中于动物药效实验或临床观察, 尚未从内源物质代谢的角度来研究 GUSM 的机制。

为阐明 GUSM 复方抗肝纤维化的作用机制, 本研究采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC-TOF-MS) 技术的代谢组学方法开展 GUSM 提取物抗 HF 大鼠的血清代谢组学研究, 将所鉴定的潜在生物标志物进行相关分析, 并探讨其代谢途径, 以期 GUSM 抗 HF 的作用机制提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠购自辽宁省长生生物有限公司 [SCXK(辽)2020-0001], 共 50 只, SPF 级, 8~10 周龄, 体重 200~240 g。饲养单位为齐齐哈尔医学院动物实验中心 [SYXK(黑)2021-013], 所有实验均遵守齐齐哈尔医学院实验动物管理规定和《实验动物管理与使用指南》。本实验经齐齐哈尔医学院动物实验中心伦理委员会批准 (QMU-AECC-2022-13), 实验过程遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

中药复方制剂 (批号: 20190721) 由中药汤剂实验室研制而成; 甘草 (批号: 20180525) 产于新疆, 丹参 (批号: 20180914) 产于四川, 均购自哈尔滨市润禾中药饮片加工厂, 经齐齐哈尔医学院药学院郭丽娜教授鉴定为豆科植物甘草和唇科植物丹参; 秋水仙碱片 (批号: 120994, 包装规格 0.5 mg × 100) 产于昆明制药集团股份有限公司。甲醇 (色谱纯, 批号: 348604)、乙腈 (色谱纯, 批号: 142085), 均购自美国 Fairfield 试剂有限公司; 甲酸 (色谱纯, 批号: 095224, Dikma 公司, 美国); 纯净水 (批号: 20180521, 杭州娃哈哈集团有限公司, 杭州); 欧丽

薇兰橄榄油 (批号 F20160814, 益海嘉里食品营销有限公司, 上海); CCl<sub>4</sub> (批号: 20181204, 阿拉丁生化科技股份有限公司, 上海)。

SCIEX Triple TOF® 4600 AB ACQUITY 超高效液相色谱 (UPLC) 系统 (AB 公司, 美国); Micromass Quattro Micro API 质谱仪 (AB 公司, 美国); ST8R 冷冻离心机 (Thermo Fisher 公司, 美国); AL204 微量分析天平 (Mettler Toledo 公司, 瑞士)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 UPLC-TOF-MS 分析

超高效液相色谱 (UPLC) 系统与质谱仪联用, 进行 UPLC-TOF-MS 分析。UPLC 分析系统采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 液相色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温 40°C; 进样温度 4°C; 流动相由含有 0.1% 甲酸的水 (A) 和含有 0.1% 甲酸的乙腈 (B) 组成; 梯度洗脱, 血清的梯度洗脱时间为 12 min (表 1); 流速 0.4 mL/min; 进样量 5 μL。在血清分析中, 采用 TOF-MS 方法进行鉴定, 获取较多的代谢物信息。离子源为电喷雾离子源, 正、负离子检测模式; 采集范围 m/z 50~1200; 毛细管电压: 2.5 kV (正离子模式) / 2.2 kV (负离子模式); 喷雾气流量和锥孔气流量 500 L/h 和 50 L/h; 锥孔电压: 正模式为 25 V, 负模式为 40 V; 离子源温度: 530°C。

### 1.3.2 动物实验

将大鼠随机分为 4 组 (每组 10 只): 健康对照组 (正常组)、HF 模型组 (模型组)、GUSM 治疗组 (GUSM 组) 和秋水仙碱治疗组 (阳性组)。

HF 模型建立及给药方案<sup>[22-23]</sup>: 通过皮下注射 50% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液建立 HF 模型大鼠, 每周 2 次 (周一和周三), 每次 0.6 mL, 连续 12 周。正常组皮下注射等剂量生理盐水, 其余操作同模型组。在建立 HF 模型的同时, GUSM 组大鼠给予 GUSM 灌胃, 每日 1 次; 阳性组, 给予秋水仙碱溶液灌胃 0.5 mL

表 1 超高效液相色谱法分析血清梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program for the analysis of serum using ultra performance liquid chromatography

时间 (min) Time	A% (0.1% 甲酸-水) (0.1% FA-Water)	B% (0.1% 甲酸-乙腈) (0.1% FA-ACN)
0	100	0
3	100	0
6	75	25
10	25	75
12	10	90

(由秋水仙碱片剂 13.44 mg 和水 168 mL 混合而成)。正常组和模型组灌胃相同剂量的生理盐水。

肝纤维化大鼠模型的评价:(1)一般情况:12 周后通过大观察大鼠一般症状和体征。包括体重、精神状态、尿量等。(2)血清 ALT、AST 水平。(3)肝病理形态学变化。

肝纤维化大鼠模型成功建立的主要标准:(1)一般情况:精神萎靡、尿量减少、体重增长缓慢。(2)肝组织损伤指标检查:血清 ALT、AST 水平均显著升高。(3)组织病理学检查:肝颜色变为暗红、质地变硬、表面凹凸不平,呈小颗粒状改变;光镜下观察可见纤维间隔,肝小叶结构紊乱。

### 1.3.3 GUSM 提取物的制备

分别准确称取丹参、甘草干燥根茎粉末(过 20 目筛)各 10 g,混合。混合物在 60℃ 下用 200 mL 50%乙醇提取,每次提取 1 h,过滤,重复两次。两次提取液合并,减压浓缩至 200 mL,最终浓度为 0.1 g/mL。GUSM 提取物的特征指纹图谱如图 1 所示。

### 1.3.4 生物样品采集与处理

灌胃给药 12 周后,麻醉,肉眼观察剥离的肝组织。从眼眶静脉采集血样,在非肝素化试管中 4℃ 放置 2 h。4℃,3500 r/min 离心 10 min 后分离出血清样品。将所有血清样品转移至洁净试管中,置于 -80℃ 冰箱中冷冻保存。将大鼠肝左叶固定于 4% 中性多聚甲醛溶液中。分析前将血样在室温下重融,取 200 μL 分别置于 EP 管中,加入 3 倍量的色谱级甲醇沉淀蛋白,涡旋 1 min。4℃ 下,12000 r/min 离心 12 min。取上清液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,在 UPLC-TOF-MS 分析的正、负离子模式下注入

5 μL 制备好的血样并分析。用于验证该方法的 QC 样品的制备是从血清样品中各吸取 50 μL。然后用上述制备方法处理混合后的样品。

### 1.3.5 肝功能指标及肝病理检测

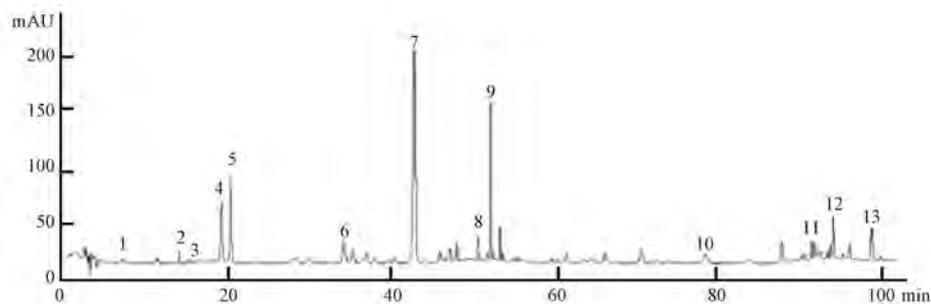
据试剂盒的说明,测量并计算血浆谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的水平。取肝组织(1.5 cm × 1 cm),用 4% 中性多聚甲醛溶液固定 24 h。正常组织切片经苏木精(HE)染色后镜下观察。2.0 cm × 2.0 cm × 0.5 cm 肝组织用 10% 福尔马林溶液固定。脱水透明后将组织包埋在融化的石蜡中,在载玻片上固化后切成 4~6 μm 宽的正方形。将载玻片放置在玻片架上进行脱蜡、染色与脱水处理。最后在玻片上滴 1~2 滴中性胶,盖玻片密封,晾干。

### 1.3.6 代谢组学方法验证

使用 QC 样品对仪器精密度、方法重复性、制备后稳定性、冻融过程和系统稳定性进行检测。仪器的精密度和方法的重复性是通过相同 QC 样品和通过相同制备程序的 6 个不同的 QC 样品进行进行 6 次重复进样来评估。用 6 个新制备的 QC 样品在室温下放置 24 h 测试样品的制备后稳定性。通过对新制备的 QC 样品进行 3 次冻融循环,评价冻融循环过程的稳定性。

### 1.3.7 代谢组学数据处理

采用 SIMCA 14.1 分析血浆代谢物数据,在对总峰强度进行归一化处理之后,进行无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),获得导致两组之间显著差异的相关代谢物信息,结果的准确性用 R<sup>2</sup> 与 Q<sup>2</sup> 等参数评价<sup>[24]</sup>,筛选出的差异代谢物通过人类代谢组数据库



注:1:丹参素;2:芍药内酯苷;3:芍药苷;4:芹糖甘草苷;5:甘草苷;6:迷迭香酸;7:丹酚酸 A;8:苯甲酰芍药苷;9:甘草酸;10:二氢丹参酮 I;11:隐丹参酮;12:隐丹参酮 I;13:隐丹参酮 II A。

图 1 GUSM 提取物的特征指纹图谱

Note. 1, Tanshinol. 2, Albiflorin. 3, Paeoniflorin. 4, Liquiritinapioside. 5, Liquiritin. 6, Rosmarinic Acid. 7, Salvianolic acid B. 8, Benzoylpaeoniflorin. 9, Glycyrrhizic acid. 10, Dihydrotanshinone I. 11, Cryptotanshinone. 12, Tanshinone I. 13, Tanshinone II A.

Figure 1 The characteristic fingerprint of GUSM extract

(HMDB)进行鉴定,最后将鉴定的潜在生物标志物导入 MetaboAnalyst 数据库进行处理分析得到潜在代谢通路。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 数据处理软件进行统计学分析,实验数据以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。多使用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析,比较不同组间双侧差异显著性,当  $P<0.05$  或  $P<0.01$  时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况及病理变化

正常组大鼠活动正常,排尿正常,体重增长平稳。模型组大鼠精神萎靡,尿量减少,皮毛易脱落,体重增长缓慢或下降。GUSM 组和阳性组大鼠症状较模型组轻,尿量明显增加,体重无明显下降。正常大鼠肝色泽红润,质地柔软。模型组大鼠肝颜色深,质地变硬,表面可见明显的胶原增生。GUSM 组和阳性对照组的肝体积、质地和颜色均有改善。

与模型组比较,GUSM 组血浆 ALT、AST 水平显

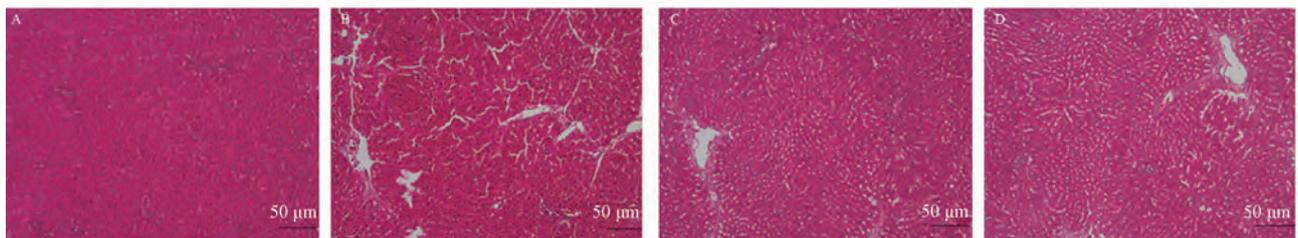
著降低( $P<0.01$ ),表明在大鼠肝纤维化模型中 GUSM 具有保护作用。HE 染色结果如图 2 所示。正常组肝组织结构完整,无变性、坏死细胞,肝小叶结构清晰。模型组肝小叶结构破坏,纤维组织增生,假小叶形成,同时形成大量脂肪变性和坏死纤维间隔,间质内有弥漫性炎性细胞浸润。GUSM 组和阳性组中,由于纤维组织的分裂,肝小叶结构紊乱,原肝小叶分叶不全,无假小叶形成,肝细胞形态与正常大鼠相似。

2.2 代谢组学方法验证

以血清(5 个阳离子和 5 个阴离子模式)所选离子的峰强度和保留时间的相对标准偏差(RSDs)和相对误差(REs)来评价方法性能(表 2)。结果表明,该实验方法是合理可靠的。

2.3 肝代谢物谱分析及潜在生物标志物的鉴定

PCA 分析得分图如图 3,GUSM 组与模型组比较,差异有统计学意义,GUSM 组与正常组比较接近,说明 GUSM 组的代谢情况向正常组转变,GUSM 对 HF 大鼠肝代谢紊乱具有调节作用。同时质控点相对集中,说明仪器稳定性好。



注:A:正常组;B:模型组;C:GUSM 组;D:阳性组。

图 2 肝组织 HE 染色结果

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Drug group. D, Positive group.

Figure 2 HE staining result of hepatic tissue

表 2 血清样品的分析性能结果

Table 2 Analytical performance of serum samples

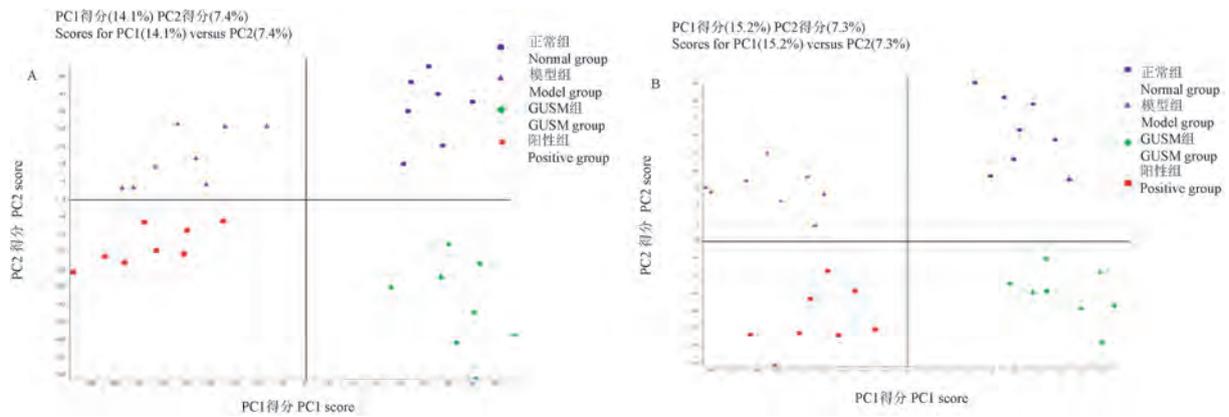
$t_R$ -m/z		精密度 (RSD, %)		重复性 (RSD, %)		系统稳定性 (RSD, %)		制备后稳定性 (RE, %) Post-preparative stability	冻融循环稳定性 (RE, %) Freeze-thaw cycles stability
		Precision		Repeatability		System stability			
		$t_R$	A	$t_R$	A	$t_R$	A	A	A
阳离子模式血清 Serum sample in positive mode	4.22-188.0709	0.3	4.7	0.1	7.6	0.4	6.5	-5.8	7.7
	7.16-453.1705	0.2	5.5	0.3	5.7	0.3	6.8	6.0	5.9
	7.82-496.3440	0.3	3.1	0.2	6.4	0.2	5.9	6.2	-5.5
	8.32-524.3766	0.1	3.8	0.2	5.1	0.2	7.4	-7.7	-8.4
	8.56-425.2151	0.2	6.4	0.2	5.1	0.3	4.9	5.6	6.4
阴离子模式血清 Serum sample in negative mode	4.83-146.9657	0.2	3.8	0.1	5.2	0.3	8.8	-8.4	-6.8
	6.93-293.1754	0.1	4.2	0.2	3.5	0.3	9.2	7.7	7.0
	7.42-564.3334	0.3	3.5	0.2	4.7	0.2	5.3	5.3	8.8
	8.34-568.3636	0.2	2.3	0.2	3.9	0.3	7.7	-6.2	10.1
	9.42-355.1587	0.2	2.6	0.2	4.3	0.2	6.5	-4.9	-7.4

注:RSD:相对标准偏差;RE:相对误差;A:峰面积。

Note. RSD, Relative standard deviation. RE, Relative error. A, Peak area.

通过 OPLS-DA 分析,正常组和模型组在正、负离子模式下代谢轮廓明显分离,如图 4,说明 HF 模型建立成功。使用分载荷图(scores plot, S-plot)并结合变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值( $VIP > 1$ ),共识别和筛选出 16 个

变量(血清样本正离子模式 7 个,负离子模式 9 个)。通过与在线数据库 HMDB 和 METLIN 获得的代谢物进行准确的质量和 MS/MS 片段信息匹配,其质荷比见表 3,所有来自样品的代谢物在各组中均有明显变化,表明 GUSM 对 HF 的治疗机制。

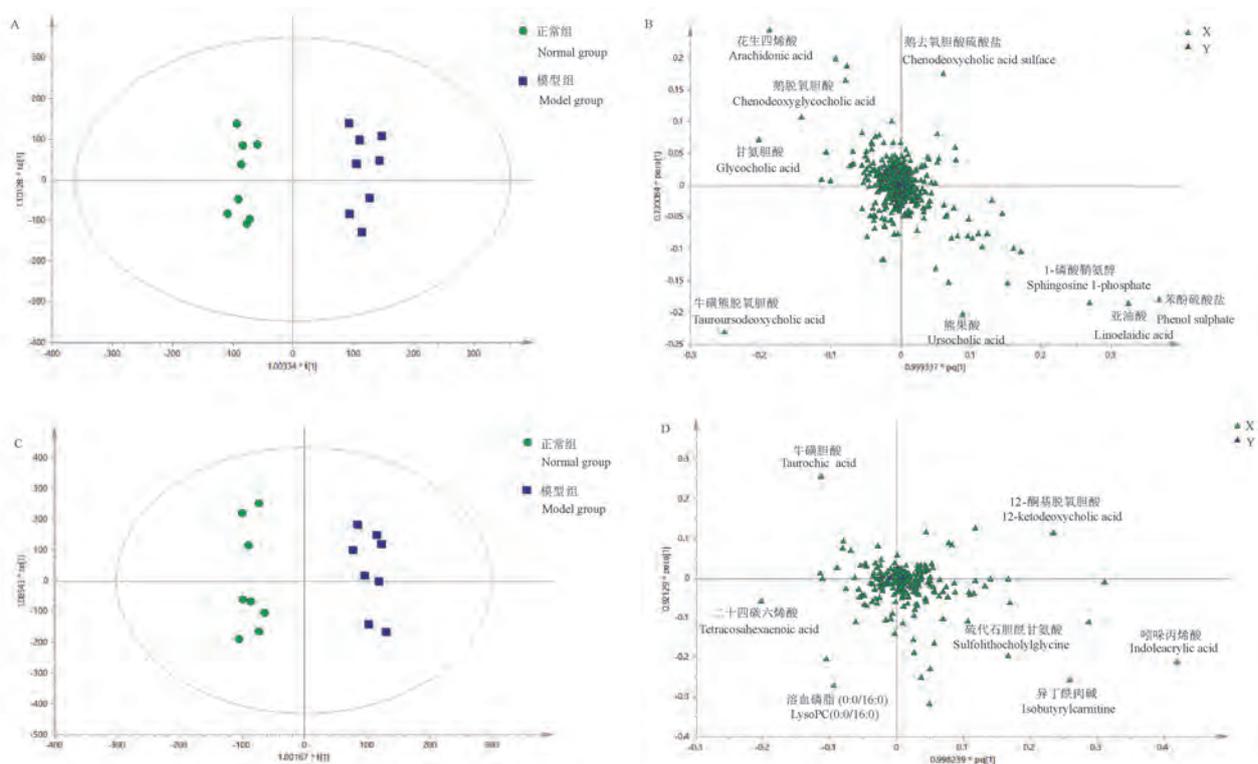


注:A:血清正离子模式;B:血清负离子模式。

图 3 PCA 分析得分图

Note. A, Serum in positive mode. B, Serum in negative mode.

Figure 3 PCA score plots



注:A、B:负离子模式;C、D:正离子模式。

图 4 血清 OPLS-DA 模型得分图和 S-plot 图

Note. A/B, Negative modes. C/D, Positive modes.

Figure 4 OPLS-DA serum score plots and S-plots

2.4 代谢组学的多变量统计分析

评估模型质量的参数结果汇总如表 4 所示, R<sup>2</sup> 和 Q<sup>2</sup> 值大于 0.9, 表明该模型具有极好的解释和预测能力, 而 R<sup>2</sup> 和 Q<sup>2</sup> 值大于 0.5, 表明该模型具有良好的解释和预测能力。以下结果表明该模型稳定可靠, 可用于差异代谢物的筛选。

2.5 代谢途径分析

通过将筛选出的潜在生物标志物输入 MetaboAnalyst 进行分析, 结果如图 5。结果显示, 这些生物标志物参与了 5 条代谢通路。其中, 亚油酸和花生四烯酸代谢、鞘脂代谢和初级胆汁酸生物合成的影响值相对较高。

表 3 CCl<sub>4</sub> 诱导的 HF 大鼠血清中潜在生物标志物

Table 3 Potential biomarkers in serum of HF rats induced by CCl<sub>4</sub>

	t <sub>R</sub> (min)	m/z (Da)	潜在生物标志物 Potential biomarkers	M/C	T/M
正离子 模式血 清样品 Positive mode in rat serum sample	3.02	232.1547	异丁酰肉碱 Isobutyrylcarnitine	↓**	↑**
	4.22	188.0709	吲哚丙烯酸 Indoleacrylic acid	↑**	↓**
	5.86	514.2846	硫代石胆酰甘氨酸 Sulfolithocholylglycine	↑*	↓*
	5.94	391.2847	12-酮基脱氧胆酸 12-Ketodeoxycholic acid	↑*	↓*
	6.87	357.2799	二十四碳六烯酸 Tetracosahexaenoic acid	↑**	↓**
	7.45	516.3061	牛磺胆酸 Taurocholic acid	↑**	↓**
负离子 模式血 清样品 Negative mode in rat serum sample	7.82	496.3440	溶血磷脂(0:0/16:0) LysoPC(0:0/16:0)	↑*	↓*
	4.19	172.9919	苯酚硫酸盐 Phenol sulphate	↓**	↑**
	5.61	498.2876	牛磺熊脱氧胆酸 Tauroursodeoxycholic acid	↑**	↓**
	6.42	448.3046	鹅脱氧胆酸 Chenodeoxyglycocholic acid	↑**	↓**
	6.63	464.3008	甘氨酸胆酸 Glycocholic acid	↑*	↓*
	6.76	471.2414	鹅去氧胆酸硫酸盐 Chenodeoxycholic acid sulfate	↑*	↓*
	7.41	407.2785	熊果酸 Ursocholic acid	↓**	↑**
	7.55	378.2431	1-磷酸鞘氨醇 Sphingosine 1-phosphate	↑**	↓**
	8.17	303.2327	花生四烯酸 Arachidonic acid	↓**	↑**
	8.93	279.2325	亚油酸 Linoleic acid	↓**	↑**

注: M/C: 模型组与对照组改变趋势; T/M: GUSM 组与模型组改变趋势。与模型组相比, \* P<0.05, \*\* P<0.01。  
Note. M/C, Change trend of model group vs control group. T/M, Change trend of GUSM treatment group vs model group. Compared with model group, \* P<0.05, \*\* P<0.01.

表 4 评估模型质量的参数汇总

Table 4 Summary of parameters for evaluating model quality.

正常组 vs 模型组 Normal group vs model group	正交偏最小二乘判别分析 OPLS-DA			
	模式 Mode	R <sup>2</sup> X	R <sup>2</sup> Y	Q <sup>2</sup>
血样 Serum sample	正离子模式 Positive mode	0.592	0.983	0.805
	负离子模式 Negative mode	0.734	0.999	0.885

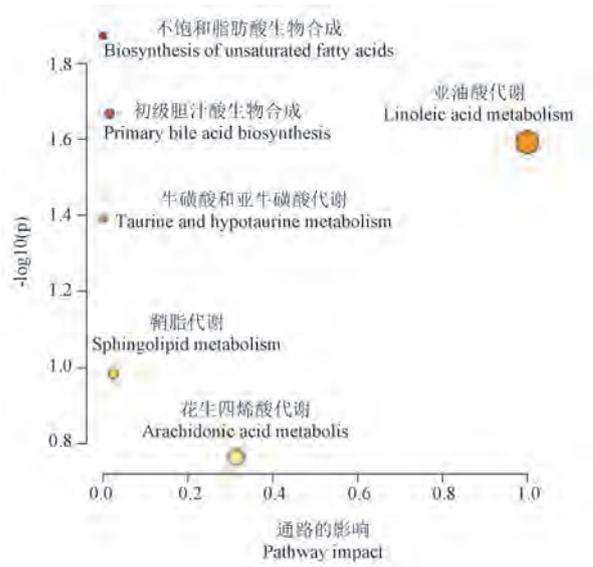


图 5 肝纤维化大鼠血浆代谢通路分析

Figure 5 Analysis of plasma metabolic pathways in HF rats

3 讨论

肝星状细胞的活化和增殖在肝纤维化的发生发展中起重要作用<sup>[25]</sup>。花生四烯酸的前体物质是亚油酸, 花生四烯酸由肝中的亚油酸生成<sup>[26]</sup>。因此, HF 大鼠血清中花生四烯酸的减少可能与肝中亚油酸生成反应的减少有关。有研究表明, 高浓度的亚油酸和花生四烯酸对肝星状细胞有毒性作用, 这与我们的研究结果一致, 即模型组亚油酸和花生四烯酸的含量较低, 而治疗组则较高, 对肝星状细胞有毒性作用。

牛磺胆酸、牛磺熊脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、12-酮基脱氧胆酸、甘氨酸胆酸和甘氨酸鹅脱氧胆酸作为胆汁的重要成分, 与胆汁酸的初级生物合成有关<sup>[27]</sup>。胆固醇可转化为胆汁酸, 是肝胆固醇代谢的主要途径, 如果发生胆汁淤积, 高浓度的胆汁酸会破坏细胞膜的脂质成分, 产生氧化应激, 最终导致肝纤维化<sup>[28]</sup>。甘氨酸胆酸是评价肝细胞功能和肝胆系统循

环功能的敏感指标之一。当肝排泄胆酸受损时,肝细胞吸收甘氨酸胆酸的能力下降,血液循环中甘氨酸胆酸的含量增加。较高水平的牛磺胆酸、牛磺熊脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸通过转化为石胆酸而成为肝毒性物质。鹅脱氧胆硫酸盐和酮脱氧胆酸在 HF 大鼠血液中的浓度鲜有报道,有望成为新的 HF 标志物。

在体内大量动物模型中,1-磷酸鞘氨醇(S1P)通过细胞表面的 S1P 受体调控肝纤维化的发生发展<sup>[29]</sup>。然而实验结果与以往的研究不同,模型组的浓度明显降低。这一结果可能与 S1P 的屏障功能有关,即高浓度的 S1P 可以保护受损的肝细胞。S1P 增强屏障功能的机制主要是通过调节细胞骨架蛋白的功能,加强细胞间连接,减少细胞间隙,降低血管通透性。S1P 既有促进肝纤维化的作用,又有抑制肝纤维化的作用。因此,通过这一途径治疗肝纤维化需要进一步的探索和研究。

本研究结果表明,GUSM 处理改变了亚油酸和花生四烯酸代谢、鞘脂代谢、初级胆汁酸生物合成等主要代谢通路。GUSM 治疗组显著逆转了 HF 大鼠的代谢异常,支持 GUSM 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的 HF 的治疗作用。所获得的代谢物谱可作为筛选 HF 大鼠模型药物疗效的早期生物标志物和动态指标。

本研究可以改进的部分:本文是参考了近几年未加内标的代谢组学实验研究<sup>[30-31]</sup>而选择了不加内标的非靶向代谢组学研究,而且本文的方法学考察也已证实了本实验结果的准确性,今后的科研中我们会考虑用加入内标的方式来完善实验过程、进而增加结果的可靠性。

#### 参考文献:

[ 1 ] Liu YT, Qi SL, Sun KW. Traditional Chinese medicine, liver fibrosis, intestinal flora: is there any connection? -a narrative review [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(4): 4846-4857.

[ 2 ] 李国华, 李鹤龄, 陈智岗, 等. 酒精性肝病与肠道微生物群落研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 423-427.

[ 3 ] Li W, Zhou C, Fu Y, et al. Targeted delivery of hyaluronic acid nanomicelles to hepatic stellate cells in hepatic fibrosis rats [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 693-710.

[ 4 ] 安振涛, 魏兰福, 黄钰萍, 等. 肝纤维化中医证候规范化与客观化研究进展 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(2): 280-282.

[ 5 ] 段桂姣, 蒋锐沉, 王振常. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2020, 26(5): 113-117.

[ 6 ] Wang S, Hua Y, Tan W, et al. Compatibility art of traditional Chinese medicine: From the perspective of herb pairs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(228): 412-423.

[ 7 ] Li H. Advances in antihepatic fibrotic therapy with Traditional Chinese Medicine herbal Formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112442.

[ 8 ] Kim HG, Han JM, Lee HW, et al. CGX, a multiple herbal drug, improves cholestatic liver fibrosis in a bile duct ligation-induced rat model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(230): 653-662.

[ 9 ] Zhou Y, Tong X, Ren S, et al. Synergistic anti-liver fibrosis actions of total astragalus saponins and glycyrrhizic acid via TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway modulation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 190: 83-90.

[ 10 ] Zhao W, Zhang X, Hou M, et al. Traditional Chinese medicine Yiqi Huoxue recipe attenuates hepatic fibrosis via YAP/TAZ signaling [J]. *Histol Histopathol*, 2021, 36(9): 967-979.

[ 11 ] 张楚焱, 孙天石, 董一昕, 等. 甘参复方对大鼠肝星状细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. *中医学报*, 2019, 34(5): 959-962.

[ 12 ] 常冠华, 薄颖异, 崔洁, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 分析甘草地上部分主要化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(6): 1449-1459.

[ 13 ] Liu YY, Yang YN, Feng ZM, et al. Eight new triterpenoid saponins with antioxidant activity from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. *Fitoterapia*, 2019, 133: 186-192.

[ 14 ] Li W, Qu H. Rapid quantification of phenolic acids in Radix *Salvia miltiorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transreflective mode [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(41): 425-431.

[ 15 ] Cao T, Lu Y, Zhu M, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Radix astragali* on the TGF- $\beta$ /Smad/Wnt pathway and the pathological process of liver fibrosis in rats [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(6): 46-51.

[ 16 ] Gou SH, He M, Li BB, et al. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch in liver injury mice [J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(24): 6083-6087.

[ 17 ] Wang C, Duan X, Sun X, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid from edible botanical *glycyrrhiza glabra* against non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Food Funct*, 2016, 7(9): 3716-3723.

[ 18 ] 朱世超, 郑学敏, 张玥, 等. 甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3554-3559.

[ 19 ] Liang B, Guo XL, Jin J, et al. Glycyrrhizic acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(17): 5271-5280.

[ 20 ] Nagappan A, Kim JH, Jung DY, et al. Cryptotanshinone from the *Salvia miltiorrhiza* bunge attenuates ethanol-induced liver injury by activation of AMPK/SIRT1 and Nrf2 signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 265-283.

(下转第 112 页)

张睿,张竞丹,舒瑶,等. CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 75-85.  
Zhang R, Zhang JD, Shu Y, et al. Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 75-85.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.010

## CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响

张睿<sup>1,2</sup>, 张竞丹<sup>2,3</sup>, 舒瑶<sup>4</sup>, 邢晓雯<sup>2</sup>, 王翠<sup>2,5</sup>, 刘志强<sup>2\*</sup>, 张剑宁<sup>1\*</sup>

(1.解放军总医院第一医学中心神经外科医学部,北京 100853;2.军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,北京 100850;3.中央民族大学生命与环境科学学院,北京 100081;4.解放军总医院第五医学中心口腔科,北京 100071;5.河北医科大学,石家庄 050017)

**【摘要】** 目的 通过动物行为学实验探究 CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响。方法 将纯合 C57BL/6J CD44 基因敲除(CD44 knockout, CD44 KO)小鼠与野生型(wild type, WT)小鼠作对比,进行平衡木实验、转棒实验、旷场实验、高架十字实验、悬尾实验、强迫游泳实验、新物体识别实验、三箱社交实验和水迷宫实验,分析比较两组小鼠的行为学差异。结果 在三箱社交实验 Stage 3 阶段,WT 雌性小鼠对新同类的探索时间要多于 CD44 KO 雌性小鼠( $P=0.0475$ )。水迷宫定位航行实验中第 5~7 天,CD44 KO 组小鼠到达目标区域所需时间长于 WT 组小鼠( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ )。水迷宫空间探索实验中,CD44 KO 组小鼠到达目标区域次数更少( $P=0.0128$ ),初次到达所需时间更长( $P=0.0003$ )。从初次到达目标区域所需时间方面分析,CD44 KO 组内雄性所需时间少于雌性( $P=0.049$ ),CD44 KO 雄性小鼠所需时间多于 WT 雄性小鼠( $P=0.0137$ ),CD44 KO 雌性小鼠所需时间也多于 WT 雌性小鼠( $P=0.0036$ )。在平衡木实验、转棒实验、旷场实验、高架十字实验、悬尾实验、强迫游泳实验和新物体识别实验结果中,各组未见明显差异。结论 CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠相比,学习记忆能力明显下降,以第 5~7 天最为显著,空间记忆能力也明显减弱。同时,CD44 KO 的雌性小鼠的社交趋向性要弱于 WT 雌性小鼠。在运动协调能力、平衡能力、耐力、焦虑、抑郁等方面,CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠未见明显差异。

**【关键词】** CD44;动物行为学;三箱社交;Morris 水迷宫

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 09-0075-11

### Effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice

ZHANG Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Jingdan<sup>2,3</sup>, SHU Yao<sup>4</sup>, XING Xiaowen<sup>2</sup>, WANG Cui<sup>2,5</sup>, LIU Zhiqiang<sup>2\*</sup>, ZHANG Jianing<sup>1\*</sup>

(1. Department of Neurosurgery, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.

2. Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850. 3. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081.

4. Department of Stomatology, Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071.

5. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of CD44 gene knockout on behavioral abilities in mice by animal behavior experiment. **Methods** Beam balance experiment, rotarod experiment, open field experiment, elevated plus-maze

[作者简介]张睿(1992—),男,医师,学士,研究方向:颅脑外伤与颅脑肿瘤方向。E-mail:512806411@qq.com

[通信作者]张剑宁(1964—),男,主任医师,博士,研究方向:颅脑外伤与颅脑肿瘤方向。E-mail:jnzhang2018@163.com

刘志强(1984—),男,副研究员,博士,研究方向:神经科学方向。E-mail:zhiqiangliu\_amms@163.com

\* 共同通信作者

experiment, tail suspension experiment, forced swimming experiment, novel object recognition experiment, three-chamber social experiment and Morris water maze experiment were carried out to analyze and compare the behavioral differences between homozygous C57BL/6J CD44 knockout (CD44 KO) mice and wild type (WT) mice. **Results** In Stage 3 of the three-chamber social experiment, WT female mice were seen to spend more time exploring novel objects than female mice in the CD44 KO group ( $P=0.0475$ ). From day 5 to day 7 in the water maze navigation experiment, mice in CD44 KO group were observed to take longer to reach the target area than WT mice ( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ ). In the water maze space exploration experiment, mice in the CD44 KO group tended to reach the target area fewer times ( $P=0.0128$ ) and took longer time to reach the target area for the first time ( $P=0.0003$ ). The time that males in the CD44 KO group took to reach the target area for the first time was less than that taken by females ( $P=0.049$ ). Additionally, males in the CD44 KO group took more time than WT males ( $P=0.0137$ ), and females in the CD44 KO group also took more time than WT females ( $P=0.0036$ ). There were no significant differences in the result of the beam balance experiment, rotarod experiment, open field experiment, elevated plus maze experiment, tail suspension experiment, forced swimming experiment and novel object recognition experiment between the two groups. **Conclusions** Compared with WT mice, CD44 KO mice were observed to have significantly decreased learning and memory ability, especially in the 5th~7th day. In addition, their spatial memory ability was obviously weakened. Meanwhile, CD44 KO female mice were seen to have weaker social propensity than WT female mice. However, no significant differences were noted between CD44 KO mice and WT mice in the aspects of sports coordination ability, balance ability, endurance, anxiety and depression.

**【Keywords】** CD44; animal behavior; three-chamber; morris water maze trials

CD44 是一种在体内广泛表达的跨膜粘附受体,是透明质酸的主要受体之一<sup>[1]</sup>。CD44 受体在神经系统中发挥着多种作用,影响许多不同类型细胞的增殖、分化和迁移。有研究表明,敲除 CD44 基因可延缓胚胎期神经嵴细胞的迁移<sup>[2]</sup>,从而影响其分化成为神经元细胞的进程。同时,CD44 的表达还影响着成人神经干细胞的分化,缺乏 CD44 的神经干细胞,多分化为未成熟的神经元细胞<sup>[3]</sup>。还有研究表明,CD44 可以通过影响血脑屏障通透性改变认知水平<sup>[4]</sup>,CD44 基因可能影响成年个体海马神经的发育,其缺失可以导致海马体功能障碍和空间学习记忆缺陷<sup>[5]</sup>。以上各个研究均提示 CD44 基因可能会影响神经系统的功能尤其是认知水平。CD44 是体内广泛表达的受体,对于 CD44 KO 小鼠模型的研究屡见不鲜,然而 CD44 对小鼠行为能力的影响,尚未有系统性研究报道,其在研究某些疾病模型中能否应用,尚未有明确探究。

本论著以 CD44 KO 小鼠与 WT 小鼠作对照,通过平衡木实验、转棒实验比较小鼠的运动能力,通过旷场实验、高架十字实验比较小鼠的焦虑情况,通过悬尾实验、强迫游泳实验比较小鼠的抑郁程度,通过三箱社交实验比较小鼠的社交能力,通过新物体识别实验、水迷宫实验比较小鼠的学习记忆能力。通过上述实验,从而系统性探讨 CD44 基因敲除对小鼠行为能力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验从江苏集萃药康生物科技有限公司 [SCXK(苏)2018-0008] 购买获得 5 只 SPF 级杂合 C57BL/6J CD44 KO 小鼠,体重 ( $25 \pm 1.5$ ) g, 20 周龄,其中雌鼠 2 只,雄鼠 3 只。繁殖后得到 13 只 SPF 级纯合 C57BL/6J CD44 基因敲除小鼠,雌性 6 只,雄性 7 只,体重 ( $25 \pm 2$ ) g, 10 周龄。本实验的 16 只 SPF 级 C57BL/6J 野生型小鼠,雌性 7 只,体重 ( $21 \pm 1$ ) g, 雄性 9 只,体重 ( $25 \pm 0.5$ ) g, 10 周龄,均从斯贝福(北京)生物技术有限公司购买 [SCXK(京)2019-0010]。实验动物饲养于 SPF 级动物实验室内鼠笼架中(苏州猴皇动物实验设备科技有限公司,规格:PEI) [SYXK(军)2019-0004]。实验动物饲养单位为军事医学研究院军事认知与脑科学研究所,本实验经军事医学研究院实验动物中心动物实验室实验动物管理与使用委员会审查批准 (IACUC-DWZX-2022-566)。本实验中,动物饲养和实验过程均按照 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

引物序列由江苏集萃药康生物科技有限公司设计,北京擎科生物科技有限公司合成;蛋白酶 K (Solarbio 北京索莱宝, lot: No. 1019C022); 2×santaq PCR master mix (with blue dye) (上海生工 Sangon Biotech, B532061-0040, lot: HC17KA2941)。凝胶

图像分析系统(上海天能 Tanon 2500);电泳仪(DYY-7C型,北京六一生物科技有限公司);any-maze stoelting 行为学分析系统(美国);转棒仪(Panlab, 美国 Harvard Apparatus)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物的基因鉴定

##### (1) 引物设计

根据 CD44 基因的特性设计第一对引物 F1 和 R1,用于检测 C57BL/6J CD44 KO 小鼠中包含 CRISPR/Cas9 片段的等位基因片段,检测发生突变造成缺失的 CD44 基因,PCR 扩增片段长度为 246 bp;以野生型 C57BL/6J 小鼠基因组 DNA 序列为模板设计引物 F2 和 R2,用于检测 WT C57BL/6J 小鼠的 CD44 等位基因的片段,扩增片段长度 337 bp(见表 1)。

##### (2) DNA 提取

裂解液配方:1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris-HCl) 1 mL + 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 2 mL + 10% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 5 mL + 5 mol/L NaCl 2 mL,加水至 100 mL 配制成裂解液。将 5  $\mu$ L 蛋白酶 K 加入到 500  $\mu$ L 裂解液中,放入 1.5 mL EP 管中,剪取加入小鼠尾巴组织约 2 mm。放入 55 $^{\circ}$ C 的水浴锅中过夜消化,上下颠倒混匀。加入等体积的酚/氯仿混合溶液(500  $\mu$ L),混匀,离心(12000 r/min, 15 min)。吸取约 300  $\mu$ L 上清液,加入 400  $\mu$ L 100%乙醇,上下颠倒混匀,离心(12000 r/min, 10 min)。弃去上清,再加入 70%乙醇 800  $\mu$ L,离心(12000 r/min, 5 min)。弃去上清,小心吸弃残留乙醇,晾干,即得到 DNA。

##### (3) PCR 扩增

PCR 反应体系总体积为 25  $\mu$ L,分别加入 12.5  $\mu$ L mix, 9.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,引物各 1  $\mu$ L 和 DNA 1  $\mu$ L。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C $\times$ 5 min, 95 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 58 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 72 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C $\times$ 5 min。

##### (4) 琼脂糖凝胶电泳

用含染色剂的 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测

表 1 引物序列合成

Table 1 Synthesis of primer sequence

名称 Name	引物序列 Primer sequence
F1	5'-GAGTCTGGGTAAAGCCACTTCTTTC-3'
R1	5'-CCATCACACCTTCATTAACATGCC-3'
F2	5'-CCTCTAAGATCTCCGTTTCCTCCC-3'
R2	5'-CGGTTTCAGTTTGACTTGCC-3'

(120 V, 40 min),电泳结束后,用紫外凝胶成像系统进行观察拍照。

#### 1.3.2 行为学测试方法

##### (1) 平衡木实验

平衡木实验用于测试小鼠的运动协调和平衡能力。架起一根长约 1 m 的狭窄平衡木,将小鼠放在起始端,用强光束诱导小鼠穿过平衡木到达另一侧。首先训练 3 d,使小鼠从平衡木起始端向终端爬行,爬行到终点后,使小鼠在终点暗箱处休息 30 s,然后开始下一次训练,每天训练 3 次,直至小鼠可自行无停顿爬行经过平衡木。第 4 天开始测试,记录小鼠从平衡木起始端到达终端所需的时间。耗时越短,说明小鼠的平衡能力越强。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的平衡木实验。

##### (2) 转棒实验

转棒实验用于衡量小鼠的运动性和耐力。先将转棒仪调整为训练状态,让小鼠进行适应性训练。训练持续 3 d,每天训练 3 次,每次间隔 10 min。训练时,将转棒仪目标转速设置为 15 r/min,时间持续 150 s。将小鼠放在转棒仪上,启动转棒仪使转速从 0 开始逐步达到目标转速,然后维持目标转速直至时间结束。训练起始时,小鼠易在加速时掉落,应迅速将小鼠放回转棒仪,直至训练结束。随着训练次数的增加,第 3 天训练时,大部分小鼠均可在转棒仪上停留 150 s,或接近 150 s。正式实验时,将与目标时间差距过大的小鼠剔除,记录每只小鼠在转棒上的停留时间。小鼠在转棒仪上停留的时间越长,耐力越强。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的转棒实验。

##### (3) 旷场实验

旷场实验主要用于评价动物的焦虑状态。将小鼠放置于 60 cm $\times$ 60 cm $\times$ 20 cm 的陌生实验箱中,持续时间 5 min,利用动物行为分析软件跟踪记录小鼠的运动轨迹,通过比较不同小鼠在中央区探索的时间,来比较小鼠的焦虑程度。在中央区探索时间越长,说明小鼠的焦虑程度越轻。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的旷场实验。

##### (4) 高架十字实验

高架十字实验常用于测试小鼠的焦虑状态<sup>[6]</sup>。高架十字迷宫拥有 4 条相互交叉贯通的通路臂,其

中两条是开放臂,为开阔且无围墙保护的空間,另外两条为封闭臂,是两侧封闭的空间,测试装置距离地面有大约 50 cm 高度的距离。小鼠在天性的驱使下会追求遮蔽,趋向于在封闭臂上待较长的时间。实验开始时,将小鼠放在中心位置,让小鼠自由探索 4 条臂,同时利用分析软件跟踪记录小鼠的运动轨迹,持续时间为 5 min。通过计算比较不同小鼠在开放臂上待的时间,从而探讨小鼠焦虑程度<sup>[7]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的高架十字实验。

#### (5) 悬尾实验

悬尾实验用于测试小鼠的抑郁程度。采用自制测试设备,用胶带将小鼠的尾巴粘在盒子顶部的挂钩上,将小鼠完全倒立悬挂在空中,小鼠将努力挣扎,试图摆脱该环境,在经过努力仍无法摆脱后,小鼠将间歇性进入静止状态,静止时间既包括小鼠静止不动的时间,也包括仅微弱抖动四肢并非试图挣扎逃离状态下的时间。测试时间持续 6 min,记录后 4 min 小鼠搅动与静止的持续时间,通过比较,探讨小鼠的抑郁程度。挣扎时间越长,抑郁程度越低<sup>[8]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的悬尾实验。

#### (6) 强迫游泳实验

用于评估小鼠的抑郁程度。将小鼠放入 1 个不可逃避的盛满水的透明容器中,小鼠将努力挣扎,试图摆脱该环境,在经过努力仍无法游出容器后,小鼠将停止挣扎,进入静止状态。小鼠仅微弱抖动四肢并非试图挣扎逃离状态下的时间,也应算入静止时间。测试持续 6 min,记录后 4 min 小鼠与逃逸相关的活动时间,从而比较小鼠的抑郁程度<sup>[9]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的强迫游泳实验。

#### (7) 新物体识别实验

用于研究小鼠学习记忆行为<sup>[10-12]</sup>。与上述旷场实验一样,将小鼠放置于 60 cm×60 cm×20 cm 的陌生实验箱中,分为 3 个阶段:习惯期持续 5 min,让小鼠适应实验箱;训练期共持续 10 min,实验箱中摆放两个完全相同的物体,让小鼠自由探索;测试期持续共 10 min,将其中一个物体变换成另一个形状完全不同的新物体,再让小鼠自由探索。其中,训练期与测试期间隔 2 h。小鼠因为天生喜欢新奇,凭借对旧物体存在的记忆,测试期会花更多时间探索新物体。分别记录每个阶段小鼠对两个物体的探

索时间,进行比较分析,这反映了小鼠的学习记忆行为。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的新物体识别实验。

#### (8) 三箱社交实验

用于评估动物的社交行为能力。实验装置由 3 个矩形箱子组成,每个矩形箱子的大小约为 20 cm×50 cm,每两个相隔的箱子之间都有大小为 7 cm×7 cm 的贯通通道,使小鼠可以在 3 个箱子之间来回往返探索。在左侧和右侧箱子的角落里各放 1 个大小完全一致的金属笼子,大小恰好足够容纳 1 只小鼠。分为 3 个阶段,每个阶段持续 10 min,开始时分别将小鼠放置在中间的矩形箱子中:第一个阶段让小鼠探索两个空置的笼子;第二个阶段,将其中 1 个笼子中放置 1 个不同品系的陌生小鼠,另 1 个笼子放置 1 个玩具鼠,小鼠由于天性,趋向于探索陌生小鼠;第三阶段:将玩具鼠替换为另 1 只不同品系的小鼠,由于天性,小鼠趋向于探索最新替换的陌生小鼠。通过分析小鼠不同阶段对于新同类的探索时间,可以比较小鼠社交行为的趋向性<sup>[13-16]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的三箱社交实验。

#### (9) Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫是由 Morris 于 1981 年报道<sup>[17]</sup>。用于评估小鼠的学习记忆能力。小鼠具有会游泳又怕水的天性,故而强迫其在水中游泳,小鼠可以依靠寻找辨识四周的空间参考标志物,来判断自己的位置,以及记忆逃逸平台所在的位置,从而爬上平台。Morris 水迷宫是一个圆形水池,直径约为 120 cm,水池壁高度约为 50 cm,将其平均分为四个象限,将逃逸平台(直径 10 cm,高度 20 cm)摆放在在第一象限中央。水迷宫四周桶壁上分别贴有正方形、圆形、三角形和箭头图案,以供小鼠辨别位置。将水位控制在刚刚没过逃逸平台,水内撒入漂白粉混匀,从而使小鼠无法肉眼看到逃逸平台,实验期间保持水温、参考图案位置、顺序及室内光线强度等环境条件不变。实验共持续 7 d,前 6 d 为定位航行实验,用于评价小鼠的学习记忆能力。每天每只动物测试 2 次,单次测试时间为 90 s。选取逃逸平台所在象限的对面象限为动物第一次入水象限,每天分别更换不同入水点位。实验开始时,将小鼠放入水中,立即开始计时,小鼠找到并爬上逃逸平台所需的时间,即为逃避潜伏期。小鼠爬上逃逸平台后,使其在平台上停留 30 s,以适应并记忆周边环

境。若小鼠在 90 s 内无法找到逃逸平台,则逃避潜伏期按 90 s 计算,同时实验人员帮助小鼠找到平台,将其放置在平台上停留 30 s。小鼠逃避潜伏期的长短反映了其学习记忆能力,逃避潜伏期越短,说明其学习记忆能力越强<sup>[18-19]</sup>。第 7 天为空间探索实验,用于评估小鼠的空间记忆能力。撤去逃逸平台,将最远离逃逸平台的位置设为小鼠的入水点。使小鼠在水池内自由游动探索 90 s,小鼠将凭记忆试图寻找原逃逸平台所在位置,记录其第一次到达原逃逸平台所在区域所需时间,以及进入这个区域的次数,从而评价小鼠的空间记忆能力<sup>[20]</sup>。为减小行为学实验个体差异性带来的影响,共进行 3 批次小鼠的 Morris 水迷宫实验。

### 1.4 统计学方法

数据分析由 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,代表性的柱状图与折线图由 GraphPad Prism 8.0.2 软件生成。数据采用平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间的数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  时,认为数据存在统计学差异。



注: M: DNA marker; 1: CD44 基因敲除小鼠纯合子; 2: CD44 基因敲除小鼠杂合子。

图 1 PCR 鉴定 CD44 基因敲除小鼠的凝胶电泳分析

Note. M, DNA marker. 1, Homozygous CD44 knockout mice. 2, Heterozygous CD44 knockout mice.

Figure 1 Gel electrophoresis analysis of CD44 knockout mice identified by PCR

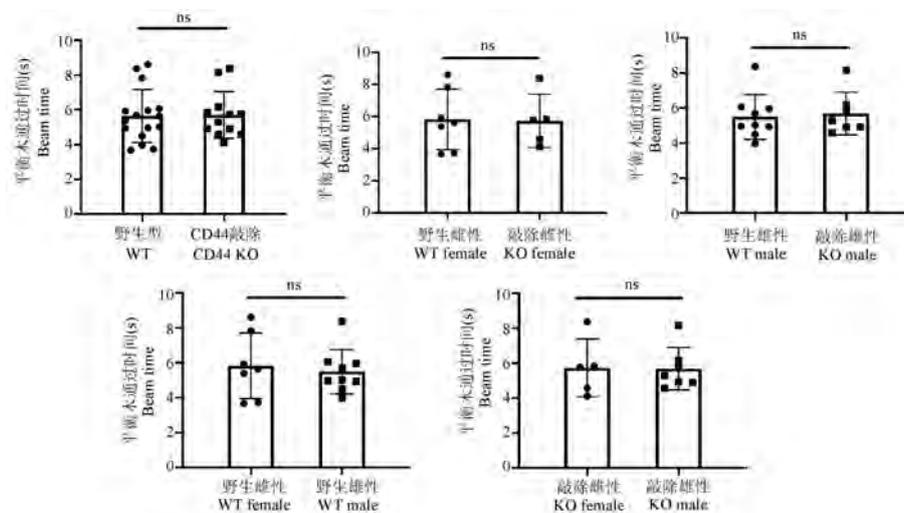


图 2 平衡木实验结果比较

Figure 2 Comparison of experimental results of beam balance experiment

## 2 结果

### 2.1 基因鉴定

小鼠经基因鉴定结果如图 1 所示, C57BL/6J CD44 KO 纯合子小鼠在第一个反应体系中, 只在 246 bp 位置出现条带, 在第二个反应体系中, 没有出现条带。杂合子小鼠在第一个反应体系中, 在 246 bp 位置出现条带, 在第二个反应体系中, 在 337 bp 位置出现条带。

### 2.2 平衡木实验

在平衡木实验中, WT 小鼠( $n = 16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n = 12$ ), 在通过平衡木所需时间上未见明显差异( $P = 0.9092$ )。且 WT 雌性小鼠( $n = 7$ )与 WT 雄性小鼠( $n = 9$ )对比( $P = 0.6795$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n = 6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n = 7$ )对比( $P = 0.951$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P = 0.9315$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P = 0.7712$ ), 通过平衡木所需时间均没有明显差异。见图 2。

### 2.3 转棒实验

在转棒实验中,WT 小鼠( $n=16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ ),在转棒仪上停留时间未见明显差异( $P=0.4927$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=7$ )与 WT 雄性小鼠( $n=9$ )对比( $P=0.2956$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.2794$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.6774$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.6135$ ),在转棒仪上停留时间均没有明显差异。见图 3。

### 2.4 旷场实验

在旷场实验中,WT 小鼠( $n=13$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ ),去中央区域探索的时间未见明显差异( $P=0.9932$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=6$ )与 WT 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.7915$ )、CD44 KO 组雌性

小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.9591$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.8837$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.9335$ ),去中心区域探索的时间均没有明显差异。见图 4。

### 2.5 高架十字实验

在高架十字实验中,WT 小鼠( $n=13$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ )对比,去开放臂探索的时间未见明显差异( $P=0.8754$ )。且 WT 雌性小鼠( $n=6$ )与 WT 雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.1457$ )、CD44 KO 组雌性小鼠( $n=6$ )与 CD44 KO 组雄性小鼠( $n=7$ )对比( $P=0.5599$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比( $P=0.2944$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比( $P=0.4278$ ),在开放臂探索的时间均没有明显差异。见图 5。

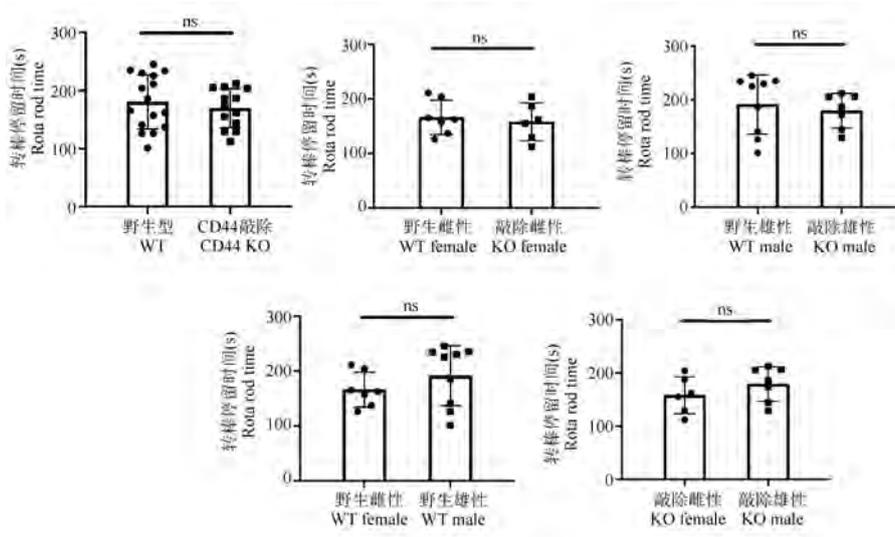


图 3 转棒实验结果比较

Figure 3 Comparison of experimental results of rotarod experiment

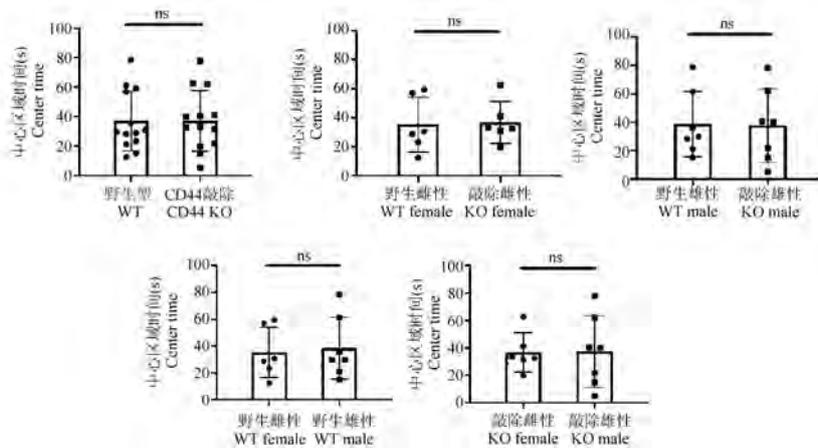


图 4 旷场实验结果比较

Figure 4 Comparison of experimental results of open field experiment

### 2.6 悬尾实验

在悬尾实验中, WT 小鼠 ( $n = 16$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n = 13$ ), 搅动挣扎持续时间未见明显差异 ( $P = 0.3518$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n = 7$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n = 9$ ) 对比 ( $P = 0.7163$ )、CD44 KO 组雌性小鼠 ( $n = 6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n = 7$ ) 对比 ( $P = 0.1632$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P = 0.9753$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P = 0.1039$ ), 搅动挣扎持续时间均没有明显差异。见图 6。

### 2.7 强迫游泳实验

在强迫游泳实验中, WT 小鼠 ( $n = 16$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n = 13$ ), 逃逸相关活动时间未见明显差异 ( $P = 0.0691$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n = 7$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n = 9$ ) 对比 ( $P = 0.5495$ )、CD44 KO 组雌性小

鼠 ( $n = 6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n = 7$ ) 对比 ( $P = 0.6967$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P = 0.4572$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P = 0.1021$ ), 逃逸相关活动时间均没有明显差异。见图 7。

### 2.8 新物体识别实验

在新物体识别实验中, WT 小鼠 ( $n = 13$ ) 与 CD44 KO 小鼠 ( $n = 12$ ), 探索新物体的时间未见明显差异 ( $P = 0.1012$ )。且 WT 雌性小鼠 ( $n = 6$ ) 与 WT 雄性小鼠 ( $n = 7$ ) 对比 ( $P = 0.2746$ )、CD44 KO 组雌性小鼠 ( $n = 6$ ) 与 CD44 KO 组雄性小鼠 ( $n = 6$ ) 对比 ( $P = 0.6246$ )、WT 雌性小鼠与 CD44 KO 雌性小鼠对比 ( $P = 0.3874$ )、WT 雄性小鼠与 CD44 KO 雄性小鼠对比 ( $P = 0.1442$ ), 探索新物体的时间均没有明显差异。见图 8。

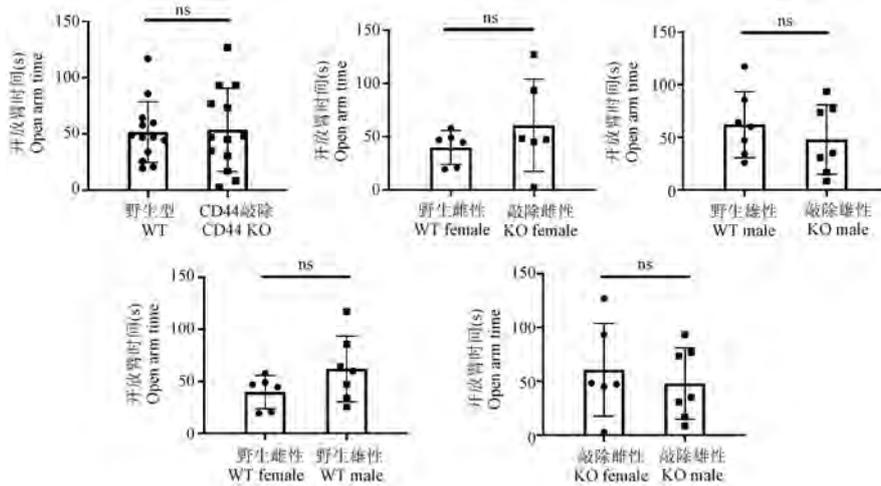


图 5 高架十字实验结果比较

Figure 5 Comparison of experimental results of elevated plus-maze experiment

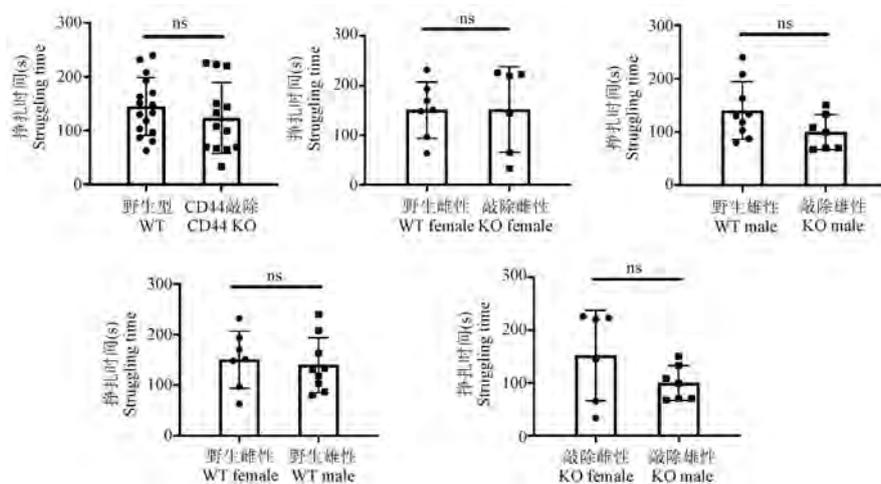


图 6 悬尾实验结果比较

Figure 6 Comparison of experimental results of tail suspension experiment

## 2.9 三箱社交实验

在三箱社交实验中(WT 小鼠  $n=16$ , CD44 KO 小鼠  $n=12$ , WT 雌性小鼠  $n=7$ , WT 雄性小鼠  $n=9$ , CD44 KO 雌性小鼠  $n=6$ , CD44 KO 雄性小鼠  $n=6$ ), Stage 2 阶段,各小组小鼠对新同类的探索时间未见明显差异( $P=0.3052, 0.5901, 0.4252, 0.6041, 0.8856$ )。Stage 3 阶段,WT 雌性小鼠对新同类的探索时间要多于 CD44 KO 雌性小鼠( $P=0.0475$ )。其余各组小鼠对新同类的探索时间均没有明显差异( $P=0.1242, 0.9601, 0.3513, 0.2356$ )。见图 9。

## 2.10 水迷宫实验

由图 10A 可见,在水迷宫定位航行实验中,WT 小鼠( $n=16$ )与 CD44 KO 小鼠( $n=13$ )在前 4 d 实验时,到达目标区域所需时间未见明显差异( $P=0.1874, 0.9447, 0.8931, 0.1474$ ),从第 5~7 天,

CD44 KO 小鼠到达目标区域所需时间长于 WT 小鼠( $P=0.0147, 0.0182, 0.0233$ )。在水迷宫空间探索实验中,CD44 KO 小鼠到达目标区域次数更少( $P=0.0128$ ) (图 10B),初次到达所需时间更长( $P=0.0003$ ) (图 10C)。

从初次到达目标区域所需时间方面来看,CD44 KO 雌性小鼠( $n=6$ )所需时间也多于 WT 雌性小鼠( $n=7$ ) ( $P=0.0036$ ) (图 11A),CD44 KO 雄性小鼠( $n=7$ )所需时间多于 WT 雄性小鼠( $n=9$ ) ( $P=0.0137$ ) (图 11A),CD44 KO 组内雄性所需时间少于雌性( $P=0.049$ ) (图 11A)。从到达目标区域次数方面分析,各组间未见明显差异( $P=0.0944, 0.0925, 0.8934, 0.5653$ ) (图 11B)。

此次研究所进行实验以及实验结果汇总如下表(见表 2)。

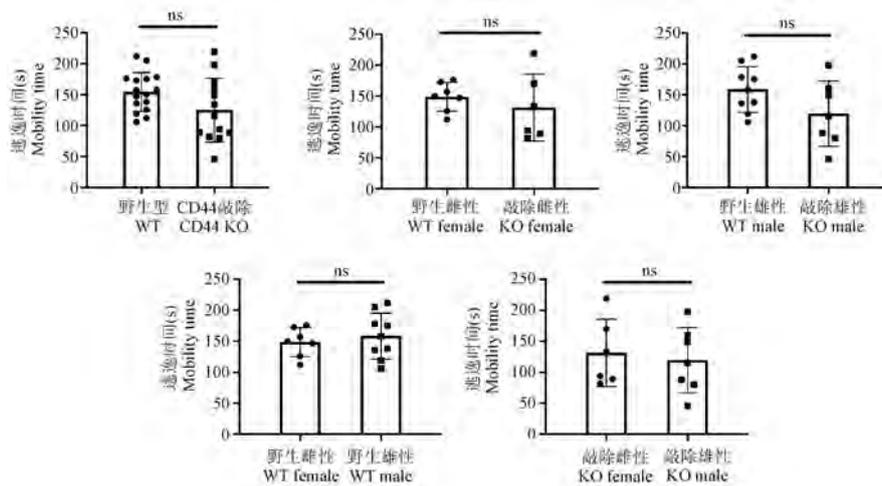


图 7 强迫游泳实验结果比较

Figure 7 Comparison of experimental results of forced swimming experiment

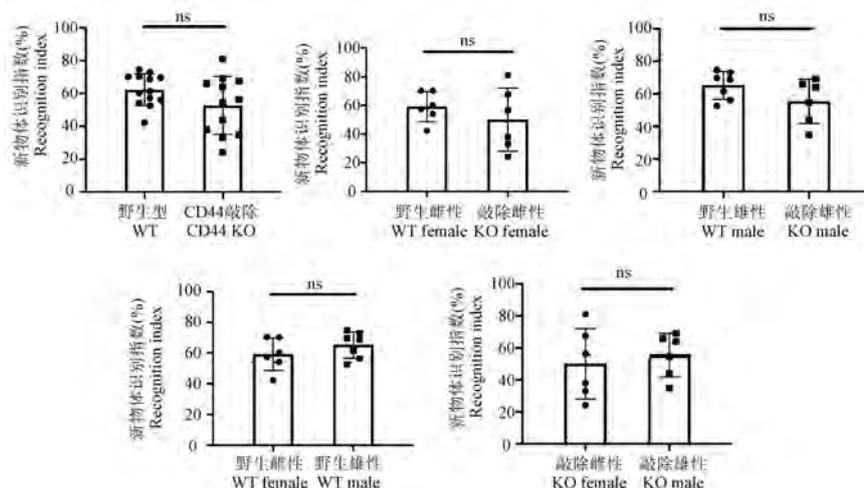
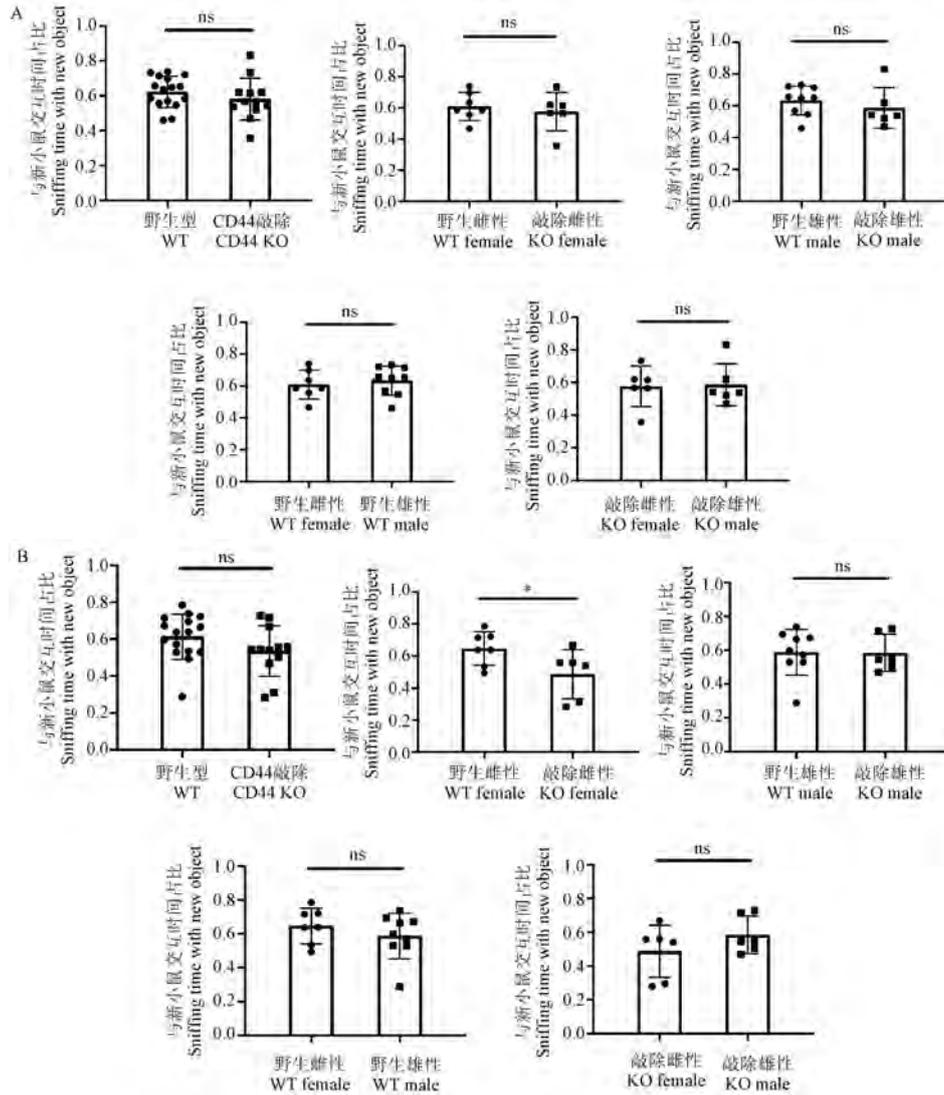


图 8 新物体识别实验结果比较

Figure 8 Comparison of experimental results of novel object recognition experiment

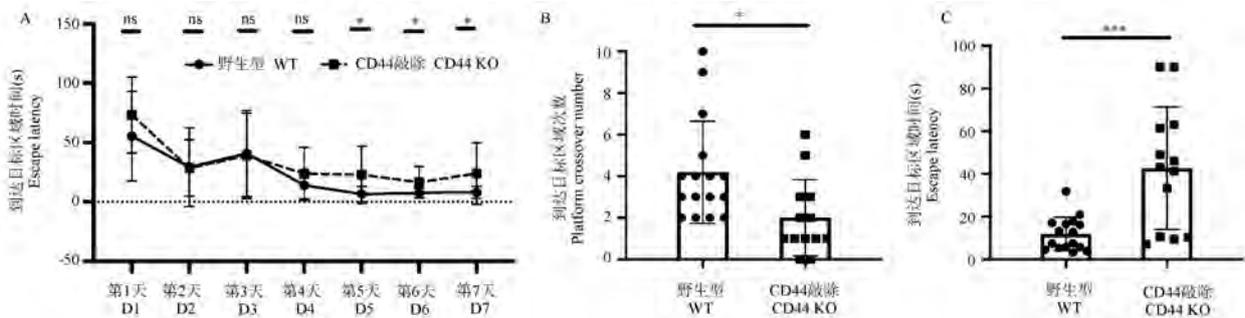


注:A;Stage 2;B;Stage 3。Stage 3 中,与 CD44 基因敲除雌性小鼠相比,\* $P < 0.05$ 。

图 9 三箱社交实验 Stage 2 和 Stage 3 结果比较

Note. A, Stage 2. B, Stage 3. During stage 3, Compared with homozygous CD44 knockout female mice, \* $P < 0.05$ .

Figure 9 Comparison of experimental results of three-chamber social experiment Stage 2 and Stage 3

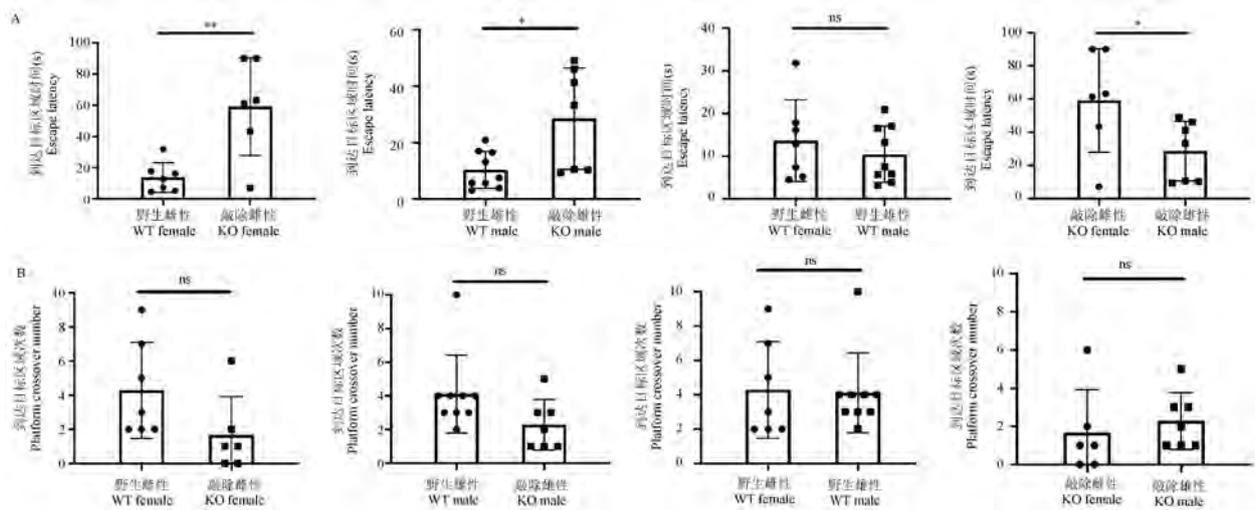


注:与 CD44 KO 相比,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 10 水迷宫实验总体结果比较

Note. Compared with homozygous CD44 knockout mice, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 10 Comparison of overall results of water maze experiment



注:A;到达目标区域时间方面;B;到达目标区域次数方面。与 CD44 KO 雌性相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

图 11 水迷宫实验空间探索结果比较

Note. A, In terms of time to reach the target area. B, In terms of the times to reach the target area. Compared with homozygous CD44 knockout female mice, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

Figure 11 Comparison of space exploration results of water maze experiment

表 2 实验结果及意义汇总

Table 2 Summary of experimental results and significance

实验名称 Experiment	含义 Meaning	结果 Result
平衡木实验 Beam balance experiment	运动协调和平衡能力 Sports coordination and balance ability	无统计学差异 No statistical difference
转棒实验 Rotarod experiment	运动能力和耐力 Athletic ability and endurance	无统计学差异 No statistical difference
旷场实验 Open field experiment	焦虑状态 Anxious state	无统计学差异 No statistical difference
高架十字实验 Elevated plus-maze experiment	焦虑状态 Anxious state	无统计学差异 No statistical difference
悬尾实验 Tail suspension experiment	抑郁程度 Degree of depression	无统计学差异 No statistical difference
强迫游泳实验 Forced swimming experiment	抑郁程度 Degree of depression	无统计学差异 No statistical difference
新物体识别实验 Novel object recognition experiment	学习记忆能力 Learning and memory ability	无统计学差异 No statistical difference
三箱社交实验 Three-chamber social experiment	社交行为能力 Social behavior ability	WT 雌性>CD44 KO 雌性 WT female>CD44 KO female
水迷宫实验 Water maze experiment	学习记忆和空间记忆能力 Memory ability	CD44 KO<WT, CD44 KO 雌<CD44 KO 雄 CD44 KO<WT, CD44 KO female<CD44 KO male

### 3 讨论

本实验发现,CD44 KO 的小鼠与 WT 小鼠相比,学习记忆能力明显下降,以第 5~7 天最为显著,空间记忆能力也明显减弱。同时,CD44 KO 雌性小鼠的社交行为能力要弱于 WT 雌性小鼠。但在运动协调能力、平衡能力、耐力、焦虑、抑郁等方面,CD44 KO 的小鼠与 WT 小鼠未见明显差异。由此可知,CD44 基因的表达对小鼠的认知功能,特别是记忆能力有影响,后续以 CD44 相关基因敲除动物做行为学实验时,学习与空间记忆能力方面的实验,需与普通野生型小鼠鉴别开,以免实验结果有偏差。

关于 CD44 基因敲除后影响学习记忆功能的机制,小鼠的运动协调能力、平衡力、耐力、焦虑抑郁程度等未见明显异常,提示 CD44 基因敲除不会引起广泛性中枢神经系统异常。而本实验所得 CD44 KO 小鼠的认知功能障碍,与海马功能障碍的表现相一致。Morris 水迷宫所探究的小鼠空间记忆能力也对神经系统的发育程度十分敏感<sup>[21]</sup>,且已有文献提出 CD44 可能影响成年个体海马神经的发育<sup>[5]</sup>,故而猜想 CD44 参与成年个体海马的发育,从而影响动物的认知能力。

在三箱社交实验中,CD44 KO 雌性小鼠的社交趋向性弱于 WT 雌性小鼠,而雄性小鼠之间则未发

现相关差异,提示 CD44 基因的表达与性别因素有关。有文献提出,雌二醇可以通过下调几个微 RNA 的表达,增加环指蛋白 4 的表达,从而降低转录因子 Sp1 的水平,最终增强了 CD44 的表达<sup>[22]</sup>。这也提示着 CD44 的表达与雌激素存在相关性。这仍有待进一步实验研究探讨。

由于行为学指标存在个体差异性,一般行为学研究需要多批次的动物实验来验证。在本研究中,我们也进行了共 3 批次动物行为学实验,并且得到了相似的结果。由于不同批次实验条件无法完全一致,且不同批次动物之间总体行为能力存在一定差异,因此,尽管不同批次实验的结果趋势是一致的,但是并不适合将不同批次结果放在一起统计分析,所以本研究中展示了最具有代表性的一批研究数据。本实验所得结果,符合前述研究所报道的“CD44 基因的缺失可以导致海马体功能障碍和空间学习记忆缺陷<sup>[19]</sup>”。本研究的局限性在于,只研究了 CD44 基因对于行为能力的表观影响。在接下来的研究工作中,我们将进一步探讨 CD44 如何受到调控,上下游分子机制如何,哪些调控因子相互作用形成相关通路等分子机制方面的问题。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules [J]. *Mol Pathol*, 1999, 52(4): 189-196.
- [ 2 ] Casini P, Nardi I, Ori M. Hyaluronan is required for cranial neural crest cells migration and craniofacial development [J]. *Dev Dyn*, 2012, 241(2): 294-302.
- [ 3 ] Su W, Foster SC, Xing R, et al. CD44 transmembrane receptor and hyaluronan regulate adult hippocampal neural stem cell quiescence and differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(11): 4434-4445.
- [ 4 ] Sun J, Wu J, Hua F, et al. Sleep deprivation induces cognitive impairment by increasing blood-brain barrier permeability via CD44 [J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 563916.
- [ 5 ] Raber J, Olsen RHJ, Su W, et al. CD44 is required for spatial memory retention and sensorimotor functions [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 275: 146-149.
- [ 6 ] Pellow S, Johnston AL, File SE. Selective agonists and antagonists for 5-hydroxytryptamine receptor subtypes, and interactions with yohimbine and FG 7142 using the elevated plus-maze test in the rat [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1987, 39(11): 917-928.
- [ 7 ] Nasehi M, Ostadi E, Khakpai F, et al. Synergistic effect between D-AP5 and muscimol in the nucleus accumbens shell on memory consolidation deficit in adult male wistar rats: an isobologram analysis [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2017, 141: 134-142.
- [ 8 ] 田野, 栗莹, 原一桐, 等. 长时程抑郁小鼠模型建立及行为与神经病理特征观察 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 358-363.
- [ 9 ] Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005, 177(3): 245-255.
- [ 10 ] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data [J]. *Behav Brain Res*, 1988, 31(1): 47-59.
- [ 11 ] Kim S, Kim T, Lee HR, et al. Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice [J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 16.
- [ 12 ] Rogel-Salazar G, Luna-Munguia H, Stevens KE, et al. Transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes does not modify the short-and long-term memory formation in rats evaluated in the novel object recognition test [J]. *Epilepsy Behav*, 2013, 27(1): 154-158.
- [ 13 ] Pearson BL, Defensor EB, Blanchard DC, et al. C57BL/6J mice fail to exhibit preference for social novelty in the three-chamber apparatus [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 213(2): 189-194.
- [ 14 ] Reilly MP, Weeks CD, Topper VY, et al. The effects of prenatal PCBs on adult social behavior in rats [J]. *Horm Behav*, 2015, 73: 47-55.
- [ 15 ] Takechi K, Suemaru K, Kiyoi T, et al. The  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor modulates autism-like behavioral and motor abnormalities in pentylenetetrazol-kindled mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 775: 57-66.
- [ 16 ] Hsieh LS, Wen JH, Miyares L, et al. Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 637: 142-147.
- [ 17 ] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues [J]. *Learn Motiv*, 1981, 12(2): 239-260.
- [ 18 ] Li H, Kang T, Qi B, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/Akt signaling pathway in the hippocampus of D-galactose/A $\beta$ 1-42 inducing rats model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 162-169.
- [ 19 ] Sha HY, Zhao JB, Sha MX, et al. Effects of vitamin B12 on postoperative cognitive dysfunction induced by isoflurane anesthesia in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(8): 1959-1966.
- [ 20 ] Golub MS, Germann SL, Lloyd KCK. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 153(1): 159-170.
- [ 21 ] Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats [J]. *Learn Mem*, 2009, 16(2): 147-154.
- [ 22 ] Young MJ, Chen YC, Wang SA, et al. Estradiol-mediated inhibition of Sp1 decreases miR-3194-5p expression to enhance CD44 expression during lung cancer progression [J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1): 3.

杨泽,王可洲,于杨. 脂多糖结合蛋白和杀菌/通透性增加蛋白:脓毒症的潜在治疗靶点 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (11): 86-94.

Yang Z, Wang KZ, Yu Y. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein: potential therapeutic targets in sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 86-94.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.011

# 脂多糖结合蛋白和杀菌/通透性增加蛋白:脓毒症的潜在治疗靶点

杨泽<sup>1,2</sup>,王可洲<sup>1\*</sup>,于杨<sup>1\*</sup>

(1.山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(山东省实验动物中心),济南 250117;  
2.山东第一医科大学第二附属医院输血科,山东 泰安 271000)

**【摘要】** 脓毒症是严重感染、创伤、烧伤和休克等损伤的常见并发症和主要死因。革兰氏阴性菌细胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)导致的内毒素血症是导致脓毒症的主要原因之一。包括脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)和杀菌/通透性增加蛋白(bactericidal permeability increasing protein, BPI)在内的多种血浆蛋白参与调控LPS激活的信号通路。两种蛋白属于同类蛋白家族,结构相似但生物学效应差异很大;LBP能协助LPS与靶细胞CD14受体结合增加宿主对LPS的敏感性,而BPI可中和LPS致炎作用并加速LPS从循环内清除。本文就LBP与BPI的结构、功能、治疗脓毒症的潜力及基因多态性与脓毒症的相关性等方面的研究进展进行综述。

**【关键词】** 脓毒症;脂多糖;脂多糖结合蛋白;杀菌/通透性增加蛋白

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0086-09

## Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein: potential therapeutic targets in sepsis

YANG Ze<sup>1,2</sup>, WANG Kezhou<sup>1\*</sup>, YU Yang<sup>1\*</sup>

(1. School of Laboratory Animal & Shandong Laboratory Animal Center, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China. 2. Blood Transfusion Department, the Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian 271000)

**【Abstract】** Sepsis is a common complication of severe injuries, such as severe infection, trauma, burn, and shock, and it is the main cause of death of critically ill patients. Endotoxemia caused by lipopolysaccharides (LPS), cell wall components of gram-negative bacteria, is one of the main causes of sepsis. Multiple plasma proteins, including lipopolysaccharide binding proteins (LBP) and bactericidal permeability increase proteins (BPI), are involved in regulating the signaling pathways of LPS activation. The two proteins belong to the same family of proteins with similar structures but different biological functions: LBP facilitates LPS in binding to the CD14 receptor of target cells to increase host sensitivity to LPS, while BPI neutralizes the inflammatory effects of LPS and accelerates the clearance of LPS from the

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81970385);山东省自然科学基金面上项目(ZR2019MH021)。

**【作者简介】** 杨泽(1986—),男,学士,研究方向:脂类代谢与炎症性疾病研究。E-mail: xipangtsmu@163.com

**【通信作者】** 王可洲(1974—),男,研究员,博士,研究方向:脂质转运蛋白与基因修饰动物药理研究。E-mail: wangkezhou\_cn@163.com

于杨(1977—),男,教授,博士,研究方向:脂类代谢与炎症性疾病研究。E-mail: yu@sdfmu.edu.cn \* 共同通信作者

circulation. In this review, we summarized the research progress of LBP and BPI in terms of structure, function, potential for treatment of sepsis, and the correlation between gene polymorphisms and sepsis.

**【 Keywords 】** sepsis; lipopolysaccharide; lipopolysaccharide-binding protein; bactericidal permeability increasing protein

脓毒症是一种危及生命的多器官功能障碍综合征,由于宿主对感染反应失调所致<sup>[1]</sup>。脓毒症仍是导致人类死亡最常见的原因,仅 2017 年,全球估计有 4890 万例脓毒症病例,其中 1100 万例死亡,占全球死亡总人数的 19.7%<sup>[2]</sup>。细菌、真菌、病毒等微生物感染都可以导致脓毒症,其中细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)被认为是脓毒症发病机制中最重要的激活剂<sup>[3-5]</sup>。

脂多糖是革兰氏阴性细菌(gram negative bacteria, GNB)细胞壁的主要糖脂成分,是引发脓毒症的强效毒素之一<sup>[6]</sup>。LPS 能够通过细胞内和细胞外途径引发炎症。LPS 进入血液后,被 Toll 样受体(toll-like receptors, TLR)识别,启动信号级联反应,释放大量炎症因子,如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-8(IL-8)<sup>[5-6]</sup>。大量炎症因子释放会进一步扩大炎症反应,破坏宿主促炎和抗炎机制之间的平衡,导致炎症反应失控,引起发热、内皮损伤、外周血管扩张、毛细血管渗漏、凝血障碍、微血栓和心肌抑制等变化,最终造成多器官功能障碍,甚至休克和个体死亡<sup>[7]</sup>。

LPS 是研究脓毒症发病机制最常见的微生物介质。因为 LPS 具有高重复性,并且能够模拟临床上有意义的情况,故经常被用于构建实验性脓毒症模型<sup>[8]</sup>。另外,LPS 激活的宿主防御网络,与革兰氏阳性细菌、病毒和真菌中的其他微生物介质激活的宿主防御网络有很多相似之处<sup>[7]</sup>。大量实验证实,阻断 LPS 介导炎症反应的信号通路,可预防 LPS 诱导的脓毒症,是治疗脓毒症的重要靶点。

脓毒症中循环内的 LPS 与多种血浆蛋白相互作用,产生不同的生物学效应。其中脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)和杀菌/通透性增加蛋白(bactericidal permeability increasing protein, BPI)是最主要的两种血浆蛋白<sup>[9]</sup>。

## 1 LBP 和 BPI 的基因位点及结构

LBP 和 BPI 同属于 BPI 样家族<sup>[10]</sup>,两者基因位点均位于 20 号染色体 q11.23,其中 LBP 含 15 个外显子,BPI 含 16 个外显子(如表 1 所示)。

LBP 和 BPI 的蛋白结构均已解析成功<sup>[11]</sup>,两者是由双结构域组成的“回旋镖”结构,即在 N-末端结构域和 C-末端结构域各有一个疏水桶状结构(如图 1 所示)<sup>[12]</sup>,可以用来结合配体分子。

LBP 是分子量约  $60 \times 10^3$  的脂质结合和转移蛋白<sup>[13]</sup>,人 LBP 主要由肝合成。LBP 的 C-末端结构域含有一个带负电荷的凹槽和一个疏水的“苯丙氨酸核心”,它可以与 LPS 结合,该位点发生突变时,会减弱与 LPS 的结合能力<sup>[14]</sup>。

BPI 是分子量约为  $55 \times 10^3$  的单链阳离子蛋白。人 BPI 的 N 端结构域(氨基酸 1~230)通过富含脯氨酸的铰链区(氨基酸 230~250)与 C 端结构域(氨基酸 250~456)相连,该铰链区还包含一个弹性蛋白酶切割位点(氨基酸 240~245),构成了 BPI 的“回旋镖”形状<sup>[15]</sup>。N-末端结构域与杀菌及中和 LPS 有关,C-末端结构域与调理吞噬有关<sup>[16]</sup>。

## 2 LBP 的功能及研究进展

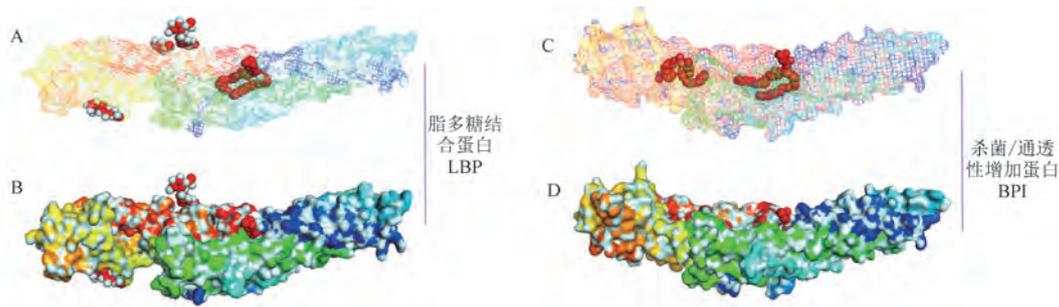
### 2.1 LBP 的促炎作用

LBP 是急性期反应蛋白,主要由肝细胞合成。

表 1 LBP 和 BPI 的基因位点信息

Table 1 The loci information of LBP and BPI

名称 Name	脂多糖结合蛋白 LBP	杀菌/通透性增加蛋白 BPI
基因位点 Location	20 号染色体 q11.23 Chromosome 20 q11.23	
长度(nt) Length	38346482~38377013	38304156~38337505
NC_000020.11 位置 NC_000020.11 position	30532	33350
基因位置 Gene position	38,367,310	38,323,987
	20829	19832



注:A:LBP 的 licorice 格式及其配体位置;B:LBP 结构的 surface 格式;C:BPI 的 licorice 格式及其配体位置;D:BPI 结构的 surface 格式。所有信息均从蛋白质数据库下载(LBP PDB ID:4M4D;BPI PDB ID:1EWF)。

图 1 脂多糖结合蛋白和杀菌/增透蛋白的结构

Note. A, The licorice style of LBP and its ligands in spacefilled style. B, The surface style of LBP structure. C, The licorice style of BPI and its ligands in spacefilled style. D, The surface style of BPI structure. All information was downloaded from Protein data bank (LBP PDB ID, 4M4D; BPI PDB ID, 1EWF).

Figure 1 The structures of Lipopolysaccharide binding protein (LBP) and Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)

正常人血清中 LBP 的浓度为 5~10 mg/mL,当受到 LPS 刺激后,LBP 会迅速升高。在脓毒症期间,血浆 LBP 可达到正常浓度的 7 倍以上<sup>[17]</sup>,人群研究证明 LBP 可以作为诊断脓毒症的标志物,其诊断准确性与 C 反应蛋白相似<sup>[18]</sup>。

LBP 从 GNB 细胞壁或 LPS 聚集体中将 LPS 提取出来,随后将其运送至膜 CD14 或可溶性 CD14 分子,形成 LPS-CD14 复合物,该复合物激活 Toll 样受体 4-MD2(TLR4-MD2)和依赖 TLR4 的炎症细胞,导致信号转导通路的激活及细胞因子和其他炎性介质的生成<sup>[10,19]</sup>(如图 2 所示)。除了上述激活作用,LBP 还可以将 LPS 转运至脂蛋白颗粒,经肝从胆管排入肠道,清除到体外<sup>[10]</sup>。

LBP 和 CD14 的结合能显著提高宿主对 LPS 的敏感性,LBP 的这种增敏作用易引发宿主炎症反应失调,与脓毒症的发生发展密切相关,是诱发脓毒症的危险因素<sup>[3]</sup>,因此通过抑制 LBP 与 LPS 的结合,阻止宿主反应失调,可以避免脓毒症发生。动物实验证实抑制 LBP 的增敏作用能提高个体在内毒素血症时的生存率:在小鼠内毒素血症模型中,利用 LBP 抗体阻断 LBP 和 LPS 的结合或 LPS/LBP 复合体与 CD14 的结合,可以显著降低血浆 TNF 水平,提高致死性内毒素血症(LPS 剂量每只小鼠 50 ng)时小鼠生存率;而用高剂量 LPS(每只小鼠 250 ng)攻击小鼠时,抗 LBP 抗体虽阻断了 LBP 的活性,但未发挥上述保护作用<sup>[20]</sup>,可见高剂量 LPS 可通过除 LBP 以外的途径诱导死亡,表明抗 LBP 的治疗作用的局限性。临床上可应用连续性血浆过滤吸附清除体内 LBP<sup>[21]</sup>。早期清除体内 LBP 可以预防脓

毒症诱导的急性肾损伤,改善危重患者的愈后<sup>[22]</sup>。另外,超重肥胖患者服用石榴提取物后能显著降低血浆中 LBP,从而降低该类患者内毒素血症的发生率<sup>[23]</sup>。综上所述,以 LBP 为治疗靶点,通过单克隆 LBP 抗体,服用石榴提取物或物理清除 LBP 等方式抑制 LBP 结合 LPS 的活性,为下一步治疗 LPS 介导的脓毒症提供了多种方向。

也有研究证明在某些类型 GNB 感染时,LBP 结合 LPS 介导的炎症反应起到了保护作用。利用 LBP 基因缺陷小鼠证实 LBP 可以快速诱导针对低剂量 LPS 或 GNB 的炎症反应,保护腹腔注射沙门氏菌的小鼠<sup>[24]</sup>。此外,LBP 还被证实在针对毒性强的肺炎克雷伯菌时具有重要的先天免疫作用<sup>[25]</sup>。这些现象说明在 GNB 感染初期,LBP 的激活作用是启动宿主免疫防御的关键点。

在宿主感染时,LBP 结合 LPS 介导的炎症反应所表现出的正反两种作用,可能与细菌种类、感染途径及 LPS 的浓度有关,提示 LBP 治疗脓毒症的具体条件和适应症还有待深入研究。

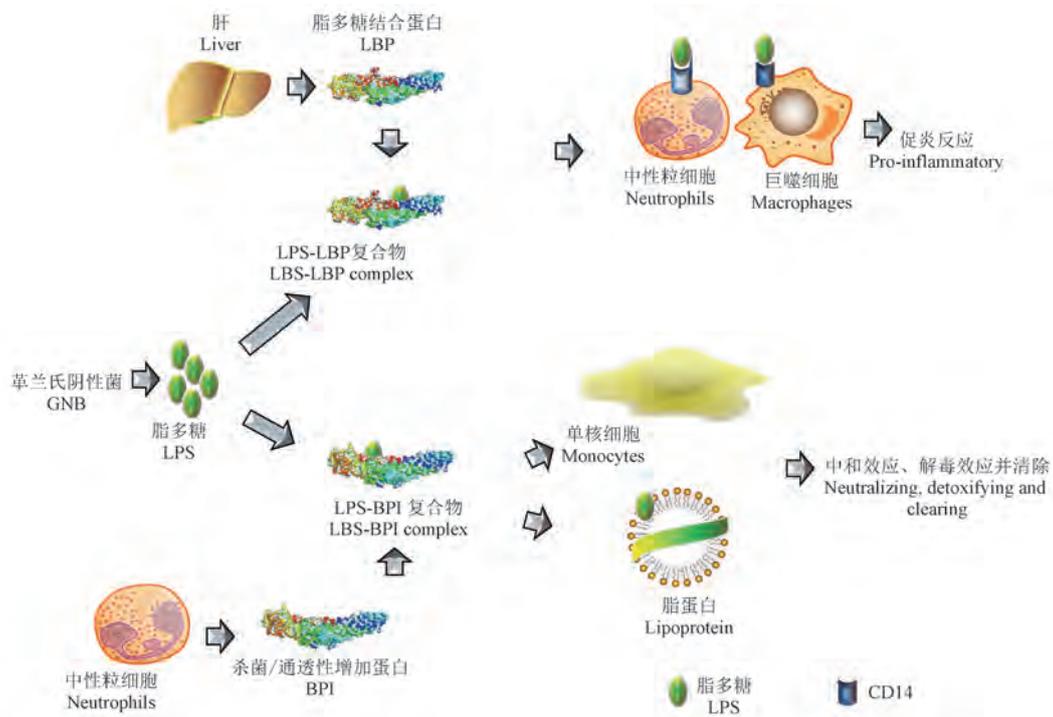
## 2.2 高浓度 LBP 对 LPS 活性的抑制作用

LBP 是急性期反应蛋白,在脓毒症阶段时,血浆中 LBP 会升高数倍,有研究表明,高浓度的 LBP 对 LPS 的活性具有抑制作用,这种作用可以抑制 LPS 介导的促炎反应,避免宿主炎症反应的失调,从而阻止脓毒症的发生发展。

研究证明高浓度的 LBP 在体外可以抑制 LPS 诱导的鼠巨噬细胞激活。小鼠通过注射高浓度重组鼠 LBP 可以抑制 LPS 介导的细胞因子释放、阻止肝功能衰竭、降低 D-半乳糖胺致敏内毒素小鼠和脓

毒症小鼠的死亡率<sup>[26]</sup>。在临床研究中,也发现了类似现象:研究者通过分析严重脓毒症或感染性休克患者的血清 LBP 浓度,发现血清 LBP 较高时,LPS 活性明显降低。随着 LBP 的减少,LPS 活性又会慢慢恢复<sup>[27]</sup>。另外,在脓症患者血清中加入重组人 LBP,也可以抑制 LPS 的活性<sup>[27]</sup>。有学者认为,高浓度 LBP 的上述抑制作用与 LBP 通过脂蛋白代谢途径清除 LPS 有关<sup>[26]</sup>。随着体外实验发现高浓度的 LBP 在无血清(无脂蛋白)存在时也可以阻断 LPS 诱导的鼠巨噬细胞激活,表明 LBP 对 LPS 的抑制还存在另一种机制。这种机制可能与高浓度 LBP 可以抑制 LPS-CD14 复合物的形成有关系,高浓度

LBP 可以快速将 LPS 从 mCD14 上解离下来,抑制 LPS 从 CD14 转移到 TLR4-MD2 受体来,从而抑制炎症细胞对 LPS 的反应<sup>[28]</sup>。高浓度 LBP 通过不同机制阻断粗糙(R)型和光滑(S)型 LPS 与 CD14 的结合,抑制 LPS 诱导 NF-κB 核转位<sup>[29]</sup>。这种机制似乎与氯胺酮的抗炎机制相似:研究发现氯胺酮可以抑制 LPS 诱导的 TLR4 表达和 NF-κB 活化,通过抑制 TLR4/NFκB 通路减弱 LPS 介导的过度炎症反应<sup>[30-31]</sup>,由此可推测,利用高浓度的 LBP 抑制 TLR4/NF-κB 通路,可产生与氯胺酮相似的作用来减弱 LPS 介导的炎症反应,进而阻止脓毒症的发生发展。



注:脂多糖结合蛋白(LBP)主要由肝细胞合成,LBP 可以从革兰氏阴性菌(GNB)的外膜中提取 LPS 单体,从而将 LPS 分子递送至膜形式和可溶性形式的 CD14 受体,从而触发中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞介导的促炎反应。除了上述激活作用外,LBP 还可将内毒素传递给脂蛋白,从而促进 LPS 在肝的清除。杀菌/通透性增加蛋白(BPI)主要存在于中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的颗粒中。此外,在单核细胞和结肠上皮细胞表面也检测到 BPI,这可能是中性粒细胞活化后二次分泌所致。BPI 对 LPS 和细菌具有更高的亲和力,具有杀菌作用、抗炎作用。BPI-内毒素聚集体的主要靶细胞是单核细胞,BPI 促进纯化的 LPS 聚集体在不依赖 CD14 的情况下向宿主细胞递送,并且没有明显的细胞活化。

图 2 LBP 和 BPI 在革兰氏阴性菌感染时的作用

Note. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) synthesized principally by hepatocytes and secreted into the bloodstream, can extract LPS monomers from the out membrane of Gram negative bacteria (GNB), thereby deliver the LPS molecules to membrane and soluble forms of CD14 receptors, which trigger the pro-inflammatory response mediated neutrophils, monocytes, and macrophages. Besides the activation described previously, LBP delivers LPS to lipoproteins leads to hepatic clearance. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is found mainly in the granules of neutrophils and eosinophils. Additionally, BPI has been detected on the surface of monocytes and colon epithelium, which possibly due to the secondary secretion from activated neutrophils. BPI has higher affinity for LPS and bacteria, is bactericidal and represses inflammation by preventing LBP from delivering LPS to CD14. The major target cell of BPI-endotoxin aggregates are monocytes, while BPI promotes the CD14-independent delivery of purified LPS aggregates to host cells without apparent cell activation.

Figure 2 Role of LBP and BPI in host responses to Gram negative bacteria

### 2.3 LBP 基因单核苷酸多态性与脓毒症及其并发症的关系

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 是最常见的遗传变异类型。免疫反应相关的关键基因 SNP, 可能与多种疾病的易感性和临床结果有关, 有助于预测疾病预后和治疗效果<sup>[19]</sup>。越来越多的证据表明, LBP 基因中的特定

SNP 与脓毒症及其并发症有关<sup>[14,19,32-38]</sup> (见表 2)。

综上所述, 通过分析 LBP 基因中 SNP 与脓毒症及其并发症的关系, 识别出高危人群, 及时调整治疗策略可能会改善脓毒症患者预后。此外, 为脓症患者提供了新的治疗策略, 例如基因编辑技术。但是由于患者队列数量及结果可重复性的限制, 仍需更多的临床研究来验证 SNP 与脓毒症的关系。

表 2 LBP 基因中 SNP 与脓毒症和脓毒症并发症的关系  
Table 2 Impact of SNPs in LBP gene on sepsis and septic complications

dpSNP 编码 dpSNP ID	疾病 Disease	SNP 携带形式 SNP carrier	对脓毒症的主要影响 Major effects on sepsis	参考文献 Reference
-(Cys98→Gly)	脓毒症 Sepsis	/	可能增加男性患者脓毒症的易感性。 Gly98 allele may contribute to an increased predisposition to sepsis in male patients.	[27]
rs2232582	造血干细胞移植后并发脓毒症 Septic complications after hematopoietic cell transplantation (HCT)	杂合子 Heterozygous	C 等位基因可增加造血干细胞移植后发生革兰阴性菌脓毒症的风险。 C allele associated with a 2-fold higher risk for GN bacteremia after HCT.	[26]
4-SNP 单倍体 4-SNP haplotype (rs1780616-C、 rs5741812-A、 rs2232571-T、 rs1780617-A)	脓毒症 Sepsis	纯合子 Homozygous	可增加脓毒症发生风险和血液中 LBP 的平均水平。 The haplotype associated with increased risk for sepsis and higher mean levels of serum LBP.	[28]
rs2232571	造血干细胞移植后并发脓毒症 Septic complications after HCT	杂合子 Heterozygous	C 等位基因与较高的血清 LBP 水平有关, 增加患者死亡风险。 C allele is associated with higher serum LBP level, which increases the risk of death.	[26]
	造血干细胞移植 HCT	杂合子 Heterozygous	可增加内毒素提取和转移至 MD-2 的效率。 Showed association with higher efficiency in endotoxin extraction and transfer to MD-2.	[29]
rs2232613	肺炎和脓毒症 Pneumonia and sepsis	杂合子 Heterozygous	体外实验发现携带 T 等位基因会损害细菌配体结合能力和细胞因子诱导功能, 并在脓毒症并发症和肺炎过程中表现出更高的死亡风险。 Carriage of T allele impaired bacterial ligands binding capacity and cytokines-induction function and exhibited a higher risk for mortality in the course of septic complications and pneumonia.	[9]
rs2232618	创伤 Trauma	/	生成的突变蛋白与 CD14 的结合能力增强。C 等位基因增加创伤后脓毒症的发生率。 Generated mutant protein had an enhanced binding capacity with CD14. C allele contributed to higher incidence and development of sepsis.	[25,30]
	脓毒症 Sepsis	纯合子 Homozygous	与另外四个 SNP 的组合和儿童脓毒症有关。 A combination with additional four SNPs was associated with sepsis in children.	[31]

### 3 BPI 的功能及研究进展

BPI 主要存在于中性粒细胞的颗粒中,在单核细胞和结肠上皮细胞表面也可检测到 BPI,这可能是由于激活的中性粒细胞二次分泌所致<sup>[10]</sup>。BPI 在 LPS 的清除过程中发挥着十分重要的作用,具有杀菌、消炎、调理吞噬等作用<sup>[9]</sup>(如图 2 所示)。

#### 3.1 BPI 的杀菌活性

在早期研究中发现新生儿中性粒细胞由于缺乏 BPI,削弱了新生儿中性粒细胞对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的吞噬和杀菌活性。人血清 BPI 抗体可抑制 BPI 对大肠杆菌的杀菌活性<sup>[39]</sup>,进一步证实了 BPI 具有独立杀菌活性。

BPI 的杀菌活性与 N 端结构域有关,BPI 带阳离子的 N 末端结构域结合带负电的 LPS 磷酸基团后,扰乱 LPS 分子的排列和细菌膜电位,导致膜破裂,引发细菌死亡<sup>[40]</sup>。GNB 细胞壁损伤后不仅严重影响细菌生长,还导致多种协同抗微生物肽更易进入菌体<sup>[41]</sup>,进一步加速细菌死亡。当 BPI 和 LPS 紧密结合时,能发挥直接杀菌作用<sup>[42]</sup>。BPI 还能与补体系统协同起到杀菌作用,当血清中 C7 耗尽后,BPI 对大肠杆菌的杀菌活性会受到抑制,而加入正常血清,这种活性会再次恢复<sup>[43]</sup>。

#### 3.2 BPI 的调理吞噬活性

相比杀菌活性,BPI 调理吞噬功能的相关研究较少,已证实 BPI 的 C 末端结构域参与细菌的调理吞噬作用<sup>[15]</sup>。BPI C 末端结构域帮助树突状细胞摄取 LPS 和呈递抗原<sup>[44]</sup>,发挥调理吞噬作用。重组(全长)BPI 可以促进细菌表面补体激活,加速大肠杆菌的吞噬,证实 BPI 间接影响吞噬作用<sup>[45]</sup>。近期

一项研究证实了 BPI 在调理吞噬过程中的重要作用,在急性感染时,BPI 基因缺陷小鼠中性粒细胞会抑制对铜绿假单胞菌的吞噬和清除作用,而从人类中性粒细胞纯化的 BPI 能够恢复 BPI 基因缺陷小鼠对铜绿假单胞菌的吞噬清除能力。同时还观察到外源性 BPI 通过 CD18 增加中性粒细胞对铜绿假单胞菌的摄取,加快基因敲除小鼠体内铜绿假单胞菌的清除,阻断 CD18 可以抑制以上作用,进一步证实 BPI 可以介导细菌吞噬<sup>[46]</sup>。BPI 不仅促进白细胞对 GNB 的清除,还促进抗原的摄取和呈递,说明 BPI 在天然抗菌免疫过程中扮演着重要角色。

#### 3.3 BPI 的抗炎作用

除了促进 GNB 的清除,BPI 还可以调节 LPS 触发的细胞因子反应,发挥抗炎作用<sup>[15]</sup>。与 LBP 相比,BPI 的 N-末端结构域对 LPS 具有更强的亲和力,这种高亲和力不仅增加了 LPS 聚集体的大小,还竞争性阻断了 LPS 与 LBP 的相互作用,减弱炎症细胞的炎症活动(即炎症细胞因子的产生和释放)<sup>[47-48]</sup>。BPI 基因缺陷小鼠中性粒细胞的募集活性加强,导致炎症因子增多。注射外源性人 BPI 后,BPI 基因缺陷小鼠感染部位炎症减弱,炎症因子减少<sup>[46]</sup>。

综上所述,BPI 的杀菌、调理吞噬作用会加速 LPS 清除,从而减少血液中 LPS 含量,其抗炎作用又可以抑制 LPS 介导的炎症因子释放,从而降低了 LPS 导致宿主炎症反应失控的可能,阻止 LPS 介导的脓毒症的发生发展,因此 BPI 很可能成为脓毒症治疗的重要靶点。

#### 3.4 BPI 治疗脓毒症的潜力

BPI N 末端片段 rBPI21 和 rBPI23 是目前在治

表 3 rBPI 的治疗潜力  
Table 3 Therapeutic potential of rBPI

rBPI 类型 Stype of rBPI	疾病 Disease	对疾病的作用 Effect on disease	参考文献 Reference
	脑膜炎球菌病 Meningococcal disease	减少脑膜炎球菌病的并发症。 Reduce the complications of meningococcal disease.	[43]
rBPI21	脑膜炎球菌脓毒症 Meningococcal sepsis	rBPI21 可有效抑制脑膜炎球菌和清除细菌内毒素,从而降低发病率并改善患儿的功能结果。 rBPI21 can effectively inhibit meningococci and clear bacterial endotoxin, thus reducing clinically significant morbidities and improving the functional outcome of children with severe meningococemia.	[46]
rBPI23	接受内毒素注射的人体试验 A clinical trial study involving endotoxin challenge of human volunteers	rBPI23 可以中和 LPS,并且显著减少炎症因子的释放,降低小剂量内毒素输注后纤溶系统和凝血系统的激活。 rBPI23 neutralized endotoxin and reduced the activation of the fibrinolytic and coagulation cascades after low-dose endotoxin infusion in human volunteers.	[44-45]

疗方面较为有效的两种重组蛋白。两者的区别在于氨基酸的数量(rBPI21: 1-193, rBPI23: 1-199), 以及 132 位氨基酸的突变(rBPI21 的半胱氨酸 132 变成丙氨酸)减少了二聚体的形成<sup>[15]</sup>。

由于 BPI 在 GNB 感染时发挥的重要作用, 重组 BPI 应可以作为治疗内毒素血症及脓毒症的潜在方案。在脓毒症和内毒素血症的动物模型中, 发现重组 rBPI21 有助于降低血清中的 LPS, 显著降低动物的死亡率<sup>[49]</sup>。重组 BPI 可以增加 BPI 基因缺失小鼠中性粒细胞对铜绿假单胞菌的摄取, 通过促进腹腔中致病菌的清除, 减轻急性腹膜感染引起的炎症反应<sup>[46]</sup>。

临床研究表明重组 BPI 片段也发现有治疗潜力, 如脑膜炎球菌病, 儿童脑膜炎球菌脓毒症等<sup>[50-53]</sup>(详见表 3)。相比于动物实验, 目前仍未有全长重组 BPI 应用于临床的报道。由于全长重组 BPI 不仅具有 N 末端结构域的杀菌活性, 还具有 C 末端结构域的调理吞噬作用, 因此其治疗效果可能比简单 BPI 重组片段更有效, 这有待深入研究。

BPI 体内较短的半衰期(终末消除半衰期为 42 min)限制了重组 BPI 在临床上的应用<sup>[15]</sup>。而一种由 LBP N 端结构域和 BPI C 端结构域组成的嵌合蛋白克服了半衰期短的优点, 还能有效提高脓毒症大鼠的生存率<sup>[54]</sup>, 这很可能有利于增加 BPI 治疗脓毒症的便利。

BPI 基因的一种 SNP 与脓症患者死亡率有关, 这种 SNP 发生在 BPI 基因的第 645 位(rs4358188), 携带等位基因 645A(腺嘌呤)的患者谷氨酸(BPI216E)被氨基酸 216 位的赖氨酸(BPI216K)取代。Ederer 等<sup>[55]</sup>发现该位置基因突变影响了 BPI 与 LPS 的结合, BPI216K 表现出更强的 LPS 中和能力, 还能抑制 LPS 诱导的炎症因子分泌, 降低脓毒症致死率。BPI216K 和 BPI216E 变异性在脓毒症时存在的不同表现, 为将来利用重组 BPI 治疗 GNB 脓毒症提供新的选择。

除了前述问题, 利用重组 BPI 片段治疗脓毒症, BPI 自身抗体也是影响治疗效果的因素之一。目前抗 BPI 自身抗体产生机制仍不明确, 但在革兰氏阳性菌和 GNB 脓症患者中时有发现, 如金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌, 尤其在 GNB 脓毒症中发生率较高<sup>[56]</sup>。另外, 应用重组 BPI 治疗也有可能产生抗 BPI 抗体, 影响治疗效果。抗 BPI 自身抗体可以抗调理吞噬, 抑制 BPI 杀菌, 削弱 BPI 抗炎活性, 从而

增加脓毒症的发病率和死亡率<sup>[56]</sup>, 并且导致重组 BPI 治疗效果不佳。这需要更多研究阐明 BPI 自身抗体产生的机制及与上述疾病的关系, 减少其对治疗效果的不良影响。

#### 4 总结与展望

LBP 和 BPI 均是参与脓毒症过程的重要血浆蛋白。根据它们在脓毒症时的具体机制, 可采取针对性的治疗策略。BPI 由于其杀灭细菌、中和 LPS、调理吞噬活性、抗炎作用等, 已被证明是很有前景的脓毒症治疗靶点, 其生物学特性值得深入研究: 如 BPI 的 C 端结构域与调理吞噬功能的关系、全长重组 BPI 的临床应用、完美重组 BPI, BPI 基因 SNP 与脓毒症易感性以及 BPI 自身抗体与疾病的关系等。LBP 在治疗方面的应用仍有待深入研究, 脓毒症个体既需要感染初期 LBP 的激活作用来加速低浓度 LPS 清除, 又需要避免过度激活炎症反应。另外, 鉴于高浓度的 LBP 有利于清除 LPS 和抑制 LPS 介导的炎症细胞活化, 重组 LBP 将来有可能成为治疗脓毒症的工具之一。LBP 基因 SNP 与脓毒症易感性的关系为防治脓毒症提供了新思路, 有待更多的基础和临床研究为 LBP 作为靶点治疗脓毒症提供证据。

#### 参考文献:

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810.
- [2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the global burden of disease study [J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-211.
- [3] He Z, Song Z, Meng L, et al. Lipopolysaccharide-induced transcriptional changes in LBP-deficient rat and its possible implications for liver dysregulation during sepsis [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 1-14.
- [4] Peng X, Luo Z, He S, et al. Blood-brain barrier disruption by lipopolysaccharide and sepsis-associated encephalopathy [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 1-18.
- [5] Gabarin RS, Li M, Zimmel PA, et al. Intracellular and extracellular lipopolysaccharide signaling in sepsis: Avenues for novel therapeutic strategies [J]. J Innate Immun, 2021, 13(6): 323-332.
- [6] Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, et al. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin [J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 2821-2828.
- [7] Opal SM. Endotoxins and other sepsis triggers [J]. Contrib

- Nephrol, 2010, 167: 14–24.
- [ 8 ] Durasevic S, Ruzicic A, Lakic I, et al. The effects of a meldonium pre-treatment on the course of the LPS-induced sepsis in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4) : 1–28.
- [ 9 ] Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, et al. Bactericidal/permeability increasing protein: A multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization [J]. *Innate Immun*, 2013, 19(4) : 339–347.
- [ 10 ] Yu Y, Song G. Lipopolysaccharide-binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein in lipid metabolism and cardiovascular diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1276: 27–35.
- [ 11 ] Alva V, Lupas AN. The tulip superfamily of eukaryotic lipid-binding proteins as a mediator of lipid sensing and transport [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(8) : 913–923.
- [ 12 ] Krasity BC, Troll JV, Weiss JP, et al. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(4) : 1039–1044.
- [ 13 ] Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): Structure, function and regulation in host defence against gram-negative bacteria [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(4) : 785–790.
- [ 14 ] Eckert JK, Kim YJ, Kim JI, et al. The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity [J]. *Immunity*, 2013, 39(4) : 647–660.
- [ 15 ] Theprungsirikul J, Skopelja-Gardner S, Rigby WFC. Killing three birds with one BPI: bactericidal, opsonic, and anti-inflammatory functions [J]. *J Transl Autoimmun*, 2021, 4: 1–10.
- [ 16 ] Schultz H, Weiss JP. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 384(1–2) : 12–23.
- [ 17 ] Chen KF, Chaou CH, Jiang JY, et al. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein as biomarker for sepsis in adult patients: A systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4) : 1–13.
- [ 18 ] Garcia de Guadiana Romualdo L, Albaladejo Oton MD, Rebollo Acebes S, et al. Diagnostic accuracy of lipopolysaccharide-binding protein for sepsis in patients with suspected infection in the emergency department [J]. *Ann Clin Biochem*, 2018, 55(1) : 143–148.
- [ 19 ] Meng L, Song Z, Liu A, et al. Effects of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) single nucleotide polymorphism (SNP) in infections, inflammatory diseases, metabolic disorders and cancers [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 1–12.
- [ 20 ] Le Roy D, Di Padova F, Tees R, et al. Monoclonal antibodies to murine lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) protect mice from lethal endotoxemia by blocking either the binding of LPS to LBP or the presentation of LPS/LBP complexes to cd14 [J]. *J Immunol*, 1999, 162(12) : 7454–7460.
- [ 21 ] Castellano G, Stasi A, Intini A, et al. Endothelial dysfunction and renal fibrosis in endotoxemia-induced oliguric kidney injury: possible role of LPS-binding protein [J]. *Crit Care*, 2014, 18(5) : 520.
- [ 22 ] Stasi A, Intini A, Divella C, et al. Emerging role of lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(1) : 24–31.
- [ 23 ] Gonzalez-Sarrias A, Romo-Vaquero M, Garcia-Villalba R, et al. The endotoxemia marker lipopolysaccharide-binding protein is reduced in overweight-obese subjects consuming pomegranate extract by modulating the gut microbiota: A randomized clinical trial [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(11) : 1–32.
- [ 24 ] Jack RS, Fan X, Bernheiden M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection [J]. *Nature*, 1997, 389(6652) : 742–745.
- [ 25 ] Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, et al. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria [J]. *J Immunol*, 2001, 167(5) : 2759–2765.
- [ 26 ] Lamping N, Dettmer R, Schroder NW, et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(10) : 2065–2071.
- [ 27 ] Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, et al. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes [J]. *Blood*, 2001, 98(13) : 3800–3808.
- [ 28 ] Thompson PA, Tobias PS, Viriyakosol S, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cell-bound LPS [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(31) : 28367–28371.
- [ 29 ] Hamann L, Alexander C, Stamme C, et al. Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(1) : 193–200.
- [ 30 ] Yang C, Shen J, Hong T, et al. Effects of ketamine on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior and the expression of inflammatory cytokines in the rat prefrontal cortex [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(3) : 887–890.
- [ 31 ] Wu Y, Li W, Zhou C, et al. Ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced astrocytes activation by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3) : 609–617.
- [ 32 ] Lu HX, Sun JH, Wen DL, et al. LBP rs2232618 polymorphism contributes to risk of sepsis after trauma [J]. *World J Emerg Surg*, 2018, 13: 52.
- [ 33 ] Chien JW, Boeckh MJ, Hansen JA, et al. Lipopolysaccharide binding protein promoter variants influence the risk for gram-negative bacteremia and mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Blood*, 2008, 111(4) : 2462–2469.
- [ 34 ] Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, et al. Gene variants of the

- bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(3): 557-561.
- [35] Flores C, Perez-Mendez L, Maca-Meyer N, et al. A common haplotype of the LBP gene predisposes to severe sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(10): 2759-2766.
- [36] Guinan EC, Palmer CD, Mancuso CJ, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in hematopoietic cell transplant patients affecting early recognition of, and response to, endotoxin [J]. *Innate Immun*, 2014, 20(7): 697-711.
- [37] Zeng L, Gu W, Zhang AQ, et al. A functional variant of lipopolysaccharide binding protein predisposes to sepsis and organ dysfunction in patients with major trauma [J]. *Ann Surg*, 2012, 255(1): 147-157.
- [38] Jabandziev P, Smerek M, Michalek J, et al. Multiple gene-to-gene interactions in children with sepsis; A combination of five gene variants predicts outcome of life-threatening sepsis [J]. *Crit Care*, 2014, 18(1): R1.
- [39] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence [J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(1): 45-49.
- [40] Wiese A, Brandenburg K, Carroll SF, et al. Mechanisms of action of bactericidal/permeability-increasing protein BPI on reconstituted outer membranes of gram-negative bacteria [J]. *Biochemistry*, 1997, 36(33): 10311-10319.
- [41] Levy O. A neutrophil-derived anti-infective molecule; bactericidal/permeability-increasing protein [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(11): 2925-2931.
- [42] Capodici C, Chen S, Sidoreczyk Z, et al. Effect of lipopolysaccharide (LPS) chain length on interactions of bactericidal/permeability-increasing protein and its bioactive 23-kilodalton nh2-terminal fragment with isolated LPS and intact proteus mirabilis and escherichia coli [J]. *Infect Immun*, 1994, 62(1): 259-265.
- [43] Madsen LM, Inada M, Weiss J. Determinants of activation by complement of group ii phospholipase a2 acting against escherichia coli [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(7): 2425-2430.
- [44] Schultz H, Hume J, Zhang DS, et al. A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2007, 179(4): 2477-2484.
- [45] Nishimura H, Gogami A, Miyagawa Y, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein promotes complement activation for neutrophil-mediated phagocytosis on bacterial surface [J]. *Immunology*, 2001, 103(4): 519-525.
- [46] Theprungsirikul J, Skopelja-Gardner S, Burns AS, et al. Bactericidal/permeability-increasing protein preeminently mediates clearance of pseudomonas aeruginosa in vivo via cd18-dependent phagocytosis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 1-12.
- [47] Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(30): 18682-18685.
- [48] Iovine N, Eastvold J, Elsbach P, et al. The carboxyl-terminal domain of closely related endotoxin-binding proteins determines the target of protein-lipopolysaccharide complexes [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10): 7970-7978.
- [49] Evans TJ, Carpenter A, Moyes D, et al. Protective effects of a recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in an animal model of gram-negative sepsis [J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(1): 153-160.
- [50] Levin M, Quint PA, Goldstein B, et al. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis; a randomised trial. RBPI21 meningococcal sepsis study group [J]. *Lancet*, 2000, 356(9234): 961-967.
- [51] von der Mohlen MA, Kimmings AN, Wedel NI, et al. Inhibition of endotoxin-induced cytokine release and neutrophil activation in humans by use of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein [J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(1): 144-151.
- [52] von der Mohlen MA, van Deventer SJ, Levi M, et al. Inhibition of endotoxin-induced activation of the coagulation and fibrinolytic pathways using a recombinant endotoxin-binding protein (rBPI23) [J]. *Blood*, 1995, 85(12): 3437-3443.
- [53] Giroir BP, Scannon PJ, Levin M. Bactericidal/permeability-increasing protein-lessons learned from the phase iii, randomized, clinical trial of rBPI21 for adjunctive treatment of children with severe meningococemia [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(7 Suppl): S130-135.
- [54] Opal SM, Palardy JE, Jung JW, et al. Activity of lipopolysaccharide-binding protein-bactericidal/permeability-increasing protein fusion peptide in an experimental model of pseudomonas sepsis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(12): 2813-2815.
- [55] Ederer KU, Holzinger JM, Maier KT, et al. A polymorphism of bactericidal/permeability-increasing protein affects its neutralization efficiency towards lipopolysaccharide [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1-10.
- [56] Theprungsirikul J, Thaden JT, Wierzbicki RM, et al. Low-avidity autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein occur in gram-negative and gram-positive bacteremia [J]. *Infect Immun*, 2020, 88(10): 1-10.

[收稿日期]2022-04-18

侯雨君,王楷,陈颖,等. MicroRNA 调控肠道屏障机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 95-100.

Hou YJ, Wang K, Chen Y, et al. Research progress on the mechanism of microRNA-regulation of intestinal barrier [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 95-100.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.012

## MicroRNA 调控肠道屏障机制的研究进展

侯雨君<sup>1</sup>,王楷<sup>1</sup>,陈颖<sup>1</sup>,王路<sup>1</sup>,蒋慧灵<sup>1</sup>,李瑛<sup>2</sup>,周思远<sup>1\*</sup>

(1.成都中医药大学针灸推拿学院/第三附属医院,成都 610075;

2.成都中医药大学研究生院,成都 610075)

**【摘要】** 肠道屏障受损是许多疾病的重要病因与病理特征。随着研究的深入, microRNA 调控肠道屏障的作用被日益重视。研究发现,在不同的疾病中 microRNA 可以通过结合不同靶点,调控结构蛋白、细胞凋亡、免疫与炎症、氧化应激等过程,参与破坏或保护肠屏障功能。笔者通过对相关文献进行检索、归纳,发现 microRNA 可通过不同机制调控肠道屏障,以期探索 microRNA 在这些疾病机制研究以及诊断与治疗中的潜在价值。

**【关键词】** 肠道屏障; microRNA; 炎症性肠病; 研究进展

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0095-06

## Research progress on the mechanism of microRNA-regulation of intestinal barrier

HOU Yujun<sup>1</sup>, WANG Kai<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, JIANG Huiling<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, ZHOU Siyuan<sup>1\*</sup>

(1. School of Acupuncture-Moxibustion/Third Affiliated Hospital, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075, China.

2. Graduate School, Chengdu University of Chinese Medicine, Chengdu 610075)

**【Abstract】** Intestinal barrier dysfunction is an important etiological and pathological feature of many diseases. The role of microRNA in intestinal barrier injury is the subject of more and more attention and increasingly focused research. Studies have found that microRNA can be involved in the destruction or protection of intestinal barrier function by combining different targets to regulate structural proteins, apoptosis, immunity, inflammation, and oxidative stress. The research is summarized, and different mechanisms of microRNA regulation of the intestinal barrier are discussed, to explore the potential value of microRNA when studying the mechanisms, diagnosis, and treatment of these diseases.

**【Keywords】** intestinal barrier; microRNA; inflammatory bowel disease; research progress

肠道屏障是人体的重要防线。完整的肠道屏障可以抵御病菌等有害物质的入侵,维持肠道的稳态。而当肠道发生炎症、癌变时,肠道组织完整性被破坏,肠道屏障受损,细菌及其产物以及内毒素等物质通过肠腔进入循环,导致全身感染和炎症,进一步加重疾病症状<sup>[1]</sup>。在炎症性肠病

(inflammatory bowel disease, IBD)、腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D)、缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion, I/R) 与结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 等疾病中都观察到肠道屏障损伤的现象。

MicroRNA (miRNA) 是一种由内源性基因编码

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目 (82074588)。

**【作者简介】** 侯雨君 (1996—), 女, 硕士, 研究方向: 功能性肠病的临床及机制研究。E-mail: meizanbei@163.com

**【通信作者】** 周思远 (1984—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性肠病的临床及机制研究。E-mail: zsysy6688@qq.com

的高度保守的单链小 RNA 分子,参与调控多种基因与蛋白表达<sup>[2]</sup>,在调节肠道屏障功能中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。本文从结构蛋白、免疫与炎症、上皮细胞凋亡与氧化应激几个角度出发,讨论了 miRNA 在这些疾病中调节肠道屏障机制的研究进展,以期为未来研究提供文献依据。

## 1 结构蛋白

机械屏障是肠道屏障的主要组成部分,由覆盖于最上层的黏液层、肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)以及上皮细胞之间的连接结构组成。紧密连接(tight junctions, TJs)是 IECs 连接结构中最重要的一种,因此 TJs 蛋白常作为反映肠道屏障功能的理想指标。黏附连接(adheren junctions, AJs)与 TJs 一同形成顶端连接复合体,在上皮屏障的形成与维持中发挥核心作用。黏液层功能则主要由黏蛋白表达反映。

### 1.1 TJs 蛋白

TJs 是机械屏障最重要的组成部分,由跨膜蛋白 Claudins (CLDN)、Occludin (OCLN)、闭锁小带蛋白(zonulaoccludens, ZO)与连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)组成。在 IBD 中,miR-320a 通过增加上皮间质抵抗反应,导致 JAM-A 表达增加<sup>[4]</sup>。体内外实验证明,在 IBD 模型中 miR-122a 与 ZO-1<sup>[5]</sup>与 OCLN<sup>[6]</sup>的表达水平呈正相关。最新研究发现,在炎症条件下,miR-195-5p 可以调节 CLDN1 与 CLDN2 的表达,并保护肠上皮屏障的完整性<sup>[7]</sup>,提示在炎症情况下,这些 miRNA 可以参与上调 TJs 蛋白表达。部分 miRNA 也可以参与破坏肠道屏障。例如,在 IBD 模型中,miR-1 可以通过调控肌球蛋白轻链激酶(myosin light-chain kinase, MLCK)下调 ZO-1 与 CLDN2 的表达<sup>[8]</sup>。Hou 等<sup>[9]</sup>发现 IBS-D 大鼠结肠 miR-144 明显上调,并且可导致 OCLN、ZO-1 表达降低,肠道屏障损伤。Zhou 等<sup>[10]</sup>则发现 IBS-D 患者结肠 miR-29a 与 miR-29b 表达水平升高,并可降低 CLDN1 表达,在此基础上,抑制 IBS-D 模型小鼠的 miR-29a 后肠道 ZO-1 和 CLDN1 的表达增加<sup>[11]</sup>。此外,有研究通过对比 IBS-D 患者与健康人肠道 miRNA,发现 miR-16 和 miR-125b 靶向下调 CLDN2,破坏肠道屏障<sup>[12]</sup>。宫内生长受限(intrauterine growth restricted, IUGR)是新生儿常见疾病,肠道功能受损是 IUGR 的重要特征。研究通过对比 IUGR 模型猪与正常新生猪肠道

miRNA 表达区别,发现 IUGR 模型猪肠道 miR-29 显著增加与 CLDN1 表达降低有关<sup>[13]</sup>。

### 1.2 AJs 蛋白

钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)是 AJs 的主要组成部分。Mahurkar-Joshi 等<sup>[14]</sup>在 IBS 患者结肠黏膜中观察到 miR-219a-5p 水平下调,体外实验中使用 miR-219a-5p 抑制剂处理后,细胞中 E-cadherin 水平降低,肠道通透性增加。Rho 相关蛋白激酶 1(rho-associated protein kinase 1, ROCK1)是一种参与调节黏附连接、IECs 增殖和凋亡、平滑肌细胞收缩等多种细胞活动的激酶,使用 ROCK1 抑制剂后观察到 E-cadherin 表达上调<sup>[15]</sup>。研究发现肠梗阻患者结肠 miR-21 表达降低,炎症因子水平升高,肠道屏障受损,敲除模型小鼠 miR-21 后则观察到肠道炎症反应加重,体外实验也证实 miR-21 靶向调控 ROCK1 调节肠道屏障,提示 miR-21 极有可能通过 ROCK1 调节黏附连接从而影响肠道屏障<sup>[16]</sup>。

### 1.3 黏蛋白

黏蛋白(mucin, Muc)由杯状细胞分泌,是黏液层的主要组成成分,发挥着维持肠道稳态的作用。T-合成酶是 Muc 形成与发挥作用所需的关键酶。Sun 等<sup>[17]</sup>对 IBD 患者和模型小鼠的结肠组织进行分析,发现随着年龄的增长,miR-1-3p 和 miR-124-3p 表达增加,并协同抑制 T-合成酶的表达,下调 Muc2 水平,损伤黏液层。Morris 等<sup>[18]</sup>观察到 L/R 模型动物肠道损伤,而使用药物治疗后,miR-150 与 miR-7a 水平上升, TJs 蛋白与黏蛋白 Muc2 表达上调,肠道屏障功能恢复。以上研究表明 miRNA 可通过调节黏蛋白的表达影响黏液层的完整性,从而达到调控肠道屏障的目的。

## 2 免疫与炎症

完整的免疫系统对于肠道稳态的维持至关重要。免疫细胞的异常激活导致过多的炎症因子损伤肠道组织,最终造成肠道屏障功能的紊乱。

### 2.1 T 细胞

T 细胞是人体重要的免疫细胞,可分化为不同的亚群而发挥作用。研究表明 miRNA 可以通过调节 T 细胞进而影响免疫功能。Wang 等<sup>[19]</sup>发现在炎症状态下 miR-423-5p 水平升高,靶向调控 CLDN5 调节并促进 T 细胞分化,加重炎症的进展,破坏肠屏障。MiR-31<sup>[20]</sup>与 miR-146a<sup>[21]</sup>分别通过下调胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin,

TSLP)与限制肠道 T 细胞分化,影响 T 细胞成熟和极化过程,破坏肠道稳态。Th9、Th17 与 Treg 都是有促炎效应的 T 细胞亚群。Th17 细胞分泌炎症因子,Treg 细胞分化为 Th17 细胞,进一步加速炎症过程,因此 Th17 与 Treg 不平衡会导致肠道免疫紊乱。研究发现肝硬化患者肠道通透性升高,血清 miR-21、Th9 水平明显升高<sup>[22]</sup>。在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者结肠中也观察到 miR-155 水平升高,体外实验中抑制 miR-155 可显著降低 Th17 与 Treg 比率,而在 AP 模型小鼠中抑制 miR-155 后炎症因子、细胞因子抑制信号(suppressor of cytokine signaling, SOCS1)和磷酸化信号转导子和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT1)的表达下调<sup>[23]</sup>。提示 miR-155 通过靶向 SOCS1 与 STAT1 调节 Th17 与 Treg 平衡,提高炎症反应,破坏肠道屏障。

## 2.2 炎症因子

MiRNA 可以通过调节炎症因子的水平进而影响肠道屏障功能。Gao 等<sup>[24]</sup>发现 CRC 模型小鼠肠道 miR-155 过度表达,引起 NF- $\kappa$ B 和炎症因子水平升高,肠道屏障损伤。此外,在脓毒症模型小鼠中也发现肠道 miR-155 水平升高,TJs 蛋白表达降低,注射 miR-155 抑制剂后肠道屏障损伤好转,体外实验发现 miR-155 模拟物转染可提高 NF- $\kappa$ B 水平,而抑制剂的作用则相反<sup>[25]</sup>,提示 miR-155 在多种疾病中可以参与炎症因子的调节从而破坏肠道屏障。在 I/R 模型大鼠中,观察到肠道 miR-21 水平升高,肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6 等炎症因子水平升高,肠道通透性增加<sup>[26]</sup>。研究发现 CRC 患者结肠肿瘤组织与血清中 miR-21 的表达与促肿瘤性炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 与 IL-21 的表达呈正相关,敲除小鼠 miR-21 后发现使用氧化偶氮甲烷/葡聚糖酸钠诱导后引起的结肠肿瘤数量明显低于正常小鼠,炎症反应也显著降低<sup>[27]</sup>。

MiRNA 也可下调炎症因子。研究表明,来源于骨髓间充质干细胞的外泌体通过转运 miR-181a 减轻了炎症,降低了 TNF- $\alpha$  等炎症因子的表达,并保护肠道屏障<sup>[28]</sup>。在 IBD 模型中,miR-146b 靶向 Siah2 调控 NF- $\kappa$ B 通路降低肠道炎症,将含有 miR-146b 的表达载体注射到结肠炎模型小鼠腹腔中后发现小鼠肠道屏障功能改善,存活率提高<sup>[29]</sup>。以上研究均表明,在不同的疾病中,miRNA 可能通过调节炎症因子水平参与肠道屏障功能的调控。

## 3 IECs 凋亡

C-myc 是一种诱导 IECs 抗凋亡基因 Bcl-1 表达的转录因子。在 IBD 模型小鼠与患者结肠组织中观察到 miR-150 表达上升,靶向下调 c-myc,诱导 IECs 的凋亡<sup>[30]</sup>。在 I/R 模型小鼠中,使用 miR-155 激动剂会加重炎症反应并加速 IECs 凋亡<sup>[31]</sup>,类似的,抑制 miR-381-3p 可增强 IECs 增殖,调节靶向核受体相关蛋白 1(nuclear receptor-related protein, nurr1),提高小鼠存活率<sup>[32]</sup>。TAGLN2 是一种促进 IECs 凋亡的肌动蛋白结合蛋白,体外实验证实 miR-133a-3p 靶向调控 TAGLN2 促进 IECs 凋亡,损伤肠道屏障<sup>[33]</sup>。Guo 等<sup>[34]</sup>观察到获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)患者肠道 miR-125b-5p 水平升高,丙氨酸丝氨酸半胱氨酸偏转运体(alanine serine cysteine-preferring transporter 2, ASCT2)mRNA 表达水平降低。体外实验发现 miR-125b-5p 可负向调控 ASCT2 并促进 IECs 凋亡。

MiRNA 也可通过抑制 IECs 的凋亡保护肠道屏障。研究证明 miR-200c-3p<sup>[35]</sup>与 miR-374a<sup>[36]</sup>可抑制磷酸酶和张力蛋白同系物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)激活,减少 IECs 凋亡,改善肠道屏障功能障碍。甲基苯丙胺(MA)是一种上调多巴胺水平的精神兴奋剂,过量使用会导致肠道屏障损伤。Shen 等<sup>[37]</sup>观察到 MA 成瘾者的肠道通透性显著高于对照组,体外实验发现 miR-181c 可抑制 IECs 凋亡,保护肠道屏障。此外,miRNA 也可调节 IECs 异常增生。Sun 等<sup>[38]</sup>发现 miR-324-5p 靶向调控 HMGXB3 与 WASF-2 这两种参与细胞骨架重塑的关键蛋白,抑制 IBD 模型小鼠 IECs 不正常的增生,并恢复肠屏障功能。

## 4 氧化应激

氧化应激会引起肠道组织的损伤,是肠道屏障功能异常的重要原因之一。过量乙醇导致诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)异常增多,破坏屏障功能<sup>[39]</sup>。研究发现,敲除酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)模型小鼠 miR-212 可以防止乙醇诱导的肠道通透性增高,而敲除 iNOS 可减少 miR-212 表达,提示 miR-212 通过 iNOS 介导氧化应激,引起肠道屏障的损伤<sup>[40]</sup>。血红素加氧酶 1(heme oxygenase1, HMOX1)是一种具有抗氧

化作用的细胞保护酶, Zhan 等<sup>[41]</sup>发现在脓毒症模型大鼠中 miR-31 靶向调控 HMOX1 引起氧化损伤, 而抑制 miR-31 后, 肠道通透性降低。表明 miRNA 可以通过参与氧化应激过程引起肠道氧化损伤, 造成肠道屏障被破坏。

## 5 讨论

IECs 的增殖与凋亡、免疫细胞的激活与耐受之间保持着微妙的平衡, 这一平衡被打破便会导致肠道稳态被破坏, 进一步导致肠道屏障的损伤。肠道存在着大量微生物, 损伤的肠道屏障可能引起细菌及其产物与细菌内毒素易位, 导致全身感染和炎症。因此, 肠道屏障受损是许多疾病的病因与重要病理特征。MiRNA 可以从不同角度对肠道屏障进行调控。这些作用从对肠道屏障的影响, 可以分为保护肠道屏障与破坏肠道屏障两个方面; 从发挥作用的途径, 可以分为调节结构蛋白、IECs 增殖与凋亡、免疫与炎症、氧化应激等角度; 从疾病分类, 可以分为胃肠道疾病与非胃肠道疾病两种类型。这提示未来 miRNA 可能作为未来多种疾病的诊断标志物, 并可利用 miRNA 模拟物或拮抗物调节肠道屏障功能, 最终实现个性化治疗, 并给相关药物的开发提供参考。

但现有的研究还存在一定的局限性。一是病

种的局限性: 目前大多数研究都集中在肠病, 尤其是 IBD 当中。但上文中提到, 肠道屏障受损是许多疾病的病因与重要病理特征<sup>[42]</sup>, 例如, 脑损伤和脊髓损伤等中枢损伤的情况中, 都观察到肠道屏障损伤的情况, 那么 miRNA 是否在这些疾病中发挥着调节肠屏障的作用, 还需要深入的研究。二是角度的局限性: 现有的研究角度多是从 IECs 凋亡与增殖以及免疫系统的平衡状态入手, 还缺乏更深入的研究。例如, 肥大细胞等除 T 细胞以外的免疫细胞, 也在肠屏障功能的调控中也发挥着重要的作用<sup>[43]</sup>, 肥大细胞与 miRNA 在许多病理过程中又存在密切联系<sup>[44]</sup>, 然而 miRNA 通过肥大细胞调控肠道屏障的研究目前还比较缺乏。除了肠道局部的紊乱以外, 接受各种应激的动物, 也体现出肠道屏障受损的特点, 说明脑-肠轴失衡也在肠道屏障受损过程起到重要作用。脑-肠轴中的关键因子, 如促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotropin releasing factor, CRF) 也被证实参与肠道屏障的调控<sup>[45]</sup>, 而 miRNA 是否在其中发挥作用, 还需要进一步探讨。

综上所述, 在多种病理过程与疾病中, miRNA 参与调控肠道屏障 (图 1)。但目前的研究还比较有限, 存在着病种与研究角度的局限性。因此, 未来的研究可以从不同的角度切入, 深入挖掘 miRNA 在肠道屏障受损的诊断与治疗中的潜在作用。

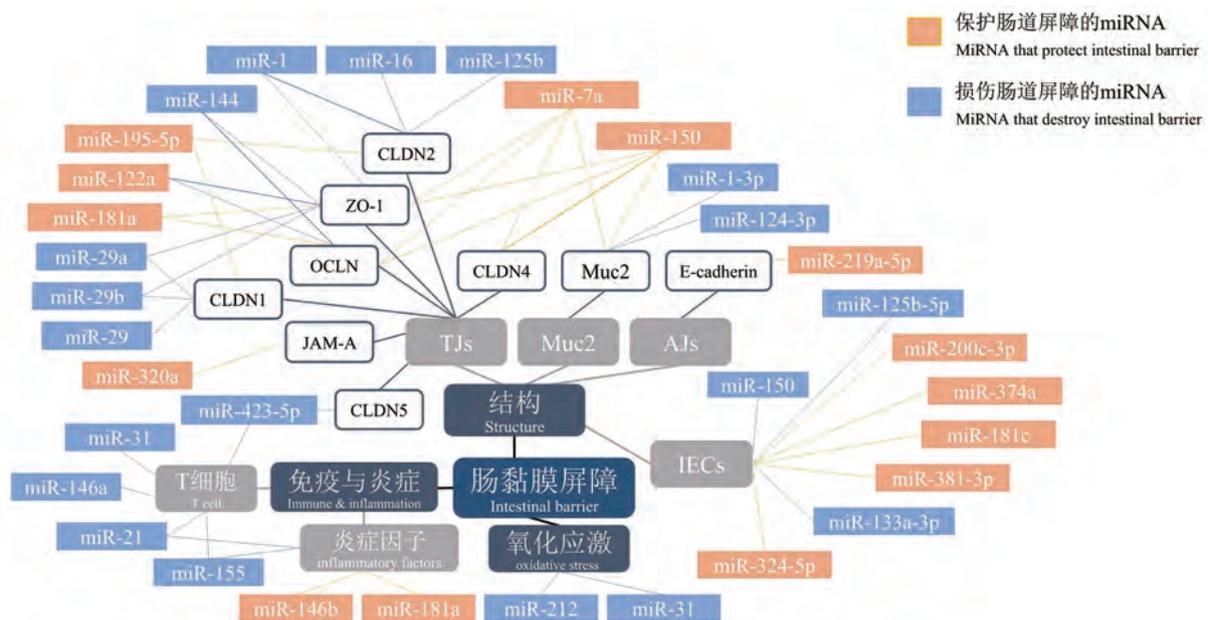


图 1 调控肠道屏障的 miRNA

Figure 1 Mechanism of miRNA regulating intestinal barrier

## 参考文献:

- [ 1 ] Wells JM, Gao Y, Groot ND, et al. Babies, bugs, and barriers: dietary modulation of intestinal barrier function in early life [J]. *Annu Rev Nutr*, 2022, 42: 165–200.
- [ 2 ] 郭文晋, 连帅, 李悦, 等. miRNA 与热应激的关系及检测方法进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(6): 666–669.
- [ 3 ] Tili E, Michaille JJ, Piurowski V, et al. MicroRNAs in intestinal barrier function, inflammatory bowel disease and related cancers-their effects and therapeutic potentials [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 37: 142–150.
- [ 4 ] Cordes F, Brückner M, Lenz P, et al. MicroRNA-320a strengthens intestinal barrier function and follows the course of experimental colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(10): 2341–2355.
- [ 5 ] Zhang B, Tian Y, Jiang P, et al. MicroRNA-122a regulates zonulin by targeting EGFR in intestinal epithelial dysfunction [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(2): 848–858.
- [ 6 ] Rawat M, Nighot M, Al-Sadi R, et al. IL1B increases intestinal tight junction permeability by up-regulation of miR200c-3p, which degrades occludin mRNA [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(4): 1375–1389.
- [ 7 ] Scalavino V, Piccinno E, Bianco G, et al. The increase of miR-195-5p reduces intestinal permeability in ulcerative colitis, modulating tight junctions' expression [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5840.
- [ 8 ] Xiong Y, Wang J, Chu H, et al. Salvianolic acid B restored impaired barrier function via downregulation of MLCK by microRNA-1 in rat colitis model [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 134.
- [ 9 ] Hou Q, Huang Y, Zhu S, et al. MiR-144 increases intestinal permeability in IBS-D rats by targeting OCLN and ZO1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2256–2268.
- [ 10 ] Zhou Q, Costinean S, Croce CM, et al. MicroRNA 29 targets nuclear factor- $\kappa$ B-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 158–169.
- [ 11 ] Zhu H, Xiao X, Shi Y, et al. Inhibition of miRNA-29a regulates intestinal barrier function in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome by upregulating ZO-1 and CLDN1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 155.
- [ 12 ] Martínez C, Rodiño-Janeiro BK, Lobo B, et al. MiR-16 and miR-125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin-2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea [J]. *Gut*, 2017, 66(9): 1537–1538.
- [ 13 ] Zhu Y, Wang W, Yuan T, et al. MicroRNA-29a mediates the impairment of intestinal epithelial integrity induced by intrauterine growth restriction in pig [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(5): G434–G442.
- [ 14 ] Mahurkar-Joshi S, Rankin CR, Videlock EJ, et al. The colonic mucosal microRNAs, microRNA-219a-5p, and microRNA-338-3p are downregulated in irritable bowel syndrome and are associated with barrier function and MAPK signaling [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(7): 2409–2422.
- [ 15 ] Buonpane C, Yuan C, Wood D, et al. ROCK1 inhibitor stabilizes E-cadherin and improves barrier function in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(4): G781–G792.
- [ 16 ] Liu Z, Li C, Chen S, et al. MicroRNA-21 increases the expression level of occludin through regulating ROCK1 in prevention of intestinal barrier dysfunction [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4545–4554.
- [ 17 ] Sun T, Li Y, Zhao F, et al. MiR-1-3p and miR-124-3p synergistically damage the intestinal barrier in the aging colon [J]. *J Crohns Colitis*, 2021, 16(4): 656–667.
- [ 18 ] Morris NL, Cannon AR, Li X, et al. Protective effects of PX478 on gut barrier in a mouse model of ethanol and burn injury [J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(6): 1121–1130.
- [ 19 ] Wang M, Guo J, Zhao Y, et al. IL-21 mediates microRNA-423-5p/claudin-5 signal pathway and intestinal barrier function in inflammatory bowel disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(16): 16099–16110.
- [ 20 ] Whiteoak SR, Claridge A, Balendran CA, et al. MicroRNA-31 targets thymic stromal lymphopoietin in mucosal infiltrated CD4<sup>+</sup> T cells: a role in achieving mucosal healing in ulcerative colitis? [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(11): 2377–2385.
- [ 21 ] Runtsch MC, Hu R, Alexander M, et al. MicroRNA-146a constrains multiple parameters of intestinal immunity and increases susceptibility to DSS colitis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 28556–28572.
- [ 22 ] 赵彩红, 田志颖, 张丽贤, 等. 乙型肝炎肝硬化患者中微小 RNA-21、Th9 的表达及其对肠道屏障功能调控机制的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(8): 1204–1207.
- [ 23 ] Wang D, Tang M, Zong P, et al. MiRNA-155 regulates the Th17/Treg ratio by targeting SOCS1 in severe acute pancreatitis [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 686.
- [ 24 ] Gao Y, Han T, Han C, et al. Propofol regulates the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway through miRNA-155 to protect colorectal cancer intestinal barrier [J]. *Inflammation*, 2021, 44(5): 2078–2090.
- [ 25 ] Cao Y, Wang Z, Wang Z, et al. Inhibition of miR-155 alleviates sepsis-induced inflammation and intestinal barrier dysfunction by inactivating NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107218.
- [ 26 ] Zhang L, Zhang F, He D, et al. MicroRNA-21 is upregulated during intestinal barrier dysfunction induced by ischemia reperfusion [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(10): 556–563.
- [ 27 ] 石忧长. 微小 RNA-21 调控肠道屏障功能及炎症相关性结肠癌的机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [ 28 ] Gu L, Ren F, Fang X, et al. Exosomal microRNA-181a derived from mesenchymal stem cells improves gut microbiota

- composition, barrier function, and inflammatory status in an experimental colitis model [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 660614.
- [29] Nata T, Fujiya M, Ueno N, et al. MicroRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating nuclear factor- $\kappa$ B and improving epithelial barrier function [J]. *J Gene Med*, 2013, 15(6-7): 249-260.
- [30] 卞楨. 炎症状态下 IL-17A 介导的中性粒细胞迁移能力增强及 miR-150 介导的结肠上皮细胞损伤在小鼠和人溃疡性结肠炎中的作用 [D]. 南京: 南京大学, 2012.
- [31] Zhang X, Guan S, Zhang H, et al. Activation of PD-1 protects intestinal immune defense through IL-10/miR-155 pathway after intestinal ischemia reperfusion [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(12): 3307-3316.
- [32] Liu L, Yao J, Li Z, et al. MiR-381-3p knockdown improves intestinal epithelial proliferation and barrier function after intestinal ischemia/reperfusion injury by targeting nurr1 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 411.
- [33] Tian X, Li L, Fu G, et al. MiR-133a-3p regulates the proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells by modulating the expression of TAGLN2 [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 824.
- [34] Guo H, Gao J, Qian Y, et al. MiR-125b-5p inhibits cell proliferation by targeting ASCT2 and regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway in an LPS-induced intestinal mucosa cell injury model [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 838.
- [35] He S, Guo Y, Zhao J, et al. Ferulic acid ameliorates lipopolysaccharide-induced barrier dysfunction via microRNA-200c-3p-mediated activation of PI3K/AKT pathway in Caco-2 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 376.
- [36] Xiong Y, Qiu J, Li C, et al. Fortunellin-induced modulation of phosphatase and tensin homolog by microRNA-374a decreases inflammation and maintains intestinal barrier function in colitis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 376.
- [37] Shen S, Zhao J, Dai Y, et al. Methamphetamine-induced alterations in intestinal mucosal barrier function occur via the microRNA-181c/TNF- $\alpha$ /tight junction axis [J]. *Toxicol Lett*, 2020, 321: 73-82.
- [38] Sun LN, Xing C, Zhi Z, et al. Dicer suppresses cytoskeleton remodeling and tumorigenesis of colorectal epithelium by miR-324-5p mediated suppression of HMGXB3 and WASF-2 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 55776-55789.
- [39] Landmann M, Sellmann C, Engstler AJ, et al. Hops (*humulus lupulus*) content in beer modulates effects of beer on the liver after acute ingestion in female mice [J]. *Alcohol Alcohol*, 2017, 52(1): 48-55.
- [40] Tang Y, Zhang L, Forsyth CB, et al. The role of miR-212 and iNOS in alcohol-induced intestinal barrier dysfunction and steatohepatitis [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2015, 39(9): 1632-1641.
- [41] Zhan C, Chen D, Luo J, et al. Protective role of down-regulated microRNA-31 on intestinal barrier dysfunction through inhibition of NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway by binding to HMOX1 in rats with sepsis [J]. *Mol Med*, 2018, 24(1): 55.
- [42] 王丽, 吉喆, 董丽, 等. 姜黄素和/或有氧运动对血脂紊乱大鼠肠道机能的调节作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(2): 208-215.
- [43] Kamphuis JBJ, Reber L, Eutamène H, et al. Increased fermentable carbohydrate intake alters colonic mucus barrier function through glycation processes and increased mast cell counts [J]. *FASEB J*, 2022, 36(5): e22297.
- [44] Maltby S, Plank M, Ptaschinski C, et al. MicroRNA function in mast cell biology: protocols to characterize and modulate microRNA expression [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 12(20): 287-304.
- [45] Guilarte M, Vicario M, Martínez C, et al. Peripheral corticotropin-releasing factor triggers jejunal mast cell activation and abdominal pain in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115(12): 2047-2059.

[收稿日期] 2022-04-18

赵莎,雷璇,熊佳敏,等.阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与炎症相关性研究进展[J].中国比较医学杂志,2022,32(11):101-106.

Zhao S, Lei X, Xiong JM, et al. Research progress on the correlation between obstructive sleep apnea syndrome and inflammation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 101-106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.013

# 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与炎症相关性研究进展

赵莎<sup>1,2</sup>,雷璇<sup>1,3</sup>,熊佳敏<sup>1,3</sup>,杨树龙<sup>4,5</sup>,洪芬芳<sup>1\*</sup>

(1.南昌大学基础医学院病原生物学实验中心,南昌 330006;2.南昌大学第二临床医学院,南昌 330006;  
3.南昌大学公共卫生学院,南昌 330006;4.南昌大学抚州医学院生理学教研室,江西抚州 344000;  
5.南昌大学抚州医学院慢性病研究重点实验室,江西抚州 344000)

**【摘要】** 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)作为一种睡眠呼吸紊乱的慢性疾病,以睡眠时出现反复上气道的部分或完全塌陷,临床表现为睡眠片段化、严重打鼾和白天嗜睡。由于其发病率较高,常常影响患者生活质量和生存率,正被越来越多的人所重视。最近许多研究表明,OSAS的特征是炎症反应,炎症相关因子水平的变化也提示OSAS合并心血管疾病的可能性。共同的危险因素的存在,以及一些共同的致病途径,证明了OSAS与炎症之间的潜在关系。因此,本研究的目的是综述OSAS与炎症相关性研究进展,有利于我们更好地了解OSAS的发病机制。

**【关键词】** 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征;炎症;发病机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)09-0101-06

## Research progress on the correlation between obstructive sleep apnea syndrome and inflammation

ZHAO Sha<sup>1,2</sup>, LEI Xuan<sup>1,3</sup>, XIONG Jiamin<sup>1,3</sup>, YANG Shulong<sup>4,5</sup>, HONG Fenfang<sup>1\*</sup>

(1. Pathogen Biology Experimental Center, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China. 2. the Second Clinical Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006. 3. Public Health of Nanchang University, Nanchang 330006.  
4. Department of Physiology Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000. 5. Key Research Laboratory of Chronic Disease, Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344000)

**【Abstract】** Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a chronic disease of sleep-disordered breathing characterized by repeated collapse of part or all of the upper respiratory tract during sleep. Its clinical manifestations include fragmentation of sleeping, severe snoring, and excessive daytime sleepiness. Because of its high incidence and ability to affect the quality of life and survival rate of patients, increasingly more people have been attaching clinical importance to OSAS. Many recent studies have shown that OSAS is characterized by inflammation, and changes in the levels of inflammatory-related factors suggest the possibility that OSAS is complicated by cardiovascular disease. The potential relationship between OSAS and inflammation is demonstrated by the presence of common risk factors between the two conditions as well as several common pathogenicity approaches. Therefore, this study was performed to summarize the research progress on the correlation between OSAS and inflammation and thus increase our understanding of the pathogenesis of OSAS.

**【Keywords】** obstructive sleep apnea syndrome; inflammation; pathogenesis

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81660151,81660751,82060661);江西省科学自然科学基金(0212BAB206092);南昌大学科研训练项目(4363)。

**【作者简介】** 赵莎(2000—),女,在读本科生,研究方向:炎症与心血管疾病机制研究。E-mail:zhaosha8@163.com

**【通信作者】** 洪芬芳(1974—),女,高级实验师,研究方向:肝缺血损伤病理与药理和心血管生理学。E-mail: hongfenfang@126.com

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSAS) 是一种夜间高发的临床综合征。通过 PubMed、Web of Science 等网站查阅大量文献了解, OSAS 常因上呼吸道塌陷、狭窄, 而发生呼吸暂停、慢性间歇性低氧血症、睡眠结构紊乱等一系列病理生理改变。患者夜间主要表现为打鼾、呼吸暂停、夜间醒来、多动、夜尿症、睡眠行为异常, 而白天主要表现为嗜睡、认知障碍、头痛、头晕、人格改变、警惕性下降、性功能下降等。重症 OSAS 会引发一系列的并发症, 比如, 增加全身高血压、肺血管疾病、心脑血管疾病、冠心病、中风、充血性心力衰竭和心律失常的心脑血管疾病风险。近年来还报道了其他系统相关疾病, 引起 2 型糖尿病、青光眼、眼睑松弛综合征等并发症<sup>[1]</sup>。OSAS 的治疗包括一般治疗 (控制体重、改变睡眠姿势、戒烟和饮酒等等)、病因治疗、无创伤气道正压 (noninvasive positive pressure ventilation, NIPPV)、口腔矫治和手术治疗。

## 1 OSAS 与炎症的相关性

而有实验室数据表明, OSAS 的特征是炎症反应<sup>[2]</sup>。全身炎症也是引起心血管疾病并发症的关键机制之一, 全身炎症引起的高凝状态, 血小板过度激活都是引起心血管疾病的高风险因素。炎症相关因子水平的变化也提示 OSAS 合并心血管疾病的可能性<sup>[3]</sup>, 氧化应激、内皮功能障碍和代谢综合征均与 OSAS 有关。可见, OSAS 与炎症某种程度相关, 其分子机制有待进一步研究, 可为 OSAS 及其并发症的治疗和预后提供新的方向和思路, 现就 OSAS 与炎症的相关性予以综述。

## 2 OSAS 潜在的炎症生物标志物

### 2.1 YKL-40

YKL-40 是由血管平滑肌、中性粒细胞、巨噬细胞分泌得到的被称为几丁质酶样蛋白, 与多种炎症疾病如类风湿性关节炎、哮喘、阻塞性肺疾病和各种癌症等有关。实验得出, 轻中度的 OSAS 患者血清 YKL-40 与呼吸暂停低通气指数 (apnea/hypopnea index, AHI) 相关, 而重度 OSAS 患者血清 YKL-40 则与总低通气时间、年龄相关<sup>[4]</sup>, 所以 YKL-40 可以作为全身性生物信息标志物可以预测 OSAS 合并炎症的发生<sup>[5-6]</sup>。颈动脉内膜中层厚度作为早期动脉

粥样硬化的标志, 在 OSAS 患者中, 实验显示血清中的 YKL-40 水平升高, 提示 YKL-40 可能是颈动脉内膜中层的独立危险预测因子, 预兆心血管疾病的发生<sup>[7]</sup>。研究表明, 与对照组相比轻、中及重度患者的 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 更高, 并且随着病情的严重程度升高而增加, 提示高水平的 YKL-40 与 OSAS 患者的严重程度相关, 可能作为 OSAS 疾病预测的非特异性生物标志物<sup>[8]</sup>。

### 2.2 NLR

白细胞计数和中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil to lymphocyte ratio, NLR) 都是反映炎症的有力标志物, 然而 NLR 比白细胞计数更精确, 通过淋巴细胞和中性粒细胞两种炎症介质来反映 OSAS 的全身炎症反应情况。淋巴细胞参与炎症反应的调节和趋化因子的分泌, 中性粒细胞参与大多数炎症反应的发生发展同时与心血管疾病发生有关。而最近有研究人员发现, 在 OSAS 患者中, 并发心血管疾病的患者 NLR 高于没有心血管疾病的患者, 进而表明 NLR 是 OSAS 患者心血管疾病的独立预测因子<sup>[9]</sup>。一项研究证实了 OSAS 患者的炎症反应可导致 NLR 的增加, 随着疾病严重程度增加和缺氧时间的延长, 炎症指标也随之增加, 这些指标可以帮助评估 OSAS 患者炎症反应的严重程度<sup>[10]</sup>。在一研究中发现患有严重 OSAS 的老年男性中, 全身性炎症严重程度的增加即 NLR 水平的升高, 同时也发现炎症因子与不良血管事件的发生有关, 可能作为 OSAS 疾病及其并发症发生发展的预测指标<sup>[11]</sup>。由于 NLR 简便易测, 并且廉价, 值得在临床上推广, 但不能代替多导睡眠监测, 且对于治疗前后 NLR 水平的变化, 还需要进一步探讨<sup>[12]</sup>。

### 2.3 海普西丁与 IL-6

海普西丁作为一种由肝产生的肽类激素, 在肥胖患者中, 海普西丁的表达增强, 而肥胖是 OSAS 患者的危险因素, 这表明海普西丁可能通过在肥胖和 OSAS 之间起联系作用而参与 OSAS 的发病。然而, 其确切的机制还有待于进一步的研究<sup>[13]</sup>。IL-6 是炎症的重要调节因子, 能够促进中性粒细胞的募集、内皮损伤和组织破坏等。IL-6 还与肥胖水平呈正相关, 能促进肥胖<sup>[14]</sup>。不仅如此, IL-6 的基因多态性也被认为参与肥胖和 OSAS 的发病机制。有研究使用单倍型标记单核苷酸多态性方法, 在 IL-6 启动子区鉴定了 rs1800796 (-572C/G) 的 G 等位基因,

该等位基因与非肥胖 OSAS 发生风险的降低有关,并且在非肥胖个体中,IL-6-572G/C 多态性的 C 变体的携带者中,睡眠呼吸障碍的严重程度线性增加<sup>[15]</sup>。这两者在肥胖高危因素的存在情况下,与 OSAS 发生发展有着密切的联系,同时可以作为指导肥胖患者 OSAS 的预测风险指标。

## 2.4 CRP 与 IL-23

在有关儿童 OSAS 的研究中,发现 CRP、IL-17 和 IL-23 的水平显著升高,尤其是 IL-23 会对神经认知测试有显著的影响,引起相关并发症<sup>[16]</sup>。由于伴有睡眠呼吸紊乱的儿童 CRP 的值升高,提示与 AHI,血氧饱和度(SaO<sub>2</sub>)和觉醒指数有关,可能会导致儿童出现认知,行为疾病和心血管疾病等并发症<sup>[17]</sup>。OSAS 患者 CRP 水平的升高与 AHI 呈正相关,同时 OSAS 患者易并发心血管疾病的风险可以用 CRP 解释。根据某一随机对照研究的分析显示,持续的正压通气(continuous positive airway pressure, CPAP)可以显著降低 AHI,但不会显著改变血浆炎症因子水平。在成年人中,促炎因子水平与体重指数,尤其是内脏肥胖呈正相关。研究显示身体组成的性别差异在青春期开始显现,青春期男孩比女孩有更多的内脏脂肪,成年男性的内脏脂肪至少是女性的 2 倍,男孩的腰臀比更大,男孩从童年到青春期腰围的纵向增加与 CRP 和后续 CRP 升高相关,表明来自内脏脂肪组织的炎症先于疾病的发展<sup>[18-20]</sup>。炎症因子的水平的变化与 OSAS 的发展严重程度有着明显的关系,但是具体分子机制以及特异性的生物标志物还待进一步研究。

## 3 炎症与 OSAS 并发症

炎症因子不仅与 OSAS 疾病发展的严重程度密切相关,同时也对 OSAS 疾病相关并发症起重要作用,对于并发症的研究探讨,更深入了解炎症与 OSAS 的共同发病机制,从而指导疾病的治疗与预后。

### 3.1 高血压

许多研究表明,OSAS 的严重程度与血压的升高有直接的联系,可能与慢性间歇性缺氧、血小板活化、全身炎症等机制有关,其中炎症的标志物水平的改变提示高血压的发生,血小板与淋巴细胞比(platelet to lymphocyte ratio, PLR)的升高与 OSAS 的严重程度成正相关,同时也可以作为 OSAS 患者合并高血压的炎症标志物<sup>[21]</sup>。OSAS 患者血清  $\gamma$ -谷

氨酰转移酶( $\gamma$ -glutamyl transferase, GGT)升高也与合并高血压密切相关,GGT 也可以作为 OSAS 严重程度的分级指标<sup>[22]</sup>。同时,GGT 也是 OSAS 心血管疾病的独立预测因子<sup>[23]</sup>。

### 3.2 心血管疾病

#### 3.2.1 炎症增加 OSAS 患者合并心血管发病率

OSAS 患者由于慢性间歇性的低氧血症而更易患有心血管疾病,其中可能由于交感神经过度激活、血管炎症、氧化应激、代谢紊乱和血管运动反应性受损等机制而引起的心血管疾病。相关持续性通气治疗虽不能治疗 OSAS 患者并发心血管疾病,但是对于预防并发症的发生有很大价值<sup>[24]</sup>。检测 OSAS 患者血清乙酰肝素酶水平,发现乙酰肝素酶随着 OSAS 患者的严重程度而递增,而测量血流介导的扩张(flow-mediated vasodilatation, FMD)则随 OSAS 患者的严重程度递减,FMD 作为内皮功能的指标,同时血清乙酰肝素酶又是 FMD 的独立预测因子,提示 OSAS 患者血清乙酰肝素酶的水平升高可能与并发心血管疾病风险升高有关<sup>[25]</sup>。实验发现,OSAS 患者有较高的房性早搏发生率,其严重程度与左心房内径和血清 C 反应蛋白有关,由于 C 反应蛋白参与的炎症可能构成 OSAS 合并房性早搏患者的心房重构和电重构的危险性增高,因此早期应用 24 h 动态心电图监测 OSAS 患者房性早搏的发生以及测定左房大小对降低心血管发病率具有显著意义<sup>[26]</sup>。

#### 3.2.2 Lp-PLA2 和 Fractalkine

脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)是一种蛋白,它具有促进炎症发生和产生动脉粥样硬化的产物的功能。因此,若血液中 Lp-PLA2 水平升高,则会引发血管炎症,心血管疾病的患病风险也大大增加,有研究表明 OSAS 患者合并代谢综合征的 Lp-PLA2 水平明显高于无代谢综合征,心脏功能障碍发生率也明显升高,Lp-PLA2 的水平高低可以作为代谢综合征(the metabolic syndrome, METS)和 OSAS 患者心脏代谢功能障碍的血管炎症标志物<sup>[27]</sup>。Fractalkine 是一种趋化因子,具有黏附性和趋化性,也是动脉粥样硬化的相关标志物。实验表明其水平与 OSAS 密切相关。因此,fractalkine 水平升高是 OSAS 患者动脉粥样硬化导致心血管疾病的危险因素<sup>[28]</sup>。

#### 3.2.3 胱抑素 C 与 Galectin-3

胱抑素 C(cyst C)是一种半胱氨酸蛋白酶抑制

剂,由肾小球自由过滤,胱抑素 C 水平的改变与肾损害相关,同时实验证明,在无并发症的患者中,潜在的胱抑素 C 水平的升高增加肾损害和心血管疾病的风险<sup>[29]</sup>。Galectin-3 是  $\beta$  一半乳糖苷酶结合凝集素家族的一种,与炎症、心脏纤维化和心脏重构等有关,增加动脉粥样硬化风险,也与 OSAS 患者的严重程度相关<sup>[30]</sup>。还有其他实验表明,OSAS 患者的红细胞粘附性和聚集性更强,发生心血管疾病的风险更大<sup>[31]</sup>。

### 3.3 动脉粥样硬化

脂质代谢障碍为动脉粥样硬化的病变基础,累及动脉内膜,中层直至动脉壁增厚变硬,血管腔狭窄,使所供应的组织或器官将缺血或坏死,引发心血管疾病,而 OSAS 患者由于炎症的参与,氧化应激等作用,影响微循环,从而更易引起动脉粥样硬化导致心血管疾病。呼吸暂停低通气指数越高的患者,血清 C 反应蛋白越高,冠状动脉血流储备越低,微循环功能相对改变,而引发心血管疾病,提示在动脉粥样硬化中,OSAS 与微循环功能密切相关<sup>[32]</sup>。重度 OSAS 患者的 IL-6、C 反应蛋白、总胆固醇、甘油三酯等高于对照组,而 FMD 低于对照组,这些危险因素都与颈动脉内中膜厚度显著相关,提示动脉内皮损伤和炎症可能在 OSAS 患者的动脉粥样硬化发生发展中起作用<sup>[33]</sup>。自我诊断的睡眠呼吸暂停与外周动脉疾病的发生发展有一定关系,患外周动脉疾病(peripheral artery disease, PAD) 的风险更高,虽然种族/民族之间没有什么交互作用,但是证据表明与客观测量黑人睡眠呼吸暂停和横断性 PAD 有较强相关性,提示睡眠呼吸障碍是 PAD 的潜在风险,引发心血管疾病的可能<sup>[34]</sup>。

## 4 其他高危因素

### 4.1 性别

女孩的平均 AHI 比男孩低。在世界范围内,男女病人的比例大约为(2~4):1,绝经后女性的患病率明显升高。睡眠呼吸暂停的妇女比无睡眠呼吸暂停的妇女有更高水平的炎症标志物<sup>[35]</sup>。在女性中,阻塞性睡眠呼吸暂停与快速眼动(rapid eye movement, REM)睡眠时 AHI 升高相关。此外,某研究结果显示绝经是阻塞性睡眠呼吸暂停妇女 REM 睡眠期间 AHI 和 TNF- $\alpha$  水平升高的主要原因。可能雌性激素在通气化学反应和上呼吸道肌肉扩张中发挥重要作用。与绝经前女性相比,绝经后女性

AHI 更高,平均 SaO<sub>2</sub> 更低,除了 TNF- $\alpha$  水平升高外,REM 睡眠潜伏期更长,REM 睡眠时 AHI 更高。在 OSAS 女性中,绝经后女性的腰围、炎症指标和血脂水平高于绝经前女性。OSAS 严重程度与女性的高敏感性肌钙蛋白 T 水平显著相关,但与男性无关。持续气道正压治疗后,男性患者的 TNF- $\alpha$  均下降。然而,在接受持续气道正压治疗的妇女中没有观察到变化。患有 OSAS 的男性由于中枢事件而出现较高的 AHI,较低的深度睡眠和较短的睡眠起病潜伏期,这与瘦素水平升高有关。AHI 与瘦素水平直接相关,而低呼吸指数是 TNF- $\alpha$  浓度的预测因子<sup>[36]</sup>。年龄大于 50 岁的女性 CRP 较高,与男性相比,女性在上呼吸道阻塞(upper airway obstruction, UAO)期间需要更大程度的 UAO 才能引起鼾声。在 UAO 期间,女性与男性相比,有更大的上呼吸道和呼吸定时反应和更低的通气需求,严重的睡眠呼吸障碍女性患者的闭合压力明显低于男性患者<sup>[37]</sup>。

### 4.2 高凝状态

OSAS 患者高凝状态的增强可能与血小板有关。作为血小板活化的标志,OSAS 患者的平均血小板体积明显高于对照组,且与疾病的严重程度和炎症反应独立相关<sup>[38]</sup>。有学者利用代谢指纹图技术检测到血小板聚集因子和溶血磷脂的变化模式的变化,认为与 OSAS 患者的严重程度相关,为我们研究更加简便又经济的标志物以及检测手法提供了新的思路<sup>[39]</sup>。血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW)也与 OSAS 的严重程度有关。PDW 越高,OSAS 患者越严重,对 OSAS 患者的分级诊断和治疗具有重要价值<sup>[40]</sup>。

### 4.3 空气污染

长期暴露在高水平的空气污染中会损害肺部的正常免疫防御和气道黏膜,长期的上呼吸道刺激可引起水肿,增加系统炎症的炎性反应微粒,使气道狭窄。慢性阻塞性肺病和哮喘都因为空气污染而恶化。但需要更多研究辨别邻近区域和区域特征性污染物的影响以及降低空气污染水平是否会改善睡眠情况<sup>[41]</sup>。

### 4.4 吸烟

吸烟影响呼吸道黏膜,吸烟时间越长,呼吸道黏膜的病理改变越明显。吸烟也可能是习惯性打鼾的独立危险因素,而且打鼾的频率随着吸烟的数量或吸烟时间的延长而增加。吸烟的 OSAS 患者 AHI 和血氧饱和度下降指数较高,且随着吸烟史的

延长而增高,故吸烟增加了呼吸暂停和低通气发生的频率,降低了睡眠时的血氧饱和度<sup>[42]</sup>。

## 5 总结与展望

OSAS 是一种机制复杂的疾病,炎症可作为危险因素之一,促使阻塞性睡眠呼吸暂停患者并发心血管疾病、代谢性疾病和慢性全身性疾病等。同时性别或环境等其他外在因素也会通过改变全身炎症水平从而引发 OSAS,两者具有明确的相关关系,但是确切机制还不明了。因此这些研究提示我们对于相关炎症因子的分子水平研究,生物标志物的检测等,可以对于 OSAS 的发生机制有进一步的探讨,进而早期实施持续的气道正压通气治疗或是采用其他外科手术,非手术治疗等,而达到早期治疗,预防并发症的目的。虽然多导睡眠监测是诊断 OSAS 的金标准,但探索阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的确切相关生物标志物,同时也可联系其相关基因的调控,观察生物标志物水平高低变化,是提早预防和监测 OSAS 发生发展的分子层面的重要诊断。

### 参考文献:

- [ 1 ] Vijayan VK. Morbidities associated with obstructive sleep apnea [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2012, 6(5): 557-566.
- [ 2 ] Arter JL, Chi DS, Girish M, et al. Obstructive sleep apnea, inflammation, and cardiopulmonary disease [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2892-2900.
- [ 3 ] Gabryelska A, Lukasiak ZM, Makowska JS, et al. Obstructive sleep apnea: From intermittent hypoxia to cardiovascular complications via blood platelets [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 635.
- [ 4 ] Duru S, Yuce G, Firat H, et al. YKL-40: may be use as a new inflammatory biomarker in obstructive sleep apnea syndrome? [J]. *Tuberk Toraks*, 2015, 63(3): 158-164.
- [ 5 ] Mutlu LC, Tülübas F, Alp R, et al. Serum YKL-40 level is correlated with apnea hypopnea index in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(18): 4161-4166.
- [ 6 ] Wang X, Xing GH. Serum YKL-40 concentrations are elevated and correlated with disease severity in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2014, 74(1): 74-78.
- [ 7 ] Bakirci EM, Unver E, Degirmenci H, et al. Serum YKL-40/chitinase 3-like protein 1 level is an independent predictor of atherosclerosis development in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Turk Kardiyol Dern Ars*, 2015, 43(4): 333-339.
- [ 8 ] Li W, Yu Z, Jiang C. Association of serum YKL-40 with the presence and severity of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Lab Med*, 2014, 45(3): 220-225.
- [ 9 ] Uygur F, Tanriverdi H, Aktop Z, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with obstructive sleep apnoea syndrome and its relationship with cardiovascular disease [J]. *Heart Lung*, 2016, 45(2): 121-125.
- [ 10 ] Oyama J, Nagatomo D, Yoshioka G, et al. The relationship between neutrophil to lymphocyte ratio, endothelial function, and severity in patients with obstructive sleep apnea [J]. *J Cardiol*, 2016, 67(3): 295-302.
- [ 11 ] Friedlander AH, Bostrom KI, Tran HA, et al. Severe sleep apnea associated with increased systemic inflammation and decreased serum bilirubin [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 77(11): 2318-2323.
- [ 12 ] 牟嘉砾, 沈蓓. NLR、PLR 与儿童 OSAHS 的相关性研究 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 31(22): 1732-1734, 1739.
- [ 13 ] Liu Y, Yu Z, Hua D, et al. Association of serum hepcidin levels with the presence and severity of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 27-31.
- [ 14 ] Imagawa S, Yamaguchi Y, Ogawa K, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome [J]. *Respiration*, 2004, 71(1): 24-29.
- [ 15 ] Zhang X, Liu RY, Lei Z, et al. Genetic variants in interleukin-6 modified risk of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(4): 485-493.
- [ 16 ] Huang YS, Guilleminault C, Hwang FM, et al. Inflammatory cytokines in pediatric obstructive sleep apnea [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(41): e4944.
- [ 17 ] Tauman R, Ivanenko A, O'brien LM, et al. Plasma C-reactive protein levels among children with sleep-disordered breathing [J]. *Pediatrics*, 2004, 113(6): 564-569.
- [ 18 ] Gaines J, Vgontzas AN, Fernandez-Mendoza J, et al. Increased inflammation from childhood to adolescence predicts sleep apnea in boys: A preliminary study [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64: 259-265.
- [ 19 ] Sarinc Ulasli S, Sariaydin M, Gunay E, et al. Effects of nondipping pattern on systemic inflammation in obstructive sleep apnea [J]. *Sleep Breath*, 2015, 19(4): 1185-1190.
- [ 20 ] Andaku DK, D'almeida V, Carneiro G, et al. Sleepiness, inflammation and oxidative stress markers in middle-aged males with obstructive sleep apnea without metabolic syndrome: A cross-sectional study [J]. *Respir Res*, 2015, 16: 3.
- [ 21 ] Song YJ, Kwon JH, Kim JY, et al. The platelet-to-lymphocyte ratio reflects the severity of obstructive sleep apnea syndrome and concurrent hypertension [J]. *Clin Hypertens*, 2015, 22: 1.
- [ 22 ] Bozkus F, Dikmen N, Demir LS. Gamma-glutamyl transferase activity as a predictive marker for severity of obstructive sleep apnea syndrome and concomitant hypertension [J]. *Clin Respir J*, 2018, 12(5): 1964-1973.
- [ 23 ] Kanbay A, Kaya E, Buyukoglan H, et al. Serum  $\gamma$ -glutamyl transferase activity is an independent predictor for cardiovascular

- disease in obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Respir Med*, 2011, 105(4): 637-642.
- [24] Destors M, Tamisier R, Baguet JP, et al. Cardiovascular morbidity associated with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Rev Mal Respir*, 2014, 31(4): 375-385.
- [25] Ozkok A, Ozkok S, Takir M, et al. Serum heparanase levels are associated with endothelial dysfunction in patients with obstructive sleep apnea [J]. *Clin Respir J*, 2018, 12(4): 1693-1699.
- [26] Kaviraj B, 白书昌, 苏亮, 等. 睡眠呼吸暂停综合症对 C-反应蛋白、左房及房性早搏的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(2): 197-200.
- [27] Moise LG, Marta DS, Rascu A, et al. Serum lipoprotein-associated phospholipase A2 in males with metabolic syndrome and obstructive sleep apnea [J]. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 2018, 14(1): 36-42.
- [28] Wang Y, Li Y, Chen P, et al. Elevated fractalkine in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Sleep Breath*, 2013, 17(1): 203-208.
- [29] Archontogeorgis K, Nena E, Tsigalou C, et al. Cystatin C levels in middle-aged patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Pulm Med*, 2016, 2016: 8081723.
- [30] Pusuroglu H, Somuncu U, Bolat I, et al. Galectin-3 is associated with coronary plaque burden and obstructive sleep apnoea syndrome severity [J]. *Kardiol Pol*, 2017, 75(4): 351-359.
- [31] Peled N, Kassirer M, Kramer MR, et al. Increased erythrocyte adhesiveness and aggregation in obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Thromb Res*, 2008, 121(5): 631-636.
- [32] Wang N, Li SB, Zhao LS, et al. Relationship between obstructive sleep apnea and coronary microcirculatory function among patients with cardiac syndrome X [J]. *Coron Artery Dis*, 2014, 25(1): 35-39.
- [33] Kong D, Qin Z, Wang W, et al. Effect of obstructive sleep apnea on carotid artery intima media thickness related to inflammation [J]. *Clin Invest Med*, 2017, 40(1): E25-E33.
- [34] Nagayoshi M, Lutsey PL, Benkeser D, et al. Association of sleep apnea and sleep duration with peripheral artery disease: The multi-ethnic study of atherosclerosis (mesa) [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 251: 467-475.
- [35] Svensson M, Venge P, Janson C, et al. Relationship between sleep-disordered breathing and markers of systemic inflammation in women from the general population [J]. *J Sleep Res*, 2012, 21(2): 147-154.
- [36] Hirotsu C, Albuquerque RG, Nogueira H, et al. The relationship between sleep apnea, metabolic dysfunction and inflammation: the gender influence [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 59: 211-218.
- [37] Gouveris H, Bahr K, Jahn C, et al. The apnea-hypopnea index underestimates systemic inflammation in women with sleep-disordered breathing [J]. *J Womens Health (Larchmt)*, 2018, 27(7): 920-926.
- [38] Akyol S, Çörtük M, Baykan AO, et al. Mean platelet volume is associated with disease severity in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Clinics*, 2015, 70(7): 481-485.
- [39] Ferrarini A, Ruperez FJ, Erazo M, et al. Fingerprinting-based metabolomic approach with LC-MS to sleep apnea and hypopnea syndrome: a pilot study [J]. *Electrophoresis*, 2013, 34(19): 2873-2881.
- [40] Kurt OK, Yildiz N. The importance of laboratory parameters in patients with obstructive sleep apnea syndrome [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013, 24(4): 371-374.
- [41] Billings ME, Gold D, Szpiro A, et al. The association of ambient air pollution with sleep apnea: the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2019, 16(3): 363-370.
- [42] Kim KS, Kim JH, Park SY, et al. Smoking induces oropharyngeal narrowing and increases the severity of obstructive sleep apnea syndrome [J]. *J Clin Sleep Med*, 2012, 8(4): 367-374.

[收稿日期]2022-02-11

苏达,高利红. 实验动物伦理新原则的框架分析与我国相关立法发展方向 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 107-112.  
Su D, Gao LH. Analysis of the framework of new principles of laboratory animal ethics and the direction of relevant legislative development in China [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 107-112.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.014

# 实验动物伦理新原则的框架分析与我国 相关立法发展方向

苏 达,高利红\*

(中南财经政法大学,武汉 430000)

**【摘要】** 实验动物研究的3R原则发布数十年来,得到了世界范围内的普遍承认与适用,但其本身存在着一定缺陷,不能系统地保护实验动物福利,节约社会成本,创造社会效益。2020年,动物伦理研究的6项新原则被提出,通过“社会效益”三大原则与“动物福利”三大原则的构成,对3R原则进行了批判继承,在提高动物实验科学性要求的基础上,融入了丰富的道德考量。基于实验动物伦理新原则的框架分析,结合我国实验动物立法的现状,能够探索在新原则视角下未来我国实验动物立法的发展方向。

**【关键词】** 实验动物;3R原则;实验动物伦理;实验动物立法

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0107-06

## Analysis of the framework of new principles of laboratory animal ethics and the direction of relevant legislative development in China

SU Da, GAO Lihong\*

(Zhongnan University of Economics and Law, Wuhan 430000, China)

**【Abstract】** The 3R principles of laboratory animal research have been universally recognized and applied worldwide for decades, but they are inherently flawed and cannot systematically protect the welfare of laboratory animals, save social costs, or create social benefits. In 2020, new principles of animal ethics research were proposed that inherited the 3R principles, with the composition of three principles of “social benefits” and “animal welfare” This paper analyzes the new principles of animal ethics and proposes a direction for future laboratory animal legislation in China from the perspective of the six new principles.

**【Keywords】** laboratory animal; the 3R principles; laboratory animal ethics; laboratory animal legislation

1959年,Russell WI与Burch RE提出3R原则,确立了动物研究的基本伦理原则,即:替代、减少和优化原则<sup>[1]</sup>。经历数十年发展,3R原则已经在世界学界得到了广泛承认,各国也陆续将其固定到立法文本之中<sup>[2]</sup>。我国2006年科技部颁布的《关于善

待实验动物的指导性意见》确立了3R原则的法律地位,对实验动物的伦理保障与福利改善起到了基石性的作用<sup>[3]</sup>,然而其也存在弊端,主要是3R原则侧重于实验动物研究中科学性的确认,而对于道德性保障则较为模糊<sup>[4]</sup>。实践之中仍存在着对实验

**【基金项目】** 国家社科基金重大项目(20ZDA090);中南财经政法大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(2722021EG004)。

**【作者简介】** 苏达(1995—),男,博士,研究方向:动物法、环境法。E-mail: adada\_574927836@163.com

**【通信作者】** 高利红(1970—),女,教授,法学博士,研究方向:动物法、环境法。E-mail: glhlaw@126.com

动物予以非人道对待的例子,科研成果中实验动物伦理审查比例低的现象也说明了 3R 原则的效用有限<sup>[5]</sup>。2020 年,美国生命伦理学者 Beauchamp TO 和 Degrazia DA 提出关于动物研究伦理的新原则框架,在批判继承 3R 原则的基础上,提出了以“社会效益”(social benefit)和“动物福利”(animal welfare)为主要方面的六大基本原则<sup>[4]</sup>。该六项原则旨在结合道德考量与成本效益,包括风险预防的指导理念,进一步帮助有关研究人员与机构确立有关动物研究的伦理评估指导框架,从而在改善动物境况与利用动物研究之间寻找到平衡点,提供未来动物研究与立法发展的新方向。

## 1 实验动物伦理新原则的基本框架、内容与创新

### 1.1 提出背景:3R 原则的不足

3R 原则的提出是为了解决动物研究者在当时所面临的双重责难:一方面,许多疾病需要动物模型来寻找治疗方案,或者确立病因;一方面,在使用动物进行实验研究时,又无可避免地会对动物造成伤害或者死亡<sup>[6]</sup>。在这种情况下,替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)应需而生。替代原则指的是使用无知觉或者对痛苦感知度较低的实验对象代替活体动物的实验方法;减少原则则是要求在动物实验中尽量减少动物的使用;而优化原则则旨在要求通过各种程序设计、科学优化来避免或者减少对动物的疼痛或不安<sup>[7]</sup>。3R 原则确立了对动物基本的道德福利关怀,承认动物的痛苦感知能力。在其影响下,全球动物实验的动物总数量已经降低了 30% 以上<sup>[8]</sup>。

然而,3R 原则因历史、经济等因素存在一定缺陷。首先,3R 原则在动物的道德关怀上并未完全展开。科学上的正当性并不能必然推导出伦理上的正当性,而 3R 原则欠缺了对这一方面的讨论<sup>[4]</sup>。其次,3R 原则未充分考量动物实验的社会整体成本效益问题,并且完全未提及动物实验自身伴随的人畜共患病等卫生风险漏洞。动物实验是人类攻克许多疾病的主要途径,但现实中存在着许多不必要、或者社会效益甚低的动物实验。而 3R 原则并未对此进行分析,导致建立在该原则上的实验动物伦理审查制度大多流于形式<sup>[9]</sup>。其也并未涉及对已经受到伤害、或者无法通过科学手段来减少实验伤害的动物的保护与处置方法。安乐死成为了处

置它们的唯一手段,其使用前提多为实验动物痛苦程度过高、动物实验失败等<sup>[9]</sup>。

### 1.2 基本框架:六项原则

需要明确的是,新的六项原则的适用对象为人工饲养、圈养的所有动物,而不仅限于实验动物。该六项动物研究基本伦理原则为:无替代手段原则(the principle of no alternative method)、预期净收益原则(the principle of expected net benefit)、伤害合理性原则(the principle of sufficient value to justify harm)、无不必要伤害原则(the principle of no unnecessary harm)、基本需求原则(the principle of basic needs)、伤害上限原则(upper limits to harm)<sup>[4]</sup>。前三项原则属于“社会效益”原则的范围,后三项则属于“动物福利”原则的范围。

无替代手段原则是根本前提,其含义为:使用动物进行实验必须是相关研究在伦理上可接受的唯一方法,并且必须是具有社会利益的研究。即该动物实验研究是现行科学上、伦理上可以实现该研究目的的唯一方法。如果该研究使用人体组织或者计算机模拟模型,又或 3R 之中替代原则的无知觉的实验材料即可的话,就不能将动物作为实验研究对象<sup>[4]</sup>。

预期净收益原则指的是:动物实验的预期社会效益超过了该实验的成本以及相关风险。对此,Beauchamp 与 Degrazia 详细指出动物实验可能造成以下 4 种收益无法覆盖其成本或风险的情况:(1)对实验对象动物的干预手段对动物是安全的,却存在对人类的风险。(2)干预手段对动物有害,但对人类却十分安全。(3)干预手段对动物无效,但对人类却有效。(4)干预手段对动物有效,但对人类无效。(2)、(3)、(4)三种情况都造成了大量的经济成本、人力成本等社会成本。而(1)则直接存在对人类造成伤害、疫病传播的风险<sup>[4]</sup>。

伤害合理性原则指的是,动物实验的预期收益之中必须能够明确证明对动物的伤害是合理且必须的<sup>[4]</sup>。该原则是“社会效益”原则所不可或缺的,无替代手段原则和预期净收益原则仅局限于社会角度,并未涉及动物伦理与道德考量。贯彻该原则的首要表现是在对动物实验的设计与审查文件之中,必须有能够论证预期结果中足以支撑对动物合理伤害的价值理由。

无不必要伤害原则其内涵为:不得随意伤害动物,除非该伤害是科学目的所必需的,并且在道德

上是合理的<sup>[4]</sup>。其指出对动物造成伤害本身便存在道德上对动物的损益,故没有不必要的伤害是更为细致的道德原则的体现。

基本需求原则要求必须满足动物的基本需求。根据“五大自由”,动物有免于饥饿和口渴的自由、免于不适的自由、免于痛苦、伤害或者疾病的自由、表达自然行为的自由、免于恐惧和焦虑的自由<sup>[10]</sup>。五大自由起初主要适用于农场动物,而根据基本需求原则,实验、研究用动物也应当拥有基本需求上的满足。另需关注的为,该原则中提出了“免于过早死亡的自由”,但同时作者也承认其是否属于基本需求存在争议<sup>[4]</sup>。

最具颠覆性的是伤害上限原则,其具体内容为:禁止在实验过程中设计或进行需要动物长期忍受严重痛苦的程序(这种痛苦无法通过麻醉、镇痛剂、环境条件改变等方法改善)<sup>[4]</sup>。该原则为动物实验的执行人、设计者与监管者设置了以量化手段来确定操作标准、痛苦严重程度与持续时间的义务。六项原则考量到了统一的标准难以确立,故进一步提出细化内容,包括:(1)程序、环境条件等对动物造成的伤害的程度分类标准(如轻度、中度、重度);(2)有关人员对相关上限标准及其依据的详细说明;(3)持续性或长期严重伤害的禁止程序和条件清单<sup>[4]</sup>。

### 1.3 综合考量:六项原则对 3R 原则的批判继承

有关学者对 3R 原则的质疑切中了其核心缺陷:“如果我们要通过伤害动物或给它们带来痛苦而获得研究成果,那么我们必需仔细地评估收益与可能的代价(即动物所受的伤害)之间的权重问题。<sup>[8]</sup>”以 3R 原则设计的法定程序确保了动物实验的科学合理性,但却忽视了伦理合理性。六项原则在继承 3R 原则对科学性的要求上,融入了更多伦理道德元素。3R 原则的缺陷在于对“社会效益”中预期净收益和伤害合理性的忽视,同时对于“动物福利”下属的 3 项基本原则未有涉及<sup>[4]</sup>。六项原则明晰了动物实验本身的存在合理性要求。3R 原则更多着眼于实验开始后如何减少或避免动物的痛苦,却未对实验本身是否符合道德伦理进行要求。六项原则中的“社会效益”三原则全面设置了动物实验开展的合理性标准,在逻辑上呈现以下递进关系:动物实验是唯一手段——动物实验的社会效益大于其成本与风险——动物实验中对动物的伤害是合理的。

六项原则为相关实验动物伦理审查提出了更高的要求。实验动物使用和管理委员会(IACUC)是实验动物伦理审查的核心机构。在世界范围内 IACUC 都拥有对实验动物管理最为核心的审查权力,我国的 IACUC 审查制度也已确立<sup>[6]</sup>。实验动物伦理审查制度在现实中面临着审查中未关注实验合理性、动物的伤害程度等问题。有学者于 2009 年从 271 份出版物中针对英国、美国的研究机构中关于活体大鼠、小鼠与非人灵长类动物实验进行收集与分析,结果表明上述范围内只有 13% 的动物实验使用了正确的随机实验法,这意味着许多动物实验结果不具有科学效力<sup>[11]</sup>。而新原则提出的“社会效益”三原则需要 IACUC 对动物实验的可重复性、有效性进行系统性审查,这将有助于 IACUC 的审查从形式向实质深入。

六项原则要求界定对动物的合理伤害上限。世界范围内的实验动物伦理审查(包括政府型审查或 IACUC 的审查)均未要求列明对动物伤害的合理上限临界点,以及对超过合理伤害上限的预定的处理措施。在六项原则下,即使一项动物实验满足了社会效益、动物福利的基本要求,但如果不符合伤害上限原则也无法被批准。

## 2 我国实验动物立法现状与伦理原则实施现状

### 2.1 我国实验动物立法现状

1982 年的全国实验动物大会被认为是我国实验动物行业的开端<sup>[12]</sup>,目前我国已经基本形成了实验动物立法体系,包括确立对待实验动物以福利要求的《实验动物管理条例》(以下简称《条例》)、确立 3R 原则的《关于善待实验动物的指导性意见》,2021 年 4 月出台的《生物安全法》也将实验动物纳入了生物安全管理范围。通过“北大法宝法律法规数据库”检索,地方一级现行有效的关于实验动物的法规有 7 部、政府规章 9 部,而地方规范性文件则多达 105 篇。可见实验动物立法已经具备系统性,规定了与实验动物相关的行为规范。但现行立法对实验动物伦理、福利的法律规定,主要以原则性法条表述为主,缺乏具体的操作性指引,如《北京市实验动物管理条例》第 7 条规定:“从事实验动物工作的单位和个人,应当维护动物福利,保障生物安全,防止环境污染。”对这一缺陷的质疑已久<sup>[13]</sup>,而在《生物安全法》出台之前,还存在着“实验用动物”使用上的法律规制漏洞<sup>[14]</sup>。

## 2.2 我国实验动物伦理原则实施现状

尽管我国实验动物立法起步较之欧美较晚,但是对 3R 原则的重视却并不落后。各地方性法规的基础是《实验动物管理条例》,因此在关于实验动物福利的条款表述中,基本是沿循行政法规的路径,在《条例》中“应当关爱实验动物,维护动物福利,不得戏弄、虐待实验动物”的基础上进一步确立 3R 原则,体现了地方性法规在实验动物福利立法方面的积极性。2018 年《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T35892-2018)是实验动物福利伦理审查制度形成的主要标志。而正如新原则指出,因为法律规范与技术标准中的 3R 原则不具备法律意义上的强制约束力,实验动物伦理审查大多演变为形式流程,甚至未完成相关审查。有学者统计 2018 年上半年 777 篇动物相关医学论文中,只有 3% 注明对 3R 原则的遵守<sup>[15]</sup>。而根据我国 IACUC 人员的研究,当下我国相关从业人员对 3R 原则、实验动物伦理知识的掌握程度也存在不足<sup>[6]</sup>。概言之,伦理原则贯彻不足主要在于规范审查与日常管理两个方面<sup>[16]</sup>。

## 2.3 我国实施六项原则的基础条件

尽管存在不足,但我国现行实验动物伦理规制已经形成基础体系,其与六项原则有着直接或间接的承接可能性。具体体现:(1) 观念基础。尽管伦理原则的运行并不完全符合其设计初衷,但我国对于实验动物伦理的重视程度正在逐步加强。2021 年公布的《实验动物管理条例》(征求意见稿)(以下简称《征求意见稿》)在立法目的中明确增加“保障动物福利,维护公共安全”,其反映了动物福利与伦理已经成为实验动物管理规制的核心出发点;(2) 制度基础。《征求意见稿》中增加了专章“动物福利管理”,明文规定了福利伦理管理、审查、运输福利等内容。伦理审查制度、生物安全制度构建系统化的必然要求即为伦理原则与要求的提高,而六项原则可能为未来的制度规范吸收;(3) 规范基础。我国实验动物伦理在非强制性规范层面已发展较为成熟,与六项原则的某些要求或目的殊途同归。比如 2021 年 9 月国家药监局发布的《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则 第一部分:决策原则》(以下简称《指导原则》),其目的直接指向动物实验在医疗器械中的必要性论证。其中提出非活体研究与计算机模拟等方法可以适用时,则不允许动物实验,该要求实际上与无替代手段原则相符。另文件

中提出“风险管理原则”,要求在实验过程中必须将风险控制于限定范围内,并进一步明确为“可行、有效性、安全性”等具体内容。此外,动物实验结果的重复性、再现性都成为在医疗器械领域适用动物实验的决策因素。上述内容亦与预期净收益原则在目的上有所耦合。新冠肺炎发生后,公众对于动物实验与公共卫生、风险防控的关注度提升,间接提高了对动物福利的要求以及实验动物管理水平标准。我国实验动物管理者、从业者尝试在 3R 原则基础上进行发展,提出了“3R+DQ”等新型原则。但由于《指导原则》以及其他具有先进性的行业标准等技术标准不具备法律上的强制性,因故虽其已接近六项原则的价值目的,仍亟需具有强制性的法律规范对其进行吸收,如在《征求意见稿》中将伦理审查作为必备条件、国家级 IACUC 监督条款成为具有执行力的约束条款后,进一步在实验设计、实验评估、伦理审查中引入六项原则的具体内容。否则六项原则即使在我国进行规范性转化,亦可能因缺乏强制执行力与监督机制而成为“傀儡原则”。

## 3 新原则视角下我国实验动物立法的发展方向

### 3.1 宏观层面:逐步对接新原则

扩大实验动物的福利不代表着禁止对动物实验,实验动物伦理与福利水平的改善往往更有益于研究结果的科学性。现实中对动物实验的争论呈现为两个不同方向:一方面以动物保护者为代表,他们质疑动物实验对动物的伤害;一方面以科研从业者为代表,他们认为为了人类的福祉必须进行动物实验<sup>[17]</sup>。伦理原则的完善、科学程度将影响实验动物的制度设计、权利义务规定等具体内容,动物伦理研究的六项新原则应当逐步转化为我国实验动物立法体系的组成部分。宏观而言,六项原则在以下方面能够推动我国实验动物立法的发展:(1) 与《生物安全法》之“风险预防”原则形成有效衔接。《生物安全法》旨在防范和应对生物安全风险,3R 原则并未涉及对动物实验蕴含的风险考量,新原则中的预期净收益原则要求在设计、论证实验合理性时详细阐明可能的风险因素与应对手段,该路径与《生物安全法》的“风险预防”原则吻合。而目前《征求意见稿》对基因修饰动物、生物安全、免疫、检疫、特殊动物实验的条款制定,反映了我国实验动物立法已经呈现风险防控转向;(2) 弥补当前立法动物伦理、福利条款模糊的缺陷。六项原则不仅包含扩

展人类对动物予以道德关怀的理念,还包括一系列细化要求,比如对伤害具体上限的界定,对实验收益与风险、成本之间的计算等。通过引入新的六项原则,能够进一步细化立法规制的事项。但须注意的是,新原则也存在尚未达成共识的内容,比如“避免动物过早死亡”是否属于动物福利的基本需求。故未来立法在引入该原则时应首先通过行业自律标准、地方创新立法率先推进,再具备实践经验基础后,转化为强制性法律规范。

### 3.2 中观层面:完善法律制度体系

尽管新原则以“原则”为表达,但其指出了许多现实可行的制度设计与政策制定的建议,对我国实验动物法律制度面临的困境有着借鉴意义,其具体可依下开展:(1)在法律规制的范围上,应当从“实验动物”拓展至“实验用动物”。新的伦理原则关于适用动物的原始表述为“圈养动物”(captive animal),其并非局限于传统意义上的农场动物,而拓展到了所有动物实验、动物研究中所涉的动物。我国研究机构中多有使用牛、羊等畜牧动物为实验对象,这类动物的相关法律标准并不完善<sup>[18]</sup>。根据该适用范围,应该逐步建立针对“实验用动物”的有关规定与各类标准;(2)完善实验后动物的法律处置制度。3R 原则的关注范围是实验过程之中的动物,而事实是目前我国的从业者很少提交确认动物的伦理保护状况的实验终审申请<sup>[18]</sup>。新原则将视角拓展至实验结束后,或者实验无法进行时如何减少动物的痛苦、不安等负面因素。《动物防疫法》主要关注的是从动物疫病防治的角度,而《实验动物管理条例》也未对这一类动物的法定处置作出规范。故在新原则的指导下,立法应当探索建立保障实验后动物福利与预防动物疫病相结合的处置制度;(3)完善动物实验审批审查管理法律制度。目前 IACUC 的审批许多并未涉及实质问题,更未对动物实验本身的价值、目标与合理性进行详细的审查,而预期净收益原则、无替代手段原则、伤害合理性原则将会共同作用,促使 IACUC 对动物实验进行详尽的审查。该三项原则应当与伦理审查制度相结合,作为伦理审查的必要前置标准。

### 3.3 微观层面:关注动物福利

新原则要求立法进一步细化发展,摒弃以往对动物予以工具性利用视角,尽可能多地在进行研究的同时保障动物的福利,比如在进行 IACUC 的审查规则制定时引入对视频记录文件的审查,或是完善

动物实验质量评价法律体系,促使我国尽快研发出具有本国特色的动物实验质量评价工具、动物实验报告评价工具<sup>[19]</sup>。此外,许多具有操作性的实验动物伦理与福利的内容都属于标准规范。如江苏省详细参考了《赫尔辛基宣言》,制定了关于实验动物笼器具的一系列地方标准,包括代谢笼、独立通气笼、金属笼等等。但地方标准不具有强制性,只能作为参考。为了从微观层面发展我国实验动物立法,融入新的动物伦理原则的理念,应当首先鼓励地方开展创新性立法,创制具体可行的规范内容,同时将一些具有参考性的非强制性标准融入到国家标准之中。通过该路径,可以形成地方立法与国家立法的动态联动,如在 2018 年的《实验动物福利伦理审查指南》颁布前,2005 年北京市就制定了《实验动物福利伦理审查指南》,该地方性指南为全国性的指南的制定提供了经验,直接反映了在实验动物领域地方在法律规范创制上的能动性。

总而言之,一个不可否认的事实是:即使许多动物研究机构贯彻了 3R 原则,但这只能说明 3R 原则的需求被满足,而不是动物的需求被满足了。无论是我国学者提交、发表不规范的实验动物伦理审查报告等科研不端行为<sup>[20]</sup>,或是相关从业者对动物伦理、福利概念的淡漠<sup>[6]</sup>,都表明 3R 原则无法指导我国实验动物行业从业者形成完整、明确的动物研究伦理意识<sup>[20]</sup>。新原则的核心贡献在于融合了科学研究与动物福利的双重取向,通过逻辑递进、相互关联的原则设计来提高动物实验的道德性,同时通过实验质量的提高来减少实验成本,并预防动物疫病、人畜共患病与其他风险,能够与我国未来实验动物立法的方向构成衔接路径,提供理念与方法的指引。

### 参考文献:

- [1] Russell WI, Burch RE. The principles of humane experimental technique [M]. London: Methuen & Co. Ltd; 1959.
- [2] 冯丽萍,李焱冬,林金杏,等. 欧美实验动物福利立法浅析 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(12): 52-55.
- [3] 巩和凌子,孔琪,刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 71-75.
- [4] Beauchamp TO, Degrazia DA. Principles of animal research ethics [M]. UK: Oxford University Press; 2020.
- [5] 苏美洋伊,邓巍. 关于实验动物福利伦理审查的几点建议 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 104-107.
- [6] 庞万勇,朱德生,贺争鸣,等. 美国实验动物医学发展简史——对中国实验动物医学发展的思考 [J]. 中国比较医学

- 杂志, 2011, 21(S1): 81-86, 38.
- [7] 宁磊, 吴祥林. 实验动物福利与“3R”原则 [J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(3): 53-56.
- [8] 陈芬, 苏彦捷. 动物研究的伦理道德问题 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 11(2): 63-68.
- [9] 李楠, 王天奇, 何嘉玲, 等. 实验动物的安乐死及其实施方法的伦理分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 128-132.
- [10] 郭欣, 严火其. 农场动物福利“五大自由”思想确立研究 [J]. 自然辩证法通讯, 2019, 41(2): 74-82.
- [11] Kilkenny CA, Parsons NI, Kadoszewski E, et al. Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals [J]. PLoS One, 2009, 4(11): 1-11.
- [12] 孔琪. 中国实验动物行业发展现状调查研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 19-22.
- [13] 贺争鸣, 邢瑞昌, 方喜业, 等. 我国实验动物福利立法基本原则的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(2): 98-100.
- [14] 薛康宁, 刘晓宇, 赵赤鸿. 我国实验用动物卫生相关法律法规与国际陆生动物卫生法典的内容比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 7-11.
- [15] 林加西. 777 篇中文医学动物实验论文伦理规范调查分析 [J]. 中国科技期刊研究, 2019, 30(10): 1054-1058.
- [16] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 133-137.
- [17] Lamb D. Animals in research: for and against [J]. J Med Ethics, 2002, 28(1): 56-62.
- [18] 郑亚楠, 常欣峰, 李奕慧. 医学生对实验动物伦理知晓情况的调查 [J]. 医学与哲学, 2016, 37(8): 31-33.
- [19] 张钰, 梁力均, 张纯. 在精准医学背景下, 完善我国动物实验质量与福利伦理评价体系建设 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 95-99.
- [20] 赵心刚, 卢凡, 程革, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望 [J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12): 1371-1378.

[收稿日期]2021-12-07

## (上接第 74 页)

- [21] Wang W, Xu AL, Li ZC, et al. Combination of probiotics and salvia miltiorrhiza polysaccharide alleviates hepatic steatosis via gut microbiota modulation and insulin resistance improvement in high fat-induced NAFLD mice [J]. Diabetes Metab J, 2020, 44(2): 336-348.
- [22] 王丽春, 赵连三. 肝纤维化的实验动物模型 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(4): 56-60.
- [23] Jia KX, Wu JZ, Li YJ, et al. A novel pulmonary fibrosis murine model with immune-related liver injury [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 4: 1-9.
- [24] 巴哈吉力·阿卜都热合曼, 阿布力克木·毛拉尤甫, 买吾拉尼江·依孜布拉, 等. 异常黑胆质证 2 型糖尿病大鼠模型的血浆代谢组学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 16-21.
- [25] 杨仁国, 贺微微, 罗婷婷. miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 66-72.
- [26] 游茂春, 刘广益, 程俊, 等. 脂肪干细胞及其外泌体减轻肝细胞凋亡改善大鼠肝纤维 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 30-37.
- [27] Liu N, Feng J, Lv Y, et al. Role of bile acids in the diagnosis and progression of liver cirrhosis: a prospective observational study [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(5): 4058-4066.
- [28] Tanaka A. Current understanding of primary biliary cholangitis [J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(1): 1-21.
- [29] Yoshida T, Tsuchiya A, Kumagai M, et al. Blocking sphingosine 1-phosphate receptor 2 accelerates hepatocellular carcinoma progression in a mouse model of NASH [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 530(4): 665-672.
- [30] Liu F, Wang M, Wang Y, et al. Metabonomics study on the hepatoprotective effect of Panax notoginseng leaf Saponins using UPLC/Q-TOF-MS analysis [J]. Am J Chin Med, 2019, 47(3): 559-575.
- [31] 尤心怡, 王文凤, 徐霞, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的补阳还五汤抗慢性炎症大鼠血浆代谢组学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(4): 468-476.

[收稿日期]2022-03-07

刘春慧,梁群. 脓毒症急性肺损伤模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 113-120.

Liu CH, Liang Q. Research progress in acute lung injury models of sepsis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 113-120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.015

## 脓毒症急性肺损伤模型研究进展

刘春慧,梁 群\*

(黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

**【摘要】** 急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是严重危及生命的脓毒症并发症之一,其发病机制尚不明确。建立稳定、可靠的脓毒症 ALI 临床前模型是明确其发病机制、发掘潜在治疗靶点、检测新研发药物安全性、治疗效果的必要手段,目前,脓毒症急性肺损伤在体动物模型已相对成熟,随着科研技术的增进,世界各地研究者还构建出多种不同的细胞模型、肺器官芯片模型用以该疾病的研究。全文将对脓毒症相关急性肺损伤的动物、细胞及器官芯片三种临床前模型的研究进展予以综述,为实验模型的优化和选择提供参考依据。

**【关键词】** 脓毒症;急性肺损伤;动物模型;细胞模型;肺器官芯片模;综述

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0113-08

## Research progress in acute lung injury models of sepsis

LIU Chunhui, LIANG Qun\*

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**【Abstract】** Acute lung injury (ALI) is one of the many life-threatening complications of sepsis, but its pathogenesis is still unclear. Establishing a stable and reliable preclinical model of sepsis ALI is a productive way to clarify its pathogenesis, explore potential therapeutic targets, and detect the safety and therapeutic effects of newly developed drugs. At present, the animal model of sepsis ALI *in vivo* is relatively mature. With improvements in scientific research technology, researchers around the world have built a variety of different cell models and lung organ chip models for studying the disease. In this paper, the research progress of three preclinical models of sepsis-related ALI, including animal, cell and lung-on-a-chip models, will be reviewed to provide a reference for those optimizing and selecting experimental models.

**【Keywords】** sepsis; acute lung injury; animal model; cell model; lung-on-a-chip model; review

脓毒症(sepsis)是机体对感染反应失调所引发危及生命的器官功能障碍<sup>[1]</sup>。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)被定义为,由肺内外、直接或间接多种致病因素(例如感染、创伤、烧伤、中毒、肺炎、输血、免疫反应等)引发肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞结构功能损害,肺毛细血管通透性增加造成非心源性肺间质和肺泡弥漫性水肿。以进行性低氧血症和急性呼吸困难为主要临床特征<sup>[2]</sup>。ALI是脓毒

症患者临床常见并发症,病情恶化可出现急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),是脓毒症病人死亡的重要原因<sup>[3]</sup>。据相关流行病学调查发现脓症患者中 ALI 发生率为 68.2%,合并 ALI 的病人 90 d 的病死率高达 35.5%<sup>[4]</sup>。脓毒症 ALI 作为医学界棘手问题之一,对其发病机制的研究从未停止,但其临床治疗效果不佳。因此,建立稳定、可靠的脓毒症 ALI 临床前模

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81974557);黑龙江中医药大学校级科技创新研究平台项目(2018pt06)。

**【作者简介】** 刘春慧(1986—),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗急危重症。E-mail: liu18946429580@163.com

**【通信作者】** 梁群(1968—),女,博士,主任医师,博士生导师,研究方向:中西医结合治疗急危重症。E-mail: liangqun1@sina.com

型是明确其发病机制、发掘潜在治疗靶点、检测新研发药物安全性、治疗效果的必要手段。当前,现有各种脓毒症 ALI 模型中,除了在体动物模型不断完善外,体外的离体细胞模型、肺器官芯片模型也逐渐受到大家的认可和应用。全文将对脓毒症 ALI 模型的创建方法、依据机制及其造模优缺点进行综述,为临床前实验设计及造模方法的选择提供参考。

## 1 脓毒症 ALI 在体动物模型

肺部或非肺部感染引起的脓毒症是 ALI/ARDS 的主要原因<sup>[5]</sup>。现有脓毒症 ALI 实验模型中,在体动物模型的研究与应用相对成熟。用于构建在体模型的动物常使用啮齿类(大鼠<sup>[6]</sup>、小鼠<sup>[7]</sup>)、哺乳类(家兔<sup>[8]</sup>、猪<sup>[9]</sup>、羊<sup>[10]</sup>)、灵长类恒河猴<sup>[11]</sup>等进行实验。对比于其他实验动物来说,鼠类具有与人类基因组高度同源性、繁殖周期迅速性、价格低廉性、易于操作性等优点,成为制备该疾病模型的首选。在此,在体动物模型主要以鼠类模型为例进行说明。在动物模型中,创建脓毒症 ALI 模型方法主要包括:宿主屏障破坏—以盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)为代表、内毒素注入—以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为例、“双重”打击模型等。

### 1.1 宿主屏障破坏模型——CLP 模型

建立脓毒症所致 ALI/ARDS 的模型,CLP 常用于腹膜炎继发的脓毒症肺损伤。CLP 脓毒症相关性肺损伤在 18~72 h 内发生,表现为低氧血症、中性粒细胞炎症和间质及肺泡水肿<sup>[12]</sup>。CLP 模型是指在全麻下经开腹暴露动物盲肠,按 50%比例结扎并使用 8 号针头穿刺完成手术操作,使含有多重菌的肠内容物由穿刺孔流入腹腔。手术创伤、结扎后肠道坏死、含菌粪便多重原因诱发多细菌性腹膜炎感染,感染无法控制,随后 24 h 内动物出现经典脓毒症临床症状:背部毛发竖立、自主活动减少、对声音刺激无反应、对触碰刺激反应减弱、眼睛闭合、眼角明显浑浊分泌物、呼吸频率减少、呼吸困难等<sup>[13-15]</sup>。脓毒症动物模型造模成功后,通过肺组织病理学、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及血清、肺组织中炎性介质浓度评估、肺干湿比计量、微计算机断层扫描成像等多种完整评价方法确认脓毒症 ALI 模型造模成功<sup>[16]</sup>。

CPL 造模方法之所以可成功用于脓毒症肺损伤模型的创建,近似真实的模拟临床脓毒症 ALI/

ARDS 患者,主要是基于肺微生物组的改变是脓毒性 ALI/ARDS 发病机制之一。脓毒性肺损伤时,肠道紧密连接蛋白表达、肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)活性、内皮细胞增殖和凋亡的调节均受细胞因子风暴的影响,导致肠道通透性增高。肠道通透性增加导致肠道微生物移位,引起肠道炎症等一系列炎症反应,炎症细胞因子增加引起肠道屏障功能障碍、肠道通透性增高、细菌移位和炎症反应增大诱发急性肺损伤。肠道菌群及其代谢产物的改变通过调节局部和全身炎症、氧化应激和细胞浸润、活化水平,影响脓毒症 ALI/ARDS 的严重程度<sup>[17]</sup>。同类造模方法腹腔持续置管引流(continuous indwelling catheter drainage in abdominal cavity, CASP)模型也被认为是脓毒症的高度标准化模型,但在脓毒症 ALI 动物模型的研究中却很少被提及。Xiong 等<sup>[18]</sup>在 CLP 多菌性脓毒症炎症性肺损伤模型研究中,证实白细胞介素-1(interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )诱导环磷酸腺苷(cyclic AMP)-cAMP 反应元件结合蛋白(cyclic-AMP response binding protein, CREB)-血管内皮细胞钙黏蛋白(vascular endothelial-cadherin, VE-Cadherin)即 CAMP-CREB-VE-cadherin 通路下调是脓毒症引起肺内皮屏障损伤和肺损伤的关键机制,提出了增加内皮细胞 CREB 介导的 VE-Cadherin 转录能力可能有助于预防脓毒症诱导的 ARDS 肺血管损伤的新发现。目前,为了更好的验证实验结果,大部分专家学者常常一个实验中应用两种造模方法:Chen 等<sup>[19]</sup>同时建立 CLP 诱导的脓毒症 ALI 和 LPS 诱导 ALI 两种小鼠模型,更加充分验证了 Sirtuin-3(Sirt3)可通过调节 VE-Cadherin 和  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -Catenin)的相互作用,维持微血管内皮细胞、黏着小带的完整性,从而达到减轻脓毒症引起的肺部炎症的治疗作用。但 Chimenti 等<sup>[12]</sup>有不同的发现,其实验中没有发现 CLP 大鼠肺损伤的证据。脓毒症模型引起的肺损伤首先局限于血管和间质部,在最初的小时内很少累及肺泡部。基于此观点,实验中观测指标、时间节点的选择及确定需要得到更多的关注和研究。

### 1.2 内毒血症模型——LPS 模型

LPS 作为革兰氏阴性细菌细胞壁的关键成分,可引起以显著肺微血管受损为病理特征的严重肺损伤。而且 LPS 诱导的体内实验模型与临床 ALI/ARDS 高度相似。因此在 ALI 的动物模型建立中,以 LPS 为代表的诱导脓毒症致 ALI 最为普遍。

主要依据经典的炎症与免疫反应机制:LPS 在脂多糖结合蛋白(LBP)辅助作用下被运输至分化簇 14(CD14)蛋白上,CD14 承载 LPS 到达细胞外,经髓样分化蛋白 2(medullary differentiation protein,MD2)识别,LPS 与 Toll 样受体 4(toll like receptor-4,TLR4)相结合形成新受体复合体。该复合体通过衔接蛋白 88(My88)刺激转录因子核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)激活免疫细胞,诱导炎症反应,各种促炎细胞因子,包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1,HMGB1)、巨噬细胞炎症蛋白-1 $\beta$ (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ,MIP-1 $\beta$ )等被释放,受到 LPS 刺激后同时增加的还有抗炎细胞因子白细胞介素-10(interleukin -10,IL-10)的产生<sup>[20]</sup>。与此同时,LPS 通过病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMPS)或损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPS)激活先天免疫系统引发大量趋化因子、促炎细胞因子和抗炎细胞因子的产生。前炎性细胞因子可有效清除病原体发挥积极作用,但当前炎性细胞因子水平过高时就会使内皮层(循环细胞因子)或上层(肺泡液细胞因子)遭到永久性损伤,打破肺泡-毛细血管屏障固有完整性功能。肺泡液中前炎症效应物通过血管屏障缺口处,释放入循环中,引发进一步炎症和免疫反应。失控的炎症与失衡的免疫反应加重肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤,肺泡毛细血管膜通透性增加,形成肺水肿,发生脓毒症 ALI。

对于 LPS 诱导这种脓毒症 ALI 动物模型的造模方式,权威机构美国胸科协会<sup>[15]</sup>推荐使用内毒素吸入、气管内滴入、静脉注射等不同干预方法。具体实验研究及操作流程包括:(1)LPS 雾化吸入造模法<sup>[21]</sup>:将小鼠周身暴露在可实施 LPS 雾化吸入的容器内,以 3 mg/mL 浓度,24 h 后给予安乐死,观测 LPS 诱导 ALI 的短期急性效应。(2)气管内滴注造模法:又分为直接无创伤性经鼻滴注法和间接创伤性经气管滴入两种方法,陈朝阳等<sup>[22]</sup>首先应用戊巴比妥钠麻醉小鼠,然后将 10  $\mu$ g LPS 经鼻孔滴入小鼠呼吸道中,成功造模。张毅等<sup>[23]</sup>经气管滴注法造模成功步骤为:将腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉后大鼠于手术台板上固定,碘伏清洁颈部,切开颈部充分暴露气管,用 50  $\mu$ L 微量进药器插入

气管,按 2 mg/kg 计量缓慢均匀滴入 LPS,滴注完毕后立刻将大鼠呈头上尾下垂直正立体位,小幅度左右摇动,使 LPS 充分流入整个气管内,正立姿势保持 1 min。(3)LPS 静脉注射造模法<sup>[24]</sup>:大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,背侧固定,分离右股静脉,置入股静脉注射给药 8 mg/kg 的 LPS,24 h 后大鼠 ALI 模型造模成功,实施安乐死进一步采集观测标本。以上各种方法注入 LPS 均可引起内毒素攻击所导致的肺组织损伤。静脉注射 LPS 会导致肺部的变化,包括粒细胞变形能力的改变和迁移到气道内的少量多型核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils,PMN)的作用。相反,气管内给予 LPS 方式,气道中 PMN 则表现为大量增加<sup>[25]</sup>。在具体应用中,Zhang 等<sup>[26]</sup>先用载体处理小鼠 60 min 后,鼻内给药 200  $\mu$ g LPS 诱导肺损伤创建模型证明赖氨酸对脓毒症诱导的急性肺损伤有效。Chimenti 等<sup>[12]</sup>明确指出:直接气管内注射 LPS 致肺损伤大鼠 ALI 模型比间接损伤 CLP 致 ALI 大鼠模型更能有效地再现人 ARDS 急性期的特征。除了动物模型,更多的研究者,采取 LPS 同时诱导体内、体外两种脓毒症 ALI 模型来相互印证、进一步研究其分子层面的病理机制。LPS 单一提供的肺部活菌影响不够完整,双重打击模型可能更好地反映脓毒症 ALI 患者存在的共性和危险因素。

### 1.3 双重打击模型

大多数动物模型是基于一种或最多两种方法来诱发损伤,但是人类脓毒症相关性 ALI/ARDS 常常是多种原因共同作用的结果。和 ALI 的失血+内毒素、缺血再灌注+CLP、休克+LPS、肺挫伤+LPS、酸吸入+CLP、烟尘+CLP 等“二次打击”动物模型相似,在脓毒症诱发 ALI/ARDS 的临床前模型中,“双重打击”的造模方式更接近临床实际情况,如:脓毒症后给予免疫复合物或 LPS 直接导致肺损伤时,中性粒细胞向肺部的聚集浸润明显增加。机械通气与脓毒症或单用机械通气相关性肺损伤(mechanical ventilation-related lung injury,VILI)相比产生协同损伤<sup>[27-28]</sup>。这些被称为“双重打击”模型,镜像人类脓毒症 ALI 的过程<sup>[29]</sup>。Liu 等<sup>[30]</sup>在实验中采用 CLP+中等潮气量(moderate tidal volume,MTV)双重打击模型,发现本身不引起 ALI 机械通气的 MTV,不但增强了此前 CLP 脓毒症小鼠肺泡毛细血管通透性,相对应的组织病理学评分和肺脏炎症指标也得到了明显增高,这种两次打击模型可完

成脓毒症重症肺损伤模型的创建。此外还发现该模型在 TLR4 敲除小鼠中无法造模成功。为了更好的模拟临床,脓毒症急性肺损伤后给予液体复苏或抗生素干预治疗的动物模型也逐渐得到应用。

## 2 脓毒症 ALI 离体细胞模型

脓毒症相关 ALI 疾病过程精密而又复杂,致病环节众多,细胞层面暂时无法模拟疾病的全过程。目前,在细胞水平只能复制疾病机制中个别部位损伤的某一阶段的病理特征。虽有个别研究者应用 TNF- $\alpha$  诱导构建脓毒症相关 ALI 细胞模型,但 LPS 仍被世界公认为最常用细胞模型诱导剂。脓毒症 ALI 的发病机制主要包括炎症与免疫反应<sup>[31]</sup>、氧化应激<sup>[32]</sup>、细胞焦亡<sup>[33]</sup>、细胞凋亡<sup>[34]</sup>、细胞自噬<sup>[35]</sup>、凝血功能异常<sup>[36]</sup>、肺微生物组改变<sup>[17]</sup>、肠-肺-淋巴介导<sup>[37]</sup> 以及肺血管内皮糖萼 (vascular endothelial glycocalyx, VEG) 结构功能障碍<sup>[38]</sup> 等多种原因导致的肺血管内皮损伤和肺泡上皮损伤<sup>[39]</sup>。因此体外细胞模型所选用细胞种类:也主要分为肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs) 和肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial cells, AEC) 系两种。此外,肺泡巨噬细胞 (pulmonary alveolar macrophages, PAM) 也常用于模拟肺损伤模型的创建。

### 2.1 PMVECs 模型

PMVECs 是肺组织中的主要细胞之一。它与一系列生理和炎症反应密切相关,包括再生、发育、伤口愈合等。由 PMVECs 形成的一个半选择性屏障,对肺部气体交换、调节血液与肺间质之间液体和可溶性物质的流动具有重要意义。肺组织的功能取决于 PMVECs 的活性。机体遭受外界不良刺激后,肺内皮细胞可以合成多种生物活性物质。这些生物活性物质吸引中性粒细胞和单核巨噬细胞汇集、激活并在局部炎症中发挥作用。同时,肺内皮细胞发挥防御作用,调节免疫功能。因此,PMVECs 在急性肺损伤的发生发展中起着重要作用。PMVECs 模型是肺损伤研究中常用的模型。主要包括小鼠来源的和人来源的人肺微血管内皮细胞 (human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMECs)。在最新的一项研究报道中,Xu 等<sup>[40]</sup> 应用 LPS 诱导的 HPMECs 作为脓毒症肺损伤的细胞模型,证明了 jte-013 作为鞘氨醇-1-磷酸受体 2 (sphingosine-1-phosphate receptor 2, S1PR2) 的拮抗剂,在体内外均

能减轻脓毒症引起的炎症损伤和内皮功能障碍,减轻肺损伤。发现了 jte-013 可能是治疗脓毒症相关肺损伤的有效靶向药物。

### 2.2 AEC 模型

肺疾病一旦发生,AEC 一方面阻止富蛋白液体漏入肺泡腔,另一方面在肺水肿的回吸收中发挥积极作用。但是 ALI 和 ARDS 时 AEC 大量凋亡,ALI 时 AEC 不仅参与分泌炎症因子(如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 等),它还能增加细胞相关粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达并促进中性粒细胞肺内浸润。多项实验资料提示,AEC 在 ALI 病程中参与了肺内的炎症反应。常用体外实验模型的细胞包括:体外培养人 AEC 源性肿瘤 a549 细胞、人支气管上皮细胞 (BEAS-2B)、人小气道上皮细胞 (human small airway epithelial cells, HSAECS) 3 种人类来源细胞模拟脓毒症引起的肺损伤。LPS 处理的小鼠肺泡上皮细胞系 (MLE)-12、LPS 刺激的大鼠肺泡上皮 II 型细胞 (AECII) 两种鼠类细胞建立脓毒症急性肺损伤细胞模型。Hao 等<sup>[41]</sup> 通过分析 gse16650 基因组,在以人肺上皮细胞 AEC 源性肿瘤 a549 细胞模型的肺损伤细胞模型中检测到上调的酮戊二酸脱氢酶 (oxoglutarate dehydrogenase, OGDH) 基因。在 CLP 建立的脓毒症动物模型和肺损伤细胞模型中,发现 OGDH 在 CLP 肺损伤细胞模型和肺组织中高表达,OGDH 下调可减轻脓毒症 ALI。在动物模型和细胞模型中,OGDH 的表达与促炎因子的表达呈正相关。OGDH 可能通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径起作用。Xu 等<sup>[42]</sup> 采取 LPS 诱导人肺泡上皮细胞 a549 建立脓毒症肺损伤模型,得出葛根素可抑制 LPS 诱导的小儿肺上皮细胞铁沉积和脓毒症肺损伤炎症反应的观点。Liu 等<sup>[43]</sup> 用 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞模拟体外肺损伤。采用免疫印迹法和逆转录定量 PCR 法检测细胞转染效果。免疫印迹法检测 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平。结果随着 W/D 比值和炎症细胞因子表达的增加,脓毒症引起的肺组织出现明显炎症反应。在脓毒症中,神经轴突导向因子 1 (Netrin-1) 及其受体不协调同源基因 5B (UNC5B) 减少。但是,Netrin-1 的上调减轻了 BEAS-2B 细胞的炎症水平,增加了细胞内的 UNC5B 水平。结论 Netrin-1 通过抗炎作用对脓毒症大鼠肺损伤具有保护作用,可能为预防脓毒症肺损伤提供一种新的治

疗方法。Yang 等<sup>[44]</sup>采用 CLP 和 LPS 处理的小鼠肺泡上皮细胞系(MLE)-12 建立脓毒症急性肺损伤模型,发现 miR-129-5p 通过降低 HMBL1 的表达,对脓毒症引起的急性肺损伤具有保护作用,为脓毒症的诊治提出了新的靶点。

### 2.3 PAM 模型

PAM 是存在于肺泡腔内的一种多功能间质细胞,它大量分布于肺泡内及气道上皮表面,承担免疫防护免疫损伤二重功能,PAM 根据对环境刺激的反应,通常极化为 M1(促炎症)和 M2(抗炎症)两种类型,是 ALI/ARDS 发病机制中的关键协调者<sup>[45]</sup>。当脓毒症 ALI 发生早期,炎症反应起着关键的作用。常见的革兰氏阴性细菌(gram negative bacteria, G<sup>-</sup>)感染被认为是 ALI 的主要诱因,G<sup>-</sup>毒性和致病性是与紧密结合在细菌外膜的生物大分子物质即 LPS 密切相关,LPS 介导了革兰氏阴性细菌诱发疾病的众多病理生理反应。实验可通过小鼠 PAM 体外培养技术,采用 LPS 刺激离体培养的小鼠 PAM,使得在细胞水平模拟 ALI 的初期发病成为可能。小鼠肺泡巨噬细胞 MH-S 暴露于内毒素,可成功建立脓毒症体外模型。Hou 等<sup>[46]</sup>通过检测巨噬细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  mRNA、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)蛋白和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, cox-2)的表达,探讨巨噬细胞活化的机制。采用相同方法观察杨梅素对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞炎症反应的影响。最后,用 Western blot 方法检测 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路。证实杨梅素通过抑制 NF- $\kappa$ Bp65 和蛋白激酶(protein kinase b, AKT)的活化,抑制 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、磷酸化细胞外信号调节激酶(P-ERK)和 p38 在丝裂原活化蛋白激酶信号通路中的表达,发挥抗炎作用。杨梅素通过抑制巨噬细胞活化,抑制体内外炎症反应而减弱 ALI。这可能是预防炎症性疾病的潜在诊疗备选药物。Ling 等<sup>[47]</sup>体外培养大鼠肺泡巨噬细胞 NR8383,同样应用 LPS 诱导建立急性肺损伤模型探讨出曲古抑菌素 a(trichostatin A, TSA)对 LPS 诱导的小分子 RNA-146a(miR-146a)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的影响,得出 LPS 诱导的急性肺损伤模型中具有抗炎作用,其机制可能与抑制 TNF- $\alpha$  分子和上调 miR-146a 表达有关。研究结果提示 TSA 有望成为治疗急性肺损伤的潜在治疗剂。

### 3 肺器官芯片模型

人肺血管内皮细胞与人肺泡上皮细胞共培养的肺芯片由三个平行通道组成,中间夹有一层基质膜,概括了人肺泡毛细血管屏障的主要特征。细胞-细胞相互作用、细胞-基质相互作用和血管力学信号协同作用,促进了肺芯片模型的屏障功能。经典文献报道在 2010 年,哈佛大学的 Huh 等<sup>[48]</sup>成功构建的肺器官芯片在 Science 上发表,该芯片模型分为上下两层,中间被生物膜所分开,上层为肺细胞,流通的是空气,而在下层为肺毛细血管细胞,流通的是培养液。而两边为真空侧室,通过循环吸力来使得两侧的真空通道进行伸缩,进而带动膜上细胞的收缩,从而达到与人体肺细胞呼吸时的状态,实现传统培养皿不可能实现的呼吸功能。该肺芯片可模拟人体肺泡中的呼吸伸缩生理过程,是肺部器官体外生理功能的最优模型。该肺模型之所以很经典,是因为该模型可以对微环境进行精准操控,如剪切力、张力、压力等。因为这些物理性的因素对于细胞在微环境中是很重要的,很大程度上影响细胞的分化以及组织的功能。正是由于这些因素的存在才促成了器官功能的显现<sup>[49]</sup>。Zhang 等<sup>[50]</sup>创建了一个仿生芯片上的人类疾病模型,可以重现新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)在体外器官水平诱导的肺损伤和免疫反应。通过人肺泡上皮细胞、微血管内皮细胞和循环免疫细胞在流体流下共培养,再现了肺泡毛细血管屏障的关键特征。在 SARS-CoV-2 感染时,上皮对病毒的敏感性高于内皮细胞。转录分析显示,感染后 3 d,上皮细胞和内皮细胞的细胞因子依赖通路激活了天然免疫反应,不同细胞类型的免疫反应各不相同。值得关注的是,病毒感染引起免疫细胞招募,内皮剥离,增加炎症细胞因子的释放,提示免疫细胞不但参与肺泡屏障损伤还是加重炎症的关键因素。

### 4 各模型的特点评价

CLP 模型和 LPS 模型被认为最常用的脓毒症 ALI 动物模型。CLP 模型模拟机体内源性多种细菌移位、感染诱发的 ALI 过程,与临床上疾病进程、进展最高相似,被广泛引用。CLP 模型和 LPS 模型各有优缺点,具体如表 1。针对临床前模型中动物模型、细胞模型、芯片模型的各自特点进行对比,具体如表 2。

## 5 总结与展望

对于脓毒症相关 ALI 研究探索虽从未停止,但至今人们仍无法准确清晰阐述发病过程中复杂的分子机制。脓毒症 ALI 的病理生理学的理解进展相

对缓慢,相对应有效的治疗和特异性药物匮乏。目前公认的脓毒症相关 ALI 在体和离体模型种类繁多,在体动物模型的应用和研究已趋于成熟;而随着多种肺部疾病细胞系模型的建立,ALI 体外细胞模型研究逐渐增多。尤其是人源细胞的发现应用,

**表 1** 两种常用脓毒症 ALI 鼠类动物模型对比  
**Table 1** Comparison of two commonly used animal models of sepsis ALI mice

模型 Model	适合研究方向 Suitable research direction	特点 Characteristic	缺点 Disadvantage
CLP-ALI 模型 CLP-ALI model	适合血管内皮肺上皮屏障损伤和脓毒症免疫抑制机制研究。 Suitable for the study of immunosuppressive mechanism of vascular endothelial lung epithelial barrier injury and sepsis.	操作技术规范成熟。 与人类临床脓毒症 ALI 患者的病理生理过程相似度高。 Mature technical specifications. It is highly similar to the pathophysiological process of ALI patients with human clinical sepsis.	易形成腹腔内脓肿,建模后处死动物来验证造模成功。 建模时操作者的技术等外部因素导致脓毒症 ALI 严重程度不统一。 It is easy to form abdominal abscess. After modeling, the animals were killed to verify the success of modeling. External factors such as the operator's technique during modeling lead to the non-uniform severity of sepsis ALI.
LPS-ALI 模型 LPS-ALI model	适合研究包括肺泡巨噬细胞或肺上皮细胞介导的先天性免疫反应。 Suitable research includes the innate immune response mediated by alveolar macrophages or pulmonary epithelial cells.	模型重复性强、诱导物 LPS 可定性、定量,易于标准化。 The model has strong repeatability, qualitative and quantitative inducer LPS, and is easy to standardize.	LPS 诱导信号通路传达多依赖 Toll 单一受体细胞因子和血流动力学等变化迅速较人类疾病过程发展过快。 LPS-induced signaling pathway relies on Toll-like receptor. Cytokines and hemodynamics change more rapidly than human diseases.

注:CLP:盲肠结扎穿孔术;ALI:急性肺损伤;LPS:脂多糖。

Note. CLP, Cecal ligation and perforation. ALI, Acute lung injury. LPS, Lipopolysaccharide.

**表 2** 动物模型、细胞模型、器官芯片模型对比  
**Table 2** Comparison of animal model, cell model and organ chip model

模型 Model	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
动物模型 Animal model	应用广泛,技术成熟,操作简单,易复制,易推广。可供选择动物种属丰富。 Wide application, mature technology, simple operation, easy replication and easy popularization. The available animal species are abundant.	实验室实验程序和饲养动物的环境条件会发生一定程度的变化、生理过程中也存在种间变异以及遗传等因素,导致动物体内环境出现异常。 Laboratory procedures and environmental conditions of raising animals will change to a certain extent, and there are also interspecific variation and genetic factors in physiological process, which lead to abnormal environment in animals.
细胞模型 Cell model	培养周期短、标准化程度高,细胞来源广泛,观测指标更精准,结果确切。 The culture period is short, the degree of standardization is high, the cell sources are extensive, the observation indexes are more accurate, and the results are accurate.	细胞模型是二维(2D)的,不能模拟组织和器官的固有复杂性,所以这些标准的 2D 模型不能重现人体组织的结构、力学和功能特性。 Cell models are two-dimensional (2D) and can't simulate the inherent complexity of tissues and organs, so these standard 2D models can't reproduce the structural, mechanical and functional characteristics of human tissues.
器官芯片模型 Organ chip model	更好地复制微架构、微环境和组织-组织界面,可实现细胞动态下观测,帮助研究复杂的人类器官-细胞生理过程。 Copying the micro-architecture, micro-environment and tissue-tissue interface better can realize the observation of cell dynamics and help to study the complex human organ-cell physiological process.	制作过程复杂,技术水平要求高,研究经费大。 The manufacturing process is complicated, the technical level is high, and the research funds are large.

突破人类细胞来源受限和动物种属差异的缺点,为脓毒症肺损伤人源细胞模型的建立奠定了坚实的基础。数十年来,研究者通过以上各种模型的创建及应用,逐步展现了脓毒症相关 ALI 的复杂机制,试行探究各种药物,尤其是传统中药对脓毒症相关 ALI 治疗,不断取得新的发现。但是,这些模型不能完全模拟人体脓毒症 ALI 发生发展全过程,还有必要进一步的优化,坚信伴随基因编辑、组织工程和 3D 技术等的逐渐发展,将会有越来越多的模型被开发出来。例如:肺活体内显微镜 (*in vivo* lung microscope, IVM) 是研究肺免疫细胞相互作用的实时活体动物的黄金标准。这项技术可以应用于不同的炎症模型,包括细菌和病毒感染,脓毒症引起的 ALI,吸入和囊性纤维化,以揭示生理参数和细胞行为的动态变化相对于非炎症状态<sup>[51]</sup>。先进的三维培养系统可以模拟不同器官的微环境,不仅限于单一细胞类型,而且可以模拟多种细胞类型之间的交流,这对器官功能研究至关重要。其中肺芯片的应用弥补了目前用于呼吸道疾病建模和药物开发的传统体外模型的局限性。肺芯片是目前呼吸道疾病体外建模一大新的研究重点,具有广泛的科研前景和应用空间。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 775-787.
- [ 2 ] Hughes KT, Beasley MB. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141(7): 916-922.
- [ 3 ] Mark-Christensen A, Mie Dilling Kjær, Ganesalingam S, et al. Increasing incidence of pelvic sepsis following ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis in denmark: a nationwide cohort study [J]. *Dis Colon Rectum*, 2019, 62(8): 965-971.
- [ 4 ] Xie J, Wang H, Kang Y, et al. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(3): e209-e218.
- [ 5 ] Mohsin M, Tabassum G, Ahmad S, et al. The role of mitophagy in pulmonary sepsis [J]. *Mitochondrion*, 2021, 59: 63-75.
- [ 6 ] 黄钟, 孙洁, 姚振滨, 等. 下调 miR-128-3p 缓解脓毒症大鼠急性肺损伤的炎症反应和肺组织形态学的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(12): 9-16.
- [ 7 ] Chen L, Li L, Song Y, et al. Blocking SphK1/S1P/S1PR1 signaling pathway alleviates lung injury caused by sepsis in acute ethanol intoxication mice [J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2170-2179.
- [ 8 ] Hu L, Chai Y, Xi R, et al. Pathophysiologic characterization of a novel rabbit model of biliary tract infection-derived sepsis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11947.
- [ 9 ] Mehaffey JH, Charles EJ, Schubert S, et al. *Ex vivo* lung perfusion rehabilitates sepsis-induced lung injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 103(6): 1723-1729.
- [ 10 ] Passmore MR, Byrne L, Obonyo NG, et al. Inflammation and lung injury in an ovine model of fluid resuscitated endotoxemic shock [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 231.
- [ 11 ] Rosado-Franco JJ, Ramos-Benitez MJ, Parodi LM, et al. Outlining key inflammation-associated parameters during early phase of an experimental gram-negative sepsis model in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2(4): 326-333.
- [ 12 ] Chimenti L, Morales-Quinteros L, Puig F, et al. Comparison of direct and indirect models of early induced acute lung injury [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2020, 8(S1): 62.
- [ 13 ] 荆喜中, 贾欢欢, 罗挺, 等. 小鼠脓毒症模型的建立和评价 [J]. *中国实验动物报*, 2016, 24(2): 158-163.
- [ 14 ] Drechsler S, Osuchowski M. Cecal ligation and puncture [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2321: 1-8.
- [ 15 ] Kulkarni HS, Lee JS, Bastarache JA, et al. Update on the features and measurements of experimental acute lung injury in animals: an official American thoracic society workshop report [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(2): e1-e14.
- [ 16 ] 付静怡, 汪雷, 杨昇. 急性肺损伤动物模型建立的研究进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2021, 41(5): 690-694.
- [ 17 ] Zhou X, Liao Y. Gut-Lung crosstalk in sepsis-induced acute lung injury [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 779620.
- [ 18 ] Xiong S, Hong Z, Huang LS, et al. IL-1 $\beta$  suppression of VE-cadherin transcription underlies sepsis-induced inflammatory lung injury [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(7): 3684-3698.
- [ 19 ] Chen DQ, Shen MJ, Wang H, et al. Sirt3 maintains microvascular endothelial adherens junction integrity to alleviate sepsis-induced lung inflammation by modulating the interaction of VE-Cadherin and  $\beta$ -Catenin [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8978795.
- [ 20 ] Meng L, Song Z, Liu A, et al. Effects of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) single nucleotide polymorphism (SNP) in Infections, inflammatory diseases, metabolic disorders and cancers [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 681810.
- [ 21 ] de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G, Dos Santos Alemany AA, et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: an acute lung injury model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185474.
- [ 22 ] 陈朝阳, 姚茹, 王璐, 等. 莲心碱对 LPS 诱导小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 343-348.
- [ 23 ] 张毅, 程晨, 苏景超, 等. 急性肺损伤大鼠模型制备及不同时段肺损伤比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(1): 27-34.
- [ 24 ] Li X, Jamal M, Guo P, et al. Irisin alleviates pulmonary epithelial barrier dysfunction in sepsis-induced acute lung injury

- via activation of AMPK/SIRT1 pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109363.
- [25] Jiang Y, Xia M, Huang Q, et al. Protective effect of dexmedetomidine against organ dysfunction in a two-hit model of hemorrhage/resuscitation and endotoxemia in rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(3): e7905.
- [26] Zhang Y, Yu W, Han D, et al. L-lysine ameliorates sepsis-induced acute lung injury in a lipopolysaccharide-induced mouse model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109307.
- [27] Wu X, Zheng R, Zhuang Z. Effect of transpulmonary pressure-guided positive end-expiratory pressure titration on lung injury in pigs with acute respiratory distress syndrome [J]. *J Clin Monit Comput*, 2020, 34(1): 151-159.
- [28] Zampieri FG, Mazza B. Mechanical ventilation in sepsis: a reappraisal [J]. *Shock*, 2017, 47(Suppl 1): 41-46.
- [29] Englert JA, Bobba C, Baron RM. Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(2): e124061.
- [30] Liu S, Deng M, Pan P, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volume exacerbates extrapulmonary sepsis-induced lung injury via IL33-WISP1 signaling pathway [J]. *Shock*, 2021, 56(3): 461-472.
- [31] Jiang WY, Ren J, Zhang XH, et al. CircC3P1 attenuated pro-inflammatory cytokine production and cell apoptosis in acute lung injury induced by sepsis through modulating miR-21 [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(19): 11221-11229.
- [32] Zhan Y, Yang C, Zhang Q, et al. Silent information regulator type-1 mediates amelioration of inflammatory response and oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *J Biochem*, 2021, 169(5): 613-620.
- [33] Mitra S, Exline M, Habyarimana F, et al. Microparticulate caspase-1 regulates gasdermin-D and pulmonary vascular endothelial cell Injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59(1): 56-64.
- [34] Wang Y, Yang Y, Chen L, et al. Death-associated protein kinase 1 mediates ventilator-induced lung injury in mice by promoting alveolar epithelial cell apoptosis [J]. *Anesthesiology*, 2020, 133(4): 905-918.
- [35] Qiu P, Liu Y, Chen K, et al. Hydrogen-rich saline regulates the polarization and apoptosis of alveolar macrophages and attenuates lung injury via suppression of autophagy in septic rats [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(12): 974.
- [36] Xu S, Pan X, Mao L, et al. Phospho-Tyr705 of STAT3 is a therapeutic target for sepsis through regulating inflammation and coagulation [J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 104.
- [37] Jin C, Chen J, Gu J, et al. Gut-lymph-lung pathway mediates sepsis-induced acute lung injury [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(18): 7.
- [38] 陈加弟, 龚迪, 易玉虎, 等. 血管内皮糖萼在脓毒症急性肺损伤病理机制及诊断治疗中的作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(4): 6.
- [39] 张宇, 卢笑晖, 连新宝. 脓毒症急性肺损伤的发生机制及治疗研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(11): 1159-1164.
- [40] Xu Q, Chen J, Zhu Y, et al. JTE-013 Alleviates inflammatory injury and endothelial dysfunction induced by sepsis *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Surg Res*, 2021, 265: 323-332.
- [41] Hao Y, Wang Z, Wang X, et al. OGDH is involved in sepsis induced acute lung injury through the MAPK pathway [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(8): 5042-5054.
- [42] Xu B, Wang H, Chen Z. Puerarin inhibits ferroptosis and inflammation of lung injury caused by sepsis in LPS induced lung epithelial cells [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 706327.
- [43] Liu J, Du J, Cheng X, et al. Effect of netrin-1 anti-inflammatory factor on acute lung injury in sepsis rats [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7928-7935.
- [44] Yang P, Xiong W, Chen X, et al. Overexpression of miR-129-5p mitigates sepsis-induced acute lung injury by targeting high mobility group box 1-sciencedirect [J]. *J Surg Res*, 2020, 256: 23-30.
- [45] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [46] Hou W, Hu S, Su Z, et al. Myricetin attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages and mouse models [J]. *Future Med Chem*, 2018, 10(19): 2253-2264.
- [47] Ling T, Xie J, Shen YS, et al. Trichostatin A exerts anti-inflammation functions in LPS-induced acute lung injury model through inhibiting TNF- $\alpha$  and upregulating micorRNA-146a expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3935-3942.
- [48] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting organ-level lung functions on a chip [J]. *Science*, 2010, 328(5986): 1662-8.
- [49] Zhang M, Cong X, Lei J, et al. A 3D human lung-on-a-chip model for nanotoxicity testing [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7(6): 1048-1060.
- [50] Zhang M, Wang P, Luo R, et al. Biomimetic human disease model of SARS-CoV-2 induced lung injury and immune responses on organ chip system [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 8(3): 2002928.
- [51] Alizadeh-Tabrizi N, Hall S, Lehmann C. Intravital imaging of pulmonary immune response in inflammation and infection [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 620471.

[收稿日期]2022-04-01

彭孟凡,李鸣,苗晋鑫,等. LncRNA 在食管癌中的双重调控机制及其临床价值 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 121-127.

Peng MF, Li M, Miao JX, et al. Dual regulation mechanism of LncRNA in esophageal cancer and its clinical value [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 121-127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.016

# LncRNA 在食管癌中的双重调控机制及其临床价值

彭孟凡<sup>#</sup>, 李 鸣<sup>#</sup>, 苗晋鑫, 田 硕, 苗明三<sup>\*</sup>

(河南中医药大学, 郑州 450056)

**【摘要】** 食管癌是临床常见消化道恶性肿瘤,具有较高的发病率和死亡率,由于早期症状不典型,多数患者确诊时已处于中晚期,治疗效果欠佳。目前对食管癌发病机制的认识有限,基本认为是基因-遗传-环境互作的结果,但目前尚无确切定论,且缺乏有效的治疗方法。因此,明确食管癌潜在发病机制对于临床早期筛查、诊断、治疗和预后等均具有重要意义。其中,长链非编码 RNA(long noncoding RNA, LncRNA)是肿瘤诊断、治疗和预后评估的新型生物标志物,在肿瘤细胞的分化、增殖、凋亡、侵袭和转移中扮演着重要角色,介导包括食管癌在内的多种恶性肿瘤的发生与发展。LncRNA 在食管癌中具有抑癌和促癌的双重角色,但文献报道较为零散,且 LncRNA 介导食管癌发生与发展的作用机制尚不完全明确。基于此,文章就 LncRNA 在食管癌发生发展中的双重调控机制进行系统综述,旨在明确 LncRNA 如何影响食管癌的发生与发展,以期为食管癌的临床防治提供新思路。

**【关键词】** 食管癌;长链非编码 RNA;生物标志物;临床价值

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0121-07

## Dual regulation mechanism of LncRNA in esophageal cancer and its clinical value

PENG Mengfan<sup>#</sup>, LI Ming<sup>#</sup>, MIAO Jinxin, TIAN Shuo, MIAO Mingsan<sup>\*</sup>

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

**【Abstract】** Esophageal cancer is a common gastrointestinal cancer with high incidence and mortality rates. Because the early symptoms are not typical, most patients are in the middle and late stages when diagnosed, and the treatment effect is disappointing. At present, our understanding of the pathogenesis of esophageal cancer is limited; it is considered to be the result of genetic-environmental interactions, but there are no definite conclusion, and there is a lack of effective treatments. Therefore, clarifying the potential pathogenesis of esophageal cancer is of great significance for research into early clinical screening, diagnosis, treatment, and prognosis. Long noncoding (LncRNA) is a new biomarker for tumor diagnosis, treatment, and prognosis evaluation. LncRNA plays an important role in tumor cell differentiation, proliferation, apoptosis, invasion, and metastasis and mediates the occurrence and development of a variety of malignant tumors, including esophageal cancer. LncRNA plays a dual role by inhibiting and promoting cancer in esophageal cancer, but the amount of relevant literature is limited, and the mechanism of LncRNA mediation of the occurrence and development of

**【基金项目】** 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);河南省自然青年科学基金项目(202300410259);中国博士后科学基金特别资助(2021T140184);河南省博士后科研启动项目(202001043)。

**【作者简介】** 彭孟凡(1992—),女,博士,研究方向:中药药理与肿瘤。E-mail: pengmengfanfan@163.com

李鸣(1996—),女,硕士,研究方向:中药药理学。E-mail: 154095068@qq.com <sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 苗明三(1965—),男,教授,博士,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

esophageal cancer is not completely clear. This paper systematically reviews the dual-regulation mechanism of LncRNA to clarify how it affects the occurrence and development of esophageal cancer and to provide new research ideas for the clinical prevention and treatment of esophageal cancer.

**【Keywords】** esophageal cancer; long noncoding RNA; biomarkers; clinical value

食管癌具有较高的发病率和死亡率,是全球第七大最常见的癌症<sup>[1]</sup>。在我国,食管癌的总患病例数和死亡例数占全球的一半<sup>[2]</sup>,尤以河南林县和辉县、河北磁县、山西阳城等区域发病率和死亡率最高<sup>[3]</sup>。手术、放疗和化疗是食管癌常见的临床治疗方式,在控制病情恶化、降低复发和转移、延长生存期等方面疗效显著。但由于早期症状不典型,多数患者就诊时已处于中晚期,错过最佳救治时期,食管癌的五年生存率仍处于较低水平<sup>[4]</sup>。全基因组测序发现仅有 2% 的基因组编码蛋白质,其余基因组被转录成非编码 RNA (ncRNAs)。其中,长链非编码 RNA (LncRNA) 占 ncRNAs 的 76% 以上,参与肿瘤在内的多种疾病的调控,是目前研究的热点<sup>[5-6]</sup>。与传统蛋白、mRNA 等生物标志物相比,LncRNA 诊断恶性肿瘤的能力可能更高。据报道,LncRNA 既可作为促癌基因参与食管癌的发生,促进肿瘤细胞无限增殖、侵袭和转移等多种恶性生物学行为;又可作为抑癌基因降低食管癌的发生率,阻断其恶性发展<sup>[7-8]</sup>。因此,文章就 LncRNA 在食管癌发生发展中的双重调控机制进行系统综述,旨在为食管癌的临床诊断和预后评估等提供新思路。

### 1 LncRNA 对食管癌发生发展的影响——动物实验

**促癌作用:** 据报道,食管鳞癌组织 Lnc LINC01980 表达水平高于癌旁组织 200 多倍,在食管癌中可能扮演癌基因的角色。皮下成瘤实验表明,干扰 Lnc LINC01980 表达能显著抑制 KYSE450 细胞皮下成瘤能力,降低瘤重和肿瘤体积<sup>[9]</sup>。谭德立<sup>[10]</sup>发现,干扰食管癌 EC9706 细胞株 Lnc H19 表达可降低其皮下成瘤能力,抑制皮下肿瘤体积变大并降低瘤重,是食管癌治疗的潜在靶点。Wu 等<sup>[11]</sup>发现,基因敲除 CASC9 能抑制食管鳞癌细胞的生长和降低裸鼠肿瘤的发生率,且 LncRNA CASC9 促食管癌发生的作用是通过招募 zeste 同源物增强子 2 (EZH2) 并随后改变 H3K27 me3 水平来负性调节 PDCD4 的表达实现的。研究表明,与食管癌 KYSE510 细胞相比,干扰 KYSE510 细胞 LncRNA LINC00467 的表达具有较弱的皮下成瘤能力,且肿瘤体积和瘤重均呈降低趋势<sup>[12]</sup>。Lnc-J23 能促进食

管癌细胞 KYSE30 在裸鼠体内的皮下及肺部成瘤能力,敲低 Lnc-J23 则能显著降低食管癌细胞在裸鼠皮下成瘤的大小和体积,降低尾静脉注射 KYSE30 细胞在裸鼠肺部成瘤的数量和大小<sup>[13]</sup>。

**抑癌作用:** 文献报道,相较于皮下注射食管癌 TE-9 细胞,注射过表达 LncRNA LOC441178 的细胞具有较弱的皮下成瘤能力、较小的肿瘤体积和瘤重,进一步研究发现,LncRNA LOC441178 的抗食管癌作用是通过抑制 Akt/FOXO3a 途径实现的<sup>[14]</sup>。与食管癌 EC9706 细胞比,过表达 LncRNA GAS8-AS1 的 EC9706 细胞在裸鼠皮下形成肿瘤的比例显著减低,且肿瘤的体积显著降低,表明 LncRNA GAS8-AS1 能够在体内抑制食管癌的发生和发展<sup>[15]</sup>。Chang 等<sup>[16]</sup>发现,LncRNA-TUSC7 在食管癌组织和细胞中低表达,是潜在的抑癌基因;皮下成瘤实验表明,过表达 LncRNA-TUSC7 能抑制 KYSE30 细胞的皮下成瘤能力,抑制肿瘤体积、大小和重量,并增强顺铂的治疗效果。据报道,与过表达 LncRNA CASC2 的细胞比,干扰 LncRNA CASC2 表达可促进食管癌 EC109 细胞的皮下成瘤能力,加速肿瘤生长速度,增大肿瘤体积和重量,增加肿瘤组织中增殖相关蛋白 Ki67 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达;HE 染色结果知,干扰 LncRNA CASC2 表达可增加皮下移植瘤组织中肿瘤细胞数目; Tunnel 染色表明,干扰 LncRNA CASC2 减少瘤组织中凋亡细胞数目<sup>[17]</sup>。

综上,体内动物实验表明 LncRNA 参与食管癌的发生与发展,同时具有抑癌和促癌双重角色。正常机体条件下,机体癌基因与抑癌基因处于动态平衡过程,当平衡被打破,两者失衡,影响癌症的发生与发展。分析文献可知,LncRNA 的促癌机制可能与其促进血管生成、抑制细胞凋亡、促进癌细胞增殖、促进上皮间质化 (EMT)、利于形成肿瘤炎症微环境有关,抑癌机制可能与其抑制癌细胞生长、活力,干扰细胞周期等有关<sup>[18-19]</sup>。

### 2 LncRNA 对食管癌发生发展的影响——细胞实验

凋亡受阻、无限增殖、向周围组织侵袭和转移、对放化疗不敏感是肿瘤细胞异于正常细胞最主要

的特点,抑制肿瘤细胞的恶性生物学行为并诱导其凋亡是抗癌研究的主要方向。在影响细胞恶性生物学行为的众多因素中,LncRNA 能从基因层面参与肿瘤的调控。因此,从 LncRNA 的角度探究食管癌的发生与发展具有重要意义。

## 2.1 LncRNA 对食管癌细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响

**促癌作用:**体外细胞实验表明,LncRNA LINC01980 能促进食管鳞癌细胞的生长,抑制其凋亡,加速细胞周期进程并促进其增殖,而干扰 LncRNA LINC01980 表达则能抑制食管鳞癌细胞生长,促进其凋亡,减缓细胞周期进程并加速细胞凋亡<sup>[20]</sup>。徐萌博等<sup>[21]</sup>发现,LncRNA HOXA11-AS 在食管癌 Eca-109 细胞中高表达,下调 LncRNA HOXA11-AS 表达可通过上调 miR-506-3p 抑制 Eca-109 细胞增殖活性并促进其凋亡。Liu 等<sup>[12]</sup>发现,LncRNA LINC00467 可通过海绵吸附作用抑制 miR-485-5p 的表达,从而促进食管癌细胞 KYSE510、TE-19 的增殖和阻碍其凋亡。LncRNA LINC00667 在食管癌细胞系 Eca-109、KYSE150、TE-1 和 TE-13 中高表达,能抑制细胞凋亡,并促进细胞的增殖、侵袭和迁移,且 LINC00667 的促癌作用是通过竞争性吸附 miR-200b-3p,进而促进葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3, SLC2A3) 高表达实现的。沉默 LINC00667 则可通过升高 miR-200b-3p、降低 SLC2A3,增加食管癌细胞的凋亡,并抑制细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[7]</sup>。LncRNA LNC01852 在人食管癌细胞系 EC9706、KYSE30、TE-13 中表达水平显著高于正常食管上皮细胞 HET-1A,敲低 LncRNA LNC01852 表达能通过上调 EC9706 细胞中促凋亡分子 p53 和 Bax 的蛋白和 mRNA 表达,抑制抗凋亡分子 Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达诱导细胞凋亡,同时抑制细胞增殖能力和菌落形成能力<sup>[22]</sup>。综上,LncRNA 可通过调节 miRNA、糖代谢相关指标、干扰细胞周期、p53-Bcl-2/Bax 凋亡信号通路以及细胞侵袭和迁移能力等发挥促癌作用。

**抑癌作用:**过表达 LncRNA LOC441178 能显著抑制食管癌 TE-9 和 Eca-109 细胞的 DNA 合成能力、增殖能力,并可通过抑制 miR-182 甲基化诱导 TE-9 和 Eca-109 细胞凋亡、抑制食管鳞癌细胞生长和迁移<sup>[14]</sup>。吴菁等<sup>[23]</sup>发现,LncRNA AL158206.1 在食管癌 Eca109、KYSE30、TE-13 和 EC9706 细胞中低表达,以 KYSE30 中表达量最低,上调 LncRNA

AL158206.1 可明显抑制 KYSE30 细胞的增殖和迁移能力。孙磊<sup>[15]</sup>发现,敲低 LncRNA GAS8-AS1 能增加食管癌细胞 KYSE140 和 KYSE510 细胞的增殖能力、克隆形成能力、增加位于 G1/S 期肿瘤细胞的比例,抑制凋亡;过表达 LncRNA GAS8-AS1 能抑制食管癌 EC9706 细胞的存活、增殖,促进凋亡。LncRNA MIR31HG 在食管癌细胞系 Eca-109、EC-1 和 KYSE30 中低表达,过表达 LncRNA MIR31HG 可通过阻滞细胞 G1 到 S 期的进程,上调 p53、Caspase3 的 mRNA 和蛋白质表达,下调 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白质表达抑制 Eca-109、EC-1 和 KYSE30 细胞的增殖活性<sup>[24]</sup>。LncRNA XLOC005009 在食管癌细胞中低表达,过表达 LncRNA XLOC005009 可抑制 Eca-109、KYSE170 细胞的侵袭和迁移能力,并使细胞阻滞于 S 期从而降低细胞的增殖活性<sup>[25]</sup>。即 LncRNA 可通过调节 miRNA 甲基化、抑制细胞增殖和迁移能力、上调促凋亡蛋白的表达、抑制抗凋亡蛋白表达以及诱导细胞周期阻滞等发挥抗癌作用。

## 2.2 LncRNA 对食管癌细胞化疗抵抗的影响

化疗是精准医学时代下重要的治疗手段,在诱导食管癌细胞凋亡和抑制其侵袭等方面疗效确切,但因癌细胞的异质性常导致安全剂量范围内癌细胞对药物的敏感性低,造成化疗失败<sup>[26]</sup>。其中,LncRNA 的异常表达是影响癌细胞化疗抵抗的重要因素。因此,明确 LncRNA 在食管癌细胞化疗抵抗中扮演的角色(促进或抑制),并靶向抑制或增加肿瘤细胞内异常表达的 LncRNA,是增加癌细胞对药物的敏感性和提高临床治疗效果的关键手段。

**促癌作用:**Zhu 等<sup>[27]</sup>发现,LncRNA EMS 在食管癌细胞系 Eca-109、EC9706、TE-1、TE-10、KYSE150 和 KYSE450 中的表达高于正常食管上皮细胞 HET-1A;低氧状态可通过增加 LncRNA EMS 的水平降低 miR-758-3p 的表达,从而抑制维尔姆肿瘤 1 相关蛋白(WTAP)蛋白和 mRNA 的表达,最终降低 Eca-109 细胞对顺铂的敏感性,增强 Eca-109 细胞对顺铂的耐药性。Liu 等<sup>[28]</sup>发现,与正常食管上皮细胞 HET-1A 比,Lnc-MCEI 在食管鳞状细胞系 TE-1、KYSE-30、Eca-109 和 EC9706 中高表达,敲除 Lnc-MCEI 可增加 KYSE30、Eca-109 细胞对顺铂的敏感性,进而提高抑制细胞增殖和克隆形成能力的抑制作用,并增加细胞凋亡。LncRNA LINC01270 在食管癌组织和细胞中高表达,并能通过招募 DNA 甲基转移酶 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 启动 GSTP1 启动子

甲基化,从而导致食管癌细胞的增殖、迁移、侵袭和耐药性;沉默 LncRNA LINC01270 可增强食管癌细胞对 5-氟尿嘧啶(5-FU)的敏感性、抑制其增殖、侵袭和迁移能力<sup>[29]</sup>。Zang 等<sup>[30]</sup>发现,基因敲除 LncRNA TP73-AS1 可增强食管癌细胞 EC9706 和 KYSE30 对 5-FU 和顺铂的化疗敏感性,在体内外减弱食管癌细胞的增殖能力,是食管癌潜在的治疗靶点。LncRNA HOTAIR 在食管癌 Eca-109、KYSE150 和 TE-1 细胞中高表达,且 5-FU 耐药 TE-1 细胞(TE-1/5-FU) LncRNA HOTAIR 水平高于 TE-1 细胞,敲除 LncRNA HOTAIR 能增加 TE-1/5-FU 细胞对 5-FU 的敏感性,抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡<sup>[31]</sup>。Li 等<sup>[32]</sup>发现,食管癌 Eca-109 细胞中 LncRNA HOTTIP 表达随阿霉素的浓度增大而增加,提取阿霉素处理后的 Eca-109 细胞外小泡(EVs)预处理 Eca-109 可增加该细胞增殖指数,降低阿霉素对细胞的杀伤性,且 LncRNA HOTTIP 促癌作用是通过增加 ABCG2 的表达实现的。

**抑癌作用:**研究表明,LncRNA-TUSC7 在食管癌细胞 TE-13、KYSE140、EC9706 和 KYSE30 中低表达,低水平的 LncRNA-TUSC7 与食管癌细胞化疗抵抗相关,过表达 LncRNA-TUSC7 则能通过抑制 miR-224 提高鳞癌细胞差异表达蛋白酶 1(DESC1)蛋白和 mRNA 的表达,从而增加 EC9706 和 KYSE30 对顺铂和 5-FU 的敏感性<sup>[16]</sup>。单次给药时约 85% 的 5-FU 会被二氢嘧啶脱氢酶(DYPD)降解,造成抗肿瘤效果不佳。对 5-FU 表现出耐药性的食管癌患者肿瘤组织中 LINC00261 低表达,过表达 LINC00261 能显著抑制 TE-1/5-FU 和 TE-5/5-FU 细胞的增殖和抗凋亡能力,该作用是通过介导 DYPA 甲基化依赖性抑制从而提高细胞对 5-FU 的敏感性实现的<sup>[33]</sup>。

综上,LncRNA 可通过介导 miRNA 的表达调节耐药相关 mRNA 或蛋白的表达、影响相关 DNA 甲基化、增加或抑制药物代谢相关酶的表达,调节癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移能力,从而发挥促癌和抗癌作用。

### 2.3 LncRNA 对食管癌细胞放疗抵抗的影响

放疗是临床治疗食管癌的主要手段,放疗抵抗是肿瘤局部复发和转移的主要因素。因此,有必要寻找潜在的治疗靶点以增强患者对放疗的敏感性。现有研究表明,LncRNA 表达异常可导致肿瘤细胞对射线的敏感性降低,是潜在的增敏靶点。

**促癌作用:**Li 等<sup>[34]</sup>发现,干扰 Lnc Rpph1 的表

达不影响 TE-1 和 KYSE150 细胞的集落大小和存活率,但给予射线照射可剂量依赖性降低细胞存活率、增值率、侵袭和迁移能力,并增加凋亡率,且 siRNA-Rpph1 可通过增加促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3、降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达和扰乱细胞周期,抑制食管癌细胞增殖、迁移和促进其凋亡,增加肿瘤细胞对射线的敏感性。LncRNA Linc-POU3F3 是定位于垂体特异性转录因子-3 基因附近的反向 LncRNA,参与食管癌在内的多种肿瘤细胞的恶性生物学行为。研究表明,LncRNA Linc-POU3F3 在食管癌 ECA109、TE-1、TE-2 及 TE-13 细胞中高表达,诱导低分化食管癌细胞 TE-13 放疗抵抗后发现 Linc-POU3F3 显著上调;敲低 Linc-POU3F3 则能显著增强 ECA109 细胞对放疗的敏感性,并降低肿瘤干细胞(CSCs)标志物 CD44、CD133 及 CD90 表达;过表达 Linc-POU3F3 则能通过增加 CD44、CD133 及 CD90 的表达增强 ECA109 细胞的抵抗能力<sup>[35]</sup>。据报道,乏氧状态下食管癌细胞株 KYSE150、TE-1 和 Eca-109 中 LncRNA LINC01116 显著升高,沉默 LINC01116 能增加辐射致乏氧条件下食管癌细胞株(KYSE-150-H)的 DNA 损伤修复标记物  $\gamma$ -h2ax 的表达。而过表达 LINC01116 则能减少射线引起的  $\gamma$ -h2ax 的表达,并加速细胞的修复<sup>[36]</sup>。LncRNA H19 在放射耐受细胞系 KYSE150 (KYSE150R)中高表达,且细胞存活率、增殖速率、球体形成能力、侵袭和迁移能力均强于其亲本细胞 KYSE150,敲低 LncRNA H19 则能通过增加 miR-22-3p 靶向下调 WNT1 从而抑制 ESCC 细胞的放射耐受性、增殖、迁移和干细胞特性<sup>[37]</sup>。即 LncRNA 可通过诱导细胞周期阻滞、促进 CSCs、加强食管癌细胞 DNA 损伤修复、增强细胞活力、增殖能力以及 EMT 等促进肿瘤发生与发展。

**抑癌作用:**参考文献<sup>[38]</sup>报道,Lnc MAGI2-AS3 在食管癌患者肿瘤组织和 KYSE30、KYSE150、KYSE450 细胞中低表达,尤以 KYSE150 细胞中表达量最低,且在射线抵抗 KYSE150 细胞(KYSE150R)中的表达量显著低于 KYSE150 细胞,表明 Lnc MAGI2-AS3 低表达与食管癌细胞放疗抵抗相关。同源异型盒基因 B7(HOXB7)属于转录因子家族成员,可通过结合基因启动子区域调节基因转录,从而促进肿瘤的恶性进展。而过表达 Lnc MAGI2-AS3 可通过下调 HOXB7/EZH2,发挥癌细胞对射线的增敏作用<sup>[38]</sup>。研究表明,LncRNA GAS5 可通过抑制

miR-21 发挥抗肿瘤作用。而 miR-21 在 KYSE150R 细胞中高表达,与其放疗抵抗性相关,敲低 miR-21 可增加细胞对射线的敏感性,诱导肿瘤细胞 DNA 损伤,从而降低存活率<sup>[39-40]</sup>。综上,LncRNA GAS5、Lnc MAGI2-AS3 具有潜在的增加癌细胞对射线的增敏作用,其机制可能与调节基因转录、增强癌细胞 DNA 损伤和增加抑癌基因 miRNA 的表达有关。

### 3 LncRNA 在临床对食管癌发生发展的影响

肿瘤的早期筛查、诊断对其治疗和预后具有重要的推动价值,寻找潜在的诊断、治疗效果评价和预后评估标志物对降低组织癌变率和肿瘤恶化率具有重要意义。近年来,临床数据表明 LncRNAs 在多种信号通路中作为癌基因或肿瘤抑制因子发挥作用,在肿瘤的诊断、治疗和预后评估中发挥着重要作用,是潜在的敏感性最高的生物标志物。

#### 3.1 LncRNA 在食管癌诊断中的作用

Rahimnia 等<sup>[41]</sup>发现,Lnc-POU3F3 在食管鳞状细胞癌(ESCC)患者血清中高表达,并与患者家族史和 TNM 分期具有显著相关性,可作为 ESCC 的诊断生物标志物。Li 等<sup>[34]</sup>发现,Lnc Rpph1 在食管癌患者肿瘤组织中高表达,并与患者的不同短期反应、T 分期、N 分期和临床阶段相关,是食管癌潜在的诊断标志物。Lnc MIR31HG 在 ESCC 患者组织和血浆中的表达水平呈显著的正相关性并显著升高,敲除 Lnc MIR31HG 能显著抑制食管癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力,对预测 ESCC 的发病具有较高的诊断敏感性和特异性<sup>[42]</sup>。血清 Lnc LNC00993 水平在低分化食管癌、食管腺鳞癌及中晚期食管癌患者中的增高尤为显著,且与食管癌的组织学类型、TNM 分期、分化程度相关,与基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、癌胚抗原(CEA)联合能辅助临床对食管癌的诊断<sup>[43]</sup>。Jiao 等<sup>[44]</sup>发现,Lnc NR 039819、NR 036133、NR 003353、ENST00000442416.1 和 ENST00000416100.1 在食管癌患者血浆中表达水平显著高于食管炎患者和健康志愿者。而 ESCC 患者手术后,血浆中上述 5 种 LncRNAs 的水平显著降低,是 ESCC 诊断潜在的高效、无创性生物标志物。朱娇等<sup>[45]</sup>发现,LncRNA ITGA9-AS1 在食管癌患者血清中高表达,且在 III 期患者血清中的水平显著高于 I 期和 II 期;LncRNA ITGA9-AS1 单独用于食管癌的诊断时敏感性较低,与神经元特异性烯醇化酶联合时可提高诊断的敏感度。

#### 3.2 LncRNA 在食管癌预后评估中的作用

据报道,低表达的 Lnc LOC285194 与 ESCC 患者肿瘤大小、晚期 TNM 分期、淋巴结转移和远端转移显著相关。Kaplan-Meier 生存分析显示,Lnc LOC285194 低表达的患者无病生存率(DFS)和总生存率(OS)降低<sup>[46]</sup>。多变量分析进一步确定 Lnc LOC285194 的低表达是放疗反应、DFS 和 OS 的独立预后因素。Zhang 等<sup>[5]</sup>发现,Lnc SNHG6 在 ESCC 患者肿瘤组织中高表达,采用生存分析评价其预后价值表明,Lnc SNHG6 高表达的 ESCC 患者总体生存率低于 Lnc SNHG6 低表达患者。Sadeghpour 等<sup>[47]</sup>发现,LncRNA-BANCR 在 ESCC 患者肿瘤组织中表达水平显著高于正常组织,可促进肿瘤细胞的增殖,且与淋巴结转移、肿瘤分期呈正相关,并推测 LncRNA-BANCR 是食管癌转移的潜在预后标志物。钟咪等<sup>[6]</sup>发现,Lnc H19 在食管正常上皮组织中不表达,在肿瘤组织中高表达;且与接受同一治疗方案后存活超过五年的食管癌患者比,术后一年内死亡患者肿瘤组织中 Lnc H19 显著升高。高水平的 Lnc H19 与肿瘤大小、UICC 分期和短期生存率呈正相关,是 ESCC 患者不良预后的生物标志物。Huang 等<sup>[48]</sup>发现,LncRNA-MALAT1 在食管癌患者肿瘤组织中表达高于正常组织。卡方检验分析结果表明,LncRNA-MALAT1 与淋巴转移、远端侵袭和肿瘤细胞分化程度相关,Kaplan-Meier 生存曲线分析表明 LncRNA-MALAT1 高表达患者总生存期显著低于低表达患者。

结合体内外实验可知,LncRNA 可通过调节基因转录、转录后修饰(甲基化、去甲基化等)、调控 DNA 损伤修复相关蛋白、海绵吸附 miRNA 进而影响下游蛋白的表达、调控细胞周期、作用于凋亡和增殖相关信号通路等参与食管癌的发生与发展,是食管癌诊断、治疗和预后的潜在生物标志物。但与食管癌相关的 LncRNA 研究尚处于初级阶段,且数量繁多、机制不一,如何对其进行有效筛选并大范围用于临床尚需进一步研究。

### 4 讨论

食管癌是常见消化道恶性肿瘤,具有较高的发病率和死亡率,是亟需防治的恶性肿瘤之一<sup>[49]</sup>。发病隐匿、早期症状不典型是食管癌确诊时已处于中晚期的主要原因,因此有必要寻找敏感性高的生物标志物,以便在食管即将癌变或食管癌发病早期进

行手术或药物干预,降低其发病率和恶性进展程度。与生物小分子、传统蛋白、miRNA、RNA 等相比,LncRNA 具有复杂的二级结构,可与不同类型的 DNA、RNA 和蛋白质相互作用,在多种层面调控基因的表达,是肿瘤发生发展的重要调节因子<sup>[50]</sup>。体内外文献表明,LncRNA 在体内可影响食管癌的发生、肿瘤生长的速度和对化疗的敏感性,在体外可调节食管癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和对放疗的敏感性;临床报道表明,LncRNA 在患者肿瘤组织、血清和血浆中等表达异常,是潜在的标志物。综上,LncRNA 可用于食管癌的诊断、治疗和预后评估等。但目前对 LncRNA 的功能研究多集中于体外细胞实验,动物实验较少,将 LncRNA 系统用于食管癌的早期诊断、治疗和预后等尚需大量的实验室和临床数据作为支撑。此外,LncRNA 在食管癌的发生发展中具有双重调控机制,明确抑癌和促癌两大 LncRNA“类群”的特点和上下游调控通路,从而在早期诊断和筛查时针对性检测不同“类群”的 LncRNA 并及时干预其上下游通路,将更利于食管癌的临床诊断和治疗。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Soudeh GF, Hamed S, Sepideh D, et al. Expression profile of lncRNAs and miRNAs in esophageal cancer: Implications in diagnosis, prognosis, and therapeutic response [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9269-9290.
- [ 2 ] Zhao X, Lim F. Lifestyle risk factors in esophageal cancer: an integrative review [J]. *Crit Care Nurs Q*, 2020, 43(1): 86-98.
- [ 3 ] 张庆慧, 刘晓波, 李胜保, 等. 食管癌的发病现状及趋势分析 [J]. *湖北医药学院学报*, 2019, 38(2): 192-196.
- [ 4 ] Bhat AA, Nisar S, Maacha S. Cytokine-chemokine network driven metastasis in esophageal cancer; promising avenue for targeted therapy [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 2.
- [ 5 ] Zhang YL, Li RJ, Ding XL, et al. Upregulation of long non-coding RNA SNHG6 promote esophageal squamous cell carcinoma cell malignancy and its diagnostic value [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 1084-1091.
- [ 6 ] 钟咪, 张佳音, 饶美荣, 等. LncRNA SNHG1 对 IL-6 诱导的皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(2): 74-79.
- [ 7 ] Pan JD, Zang YH. LINC00667 promotes progression of esophageal cancer cells by regulating miR-200b-3p/SLC2A3 axis [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(7): 2936-2947.
- [ 8 ] Yan QH, Liu L, Yang H, et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 inhibits the proliferation and migration of esophageal squamous carcinoma cells by targeting FOXD1/miR-30a-5p axis and the effect of micro- and nano-particles on targeting transfection system [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17(7): 1380-1391.
- [ 9 ] 张世新. 长链非编码 RNA LINC01980 促进食管鳞癌发生发展的功能及机制研究 [D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2019.
- [ 10 ] 谭德立. 长链非编码 RNA H19 在食管癌发生发展中的功能及机制研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [ 11 ] Wu YY, Hu LW, Liang Y, et al. Long noncoding RNACASC9 promotes esophageal squamous cell carcinoma growth by negatively regulating PDCD4 expression through EZH2 [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 150.
- [ 12 ] Liu Z, Yang S, Chen X, et al. LncRNA LINC00467 acted as an oncogene in esophageal squamous cell carcinoma by accelerating cell proliferation and preventing cell apoptosis via the miR-485-5p/DPAGT1 axis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 36(3): 721-730.
- [ 13 ] 范新义. Lnc-J23 在食管癌中的功能及机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [ 14 ] 胡伟涛. 长链非编码 RNA LOC441178 过表达通过 miR-182 甲基化抑制食管癌细胞的增殖和迁移 [D]. 福州: 福建医科大学, 2021.
- [ 15 ] 孙磊. 长链非编码 RNA GAS8-AS1 在食管鳞癌中的作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2020.
- [ 16 ] Chang ZW, Jia YX, Zhang WJ, et al. LncRNA-TUSC7/miR-224 affected chemotherapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma by competitively regulating DESC1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 56.
- [ 17 ] 冯健. 长链非编码 RNA CASC2 在食管鳞状细胞癌中的作用研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [ 18 ] 王利然, 杨丽红, 宁文华, 等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 143-149.
- [ 19 ] 赵前乔, 关沧海, 吴昊天, 等. 睾丸发育相关基因 1 在肿瘤中的效应和机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(10): 117-120.
- [ 20 ] Zhang S, Liang Y, Wu Y, et al. Upregulation of a novel lncRNA LINC01980 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(1): 73-80.
- [ 21 ] 徐萌博, 赵天增, 杨金华. 长链非编码 RNA HOXA11-AS 靶向 miR-506-3p 调控食管癌细胞增殖和凋亡的机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(22): 4862-4866.
- [ 22 ] 李蓉蓉, 殷先利, 刘振洋, 等. LNC01852 通过调控 Bel-2 对食管癌 EC9706 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(22): 3889-3894.
- [ 23 ] 吴菁, 蒋志勇, 李奎生, 等. lncRNA AL158206.1/miR-340-5p/ARL4C 轴对食管癌增殖和迁移的调控作用 [J]. *中国医药指南*, 2021, 19(22): 1-4.
- [ 24 ] 陈晓琦, 陈欣菊, 张传雷, 等. LncRNA MIR31HG 通过诱导细胞周期阻滞抑制食管鳞癌细胞增殖活性 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2018, 45(7): 745-751.
- [ 25 ] 刘胜男. 长链非编码 RNA XLOC<sub>0</sub>05009 在食管鳞状细胞癌中

- 的表达调控及其功能机制的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [26] Wei JY, Meng GP, Wu J, et al. MicroRNA-326 impairs chemotherapy resistance in non small cell lung cancer by suppressing histone deacetylase SIRT1-mediated HIF1 $\alpha$  and elevating VEGFA [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 5685-5699.
- [27] Zhu ZJ, Pang Y, Jin G, et al. Hypoxia induces chemoresistance of esophageal cancer cells to cisplatin through regulating the lncRNA-EMS/miR-758-3p/WTAP axis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(13): 17155-17176.
- [28] Liu GM, Wei G, Chen G, et al. Lnc-MCEI mediated the chemosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma via miR-6759-5p to competitively regulate IGF2 [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(15): 2938-2950.
- [29] Li N, Zhao ZF, Miao F, et al. Silencing of long non-coding RNA LINC01270 inhibits esophageal cancer progression and enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil by mediating GSTP1 methylation [J]. *Cancer Gene Ther*, 2021, 28(5): 471-485.
- [30] Zang WQ, Wang T, Wang YY, et al. Knockdown of long non-coding RNA TP73-AS1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 19960-19974.
- [31] Zhang SY, Zheng FC, Zhang LQ, et al. LncRNA HOTAIR-mediated MTHFR methylation inhibits 5-fluorouracil sensitivity in esophageal cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 131.
- [32] Li YM, Liu YH, Chen GQ, et al. HOTTIP is upregulated in esophageal cancer and triggers the drug resistance [J]. *J BUON*, 2021, 26(3): 1056-1061.
- [33] Lin K, Jiang H, Zhuang SS, et al. Long noncoding RNA LINC00261 induces chemosensitization to 5-fluorouracil by mediating methylation-dependent repression of DPYD in human esophageal cancer [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1972-1988.
- [34] Li ZY, Li HF, Zhang YY, et al. Value of long non-coding RNA Rpph1 in esophageal cancer and its effect on cancer cell sensitivity to radiotherapy [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(15): 1775-1791.
- [35] 陈一川, 唐敬群, 李乐之, 等. Linc-POU3F3 对食管癌细胞放射治疗抵抗及肿瘤干细胞标志物的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2021, 46(6): 583-590.
- [36] 高嫣妮. LINC01116 在食管癌乏氧微环境相关辐射抵抗中的作用及其机制的研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2020.
- [37] 罗文广. MiR-155-5p 和 LncRNA H19 在食管鳞癌细胞放射耐受中的作用及机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [38] Cheng WF, Shi XL, Lin MQ, et al. LncRNA MAGI2-AS3 overexpression sensitizes esophageal cancer cells to irradiation through down-regulation of HOXB7 via EZH2 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 552822.
- [39] 孙思洁, 张海兵, 耿晓如, 等. miR-21 对食管癌细胞放疗敏感性的作用及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2022, 47(1): 20-25.
- [40] Lyu K, Xu Y, Yue HJ, et al. Long non-coding RNA GAS5 acts as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma via miR-21 [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 8487-8498.
- [41] Rahimnia H, Moradi A, Javid N, et al. Overexpression of long non-coding RNA POU3F3 in esophageal squamous cell carcinoma is associated with TNM Stage and family history [J]. *JCBR*, 2018, 2(4): 48-53.
- [42] Sun KY, Zhao XW, Wan JH, et al. The diagnostic value of long non-coding RNA MIR31HG and its role in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Life*, 2018, 202: 124-130.
- [43] 李筱, 张静, 向慧敏. 血清长链非编码 RNA LNC00993 联合 MMP-2 和 CEA 在食管癌诊断和预后中的研究 [J]. *川北医学院学报*, 2019, 34(1): 121-125.
- [44] Jiao ZC, Yu A, Rong WW, et al. Five-lncRNA signature in plasma exosomes serves as diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 15002-15010.
- [45] 朱娇, 孙国才, 刘素荣, 等. 食管癌患者血清神经元特异性烯醇化酶与长链非编码 RNA ITGA9-AS1 水平联合检测的实验诊断价值研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(5): 62-64, 99.
- [46] Tong YS, Zhou XL, Wang XW, et al. Association of decreased expression of long non-coding RNA LOC285194 with chemoradiotherapy resistance and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 233.
- [47] Sadeghpour S, Ghorbian S. Evaluation of the potential clinical prognostic value of lncRNA-BANCR gene in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(1): 991-995.
- [48] Huang CX, Yu ZL, Yang H, et al. Increased MALAT1 expression predicts poor prognosis in esophageal cancer patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 8-13.
- [49] 吴凯, 任强. MiR-338-3p 通过靶向 WNK1 影响食管癌细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(10): 85-92.
- [50] Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 96-118.

李艺,李永生. 静脉畸形动物模型建立的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 128-134.

Li Y, Li YS. Research progress on the establishment of animal models of venous malformations [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 128-134.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.017

## 静脉畸形动物模型建立的研究进展

李 艺<sup>1,2</sup>, 李永生<sup>2\*</sup>

(1.昆明医科大学口腔医学院,昆明 650500;2.云南省第一人民医院口腔颌面外科,昆明 650032)

**【摘要】** 静脉畸形(venous malformations, VM)是先天性脉管畸形中最常见的类型,目前发病机制尚未完全阐明,治疗方法尚不成熟。动物模型在VM病理机制及治疗方法的研究中发挥了至关重要的作用。本文综述了VM基本发病机制及国内外VM动物模型研究现状,阐述了几种常见模型构建方法及结果,同时探讨了模型的优缺点,以期为研究者选用和建立实验动物模型提供参考。

**【关键词】** 静脉畸形;动物模型;TIE2;PIK3CA

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0128-07

### Research progress on the establishment of animal models of venous malformations

LI Yi<sup>1,2</sup>, LI Yongsheng<sup>2\*</sup>

(1. School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First People's Hospital of Yunran Province, Kunming 650032)

**【Abstract】** Venous malformations (VM) are the most common type of congenital vascular malformations. At present, their pathogenesis has not been fully elucidated, and treatment strategies are not yet mature. Animal models play important roles in the study of the pathological mechanisms and treatment of VM. This paper summarizes the basic pathogenesis of VM and the research status of VM animal models at home and abroad, expounds several common model construction method and result, and discusses the advantages and disadvantages of the models to provide a reference for researchers when selecting and establishing experimental animal models.

**【Keywords】** venous malformation; animal model; TIE2; PIK3CA

静脉畸形(venous malformations, VM)是一种常见的脉管性疾病,主要由扩张迂曲的静脉构成;发病率为1:5000~1:10000,无性别差异;可遍及全身,病变主要位于皮肤和粘膜,也可位于更深的结构组织如肌肉和内脏,在面颈部好发于颊、颈、眼睑、唇等<sup>[1]</sup>。VM的临床表现以触之柔软且可被压缩的蓝色或深紫色血管团块为主,有时可触及静脉

石,在组织病理学上VM的病变特征以被血管内皮细胞内衬的通道覆盖着稀疏且分布不规则的平滑肌细胞为主<sup>[2-3]</sup>。位于面部浅表的VM大多可通过临床检查诊断,而位于颈深处的病变则需借助穿刺检查或B超、MRI、MRA等影像学检查<sup>[4-5]</sup>。由于对VM的发病机制认识不足,因此治疗长期以来仅局限于硬化注射、激光疗法及手术治疗等<sup>[6-8]</sup>。但是

**【基金项目】** 云南省“万人计划”名医专项(YNWR-MY-2019-024);昆明医科大学研究生创新基金(2021S141)。

**【作者简介】** 李艺(1994—),女,硕士,研究方向:口腔颌面部肿瘤及静脉畸形的基础研究。E-mail: 20190224@kmmu.edu.cn

**【通信作者】** 李永生(1963—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:口腔颌面部肿瘤及脉管畸形的研究。

E-mail: liyongshengkm@yeah.net

硬化注射可导致炎症、组织纤维化甚至坏死,且通常需多次才能充分缓解症状;手术治疗激光疗法等通常受病变的大小与位置所限,并且手术中常无法完全切除病变组织,往往导致复发给治疗带来困难;散发性和浸润性 VM 往往传统治疗方法受限且疗效不佳<sup>[3,9-11]</sup>。

近年来,人类遗传学和分子生物学在 VM 的病理机制方面取得了突破性进展。已有的研究显示,受体酪氨酸激酶与免疫球蛋白和表皮生长因子同源域-2 (receptor tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2, *TIE2*)、编码磷酸肌醇 3-激酶 PI3K 的 p110 $\alpha$  催化亚基 (*PIK3CA*)、丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-

activated protein kinases, *MAPK*) 等基因的体细胞突变从而导致 VM 发生<sup>[12-15]</sup>。临床中约一半以上的 VM 是由于 *TIE2* 的功能获得性突变导致。在 *TIE2* 突变阴性的 VM 中,约有一半是由于 *PIK3CA* 的激活突变<sup>[13,15-17]</sup>。基于以上基本发病机制,国内外学者不断探索建立及完善 VM 的动物模型以更深入的研究该疾病具体机制及治疗措施等。目前,VM 动物模型可根据疾病的基因突变类型分为 *TIE2* 突变的动物模型, *PIK3CA* 突变的动物模型及其他类型。本文通过总结这些动物模型建立的方法及结果,针对其优势,适用条件及不足进行了详细的评述,为研究者选择和建立动物模型提供参考(表 1、表 2)。

表 1 *TIE2* 突变的静脉畸形动物模型  
Table 1 Animal model of venous malformation with *TIE2* mutation

分类 Sort	动物 Animal	操作方法 Method	时间 Time	造模结果 Result	参考文献 References
基于 HUVEC 移植模型 Transplant model based on HUVEC	6~7 周龄雄性裸鼠 6~7 weeks old male nude mice aged	用 <i>TIE2</i> -L914F 突变的逆转录病毒感染 HUVECs 后加入基质胶混匀,将其注射于裸鼠下背两侧。 After HUVECs was infected with <i>TIE2</i> -L914F mutant retrovirus, matrix glue was mixed and injected into both sides of the lower back of nude mice.	7 d	鼠体重和对照组无差别;注射部位形成血管样团块并随时间增加团块不断增大;切片可见不规则管状内含红细胞且 CD31 及 $\alpha$ SMA 成阳性;超声示血流为静脉血。 There was no difference in body weight between the control group and the control group; vascular masses were formed at the injection site and increased with time; sections showed that the irregular channels contained red blood cells and CD31 and $\alpha$ SMA were positive; ultrasound showed that the blood flow was venous blood.	[18-20]
	6~8 周龄雌性重度联合免疫缺陷小鼠 6~8 weeks old female SCID	将静脉畸形 <i>TIE2</i> 突变中常见位点的逆转录病毒感染 HUVECs,将其只作为内皮细胞球体后加入低生长因子基质胶和凝血酶混合物后注射至鼠腹侧。 The retrovirus at the common site of <i>TIE2</i> mutation in venous malformations was infected with HUVECs and injected into the ventral side of mice after adding a mixture of low growth factor matrix glue and thrombin as endothelial cell spheres.	10 d	鼠注射部位形成血管样团块;镜下可见异常增大的血管及平滑肌分层并不规则排列。 Vascular masses were formed at the injection site of mice, and abnormally enlarged blood vessels and smooth muscle layers were not arranged regularly under electron microscope.	[21]
基于人异种移植模型 Based on human xenotransplantation model	5~6 周龄雄性裸鼠 5~6 weeks old male nude mice aged	取患者静脉畸形组织及病变部位血液,分离培养并扩增内皮细胞后,基因测序确定突变类型后悬浮于基膜细胞外基质,于鼠背两侧注射。 The blood of the venous malformation tissue and lesion site of the patient was taken, and then the endothelial cells were isolated, cultured and amplified. The mutation type was determined by gene sequencing and suspended in the basement membrane extracellular matrix, and injected into the dorsal side of the mice.	9 d	注射部位形成蓝色血管样团块;镜下可见扩大的血管内衬较薄的内皮细胞层,免疫组织化学染色显示病变血管部位内皮细胞为人源。 A blue vascular-like mass was formed at the injection site, the enlarged blood vessels lined with thin endothelial cells could be seen under the light microscope, and immunohistochemical staining showed that the endothelial cells in the diseased vessels were human.	[22-24]

## 1 *TIE2* 突变动物模型

已有研究显示, *TIE2* 是血管生成素 (angiopoietin, ANGPT) 家族的受体, 主要在内皮细胞中表达<sup>[27]</sup>。ANGPT1 和 ANGPT2 分别与 *TIE2* 结合, 在调节血管生成、血管重塑和血管稳定及完整性

方面发挥重要作用<sup>[18, 28-30]</sup>。临床中, 大多数 VM 是由于酪氨酸激酶受体 *TIE2* 的体细胞功能获得性突变引起, 并可能导致 VM 的所有 4 种亚型: VMCM, VM, MVM 和 BRBN, 77% 的基因突变阳性患者是由于体细胞 L914F 突变, 也就是 *TIE2* 的第 914 位亮氨酸

表 2 *PIK3CA* 突变的静脉畸形动物模型  
Table 2 Animal model of venous malformation with *PIK3CA* mutation

分类 Sort	动物 Animal	操作方法 Method	时间 Time	造模结果 Result	参考文献 References
	基因小鼠 Gene mouse	基因小鼠品系 LoxP-STOP-LoxP (LSL)- <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> 使其活化, 最后与 Sprr2f-Cre 菌株杂交。 The transgenic mouse strain LoxP-STOP-LoxP (LSL)- <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> was activated and hybridized with Sprr2f-Cre strain.	4 周 4 weeks	<i>PIK3CA</i> <sup>spr2f-Cre</sup> 小鼠同窝幼仔在 4-10 周内出现后肢麻痹; 镜下可见脊柱病变血管异常扩张并有大量血池及出血; 皮肤病变部位镜下可见内皮细胞异常增殖, 内皮细胞衬里和血红素-蛋白沉积。 The offspring of <i>PIK3CA</i> <sup>spr2f-Cre</sup> mice showed hindlimb paralysis within 4-10 weeks. Microscopically, abnormal dilatation of blood vessels and massive blood pool and bleeding could be seen in spinal lesions. Abnormal proliferation of endothelial cells, lining of endothelial cells and deposition of heme-protein could be seen in the site of skin lesions.	[13]
基因工程动物模型 Genetically modified animal model	基因小鼠 Gene mouse	<i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> 与 T-CreERT2 小鼠杂交。当小鼠怀孕 7.5 d 后向其腹腔胚胎注入高剂量的 4-OHT。 <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> was hybridized with T-CreERT2 transgenic mice. When the mice were pregnant for 7.5 d, a high dose of 4-OHT was injected into their abdominal embryos.	3 周 3 weeks	胚胎小鼠部分致死, 存活幼仔可见多灶性弥散性血管畸形病变; 血管造影可见下腔静脉及门静脉血管异常扩张; 镜下可见壁薄且不规则扩张血管。 Part of the embryonic mice died, and the surviving infants showed multifocal diffuse vascular malformations, angiography showed abnormal dilatation of inferior vena cava and portal vein, thin-walled and irregular dilated vessels could be seen under microscope.	[16]
	基因小鼠 Gene mouse	R26- <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> 与 Cdh5-CreERT2 转基因小鼠杂交, 得到子代小鼠, 然后在子代小鼠后腿肌肉注射 4-OH 诱导突变型 <i>PIK3CA</i> 蛋白的内皮细胞表达。 R26- <i>PIK3CA</i> <sup>H1047R</sup> was hybridized with Cdh5-CreERT2 transgenic mice to obtain offspring, and then 4-OH was injected into the hind leg muscle of offspring mice to induce the expression of mutant <i>PIK3CA</i> protein in endothelial cells.	1 周 1 week	注射部位血管样改变; 镜下可见由不规则排列的内皮细胞构成的异常扩张血管, 并且有大小不一的血管团。 Vascular-like changes at the injection site; microscopically, the abnormally dilated blood vessels were composed of irregularly arranged endothelial cells and vascular clusters of different sizes.	[25]
移植模型 Transplant model	6~7 周龄雄性裸鼠 6~7 weeks old male nude mice aged	取患者静脉畸形组织及病变部位血液, 分离培养并扩增内皮细胞后, 基因测序确定突变类型后悬浮于基膜细胞外基质, 在鼠背两侧注射。 After the endothelial cells were isolated, cultured and amplified from the venous malformation tissue and the blood of the diseased site, the type of mutation was determined by gene sequencing and suspended in the extracellular matrix of the basement membrane and injected into the dorsal and bilateral sides of the mice.	11 d	小鼠注射部位可见血管化组织形成; 镜下可见具有扩大的淋巴管和充满血液的血管; 免疫组化显示病变血管部位内皮细胞为人源。 Vascularized tissue formation can be seen at the injection site of mice, enlarged lymphatic vessels and blood-filled blood vessels can be seen under the microscope; immunohistochemistry shows that the endothelial cells of the diseased vessels are of human origin.	[13, 26]

酸突变成苯丙氨酸<sup>[15,17]</sup>。所有 *TIE2* 突变的共同特征是 *TIE2* 受体的非配体依赖性磷酸化,这将导致其下游的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和 RAS/MAPK/ERK 信号通路被激活,最终导致 VM 的发生<sup>[21, 31-32]</sup>。

### 1.1 基于人脐静脉内皮细胞的移植模型

Boscolo 等<sup>[18]</sup>首先建立了基于 *TIE2*-L914F 的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 移植模型,并用此模型探究了 mTOR 抑制剂雷帕霉素靶向作用于 VM 的效果,开辟了 VM 分子治疗的新篇章。随后 Li 等<sup>[19-20]</sup>用此方法建立鼠 VM 动物模型用于改善分子治疗的实验研究以及探究 VM 的发病机制。操作如下:首先分别用表达全长的 *TIE2*-WT 和 *TIE2*-L914F 的逆转录病毒感染 HUVECs,检测到 HUVEC-*TIE2*-L914F 中 *TIE2* 蛋白磷酸化增加后,将两组细胞以  $2.5 \times 10^6$  个悬浮于 200  $\mu$ L 基质胶中;然后将两组细胞分别皮下注射至 6~7 周龄的雄性无胸腺 nu/nu 鼠下背部两侧 (*TIE2*-WT 组设置为对照组)后常规饲养;最后用卡尺测量每天观察测量鼠病灶面积。结果显示:在注射后的第 7 天, HUVEC-*TIE2*-L914F 实验组裸鼠形成血管样病变团块,并且随着时间的增加病变团块不断增加。用组织病理学方法检测到,血管团块样组织中可见不规则扩大的管腔内包含大量红细胞,人特异性抗 CD31 阳性且  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> 血管内皮细胞薄而稀少。此外多普勒超声检查显示 VM 血流缓慢且无搏动,符合静脉血特征。此类模型是人内皮细胞产生的血管腔与鼠的脉管系统相连而形成,检测到的特征和婴儿血管瘤高度血管化组织不同,并且和人 VM 组织病变有一定的相似度。优点为建模过程较为简单并且时间周期较短,是目前使用最多的 VM 动物模型。缺点为此方法形成的病变为人工病变并非天然形成,与临床中人 VM 病变组织存在一定的差异,故常用于药物治疗效果的初步评估,更进一步研究 VM 发病的分子学机制需谨慎选择。

Nätynki 等<sup>[21]</sup>则是基于内皮移植法,将内皮细胞以球体形式移植到重度联合免疫缺陷小鼠 (severe combined immune-deficiency, SCID) 中,操作如下:首先将携带 *TIE2* 中 R849W、L914F、Y897F 和 R915 L 及其 Y897F-R915 L 双突变形式的逆转录病毒感染的 HUVECs;然后将其制备为 1000 个细胞/内皮细胞球体培养;最后加入降低生长因子的基质胶和凝血酶混合溶液注射到 6~8 周龄雌性 SCID 小鼠腹侧,每侧 1000 个球状体 (*TIE2*-WT 组设置为对照组)。结果显

示:注射 10 d 后实验组小鼠形成血管团块。组织病理学可见异常扩张的血管,电子显微镜下观察可见内皮细胞形态发生变化,并且可见血管平滑肌细胞分层且排列紊乱。值得注意的是, Y897F 和 R915 L 双突变组形成的血管团块的血管周围的细胞外基质胶原蛋白随机排列,非常类似于在 Y897F-R915 L 突变阳性的 VM 患者中检测到的变化。此动物模型建模方法及效果和 Boscolo 等<sup>[18]</sup>类似,主要区别在于使用动物上的差别和细胞培养基的成分,建模过程略微复杂,故未见有研究者再次使用。

### 1.2 基于人异种移植模型

近年来,基于人异体移植的 VM 模型相继被开发,为研究 VM 形成和其分子机制提供了可靠的载体。异体移植模型取于患者 VM 组织或 VM 血液中分离和扩增培养内皮细胞,异体移植之前确定 VM 患者为 *TIE2* 体细胞突变<sup>[22-23]</sup>。

Goines 等<sup>[22,24]</sup>和 Schrenk 等<sup>[23]</sup>开发了基于人异体移植模型,操作如下:取患者 VM 组织和 VM 血液中分离的细胞并扩增培养;然后用内皮细胞特异性标记物 CD31 的磁珠标记筛选 VM 内皮细胞,基因测序确定 VM 的突变类型;最后将 CD31 标记阳性的内皮细胞进行扩增,然后将其以  $2.5 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^6$  个悬浮于 200  $\mu$ L 预冷基质胶中,皮下注射到 5~6 周龄雄性无胸腺 nu/nu 鼠的下背部。结果显示由 *TIE2* 突变的内皮细胞产生的病变在注射 9 d 后可见蓝色的血管化病变部位。组织病理学检测可见扩大的血管内衬较薄且排列紊乱的内皮细胞,使用人类特异性凝集素 UEA-I 进行的免疫组织化学染色可以证实是在血管病变处的细胞源自植入的人类细胞。此模型同样由人病变的内皮细胞产生的血管腔与鼠脉管系统链接,并且形成的血管样团块非常类似于人 VM 病变。突出的优点是可以高度概括人类基因突变导致 VM 的异质性。但是,此模型的缺点是建立比较困难,是因为建模所需的细胞来自有限的人病理组织标本,并且从人病理组织中提取出的细胞较容易衰老从而不宜大量获得。此类模型适用于可获得大量人疾病组织标本的医院研究者。

## 2 *PIK3CA* 突变动物模型

*PIK3CA* 是编码磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) 的 p110 $\alpha$  催化亚基的基因<sup>[33-34]</sup>。研究显示 *PIK3CA* 突变可诱导 VM 的发生,其突变位点主要在螺旋区的外显子 9 区域和激酶区的外显子 20 区域,最常见的突变形式为 E542K、E545K、H1047R 体细胞突变。

*PIK3CA* 突变导致 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的慢性激活,从而导致 VM 的发生<sup>[17,33,35-36]</sup>。

## 2.1 基因工程动物模型

Castel 等<sup>[13]</sup>建立了 *PIK3CA*<sup>spr2f-Cre</sup> 突变的小鼠 VM 模型,并用此模型验证了 PI3K 抑制剂 BYL719 可有效治疗 *PIK3CA* 突变的胚胎小鼠中的 VM 及同种移植 VM 小鼠模型,为此基因突变的 VM 治疗提供了潜在的治疗方法。操作如下:用基因小鼠品系 LoxP-STOP-LoxP (LSL)-*PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 去除合成的转录/翻译 STOP 盒,然后使用 Cre-loxP 技术以组织特异性方式活化 *PIK3CA* 突变 H1047R 的表达,最后与 Spr2f-Cre 菌株杂交。结果显示:作为对照组的 *PIK3CA*<sup>spr2f-WT</sup> 小鼠未见异常,而 *PIK3CA*<sup>spr2f-Cre</sup> 小鼠同窝幼仔在 4~10 周内出现后肢麻痹。组织病理学检查可见脊柱病变部位血管异常扩张似“海绵状”,并伴有大量血池和白质、灰质的出血。Micro CT 可见实验组小鼠脊髓中有缓慢流动的血液并外渗;皮肤的病变部位用组织病理学检查可显示内皮细胞异常增殖并可见血红素-蛋白沉积。此方法建立的动物模型优点为模型小鼠的脊髓和皮肤病变非常类似于人类 VM,可高度模拟人类 VM 发病机制。但是其明显缺点为建立基因工程小鼠价格较高,过程繁琐且建模周期较长,此外其模型并不能直观的观察病变发生发展状况。此类模型可用于研究者探究 VM 发生发展的分子学机制。

Castillo 等<sup>[16]</sup>构建了 *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 小鼠中胚层特异性嵌合体突变模型,并探究了 *PIK3CA* 突变的 VM 的相关机制。操作如下:用 *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 与 T-CreERT2 小鼠杂交,获得 *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 中胚层特异性嵌合表达。在小鼠怀孕第 7 天,向其腹腔注入高剂量的三苯氧胺从而诱导 Cre 激活,使得胚胎中胚层的嵌合体 *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 表达。结果显示:*PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 胚胎小鼠具有一定胚胎致死性,但是部分成活的小鼠幼仔皮肤可见多灶性及弥散的异常扩张的静脉,计算机断层血管造影下可见泌尿生殖器下腔静脉和门静脉异常扩张,多普勒超声可证明病变部位的血流为静脉血。组织病理学检查可见病变部位由壁薄且不规则的血管组成,部分血管内含有组织性纤维蛋白血栓并伴有局灶性间质性出血,淋巴标记免疫染色可见零星分布的畸形淋巴管。以上特征表明 *PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 胚胎小鼠病变可诊断为 VM,与人类 VM 观察到的特征较相似。此基因小鼠模型和 Castel 等<sup>[13]</sup>建立的基因小鼠模型有相似的优缺点,除此之外还有明显的缺点为此模型建造过程中

导致全身高度病理性血管形成而致使其早期胚胎致死率较高,故建模效率较低。此模型适合研究者探索 VM 相关复杂表型综合征。

Di Blasio 等<sup>[25]</sup>通过在内皮细胞中局部表达 *PIK3CA* 激活突变建立了 VM 小鼠模型,并使用 PI3K/mTOR 抑制剂证明可以消退鼠 VM 病变。操作如下:将 R26-*PIK3CA*<sup>H1047R</sup> 与 Cdh5-CreERT2 转基因小鼠杂交,得到子代小鼠,然后在子代小鼠后腿部肌肉注射三苯氧胺诱导突变型 *PIK3CA* 蛋白的内皮细胞表达,观察注射部位在肌肉中的局部表达情况。结果显示:诱导 1 周后,注射部位出现明显的出血点和血管异常。组织病理学分析显示血管扩张,血管由厚层的形态异常且不规则排列的内皮细胞构成,并存在大小不一的细胞聚集团。这些现象与人 VM 病变组织相似。此模型相比 Castel 等<sup>[13]</sup>和 Castillo 等<sup>[16]</sup>有所改进,突出优点为可直接观察到病变组织发生发展情况,并且周期有所缩短。此模型可用于 *PIK3CA* 突变的 VM 分子治疗研究。

## 2.2 移植模型

Le Cras 等<sup>[26]</sup>开发出毛细血管静脉畸形 (CLVM) 的异体移植模型,并且用此动物模型进行 CLVM 发病机制的研究。其方法与 Goines 等<sup>[22]</sup>类似,首先从 CLVM 患者的病变组织及硬化注射治疗期间收集的病变部位血液中分离出内皮细胞并进行免疫磁珠纯化、免疫荧光鉴定和单细胞克隆扩增;然后使用 DNA 测序以确定 *PIK3CA* 突变;最后将  $2.5 \times 10^6$  个内皮细胞在 200  $\mu$ L 基质胶中混合均匀后其注入到 6~7 周龄的雄性无胸腺 nu/nu 小鼠腹部两侧。结果显示注射部位在 11 d 后可见血管化组织,组织病理学检查血管化组织中可见扩大的淋巴管和充满血液的血管,人泛内皮凝集素 Ulex europaeus 凝集素 I 表达阳性,与 CLVM 患者组织相似。Castel 等<sup>[13]</sup>也通过将 *PIK3CA* 突变的 VM 内皮细胞注射到免疫受损的裸鼠体内,细胞在注射后数周形成与原始病变组织学和外观相似的高度血管化和增生的肿块从而建立了 VM 动物模型。此模型与 *TIE2* 突变的人异种模型移植的 VM 建模方法及优缺点类似,适用于可获得大量人疾病组织标本的医院和进一步研究 CLVM 发病机制及治疗的研究者。

## 3 其他动物模型

在 VM 疾病治疗研究早期,研究者们使用兔正常静脉代替 VM 疾病血管用于药物治疗研究。白南<sup>[37]</sup>运用家兔颈静脉替代 VM 的血管进行平阳霉

素治疗 VM 的研究; Smithers 等<sup>[38]</sup>通过向家兔颈静脉注射乙醇来模拟 VM 硬化治疗后模型; Kulungowski 等<sup>[39]</sup>也通过向兔面静脉注射乙醇来建立面静脉硬化再狭窄的动物模型来证明贝伐单抗和干扰素减少硬化治疗后的静脉再通。由于兔正常静脉和 VM 疾病血管在组织病理方面存在较大差异,故使用兔正常静脉代替 VM 疾病血管用于实验研究没有较强的说服力,随着基因工程小鼠和基于内皮细胞移植模型的开发,此类模型已不再用于 VM 相关机制及治疗的研究。

在 VM 分子学机制探索初期, Wang 等<sup>[40]</sup>创建了使用鼠类病毒癌基因的转基因小鼠模型。在鼠类中,鼠多瘤病毒(PyV)会诱发多种肿瘤,包括淋巴瘤、海绵状血管瘤和肉瘤,鼠多瘤病毒中 T 抗原基因(PyMT)通过募集宿主未转化的内皮细胞使其迅速转化,继而使得鼠胚胎内皮细胞永生化,从而导致新生小鼠中血管肿瘤形成<sup>[41]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>首先基于 Tet-on 系统构建了含有与 TetR 融合的 NK10 基因的条件转基因质粒载体;然后使用显微注射技术将目的片段注射到 C57BL/6J 小鼠卵中;最后将其目的基因小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠交配获得子一代小鼠,在鼠 6 周时加入强力霉素和蔗糖以诱导 MT 基因表达。结果显示:加入强力霉素及蔗糖后 2 个月,小鼠的胸部皮肤出现了血管异常的病变,似畸形的静脉病变。此模型可能因为启动子控制的转基因表达局限性而导致诱导的 VM 小鼠数量很少,并且未进行相关基因突变研究,故没有被多数研究者继续运用。

#### 4 总结

VM 是口腔颌面部常见的一种先天性局限性血管发育异常,作用机制未完全明确。近年来,随着对 VM 分子学机制的探究发现 TIE2 或 PIK3CA 突变使其相应的受体非配体依赖性磷酸化从而导致其下游的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和 RAS/MAPK/ERK 信号通路被激活,最终导致 VM 的发生<sup>[21,31-32]</sup>。基于此机制研究者开发了不同基因突变的动物模型,研究者可根据研究基因的不同进行选择。除此之外,研究者还需进一步选择建模方法。根据建模方法不同可大致分为移植模型和基因工程小鼠模型。移植模型是人内皮细胞产生的血管腔与鼠脉管系统连接,优点是建模过程较为简单,缺点为模型病变是非天然形成,故此方法仅适用于研究治疗方法及效果的初步评估。基因工程小鼠模型是在鼠内皮细胞中选择性表达突变体 PIK3CA<sup>H1047R</sup> 的鼠系,优点

是可高度模拟人 VM 发病机制,缺点为过程繁琐并且造价高,故此方法更适用于探索 VM 发病机制相关研究。

目前, TIE2 功能获得性突变诱导 VM 的基因工程鼠模型尚未见报道,可能原因是 TIE2 为血管发育的关键基因,常规方法基因修饰后造成鼠在胚胎时期死亡。未来还需继续探索构建此基因突变动物模型的新方法,可比较不同方法建立的同一突变类型 VM 动物模型与人 VM 的异同,从而选择出最优的动物模型用于较常见突变基因导致 VM 的分子研究。基于 MAP3K3 突变导致的 VM 的动物模型也尚未报道,可能还需要探索大量的分子学基础以寻找建模方法。

标准的 VM 动物模型的缺失仍然是阻碍 VM 研究发展的关键原因之一,动物模型建立目前依然存在很大的挑战。因已有的 VM 动物模型还不够成熟或建立过程较为复杂,故并没有广泛用于 VM 的实验研究,未来还需继续寻找稳定可靠且更易于建立的动物模型方法,为 VM 的分子研究及靶向治疗提供实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Vogel SA, Hess CP, Dowd CF, et al. Early versus later presentations of venous malformations: where and why? [J]. *Pediatr Dermatol*, 2013, 30(5): 534-540.
- [2] Wassef M, Blei F, Adams D, et al. Vascular anomalies classification: recommendations from the International Society for the study of vascular anomalies [J]. *Pediatrics*, 2015, 136(1): e203-214.
- [3] Domp Martin A, Vikkula M, Boon LM. Venous malformation: update on aetiopathogenesis, diagnosis and management [J]. *Phlebology*, 2010, 25(5): 224-235.
- [4] 郑家伟, 赵怡芳, 秦中平, 等. 口腔颌面-头颈部静脉畸形诊治指南 [J]. *中国口腔颌面外科杂志*, 2011, 9(6): 510-517.
- [5] Kim H, Joh J, Labropoulos N. Characteristics, clinical presentation, and treatment outcomes of venous malformation in the extremities [J]. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, 2022, 10(1): 152-158.
- [6] Johnin K, Mori Y, Nakagawa S, et al. Venous malformation of the glans penis: "Every-5-mm" neodymium: yttrium-aluminum-garnet laser irradiation [J]. *Int J Urol*, 2021, 28(11): 1189-1191.
- [7] Lee WJ, Cho KR, Choi JW, et al. Stereotactic radiosurgery for orbital cavernous venous malformation: a single center's experience for 15 years [J]. *Acta Neurochir*, 2021, 163(2): 357-364.
- [8] Song D, Guo L, Sheng H, et al. DSA-guided percutaneous sclerotherapy for children with oropharyngeal low-flow venous

- malformation [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(5): 3405–3410.
- [9] Burrows PE. Endovascular treatment of slow-flow vascular malformations [J]. *Tech Vasc Interv Radiol*, 2013, 16(1): 12–21.
- [10] Aronniemi J, Castrén E, Lappalainen K, et al. Sclerotherapy complications of peripheral venous malformations [J]. *Phlebology*, 2016, 31(10): 712–722.
- [11] Boon LM, Vanwijck R. Medical and surgical treatment of venous malformations [J]. *Ann Chir Plast Esthet*, 2006, 51(4–5): 403–411.
- [12] Seront E, Vikkula M, Boon LM. Venous Malformations of the Head and Neck [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2018, 51(1): 173–184.
- [13] Castel P, Carmona FJ, Grego-Bessa J, et al. Somatic PIK3CA mutations as a driver of sporadic venous malformations [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(332): 332–342.
- [14] Couto JA, Vivero MP, Kozakewich HP, et al. A somatic MAP3K3 mutation is associated with verrucous venous malformation [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 96(3): 480–486.
- [15] Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, et al. Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(1): 118–124.
- [16] Castillo SD, Tzouanacou E, Zaw-Thin M, et al. Somatic activating mutations in PIK3CA cause sporadic venous malformations in mice and humans [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(332): 332–343.
- [17] Soblet J, Limaye N, Uebelhoer M, et al. Variable somatic TIE2 mutations in half of sporadic venous malformations [J]. *Mol Syndromol*, 2013, 4(4): 179–183.
- [18] Boscolo E, Limaye N, Huang L, et al. Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3491–3504.
- [19] Li X, Cai Y, Goines J, et al. Ponatinib combined with rapamycin causes regression of murine venous malformation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(3): 496–512.
- [20] Li Y, Shang Q, Li P, et al. BMP9 attenuates occurrence of venous malformation by maintaining endothelial quiescence and strengthening vessel walls via SMAD1/5/ID1/ $\alpha$ -SMA pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 147: 92–107.
- [21] Nätyynki M, Kangas J, Miinalainen I, et al. Common and specific effects of TIE2 mutations causing venous malformations [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(22): 6374–6389.
- [22] Goines J, Li X, Cai Y, et al. A xenograft model for venous malformation [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(4): 725–735.
- [23] Schrenk S, Goines J, Boscolo E. A patient-derived xenograft model for venous malformation [J]. *J Vis Exp*, 2020, (160): 61501.
- [24] Goines J, Boscolo E. A xenograft model for venous malformation [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2206: 179–192.
- [25] Di Blasio L, Puliafito A, Gagliardi PA, et al. PI3K/mTOR inhibition promotes the regression of experimental vascular malformations driven by PIK3CA-activating mutations [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 45.
- [26] Le Cras TD, Goines J, Lakes N, et al. Constitutively active PIK3CA mutations are expressed by lymphatic and vascular endothelial cells in capillary lymphatic venous malformation [J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(3): 425–442.
- [27] Santhosh D, Huang Z. A Tie2-driven BAC-TRAP transgenic line for in vivo endothelial gene profiling [J]. *Genesis*, 2016, 54(3): 136–145.
- [28] Teichert M, Milde L, Holm A, et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 16106.
- [29] Frye M, Dierkes M, Küppers V, et al. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions *in vivo* via Tie-2 in the absence of VE-cadherin [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(13): 2267–2287.
- [30] Yu C, Sharma A, Trane A, et al. Myoferlin gene silencing decreases Tie-2 expression *in vitro* and angiogenesis *in vivo* [J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 55(1–3): 26–33.
- [31] Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation [J]. *Am J Hum Genet*, 2015, 97(6): 914–921.
- [32] Kennedy MA, Xu Z, Wu Y, et al. A Tie2 kinase mutation causing venous malformations increases phosphorylation rates and enhances cooperativity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(4): 898–902.
- [33] Yadav P, De Castro DK, Waner M, et al. Vascular anomalies of the head and neck; a review of genetics [J]. *Semin Ophthalmol*, 2013, 28(5–6): 257–266.
- [34] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [J]. *Cell*, 2004, 118(2): 149–161.
- [35] Eklund L, Kangas J, Saharinen P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(1): 87–103.
- [36] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3): 165–177.
- [37] 白南. 海绵状静脉畸形的实验与临床研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [38] Smithers CJ, Vogel AM, Kozakewich HP, et al. An injectable tissue-engineered embolus prevents luminal recanalization after vascular sclerotherapy [J]. *J Pediatr Surg*, 2005, 40(6): 920–925.
- [39] Kulungowski AM, Hassanein AH, Foster CC, et al. Bevacizumab and interferon reduce venous recanalization following sclerotherapy [J]. *J Pediatr Surg*, 2016, 51(10): 1670–1673.
- [40] Wang YA, Zheng JW, Fei ZL, et al. A novel transgenic mice model for venous malformation [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(2): 193–201.
- [41] Primo L, Roca C, Ferrandi C, et al. Human endothelial cells expressing polyoma middle T induce tumors [J]. *Oncogene*, 2000, 19(32): 3632–3641.

[收稿日期] 2022-04-07

王星,赵静怡,张钰,等.人工智能在动物实验中应用的研究进展[J].中国比较医学杂志,2022,32(11):135-141.  
Wang X, Zhao JY, Zhang Y, et al. Research progress in application of artificial intelligence in animal experimental data [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 135-141.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.018

# 人工智能在动物实验中应用的研究进展

王星<sup>1,2#</sup>,赵静怡<sup>1,2#</sup>,张钰<sup>3\*</sup>,沈璐妍<sup>2\*</sup>

(1.吉林大学第二临床医学院,长春 130012;2.吉林大学基础医学院病理生理学系,长春 130021;  
3.吉林大学基础医学院基础医学实验教学中心,长春 130021)

**【摘要】** 实验动物伦理与3R原则是动物实验过程中必须遵守的基本准则。但由于动物机体的复杂性,动物体内实验所得到的各种数据面临着庞大而没有合适方法充分挖掘,复杂而有很多隐藏信息无法有效分析的问题,导致实验动物使用数量居高不下。在大数据的背景下,计算机科学与技术飞速进步,人工智能(artificial intelligence, AI)取得了极大飞跃,其在实验动物领域相关数据库的建立与数学模型的构建、动物微观分子及宏观图像、行为、基本生理指标等特征的识别、分类及预测中的应用广泛,有望成为研究人员的得力助手,在医学科研和临床领域发挥至关重要的作用。而相对微观分析,动物特征识别的宏观应用具有更高的可行性与实用性,本文就人工智能技术在实验动物特征识别中的应用、挑战和展望进行综述。

**【关键词】** 人工智能;实验动物;特征识别

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0135-07

## Research progress in application of artificial intelligence in animal experimental data

WANG Xing<sup>1,2#</sup>, ZHAO Jingyi<sup>1,2#</sup>, ZHANG Yu<sup>3\*</sup>, SHEN Luyan<sup>2\*</sup>

(1. the Second Clinical Medical College of Jilin University, Changchun 130012, China. 2. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021. 3. Experimental Teaching Center of Basic Medicine, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021)

**【Abstract】** The ethics and 3R principle of experimental animals are basic tenets that should be strictly obeyed. However, because of the inner complexity of organisms, the data obtained in vivo tend to be gathered in voluminous amounts. There is a lack of appropriate method to thoroughly explore these datasets, which are too complicated and contain too much hidden information to be analyzed effectively. Therefore, the number of experimental animals performed is increasing. However, in the context of big data, and with the rapid development of computer technology, artificial intelligence (AI) has made splendid progress. Nowadays, AI is widely applied in the establishment of relevant databases and mathematical models and the identification and prediction of features of, e. g., microscopic molecules, macroscale

**【基金项目】** 吉林省卫生技术创新研究基金(2020Q010)。

**【作者简介】** 王星(1999—),男,研究方向:肿瘤化疗耐受、疾病机制及防控。E-mail:924092957@qq.com

赵静怡(2002—),女,研究方向:肿瘤化疗耐受、疾病机制及防控。E-mail:1626291322@qq.com

#共同第一作者

**【通信作者】** 张钰(1987—),女,工程师,研究方向:医学遗传学、肿瘤病理生理学。E-mail:zyjlu@jlu.edu.cn

沈璐妍(1990—),女,讲师,研究方向:肿瘤化疗耐受、疾病机制及防控。E-mail:shenly@jlu.edu.cn

\*共同通信作者

images, behavior, and basic physiological indicators, and it serves as a powerful and convenient auxiliary tool for scientific researchers. Compared with micro-analysis, the macroscopic application of character recognition seems more feasible and practicable. This paper summarizes the applications, challenges, and prospects of AI use in the recognition of phenomena hidden in experimental animal data.

**【Keywords】** artificial intelligence; experimental animal; feature recognition

人工智能(artificial intelligence, AI)作为一项变革性技术在医学领域展现出了巨大的应用前景,其中占据主导地位的是机器学习(machine learning, ML)及深度学习(deep learning, DL)。目前在实验动物领域, AI 为动物实验结果、影像资料等数据的深入分析挖掘提供了有效的技术手段,促进了实验动物相应数据库和数学模型的完善化和多样化,推动了由真实记录动物模型特征为主向以多媒体计算机为中心的软件化的特征识别与预测为主的转变。本文对 AI 技术在实验动物特征识别中的研究现状综述如下。

### 1 数据库的建立与数学模型的构建

实验动物不仅可获取的数据庞大,并且尚有诸多隐藏信息,而 AI 数据分析是从浩如烟海的信息中提取、发掘更能代表数据本质特征、更能反映数据内在统计学规律的信息的主要途径<sup>[1]</sup>。随着数据库的建立、完善,各种模型算法层出不穷,实验设计的无假设驱动将逐渐取代传统的有假设驱动,为指导后续实验方案制定提供良好基础<sup>[2-3]</sup>。因此如何利用现有的数据构建数据库、设计适用于不同情况的数学模型是进一步挖掘实验动物的宏观及微观特征最为基础且至关重要的一步。

数据库及数据分析预测模型的建立为观测实验动物的宏观特征提供了数据和方法学上的支撑。其中,马林纳等<sup>[4]</sup>通过数据挖掘的方法整理、归纳、分析、总结了子宫肌瘤动物模型构建的重要参数,如:造模方法、周期、频次等,对建立合理的实验模型、提高成模率具有重要意义;范小彪<sup>[5]</sup>提出了全新的皮下植入式除颤器的电极配置,通过对实验动物模型进行有限元建模,并基于 SCI Run 计算平台对不同配置下的除颤电场进行仿真,为动物造模指标选取提供参考。Langendam 等<sup>[6]</sup>开发了一种涵盖毒理学、环境卫生和兽医等多方面的动物研究系统综述数据库,可以快速识别有关实验动物的临床前研究结果,从而避免重复劳动,减少研究浪费;Pallast 等<sup>[7]</sup>提出一种基于云的多模态动物数据关系数据库,汇总各种临床前特征数据,大大提高了数据可访问性、数据处理效率和数据记录标准化。以

上研究均体现了结合数据分析手段建立和完善数据库、记录重要参数的必要性及对后续研究的指导和提示作用。另外,安国帅<sup>[8]</sup>通过超高效液相色谱-质谱联用技术检测损伤后骨骼肌的代谢情况,运用多种 ML 算法构建数学模型,分析骨骼肌代谢物随损伤时间的变化特点,表明了 AI 对实验动物数据变化规律表征、预测的重要作用。

AI 数据分析及数据库的建立也可为实验动物模型特征微观层面的检测提供数据支持。其中,在蛋白水平,段仕<sup>[9]</sup>基于 ML 方法对 20 个数据库的 28592 个绵羊蛋白进行预测,成功搭建绵羊蛋白质-蛋白质相互作用关系数据库,为今后深入研究动物机体内蛋白质相互作用及功能提供数据支持;在基因层面,黄宇<sup>[10]</sup>将 DL 应用于 m<sup>6</sup>A 修饰位点预测并构建了一个高精度的跨物种 m<sup>6</sup>A 修饰位点预测模型。近年来,人源化肿瘤异种移植(patient derived tumor xenograft, PDX)模型广泛应用于各种动物实验中,主要通过免疫缺陷小鼠上接种简单处理的患者肿瘤组织、原代细胞等形成移植瘤,可以有效保留原代肿瘤实质及其微环境的组织病理学、分子生物学等基本特点,是极具前景的体内实验模型,在诸多肿瘤中都有广泛应用<sup>[11-12]</sup>。并且基于测序或芯片等方法获取的 PDX 模型的组学数据与 AI 技术相结合有助于对肿瘤进行分子分型、在临床上指导肿瘤患者的诊断与治疗,并且对于肿瘤微观分子机制的揭示也有重要提示作用,目前已广泛用于药物敏感性测试、新型生物标志物的研发、疾病预测等领域<sup>[13-14]</sup>。

总的来说,大量数据库及数据分析、识别和预测模型的建立,为进行基因组学<sup>[15]</sup>、表观遗传组学<sup>[10]</sup>、代谢组学<sup>[8]</sup>、蛋白组学<sup>[16]</sup>等多组学分析提供了有效且重要的资源,并为动物实验进一步深入挖掘发现某些特定通路的意义及某些分子的生物学功能等实验动物的微观特征提供了数据和方法学上的支撑,也将有效推动实验动物宏观特征相关研究的实施。而宏观特征因容易获取、直观可见等特点研究开展广泛,相关成果层出不穷。

## 2 人工智能在实验动物特征识别中的应用

### 2.1 影像特征识别

基于 AI, 实验动物影像特征的识别也取得了长足进步, 广泛涵盖了各种医学影像模式, 包括组织病理成像、超声成像、电子计算机断层扫描成像 (computed tomography, CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 和各种内镜成像等。人工智能与医学影像结合可以实现对图像的有效分割与分类, 极大推动医学影像学的发展, 为提高疾病诊断的敏感性和特异性提供新思路。

AI 技术与计算机辅助成像结合可对组织学切片图像微观特征进行高精度检测和量化, 为研究相关病理变化提供数据支持; Zhang 等<sup>[17]</sup> 利用 DL 方法对恒河猴胰腺  $\beta$  细胞分泌胰岛素颗粒的电镜照片进行解析, 为评估非人灵长类动物糖尿病早期胰岛素合成的代偿性增加提供有效证据; Tokarz 等<sup>[18]</sup> 和 Yang 等<sup>[19]</sup> 分别通过对心肌病和脂肪肝变性组织学切片进行检测, 并运用 DL 算法, 高精度实现了对相关疾病的识别、分类及严重程度的量化。

AI 与超声成像、MRI 及 CT 扫描相结合, 对疾病的诊断及发生发展的预测具有重要价值。其中, 付甜甜等<sup>[20]</sup> 基于肝纤维化大鼠模型不同成模时期的超声灰阶与弹性图像结果, 建立 ML 自动分类模型, 为预测肝纤维化进程提供重要参考; Tang 等<sup>[21]</sup> 采用随机森林算法, 对定量超声参数进行整合, 实现了对大鼠超声波射频图像和弹性成像图的精准分类, 为诊断脂肪性肝炎、肝纤维化及相关病理改变提供重要依据。而 Bie 等<sup>[22]</sup> 基于卷积神经网络 (convolutional neural network, CNN) 以化学交换饱和和转移 MRI 的 Z-光谱特征为输入特征, 证实了 CNN 在区分乳腺肿瘤类型方面的巨大潜力; 李硕等<sup>[23]</sup> 通过结合平扫 MRI 与主动学习 (active learning, AL)、半监督学习 (semi-supervised learning, SSL) 有效评估了肝纤维化分期; Xu 等<sup>[24]</sup> 选取雪貂和兔子作为实验对象进行肺部 CT 扫描, 并基于 ML 的异常成像模式检测系统对气管树结构进行自动提取分析, 为研究肺部疾病提供计算机方法学上的支持。

在医学领域, 三维重建系基于医学成像等智能集成的方法来构建三维组织结构的过程, 从而实现仿真效果。近年来, 三维重建技术在众多动物研究中得到广泛应用; 周明璋<sup>[25]</sup> 以小鼠为研究对象进行

X 射线相衬显微成像, 在多个角度观察肿瘤未被切割的原始状态信息, 印证肝脏从正常组织到肿瘤的发生发展变化过程; 类似地, Shuvo 等<sup>[26]</sup>、Jiang 等<sup>[27]</sup> 和 Iftikhar 等<sup>[28]</sup> 结合 DL 算法与三维重建成像技术对动物血流模式和流体动力学进行深入探讨。在观测三维形态变化方面, AI 技术可对相应组织的立体结构进行重塑, 进而全方位检测结构变化。其中, Rytky 等<sup>[29]</sup> 及 Huang 等<sup>[30]</sup> 基于 DL 分别对兔膝关节钙化软骨和小鼠左心室心肌的 3D 形态变化进行研究, 提高了对组织结构和功能分析的准确性和可重复性。以上研究具体情况汇总见表 1。

### 2.2 动物行为特征识别

除动物的宏观影像特征外, 在动物实验研究中, 客观量化动物行为是必要且有意义的。然而, 传统的动物行为分析方法主要通过轨迹、速度等简化的特征来量化, 可能会造成行为描述不客观和信息大量丢失的问题。近年来在大数据背景下, 依靠互联网和高性能计算机发展起来的 DL、ML 与机器视觉在识别、处理、分析动物的图像和视频及自动、有序、定量地获取、拆解、预测动物行为方面具有一定的优势。但研究对象主要局限在实验后的动物行为视频与图片, 并且工作速度较慢, 使其应用在一定程度上受到限制<sup>[31-33]</sup>。因此, 如何结合其他非视频手段实时识别是新近需要面临的挑战。

#### 2.2.1 运动行为、姿势、轨迹的分析与预测

DL、ML 作为一种学习效率极高且易于训练的模型, 在动物行为识别中最为常用, 并且不断进步。其中, 罗墨轩等<sup>[34]</sup> 构建了包含小鼠行为学识别程序的分析装置, 研究在进食过程中饥饿小鼠对捕食者视频刺激产生的行为反应; 另外, DL 算法可以对动物姿势进行拆解分析和合理预测; 韩亚宁<sup>[35]</sup> 针对性地使用 DL 姿态估计方法和无监督 ML 算法将小鼠运动行为分解为精细的片段, 进行统一的度量 and 表征; Pereira 等<sup>[36]</sup> 基于深度神经网络, 对果蝇的运动步态和动物姿势随时间变化进行动态分析, 进而实现对果蝇快速姿势动作的评估和预测。

相对于动物行为识别、姿势拆解等领域的广泛应用, 目前 AI 在运动轨迹分析方面的研究也有重要进展。郑秀娟<sup>[37]</sup> 搭建了大鼠旷野实验行为自动分析模型, 基于 RRM 算法和稳健 LOWESS 算法提取其轨迹特征, 判别率高达 100%; Rezaei 等<sup>[38]</sup> 利用点过程过滤器和长短期记忆网络方法对海马部位细胞记录的神经活动进行解码, 在预测大鼠位置及轨迹方面具有相当高的精度; Wijeyakulasuriya 等<sup>[39]</sup> 基

表 1 人工智能在医学影像学领域的应用  
Table 1 Application of artificial intelligence in medical imaging

作者, 年限 Author, Year	动物种类 Animal species	影像学方法 Imageological method	AI 算法 AI algorithms	研究对象 Object of study
Zhang <sup>[17]</sup> , 2019	恒河猴 Rhesus monkeys	电子显微镜成像 Electron microscopy imaging	深度学习框架的多分支全卷积网络 Multi-branch fully convolutional network of deep learning framework	胰腺组织学图像 Histological images of the pancreas
Tokarz <sup>[18]</sup> , 2021	大鼠 Rats	组织学切片成像 Histological section imaging	卷积神经网络与计算机辅助图像算法 CNN and computer-aided image algorithm	心脏组织学图像 Histological images of the heart
Yang <sup>[19]</sup> , 2019	兔 Rabbits	组织学切片成像 Histological section imaging	卷积神经网络 CNN	肝脏组织学图像 Histological image of liver
Fu <sup>[20]</sup> , 2019	大鼠 Rats	超声成像 Ultrasonic imaging	支持向量机 SVM	肝血管结构 Hepatic vascular structure
Tang <sup>[21]</sup> , 2019	大鼠 Rats	超声成像 Ultrasonic imaging	随机森林 Random Forest	肝脏组织 Liver tissue
Bie <sup>[22]</sup> , 2022	小鼠 Mice	MRI 成像 Magnetic resonance imaging	卷积神经网络 CNN	乳腺肿瘤组织 Breast tumor tissue
Li <sup>[23]</sup> , 2021	兔 Rabbits	MRI 成像 Magnetic resonance imaging	半监督学习和主动学习 SSLandAL	肝实质结构 Parenchyma of liver
Xu <sup>[24]</sup> , 2015	雪貂和兔子 Ferret and rabbits	CT 成像 Computed tomography imaging	随机森林 Random Forest	气管及支气管树结构 Tracheal and bronchial tree structure
Zhou <sup>[25]</sup> , 2021	小鼠 Mice	X 射线显微成像 X-ray microscopic imaging	决策树、随机森林和支持向量机 Decision-making tree, random Forest and SVM	肝脏肿瘤组织 Liver tumor tissue
Shuvo <sup>[26]</sup> , 2021	小鼠 Mice	多通道单焦点显微镜图像 Multi-channel single-focus microscopy images	U-Net 卷积神经网络 U-Net convolutional neural network	硬脑膜组织中血管与淋巴管结构 Vascular and lymphatic structures in dural tissue
Jiang <sup>[27]</sup> , 2020	大鼠 Rats	光学相干断层扫描血流成像 Optical coherence tomography angiography	卷积神经网络 CNN	大脑血管结构 Cerebral vascular structure
Iftikhar <sup>[28]</sup> , 2011	兔 Rabbits	光学显微镜成像 Optical microscopy imaging	支持向量机 SVM	胸主动脉血管结构 Vascular structure of the thoracic aorta
Rytky <sup>[29]</sup> , 2021	兔 Rabbits	CT 成像 Computed tomography imaging	卷积神经网络和 U-Net 卷积神经网络 CNN and U-Net convolutional neural network	膝关节软骨组织 Cartilage tissue of knee joint
Huang <sup>[30]</sup> , 2021	小鼠 Mice	MRI 成像 Magnetic resonance imaging	M-Net 深度学习网络 M-Net Deep Learning network	心脏左心室心肌组织 Myocardial tissue from the left ventricle of the heart

于随机森林、神经网络提出了一个高分辨率预测蚂蚁运动的算法。

### 2.2.2 神经生理学分析

复杂的中枢神经系统是实现动物行为、认知能力的基本结构和功能单元,因此通过对动物行为、认知等不同层面的剖析,或可识别、区分其处于的不同神经生理学状态。值得注意的是:Thanos 等<sup>[40]</sup>提出了一种单摄像头自动跟踪小鼠进行社交测试

的方法,评估笼式饲养小鼠的社会行为,为相关神经精神疾病研究提供数据支持;Dolensek 等<sup>[41]</sup>通过刺激小鼠口面部肌肉组织,录制头部固定小鼠的特写视频,将小鼠在不同情绪突发事件中表现出的面部表情分为不同的类别,定量和客观评估小鼠的不同情绪特征。基于 DL 将病理条件下光遗传诱发运动的动物与正常动物肢体运动学进行对比分析,可以明确脑干的不同神经元是否为改善帕金森患者

运动的潜在临床治疗靶点,为利用脑深部电刺激、药物或光遗传学等方法实现神经元的靶向刺激开辟了新的道路<sup>[42-43]</sup>。

总之,动物运动行为分析是贯穿中枢神经系统功能及机制相关研究过程始末的不可或缺的一部分,推动了新兴 AI、仿生学等与神经生理学交叉学科的发展<sup>[44]</sup>。因此可靠的、自动化的、参数化的动物行为描述、分析方法是动物行为学实验不断演变、改进的基础,对促进相关学科的发展也具有极大的价值。

### 2.3 动物基本生理指标的识别及预测

动物个体面部识别技术的飞速发展作为动物研究及生态研究打下了坚实基础。Lencioni 等<sup>[45]</sup>基于自动视频成像系统实现了对马面部表情的实时评估和对疼痛反应的及时监测,为动物的早期诊断和治疗提供参考依据;胡旭<sup>[46]</sup>提出金丝猴面部识别网络,为金丝猴身份的快速识别和行为分析提供技术支持;何育欣<sup>[47]</sup>针对大熊猫视角变化和表情变化提出了大熊猫面部识别 CNN 模型,有助于对大熊猫个体进行自动化识别、长期监测。动物个体面部识别技术在快速识别与行为分析领域取得了极大的飞跃,具有良好的应用前景。

基于视觉的遥测式生理指标测量技术的蓬勃发展,虽然相对于人脸识别仍然以研究为主,落地应用相对较少,但由于其可以基于面部视频对于心血管、呼吸等诸多生理信号检测的特点,越来越受到关注,为动物实验设计提供新思路、新角度。并且,基于信号检测的结果,结合 AI 不同的分析方法或可区分生物体不同的生理状态,如心率变异性的分析(包括时域、频域和非线性分析)已被证明可检测出几种神经系统疾病自主神经的早期受累情况<sup>[48-49]</sup>;Liu 等<sup>[50]</sup>基于高光谱图像深度学习和 CNN 模型方法提出了更灵活可靠的体内无创光学血氧饱和度的测量手段。二维 CNN 在小鼠睡眠研究中可以用于区分小鼠所处不同睡眠阶段及状态<sup>[51]</sup>;基于 DL 的 SOLOv2 快速实例分割框架可以实时跟踪小鼠瞳孔大小进而评估蓝斑核功能状态<sup>[52]</sup>。

在生理指标识别与生理状态明确的基础上, AI 在某些生理指标预测上也具有一定意义。研究发现相比传统的一般线性模型, ML 构建的体尺性状与体重之间的回归预测模型更为准确<sup>[53]</sup>。还有研究采用全卷积神经网络对实验动物血压、心率等血流动力学指标进行预测<sup>[54-55]</sup>;某些研究采用 CNN

并行化模型对马心电图的心电节拍进行分类预测<sup>[56]</sup>;基于 DL 算法在心电图 R 峰特征的提取、分析、预测中也有重要作用<sup>[57-58]</sup>。由此可见,人工智能相应算法在提示实验人员及时调整实验计划、预估实验结果等方面具有较好的前景。

### 2.4 其他应用

器官的开发移植<sup>[59]</sup>、动物的遗传与育种<sup>[60-61]</sup>等领域也有 AI 应用的身影,如匹兹堡大学结合合成生物学与 ML 算法,基于血液和胆汁处理系统实现了肝衰竭小鼠的肝移植,为今后解决器官移植供体短缺的问题提供新的角度和思路。

本质上,除了 AI 的方法和手段在实验动物上的广泛应用,动物实验的开展对于人工智能算法的优化与改进也具有积极的推动作用,两者是相辅相成、相互促进的。如传统的人工神经网络模型不能很好地表达生物神经网络的计算机制,而基于动物电生理实验数据的分析和处理,王玲<sup>[62]</sup>将生物计算机制与普遍适用的人工神经网络模型进行有机融合,这也说明:以更简单有效的方式表达更复杂的生理过程可能才是我们试图探讨 AI 在实验动物特征识别中应用的最终目的和意义。

## 3 挑战与展望

在医学领域,由于缺乏规范标注、系统整理的大规模实验数据库及数学模型, AI 技术发展受到不小的阻碍。就目前而言, AI 尚无法取代实验动物在医学科研中的主导地位,但或可成为科研人员的得力助手。同时我们也希望其在识别及预测实验动物特征及其变化规律的基础上,能更好地在数据分析上提供更丰富的维度,在实验设计上开拓研究者的思路,在临床诊断治疗方面提出全新的角度,期待 AI 在实验动物领域取得新的进展与突破。

### 参考文献:

- [1] 郑晓川. 大数据智能分析及数据挖掘探讨 [J]. 中国科技信息, 2021, 21: 35-36.
- [2] 吴玥, 向志光, 高苒, 等. 冠状病毒感染动物模型比较转录组学数据库的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 92-99.
- [3] 郭莎, 张娟娟, 梁兴禹, 等. 基于数据挖掘及动物实验探讨维持洛哌丁胺诱导便秘小鼠模型稳定性的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 47-56.
- [4] 马林纳, 朱正望, 姜权, 等. 基于数据挖掘的子宫颈癌动物模型应用分析 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 225-228.

- [ 5 ] 范小彪. 植入式除颤器的个性化优化及可电击心律检测算法研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2020.
- [ 6 ] Langendam MW, Magnuson K, Williams AR, et al. Developing a database of systematic reviews of animal studies [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2021, 123: 104940.
- [ 7 ] Pallast N, Wieters F, Nill M, et al. Cloud-based relational database for multimodal animal data [J]. *Database (Oxford)*, 2018, 2018: 124.
- [ 8 ] 安国帅. 代谢组学与串联机器学习相结合的损伤时间推断策略研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [ 9 ] 段仕. 利用机器学习算法预测绵羊全基因组蛋白质互作关系 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- [ 10 ] 黄宇. 基于深度学习的跨物种 M6A 修饰位点预测研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [ 11 ] Jung J, Seol HS, Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research [J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(1): 1-10.
- [ 12 ] Corso S, Isella C, Bellomo SE, et al. A comprehensive PDX gastric cancer collection captures cancer cell-intrinsic transcriptional MSI traits [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(22): 5884-5896.
- [ 13 ] Rivera M, Fichtner I, Wulf-Goldenberg A, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models of colorectal carcinoma (CRC) as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine [J]. *Neoplasia*, 2021, 23(1): 21-35.
- [ 14 ] Beshiri ML, Tice CM, Tran C, et al. A PDX/organoid biobank of advanced prostate cancers captures genomic and phenotypic heterogeneity for disease modeling and therapeutic screening [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(17): 4332-4345.
- [ 15 ] 梁忙. 基于机器学习算法的全基因组选择研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [ 16 ] Pino LK, Just SC, MacCoss MJ, et al. Acquiring and analyzing data independent acquisition proteomics experiments without spectrum libraries [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(7): 1088-1103.
- [ 17 ] Zhang X, Peng X, Han C, et al. A unified deep-learning network to accurately segment insulin granules of different animal models imaged under different electron microscopy methodologies [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(4): 306-311.
- [ 18 ] Tokarz DA, Steinbach TJ, Lokhande A, et al. Using artificial intelligence to detect, classify, and objectively score severity of rodent cardiomyopathy [J]. *Toxicol Pathol*, 2021, 49(4): 888-896.
- [ 19 ] Yang F, Jia X, Lei P, et al. Quantification of hepatic steatosis in histologic images by deep learning method [J]. *J Xray Sci Technol*, 2019, 27(6): 1033-1045.
- [ 20 ] 付甜甜, 蒋卓韵, 丁红, 等. 计算机辅助超声影像组学预测肝纤维化进展的实验研究 [J]. *中国超声医学杂志*, 2019, 3(12): 1131-1133.
- [ 21 ] Tang A, Destrepes F, Kazemirad S, et al. Quantitative ultrasound and machine learning for assessment of steatohepatitis in a rat model [J]. *Eur Radiol*, 2019, 29(5): 2175-2184.
- [ 22 ] Bie C, Li Y, Zhou Y, et al. Deep learning-based classification of preclinical breast cancer tumor models using chemical exchange saturation transfer magnetic resonance imaging [J]. *NMR Biomed*, 2022, 35(2): e4626.
- [ 23 ] 李硕, 付雅晴, 郭冬梅, 等. 基于平扫 MRI 机器学习模型评估兔肝纤维化分期 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2021, 18(7): 421-425.
- [ 24 ] Xu Z, Bagci U, Mansoor A, et al. Computer-aided pulmonary image analysis in small animal models [J]. *Med Phys*, 2015, 42(7): 3896-3910.
- [ 25 ] 周明璋. 基于 X 射线相衬显微 CT 的肝脏肿瘤血管骨架化与分型统计研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- [ 26 ] Shuvo MH, Kassim YM, Bunyak F, et al. Multi-focus image fusion for confocal microscopy using U-Net regression map [J]. *Proc IAPR Int Conf Pattern Recogn*, 2021, 2020: 4317-4323.
- [ 27 ] Jiang Z, Huang Z, Qiu B, et al. Comparative study of deep learning models for optical coherence tomography angiography [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, 11(3): 1580-1597.
- [ 28 ] Iftikhar S, Bond AR, Wagan AI, et al. Segmentation of endothelial cell boundaries of rabbit aortic images using a machine learning approach [J]. *Int J Biomed Imaging*, 2011, 2011: 270247.
- [ 29 ] Rytiky SJO, Huang L, Tanska P, et al. Automated analysis of rabbit knee calcified cartilage morphology using micro-computed tomography and deep learning [J]. *J Anat*, 2021, 239(2): 251-263.
- [ 30 ] Huang L, Jin A, Wei J, et al. 3D Attention M-net for short-axis left ventricular myocardium segmentation in mice MR cardiac images [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2021, 2021: 3353-3357.
- [ 31 ] 孙蕊. 基于深度目标检测和实例分割的川金丝猴图像识别方法研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2020.
- [ 32 ] 朱健. 基于互相关融合和判别滤波的动物动作识别算法研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [ 33 ] Li D, Zhang K, Li Z, et al. A spatiotemporal convolutional network for multi-behavior recognition of pigs [J]. *Sensors (Basel)*, 2020, 20(8): 2381.
- [ 34 ] 罗墨轩. 基于卷积神经网络的实时动物行为识别及定量分析 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2020.
- [ 35 ] 韩亚宁. 基于人工智能的动物结构化行为分析与研究 [D]. 深圳: 中国科学院大学(中国科学院深圳先进技术研究院), 2021.
- [ 36 ] Pereira TD, Aldarondo DE, Willmore L, et al. Fast animal pose estimation using deep neural networks [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(1): 117-125.
- [ 37 ] 郑秀娟. 大鼠运动行为的自动分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [ 38 ] Rezaei MR, Gillespie AK, Guidera JA, et al. A comparison study of point-process filter and deep learning performance in estimating rat position using an ensemble of place cells [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2018, 2018: 4732-4735.

- [39] Wijeyakulasuriya DA, Eisenhauer EW, Shaby BA, et al. Machine learning for modeling animal movement [J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0235750.
- [40] Thanos PK, Restif C, O'Rourke JR, et al. Mouse Social Interaction Test (MoST): a quantitative computer automated analysis of behavior [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2017, 124(1): 3-11.
- [41] Dolensek N, Gogolla N. Machine-learning approaches to classify and understand emotion states in mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2021, 46(1): 250-251.
- [42] Fougère M, van der Zouwen CI, Boutin J, et al. Optogenetic stimulation of glutamatergic neurons in the cuneiform nucleus controls locomotion in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(43): e2110934118.
- [43] Van der Zouwen CI, Boutin J, Fougère M, et al. Freely behaving mice can brake and turn during optogenetic stimulation of the mesencephalic locomotor region [J]. *Front Neural Circuits*, 2021, 15: 639900.
- [44] Liao X, Song W, Zhang X, et al. A bioinspired analogous nerve towards artificial intelligence [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 268.
- [45] Lencioni GC, De Sousa RV, De Souza Sardinha EJ, et al. Pain assessment in horses using automatic facial expression recognition through deep learning-based modeling [J]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0258672.
- [46] 胡旭. 基于注意力机制的金丝猴面部识别研究与实现 [D]. 西安: 西安电子科技大学, 2019.
- [47] 何育欣. 基于卷积神经网络的大熊猫检测与个体识别研究 [D]. 南充: 西华师范大学, 2020.
- [48] Taralov ZZ, Terziyski KV, Kostianev SS. Heart rate variability as a method for assessment of the autonomic nervous system and the adaptations to different physiological and pathological conditions [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2015, 57(3-4): 173-180.
- [49] Cygankiewicz I, Zareba W. Heart rate variability [J]. *Handb Clin Neurol*, 2013, 117: 379-393.
- [50] Liu R, Cheng S, Tian L, et al. Deep spectral learning for label-free optical imaging oximetry with uncertainty quantification [J]. *Light Sci Appl*, 2019, 8: 102.
- [51] Zhang X, Landsness EC, Chen W, et al. Automated sleep state classification of wide-field calcium imaging data via multiplex visibility graphs and deep learning [J]. *J Neurosci Methods*, 2022, 366: 109421.
- [52] Lara-Doña A, Torres-Sanchez S, Priego-Torres B, et al. Automated mouse pupil size measurement system to assess locus coeruleus activity with a deep learning-based approach [J]. *Sensors (Basel)*, 2021, 21(21): 7106.
- [53] 巴桑旺堆, 平措占堆, 朱彦宾, 等. 线性模型与机器学习模型对牦牛体重预测的比较 [J]. *现代农业科技*, 2019, 23: 205-206, 208.
- [54] Valenza G, Faes L, Toschi N, et al. Advanced computation in cardiovascular physiology: new challenges and opportunities [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2021, 379(2212): 20200265.
- [55] Cheng J, Xu Y, Song R, et al. Prediction of arterial blood pressure waveforms from photoplethysmogram signals via fully convolutional neural networks [J]. *Comput Biol Med*, 2021, 138: 104877.
- [56] Van Steenkiste G, Van Loon G, Crevecoeur G. Transfer learning in ECG classification from human to horse using a novel parallel neural network architecture [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 186.
- [57] Zahid MU, Kiranyaz S, Ince T, et al. Robust R-peak detection in low-quality holter ECGs using 1D convolutional neural network [J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2022, 69(1): 119-128.
- [58] 孙权, 邱雪婷, 李传昶, 等. 采样参数设置对小鼠心电图波形的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(2): 236-241.
- [59] Velazquez JJ, LeGraw R, Moghadam F, et al. Gene regulatory network analysis and engineering directs development and vascularization of multilineage human liver organoids [J]. *Cell Syst*, 2021, 12(1): 41-55.
- [60] 陈炜昊. 绵羊生物钟基因多态性、基于决策树模型的产羔数关联分析及其组织表达探究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [61] 聂秀萍, 谢能付, 吴赛赛, 等. 基于机器学习方法的动物遗传与育种学科热点趋势预测 [J]. *农业展望*, 2020, 16(1): 101-105.
- [62] 王玲. 生物启发的神经计算模型 - 碰撞检测 [C]. *Proceedings of 2010 international conference on bio-inspired systems and signal processing (ICBSSP 2010)*. Institute of electrical and electronics engineers, 2010: 259-262.

[收稿日期]2022-05-29

张亚青,戚菲菲,鲍琳琳. Beta 属冠状病毒亚基因组检测及应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 142-148.  
Zhang YQ, Qi FF, Bao LL. Research progress on subgenome of beta-coronavirus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 142-148.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.019

## Beta 属冠状病毒亚基因组检测及应用进展

张亚青,戚菲菲,鲍琳琳\*

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

**【摘要】** 目前已知可以感染人类的冠状病毒 (coronavirus) 有 7 种,其中 Beta 冠状病毒属 (beta coronavirus) 有 5 种。人冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43)、人冠状病毒 HKU1 (human coronavirus HKU1, HCoV-HKU1) 感染呈现季节性特征,症状轻微。严重急性呼吸综合征冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染后迅速在人与人之间传播,病毒流行对公共卫生安全和国民经济造成严重威胁。核酸检测是鉴别、诊断和排查病毒感染患者的关键检测方法之一,但核酸阳性并不意味着病毒具有传染性,需要探索一种快速反应病毒复制能力的检测方法作为补充。研究证实 Beta 属冠状病毒在细胞复制过程中产生的亚基因组 (subgenomic RNA, sgRNA) 可以作为判断病毒活性的指标。本文对 Beta 属冠状病毒亚基因组的检测应用等进行综述,旨在建立亚基因组检测方法,优化病毒检测方式,完善实验室动物模型创建及药物疫苗有效性评价体系,助力开展实验研究。

**【关键词】** Beta 属冠状病毒;亚基因组;病毒复制;检测方法

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0142-07

## Research progress on subgenome of beta-coronavirus

ZHANG Yaqing, QI Feifei, BAO Linlin\*

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical Collage (PUMC); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging Infectious; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases; Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Five of seven coronaviruses that cause respiratory disease in humans were beta-coronaviruses. HCoV-OC43 and HCoV-HKU1 show seasonal transmission and cause mild symptoms after infection. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 spread rapidly from person to person, which posed a serious threat to public health security and national economy. Nucleic acid testing is the key test to identify, diagnose and screen people infected by virus, but the positive of viral loads does not mean the virus is contagious. It is urgently to explore a rapid detecting method for virus replication as a supplement to judge virus activity. Studies have confirmed that the subgenomes produced by beta-coronaviruses during cell

**【基金项目】** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-035)。

**【作者简介】** 张亚青 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 冠状病毒亚基因组检测方法的建立。E-mail: zhangyq2815@163.com

**【通信作者】** 鲍琳琳 (1979—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 新发及再发传染病动物模型创制及比较医学的研究。

E-mail: blmlsl@aliyun.com

replication can be used as indicators for judging viral activity. This paper reviews the detection and application of subgenomes of beta-coronavirus, aiming to establish subgenome detection method, optimize virus detection method, perfect experimental animal model creation and drug or vaccine effectiveness evaluation systems and help to carry out experimental research.

**【Keywords】** beta coronavirus; subgenome; virus replication; detection method

冠状病毒的传播和流行给人类带来了巨大的威胁,全球仅因 SARS-CoV-2 感染死亡的人数已超过 6000000 人,迅速判断病毒传染性在疫情防控及药物研发中具有重要意义。病毒片段或失活的病毒同样可以通过核酸检测到病毒基因组,因此核酸检测阳性并不意味着病毒具有传染性。病毒培养是目前公认判断病毒的复制能力检测方法,但病毒培养检测耗时长,需要在生物安全三级实验室中进行,对人员操作技术要求高。有研究表明冠状病毒在复制过程中产生的亚基因组可以反应病毒的复制能力。

## 1 亚基因组简介

### 1.1 亚基因组的发现

20 世纪 90 年代,研究者发现植物雀麦草花叶病毒(brome mosaic virus, BMV)可在其负链基因组 RNA 内部特定位点上启动合成一节较短的 mRNA,用于外壳蛋白的表达,这一短 mRNA 被称为亚基因组,随后在烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)感染的叶片中也检测到亚基因组的存在<sup>[1-3]</sup>。大部分正链 RNA 病毒进入细胞开始复制时,均需产生亚基因组来作为结构蛋白和辅助蛋白合成的模板。相比于动物病毒,植物病毒基因组小,复制效率高,产生亚基因组的比例也更高,更易研究亚基因组的复制机制<sup>[2]</sup>,因而对植物病毒亚基因组合成机制的研究更为广泛。但对植物病毒亚基因组的研究通常集中在对病毒结构、转录机制以及进化关系等方向<sup>[4-7]</sup>,应用比较局限。冠状病毒子代蛋白的产生也通过合成亚基因组的策略来完成,但由于具体机制不清或应用范围较窄,近几年对于冠状病毒亚基因组的研究和应用才逐渐兴起。

### 1.2 亚基因组的作用

无论是植物病毒还是动物病毒产生的亚基因组,均可在作为翻译模板、调控基因复制、参与病毒重组等几个方面发挥作用。绝大多数亚基因组 RNA 在病毒复制周期中起着类似 mRNA 的翻译模板作用,但在鸡舍病毒(flock house virus, FHV)中发现,亚基因组 RNA3 产生缺陷时, FHV 病毒无法对

病毒基因组中的 RNA2 进行翻译,即亚基因组 RNA 可以调控病毒基因的复制<sup>[8]</sup>。对大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV)的研究中也发现,其亚基因组 RNA2 (sgRNA2) 的积累可以抑制病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 的翻译从而调控 BYDV 的复制<sup>[9]</sup>。此外,有研究表明亚基因组 RNA 会参与病毒的基因重组并使其获得新的特性<sup>[10-11]</sup>。亚基因组在病毒复制中的作用可能并不限于以上几个方面,需要进一步探索亚基因组的作用从而对病毒的特性有更加全面的掌握。

### 1.3 亚基因组的产生方式

亚基因组的合成模型有内部起始模型、提前终止模型、前导启动转录模型和不连续转录模型<sup>[1]</sup>,不同的产生方式使亚基因组具有不同的结构,但其结构都相当于被截短的基因组。

(1) 内部起始模型:在合成病毒 RdRp 之后,以正链的 RNA 为模板合成全长负链 RNA,负链 RNA 用作基因组合成以及亚基因组合成的模板,因此负链 RNA 上包括两种启动子,一种位于 3' 附近,用于合成子代病毒的正链基因组 RNA,另一种位于内部,是亚基因组的启动子(subgenomic promoter, SGP)。SGP 的活性受病毒 RNA 序列和二级结构的影响。合成亚基因组时, RdRp 结合于 SGP 并直接生成正链亚基因组。Miller 等<sup>[5]</sup>最早在 BMV 病毒中证实了内部起始模型的成立,随后发现其他植物病毒如 TMV、BYDV、大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV) 等也通过这种方式完成亚基因组的产生<sup>[12-13]</sup>,部分正链 RNA 动物病毒如辛德毕斯病毒(sindbis virus, SV) 和杯状病毒科(caliciviridae) 病毒的亚基因组也通过内部起始的方式合成<sup>[14-15]</sup>。

(2) 提前终止模型:在合成 RdRp 后,病毒在 RdRp 作用下合成负链 RNA 的过程中遇到终止信号使合成终止,产生负链亚基因组,再以此为模板合成正链亚基因组,而不将正链基因组转至全长负链。此模型的另一种机制为 RdRp 合成全长负链后,在以负链为模板合成亚基因组的过程中遇到终

止信号使合成终止。研究表明环曲病毒属 (toroviruses)、乙型野田村病毒属 (betanodaviruses) 等病毒采用提前终止的方法合成亚基因组<sup>[16-17]</sup>。

(3)前导启动转录模型:合成全长负链后,以负链为模板合成亚基因组,遇到 5' 前导序列之后的前导转录调控序列 (leader-transcription regulating sequences, TRS-L) 后停止,跳跃至目的亚基因组上游的体转录调控序列 (body-transcription regulating sequences, TRS-B),然后沿着 5' -3' 的方向继续合成亚基因组<sup>[1]</sup>。

(4)不连续转录模型:与前导启动转录模型的区别在于不连续转录模型不生成全长负链,而是直接利用正链基因组合成负链亚基因组,合成过程中遇到目的亚基因组上游的 TRS-B 时暂停,TRS-B 促进负链 RNA 向 5' 端的 TRS-L 移位从而促进负链亚基因组的合成<sup>[11,18]</sup>,再以此为模板合成正链亚基因组。

前导启动转录模型和不连续转录模型的关键是病毒基因组中的转录调控序列 (transcription regulating sequences, TRS),这两种模型最初被提出用于解释套式病毒目 (nidovirales) 下病毒的亚基因组的产生,但随着研究的不断深入,研究者普遍认为套式病毒目下病毒通过不连续转录模型完成亚基因组的合成<sup>[11,19]</sup>。

上述 4 种被广泛认可的模型大多产生具有相同 3' 末端的亚基因组,通过产生亚基因组来完成子代病毒复制的策略可能是由于病毒的大小有限,基因的表达需要与其他基因共享顺式作用元件<sup>[2]</sup>,这一策略也实现了病毒基因在数量和时间上的差异表达<sup>[1]</sup>。冠状病毒在分类地位中为套式病毒目下成员,其亚基因组的合成也是通过不连续转录来完成的。

## 2 Beta 属冠状病毒及其亚基因组

Beta 冠状病毒属与 Alpha 冠状病毒属 (alpha coronavirus)、Gamma 冠状病毒属 (gamma coronavirus) 同属于套式病毒目下冠状病毒科 (coronaviridae) 冠状病毒亚科 (coronavirinae)。已知可以感染人类并引起呼吸道疾病的 7 种冠状病毒中,有 5 种属于 Beta 冠状病毒属: HCoV-OC43、HCoV-HKU、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2<sup>[20-21]</sup>。HCoV-OC43、HCoV-HKU1 感染主要引起常见的自限性上呼吸道疾病, SARS-CoV、MERS-CoV

和 SARS-CoV-2 的感染可发展为严重的、甚至危及生命的呼吸道疾病和肺部损伤<sup>[22]</sup>。Beta 冠状病毒属成员均为单正链 RNA 病毒,病毒颗粒中的核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N) 形成的螺旋衣壳与基因组 RNA 组成复合体,其外包被囊膜,囊膜上的主要蛋白有纤突蛋白 (spike, S)、膜蛋白 (membrane, M) 和包膜蛋白 (envelope, E)。

冠状病毒是已知的 RNA 病毒中基因组最大的病毒,病毒 5' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 之后的开放阅读区 1ab (open reading frame 1ab, ORF1ab) 占据了基因组将近 2/3 的长度, ORF1ab 下游为结构蛋白、辅助蛋白合成相关的基因组,基因组的末端为 3' UTR。研究表明所有冠状病毒的基因组都具有 5' -复制酶-S-E-M-N-3' 这样一段固定的结构<sup>[23]</sup>。

冠状病毒与宿主细胞膜结合进入细胞后,以正链基因组 RNA 为模板,依赖宿主中的酶对 ORF1a 和 ORF1ab 进行翻译,产生 pp1a 和 pp1ab 这两个大的多肽,剪切拼接后形成病毒的复制酶蛋白。正链基因组在复制酶的作用下产生全长负链基因组,并以此作为子代基因组合成的模板。子代病毒的产生还需要结构蛋白和辅助蛋白的作用,但与复制酶蛋白不同的是,结构蛋白和辅助蛋白的合成以亚基因组为模板。包括 Beta 冠状病毒属在内的所有套式病毒目下的病毒都采用“不连续转录模型”完成亚基因组的合成<sup>[24]</sup>。

冠状病毒正链亚基因组主要由 5' 前导序列、TRS 和目的蛋白基因到 3' polyA 尾的序列三部分组成。研究已经证实冠状病毒 mRNA 的翻译依赖于 5' 端的帽结构<sup>[25]</sup>,且 5' 前导序列可以保护亚基因组序列,有利于病毒亚基因组和相关蛋白的积累<sup>[26-27]</sup>。TRS 是亚基因组不连续合成时跳跃的关键位点,由核心序列、5' 和 3' 的侧翼序列三部分构成<sup>[28]</sup>,其中最关键的是核心序列,核心序列是一段高度保守的序列, SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 的核心序列均为 5' -ACGAAC-3'<sup>[29-31]</sup>, MERS-CoV 的核心序列为 5' -AACGAA-3'<sup>[32]</sup>, HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1 的核心序列为七聚体 5' -UCUAAAC-3'<sup>[21]</sup>。除了最小的亚基因组外,其余的亚基因组都包含多个开放阅读框 (open reading frame, ORF),但在翻译时只有靠近 5' 端的 ORF 被翻译。因此,尽管大多数亚基因组在结构上是多顺反子,但在功能上是单顺反子<sup>[1]</sup>。除了作为翻译模板外,目前并未发现冠

状病毒亚基因组在其他调控病毒基因复制等方面的作用。

冠状病毒在包装成子代颗粒时选择性的包装 RNA 分子,对于基因组 RNA 的选择是通过一种指定选择性包装的 RNA 元件来实现的,但在亚基因组 RNA 中没有发现这种元件,因此亚基因组 RNA 不会被整合到成熟的病毒颗粒中<sup>[24]</sup>。

### 3 Beta 冠状病毒亚基因组的检测

此前关于动物病毒亚基因组的研究主要针对黄病毒属 (flavivirus)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 和戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 等,且大部分的研究集中在亚基因组相关的分子机制<sup>[33-34]</sup>、药物对亚基因组的作用<sup>[35]</sup>等方面,很少应用于复制能力检测。SARS-CoV-2 爆发后,核酸检测无法准确反应病毒活性,而病毒培养需要在高等级生物安全实验室进行且等待结果时间长,对于亚基因组的检测可以快速、灵敏分析病毒活性,逐渐成为研究热点。

研究者已通过测序等手段证实了 SARS-CoV-2 亚基因组的存在。Kim 等<sup>[36]</sup>通过边合成边测序技术 (sequencing by synthesis, SBS) 和基于纳米孔的直接 RNA 测序 (nanopore-based direct RNA sequencing, DRS) 两种互补的方法测定了 SARS-CoV-2 的基因组和亚基因组,证实了 SARS-CoV-2 使用 TRS 介导的模板转换机制进行不连续转录来产生亚基因组。结果显示,SARS-CoV-2 可以产生 9 种不同的亚基因组,其中 N 亚基因组是表达最丰富的转录本,其次是 S、ORF 7a、ORF 3a、ORF 8、M、E、ORF 6 和 ORF 7b。Doddapaneni 等<sup>[37]</sup>研究表明,通过捕获富集的方法,无需进行培养就可以从患者样本中获得全长基因组和亚基因组读数。

亚基因组的检测与病毒培养之间的相关性已经得到证实。Kim 等<sup>[38]</sup>对 20 个 COVID-19 患者的 189 个样本进行病毒载量以及亚基因组检测,并进行细胞培养。结果显示病毒培养阳性和亚基因组检测阳性的平均持续时间分别为出现症状后 (11.39±10.34) d 和 (13.75±11.22) d ( $P<0.437$ ),而病毒载量阳性平均持续时间为出现症状后 (22.85±11.83) d ( $P<0.001$ ),与病毒培养结果之间有显著统计学差异,从而提示病毒亚基因组检测特异性强于病毒载量的检测。Perera 等<sup>[39]</sup>收集了新冠感染患者感染后 70 d 内的上呼吸道样本进行检

测,结果显示样本亚基因组的检测阳性和病毒培养结果阳性持续时间一致,表明亚基因组结果与病毒培养具有高度的相关性,可以通过检测亚基因组快速判断病毒活性。Dagotto 等<sup>[40]</sup>对感染 SARS-CoV-2 的恒河猴的病毒载量以及亚基因组进行连续监测,结果显示,对病毒载量的检测无法区分输入的病毒和体内新复制合成的病毒,而对于亚基因组的检测更适合测定体内活跃复制的病毒。

亚基因组的常规检测可以通过微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 进行。Oranger 等<sup>[41]</sup>建立了通过 ddPCR 测定 SARS-CoV-2 N、S 亚基因组的方法。ddPCR 是第三代 PCR 技术,灵敏度高、特异性强,不依赖于标准曲线和内参基因就可以对目的片段进行绝对定量,但检测成本较高,不适用于快速大批量的检测。实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术成熟稳定、结果可靠、灵敏度和特异性也较高,通过 RT-qPCR 检测亚基因组是目前大多数研究中使用的方法。Wölfel 等<sup>[29]</sup>最先建立了 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 亚基因组的方法,研究者收集了新冠感染初期患者痰液、唾液和粪便标本对标本中亚基因组复制情况进行检测,结果显示痰液标本中亚基因组复制明显,从而推测在感染初期病毒主要在上呼吸道进行复制。

### 4 亚基因组检测的应用

亚基因组是病毒进入细胞开始复制时才产生的,且亚基因组检测与病毒培养结果具有高度的相关性,所以亚基因组成为判断活病毒复制能力的检测指标之一。SARS-CoV-2 大流行的情况下,对于新冠病毒亚基因组的检测被广泛开发,目前新冠病毒亚基因组检测已经应用于样本检测、动物模型评价、药物/疫苗有效性评价等多个方面<sup>[42-43]</sup>。

#### 4.1 亚基因组检测在临床检测中的应用

Casagrande 等<sup>[44]</sup>对新冠死亡患者的角膜进行病毒载量、亚基因组检测以及免疫组化等研究,从而评价角膜移植时 SARS-CoV-2 传染的可能性。Truong 等<sup>[45]</sup>研究免疫功能低下的人群感染 SARS-CoV-2 后病毒亚基因组的变化,以判断病毒传染性的变化。亚基因组检测与病毒活性高度相关,临床上可与病毒载量等指标结合判断患者体内病毒复制情况,助力研究者深入分析病毒感染人体后的复制情况,从而帮助改进隔离政策、缓解资源紧张。

## 4.2 亚基因组检测在动物模型中的应用

已有研究者在动物模型评价中通过亚基因组的检测来判断病毒复制情况。Haddock 等<sup>[46]</sup>研究猪对新冠病毒的易感性实验中,发现个别样本中有核酸阳性的情况,但亚基因组的检测均为阴性,说明偶有的核酸阳性为病毒核酸片段残留,结合病理证实了 3 周龄的“约克猪”不是新冠的易感动物。Falach 等<sup>[47]</sup>研究肺损伤是否影响 CD-1 小鼠对 SARS-CoV-2 易感性时,检测分析不同组别小鼠肺组织的病毒载量、亚基因组含量等指标,证实了预先造成肺损伤会使 CD-1 小鼠对 SARS-CoV-2 敏感,表现出严重的肺部损伤和高死亡率。另外,Carroll 等<sup>[48]</sup>利用仓鼠模型评价 SARS-CoV-2 突变株 B. 1. 427/1. 429 与 B. 1 的致病力差异时,也通过检测咽拭子的亚基因组来评价病毒的复制能力。

动物模型是探索新冠病毒病理学、免疫学、传播途径和发病机制的重要一环,也是疫苗和药物从实验室走向临床中不可或缺的一部分,对于疫情防控有着重要意义。通过亚基因组检测与病毒载量、病理图片等结果综合分析,可以更好的判断病毒在动物体内复制情况,完善实验室动物模型评价体系,助力疫情防控工作。

## 4.3 亚基因组检测在药物/疫苗有效性评价中的应用

亚基因组的检测也被应用于药物、疫苗有效性评价中。截至 2022 年 3 月 2 日,共 10 种新冠疫苗列入世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布的紧急使用清单中<sup>[49]</sup>,其中 Moderna mRNA-1273 和 ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) 两种疫苗前期对动物保护作用的研究中,研究者通过检测支气管肺泡灌洗液或肺组织样品中病毒亚基因组以评价病毒复制能力<sup>[50-52]</sup>。评价 mRNA BNT162b2 疫苗完全接种后对 SARS-CoV-2 感染的保护作用时,采集人员鼻咽拭子和唾液样品并进行病毒基因组和亚基因组病毒 RNA 检测<sup>[53]</sup>。此外,样本中亚基因组检测也用于反应抗体 DH1052、瑞德西韦等<sup>[54-55]</sup>是否可以抑制新冠病毒的复制。

Sia 等<sup>[56]</sup>研究证明了病毒高载量与具备传染性之间没有必然联系,因此仅通过检测病毒载量无法准确判断病毒复制能力,也就无法准确衡量药物或疫苗治疗效果,通过亚基因组检测可以提高活病毒的检出率,从而有助于判断药物疫苗治疗对病毒复制的抑制效果,完善实验室药物、疫苗评价体系,助

力药物、疫苗开发工作。

## 5 总结与展望

SARS-CoV-2 已持续流行 2 年,未来一段时间内也将与人类共存。控制 2019 冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 大流行的一种有效策略是开发快速识别和隔离 SARS-CoV-2 感染者的高精度方法。研究者们利用多种技术检测其亚基因组以便于快速判断病毒活性,对于疫情防控有着积极意义。未来可以尝试利用反转录重组聚合酶介导恒温扩增技术 (reverse transcription recombinase add amplification, RT-RAA) 快速扩增,并与侧向流试纸条结合 (lateral flow dipstick, LFD) 使结果可视化,开发可行的 SARS-CoV-2 亚基因组快速诊断方法对于节约资源和改进隔离政策将发挥重要作用。

此外,病毒的亚基因组不仅是蛋白合成的模板,还在病毒复制和重组中发挥一定作用,可以作为抗病毒的潜在作用靶点。亚基因组检测的发展需要继续对亚基因组产生的机制进行更为深入的研究,目前对于 Beta 属冠状病毒亚基因组产生过程中涉及到的长距离 RNA-RNA 相互作用的元件、亚基因组的代谢周期及其在病毒感染和发病机制中的各种作用尚有待阐明。亚基因组的检测可以深入探索相关分子机制,有利于制定有效的病毒预防策略,同时可以完善实验室动物模型创建及药物疫苗有效性评价体系,助力研究者快速高效开展实验研究,对于疫情防控有着重要意义。

## 参考文献:

- [1] Sztuba-Solińska J, Stollar V, Bujarski JJ. Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle [J]. *Virology*, 2011, 412(2): 245-255.
- [2] Miller WA, Koev G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses [J]. *Virology*, 2000, 273(1): 1-8.
- [3] French R, Ahlquist P. Characterization and engineering of sequences controlling *in vivo* synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA [J]. *J Virol*, 1988, 62(7): 2411-2420.
- [4] Jackson AO, Dawson JRO, Covey SN, et al. Sequence relations and coding properties of a subgenomic RNA isolated from barley stripe mosaic virus [J]. *Virology*, 1983, 127(1): 37-44.
- [5] Miller WA, Dreher TW, Hall TC. Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation on (-)-sense genomic RNA [J]. *Nature*, 1985, 313(5997): 68-70.
- [6] Kanodia P, Miller WA. Effects of the noncoding subgenomic RNA of red clover necrotic mosaic virus in virus infection [J]. *J*

- Virology, 2022, 96(3): e0181521.
- [ 7 ] Campbell AJ, Anderson JR, Wilusz J. A plant-infecting subviral RNA associated with polioviruses produces a subgenomic RNA which resists exonuclease XRN1 *in vitro* [J]. Virology, 2022, 566: 1–8.
- [ 8 ] Eckerle LD, Ball LA. Replication of the RNA segments of a bipartite viral genome is coordinated by a transactivating subgenomic RNA [J]. Virology, 2002, 296(1): 165–176.
- [ 9 ] Shen R, Miller WA. Subgenomic RNA as a riboregulator: negative regulation of RNA replication by Barley yellow dwarf virus subgenomic RNA 2 [J]. Virology, 2004, 327(2): 196–205.
- [ 10 ] Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(7): 1079–1085.
- [ 11 ] Pasternak AO, Van Den Born E, Spaan WJ, et al. Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis [J]. EMBO J, 2001, 20(24): 7220–7228.
- [ 12 ] Koev G, Miller WA. A positive-strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promoters [J]. J Virol, 2000, 74(13): 5988–5996.
- [ 13 ] Johnson JA, Bragg JN, Lawrence DM, et al. Sequence elements controlling expression of Barley stripe mosaic virus subgenomic RNAs *in vivo* [J]. Virology, 2003, 313(1): 66–80.
- [ 14 ] Hertz JM, Huang HV. Evolution of the Sindbis virus subgenomic mRNA promoter in cultured cells [J]. J Virol, 1995, 69(12): 7768–7774.
- [ 15 ] Morales M, Bárcena J, Ramírez Ma, et al. Synthesis *in vitro* of Rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (–) sense genomic RNA [J]. 2004, 279(17): 17013–17018.
- [ 16 ] Van Vliet ALW, Smits SL, Rottier PJM, et al. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus [J]. EMBO J, 2002, 21(23): 6571–6580.
- [ 17 ] Iwamoto T, Mise K, Takeda A, et al. Characterization of Striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2 [J]. J General Virol, 2005, 86(10): 2807–2816.
- [ 18 ] Zúñiga S, Sola I, Alonso S, et al. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis [J]. J Virol, 2004, 78(2): 980–994.
- [ 19 ] Sawicki SG, Sawicki DL. Coronavirus transcription: a perspective [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2005, 287: 31–55.
- [ 20 ] Corman VM, Muth D, Niemeyer D, et al. Hosts and sources of endemic human coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2018, 100: 163–188.
- [ 21 ] Liu DX, Liang JQ, Fung TS. Human coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae) [J]. Encyclopedia Virol, 2021: 428–440.
- [ 22 ] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(3): 155–170.
- [ 23 ] De Haan CM, Volders H, Koetzner CA, et al. Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization [J]. J Virol, 2002, 76(24): 12491–12502.
- [ 24 ] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2006, 66: 193–292.
- [ 25 ] Nakagawa K, Lokugamage KG, Makino S. Viral and cellular mRNA translation in coronavirus-infected cells [J]. Adv Virus Res, 2016, 96: 165–192.
- [ 26 ] Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, et al. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs; viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(12): e1002433.
- [ 27 ] Sola I, Almazán F, Zúñiga S, et al. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses [J]. Annu Rev Virol, 2015, 2(1): 265–288.
- [ 28 ] Alonso SIA, Sola I, Enjuanes L. Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus [J]. J Virol, 2002, 76(3): 1293–1308.
- [ 29 ] Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 [J]. Nature, 2020, 581(7809): 465–469.
- [ 30 ] Hussain S, Pan JA, Chen Y, et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. J Virol, 2005, 79(9): 5288–5295.
- [ 31 ] Brant AC, Tian W, Majerick V, et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication [J]. Cell Biosci, 2021, 11(1): 136.
- [ 32 ] Corman VM, Ithete NL, Richards LR, et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat [J]. J Virol, 2014, 88(19): 11297–11303.
- [ 33 ] Ding Q, Nimgaonkar I, Archer NF, et al. Identification of the intragenomic promoter controlling Hepatitis E virus subgenomic RNA transcription [J]. mBio, 2018, 9(3): e00769–00718.
- [ 34 ] Finol E, Ooi EE. Evolution of subgenomic RNA shapes Dengue virus adaptation and epidemiological fitness [J]. iScience, 2019, 16: 94–105.
- [ 35 ] Oo A, Rausalu K, Merits A, et al. Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection [J]. Antiviral Res, 2018, 150: 101–111.
- [ 36 ] Kim D, Lee JY, Yang JS, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome [J]. Cell, 2020, 181(4): 914–921.
- [ 37 ] Doddapaneni H, Cregeen SJ, Sugang R, et al. Oligonucleotide capture sequencing of the SARS-CoV-2 genome and subgenomic fragments from COVID-19 individuals [J]. PLoS One, 2021, 16(8): e0244468.

- [38] Kim JY, Bae JY, Bae S, et al. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2022, 28(1): 101–106.
- [39] Perera Ra PM, Tso E, Tsang OTY, et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease [J]. *Emerg Infect Dis*, 2020, 26(11): 2701–2704.
- [40] Dagotto G, Mercado NB, Martinez DR, et al. Comparison of subgenomic and total RNA in SARS-CoV-2 challenged rhesus macaques [J]. *J Virol*, 2021, 95(8): e02370–02320.
- [41] Oranger A, Manzari C, Chiara M, et al. Accurate detection and quantification of SARS-CoV-2 genomic and subgenomic mRNAs by ddPCR and meta-transcriptomics analysis [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 1215.
- [42] Yang J, Wang W, Chen Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity [J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 572–577.
- [43] Yu J, Tostanoski LH, Peter L, et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques [J]. *Science*, 2020, 369(6505): 806–811.
- [44] Casagrande M, Fitzek A, Spitzer MS, et al. Presence of SARS-CoV-2 RNA in the cornea of viremic patients With COVID-19 [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2021, 139(4): 383–388.
- [45] Truong TT, Ryutov A, Pandey U, et al. Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: a consecutive case series [J]. *EBioMedicine*, 2021, 67: 103355.
- [46] Haddock E, Callison J, Seifert SN, et al. Three-week old pigs are not susceptible to productive infection with SARS-COV-2 [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(2): 407.
- [47] Falach R, Bar-On L, Lazar S, et al. Mice with induced pulmonary morbidities display severe lung inflammation and mortality following exposure to SARS-CoV-2 [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(12): e145916.
- [48] Carroll T, Fox D, Van Doremalen N, et al. The B. 1. 427/1. 429 (epsilon) SARS-CoV-2 variants are more virulent than ancestral B. 1 (614G) in Syrian hamsters [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(2): e1009914.
- [49] Status of COVID-19 vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process [EB/OL]. [2022-04-02]. [https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status\\_COVID\\_VAX\\_02April2022.pdf](https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_02April2022.pdf).
- [50] Fischer RJ, Van Doremalen N, Adney DR, et al. ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) protects Syrian hamsters against SARS-CoV-2 B. 1. 351 and B. 1. 1. 7 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5868.
- [51] Van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques [J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 578–582.
- [52] Corbett KS, Werner AP, Connell SO, et al. mRNA-1273 protects against SARS-CoV-2 beta infection in nonhuman primates [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(10): 1306–1315.
- [53] Deiana M, Mori A, Piubelli C, et al. Impact of full vaccination with mRNA BNT162b2 on SARS-CoV-2 infection: genomic and subgenomic viral RNAs detection in nasopharyngeal swab and saliva of health care workers [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1738.
- [54] Li D, Edwards RJ, Manne K, et al. *In vitro* and *in vivo* functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies [J]. *Cell*, 2021, 184(16): 4203–4219.
- [55] Boshier FT, Pang J, Penner J, et al. Evolution of viral variants in remdesivir-treated and untreated SARS-CoV-2-infected pediatric patients [J]. *J Med Virol*, 2022, 94(1): 161–172.
- [56] 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.

[收稿日期]2022-04-20