严美霞,霍帅,田瑞敏,等. 尿酸性肾病大鼠模型建立的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 1-9.
Yan MX, Huo S, Tian RM, et al. Establishment of a rat model of uric acid nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 1-9.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 001

尿酸性肾病大鼠模型建立的研究

严美霞[1,2,3],霍 帅[1,2,4],田瑞敏[1,2,3,5],徐 鹏[1,2,3,5],黎 创[1,2,3,5],
胡天祥[2,3],陈达豪[1,2,3],陈小玲[1,2,3],毛 炜[1,2,3,6*]

(1.省部共建中医湿证国家重点实验室(广州中医药大学第二附属医院),广州 510120;2.广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120;3.广东省中医院肾内科,广州 510120;4.河南省人民医院肾内科,华中阜外医院肾内科,郑州 450003;5.广东省中医药防治难治性慢病重点实验室,广州 510006;6.广东省中医证候临床研究重点实验室,广州 510006)

【摘要】 目的 建立合理、稳定的尿酸性肾病大鼠模型,为筛选及研究治疗尿酸性肾病提供病理模型。**方法** 实验大鼠随机分为 3 个造模组和正常组。造模组分别予以 750 mg/kg 氧嗪酸钾联合 150 mg/kg 低剂量尿酸(M-A 组)、750 mg/kg 氧嗪酸钾联合 300 mg/kg 中剂量尿酸(M-B 组)、750 mg/kg 氧嗪酸钾联合 600 mg/kg 高剂量尿酸(M-C 组),正常组(Control 组)予以 0. 3%羧甲基纤维素钠(100 g/mL),连续灌胃 4 周后检测血尿酸、血肌酐、尿素氮、甘油三酯、胆固醇等指标的变化以及肾的病理学改变。**结果** 与正常组比较,3 个模型组的血尿酸明显高于正常组($P<0. 01$,$P<0. 05$,$P<0. 05$);M-B 组、M-C 组的血肌酐显著升高($P<0. 05$,$P<0. 01$);M-B 组的甘油三酯明显低于正常组($P<0. 05$);肾病理评分 M-B 组、M-C 组的肾病理评分明显高于正常组($P<0. 01$);Masson 染色形态学显示,3 个模型组与正常组比肾损伤明显($P<0. 05$,$P<0. 01$,$P<0. 01$)。免疫组化炎症 CD68 结果显示,与正常组比,3 个模型组表达量增加($P<0. 05$,$P<0. 01$,$P<0. 01$);E-Cadherin 表达与正常组相比,M-B、M-C 组表达量明显降低($P<0. 01$);α-SMA 表达与正常组相比,3 个模型组表达量增加($P<0. 05$,$P<0. 01$,$P<0. 01$)。**结论** 氧嗪酸钾(750 mg/kg)联合中剂量尿酸(300 mg/kg)可作为构建尿酸性肾病大鼠模型较为理想的方法。

【关键词】 大鼠;氧嗪酸钾;尿酸;尿酸性肾病;动物模型
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0001-09

Establishment of a rat model of uric acid nephropathy

YAN Meixia[1,2,3], HUO Shuai[1,2,4], TIAN Ruimin[1,2,3,5], XU Peng[1,2,3,5], LI Chuang[1,2,3,5],
HU Tianxiang[2,3], CHEN Dahao[1,2,3], CHEN Xiaoling[1,2,3], MAO Wei[1,2,3,6*]

(1. State Key Laboratory of Dampness Syndrome of Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, (the Second Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine), Guangzhou 510006, China. 2. Department of Nephrology, Henan Provincial People's Hospital, Department of Nephrology of Central China Fuwai Hospital, Zhengzhou 450003. 3. Department of Nephrology, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510006. 4. Department of Nephrology, Henan Provincial People's Hospital, Department of Nephrology of Central Fuwai Hospital, Zhengzhou 450003. 5. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for Prevention and Treatment of Refractory Chronic Diseases, Guangzhou 51006. 6. Guangdong Provincial Key Laboratory of Clinical Research on Traditional Chinese Medicine Syndrome, Guangzhou 51006)

[**基金项目**]国家自然科学基金面上项目(82074376);省部共建中医湿证国家重点实验室专项 (SZ2020ZZ04,SZ2020ZZ05);广东省中医院-北京蛋白质组研究中心联合项目(2017KT1821);岭南中医学术流派临床研究专项(2016KT1067);广东省中医药局面上项目(20201140)。

[**作者简介**]严美霞(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医内科学。E-mail: ymeixia1001@ 163.com
[**通信作者**]毛炜(1967—),女,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治慢性肾脏疾病。E-mail: maowei@ gzucm.edu.cn

【Abstract】 **Objective** Establish a reasonable and stable rat model of uric acid nephropathy to provide a pathological model for screening, research, and treatment of uric acid nephropathy. **Methods** Experimental rats were randomly divided into three model groups and a control group. Model mice were administrated orally with 750 mg/kg oteracil potassium combined with 150 mg/kg low dose uric acid (M-A), 750 mg/kg oteracil potassium combined with 300 mg/kg medium dose uric acid (M-B), or 750 mg/kg oteracil potassium combined with 600 mg/kg high dose uric acid (M-B). After continuous intragastric administration for 4 weeks, changes in blood uric acid, blood creatinine, urea nitrogen, triglycerides, cholesterol and other indicators as well as pathological changes of the kidneys were observed for 4 weeks. **Results** Compared with the control group, the serum uric acid of the three model groups was significantly higher ($P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$), serum creatinine of the M-B and M-C groups was increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), triglycerides of the M-B group were significantly lower ($P<0.05$). Renal pathology scores of M-B and M-C groups were significantly higher those of the control group ($P<0.01$). Masson staining of morphology showed that, in comparison with the control group, kidney damage was more obvious in the three model groups ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). Immunohistochemical staining of inflammation marker CD68 showed that, compared with the control group, its expression was increased of in three model groups ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). Expression of epithelial cell marker E-Cadherin was significantly reduced in M-B and M-C groups in comparison with to the control group ($P<0.01$). Expression of myofibroblast marker protein α-SMA was increased the three model groups compared with the control group ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). **Conclusions** Oteracil potassium (750 mg/kg) combined with the middle dose of uric acid (300 mg/kg) is ideal to establish a rat model of uric acid nephropathy.

【Keywords】 rats; potassium oxonate; uric acid; uric acid nephropathy; animal models

高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)为体内嘌呤代谢紊乱和(或)肾对尿酸排泄障碍所致的一种常见代谢性疾病。尿酸性肾病(uric acid nephropathy,UAN)是 HUA 最常见的并发症之一[1-2],尿酸盐结晶在肾小管的沉积为其主要病因。大鼠是最常用的实验研究动物之一,但因大鼠体内的 UA 在尿酸酶作用下可分解成尿囊素,难以出现自发性 HUA 及 UAN,目前国内多采用氧嗪酸钾灌胃或腹腔注射,联合腺嘌呤或酵母灌胃等方法[3]。在氧嗪酸钾作用下,大鼠体内尿酸酶活性下降,抑制 UA 分解,导致血 UA 增多,单用氧嗪酸类药物在短期内(5 周)可引起大鼠肾动脉病变,需要干预 7 周以上才能出现明显的肾损伤[4]。该造模方法可引起轻度肾损伤,而造模时间长,氧嗪酸钾药物价格偏贵,若想探究肾小管间质纤维化,则成模周期更长。而尿酸作为引起 UAN 的直接物质,不用经过体内嘌呤代谢过程。有研究将氧嗪酸钾注射联合尿酸灌胃,第 5~6 周先后出现肾的炎症反应、肾动脉病变及高血压等病变[5],本研究尝试采用混合氧嗪酸钾和不同浓度尿酸灌胃的方法,尝试建立一种操作简便、重复性好、能够稳定模拟人类尿酸性肾损害的的 UAN 大鼠模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,SFP 级,20 只,体重 180~220 g,购于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0041]。无菌手术在广东省中医药科学院动物实验室屏障动物实验设施进行[SYXK(粤)2018-0094],本实验经由广东省中医药科学院动物伦理委员会批准(2017044),同时,向实验动物给予 3R 原则的人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾(批号:STBH0976)、尿酸(批号:BCCBB2049)购自 Sigma 公司;羧甲基纤维素钠(批号:20090328)购自上海阿拉丁公司;PBS 粉包(批号:14E05A30)购自武汉博士德公司;10%福尔马林固定液(批号:JX0100)购自广州晶欣生物公司;二甲苯(批号:20201003)、无水乙醇(批号:20200820)、3%过氧化氢溶液(批号:20160304)购自天津大茂化学试剂厂;苏木素伊红染液(批号:092520201211)购自上海碧云天公司;中性树胶(批号:20130917)购自上海国药集团化学试剂公司;CD68(批号:GR3287728-2)、E-cadherin(批号:GR3260950-7)、α-SMA(批号:GR248336)购自美国 abcam 公司。罗氏自动生化分析仪(C702)购自德国 Roche 公司;组织包埋机(Histostar)购自 Thermo Fisher 公司;电动显微镜成像系统(BX61)购自日本 OLYMPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

动物于广东省中医药科学院实验动物中心 SPF 级动物房分笼适应性饲养 7 d 后，将已编号的大鼠升序排列体重值，同时经由随机数字表完成分组设计，随机划分出 4 组，每组 5 只，即正常组（Control 组）、模型 A 组（M-A 组）、模型 B 组（M-B 组）、模型 C 组（M-C 组），其中 A、B、C 组分别给予氧嗪酸钾 750 mg/kg+尿酸 150 mg/kg、氧嗪酸钾 750 mg/kg+尿酸 300 mg/kg、氧嗪酸钾 750 mg/kg+尿酸 600 mg/kg[6]，正常组所用为相应量的 0.3%羧甲基纤维素钠溶液，灌胃频次为每天 1 次，每 3 d 对大鼠体重进行称定，同时基于体重对灌胃剂量进行调节，连续灌胃 4 周[6]。

1.3.2　标本留取

灌胃 4 周后收取大鼠血液样本，再借助低速台式离心机，于转速为 3000 r/min 时实施 15 min 离心操作，将分离出的血清分装至无菌的 1.5 mL 离心管中，冻存于−80℃冰箱中。造模 4 周后取 1/2 右肾放置 4%的多聚甲醛固定液中。

1.3.3　生化指标检测

借助罗氏自动生化分析仪与配套检测试剂，对大鼠血清检测以下指标：血尿酸（serum uric acid, sUA）、尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）、血肌酐（serum creatinine, sCr）、甘油三酯（triglyceride, TG）、总胆固醇（total cholesterol, TC）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein, LDL-C）及高密度脂蛋白胆固醇（highdensity lipoprotein, HDL-C）[6]。

1.3.4　病理检测及分析

将肾组织移至 4%的多聚甲醛溶液内，固定 24 h，再实施常规石蜡包埋操作，之后切片厚度为 3 μm，实施苏木素-伊红（HE）染色；Masson 染色；免疫组化检测 CD68、E-Cadherin、α-SMA 的表达。并利用显微镜观察大鼠肾组织形态学变化，拍照记录，然后读片。

（1）HE 染色：按照 5 分制评分法进行评分[7]，评估细则根据肾病理损伤程度以病理损伤面积与拍摄视野面积比值（%）的大小判断：肾小球系膜基质是否增宽、增厚；肾小球硬化与否；肾小管萎缩与否；炎症细胞是否浸润肾间质；肾组织是否存在纤维化，具体为：无损伤为 0 分，小于 10%为 1 分，10%～25%为 2 分，25%～50%为 3 分，50%～75%为 4 分，大于 75%为 5 分，病理分析由两人独立进行。各组随机确定 3 个样本，各样本随机确定 8 个视野参与评分。

（2）Masson 染色：首先进行石蜡切片，再行 Masson 染色，显微镜下记录其形态学改变，Masson 染色胶原呈蓝色，每组 3 个样本，于 400 倍显微镜下随机选取 8 个视野，借助图像分析软件 Image J 开展分析，其中视野总范围中胶原阳性蓝染部分的占比即胶原容积分数（collagen volume fraction, CVF），将其平均值定为该组织 CVF。

（3）免疫组化：4%多聚甲醇固定肾组织制成 3 μm 厚的石蜡切片脱蜡后，高压处理修复抗原，3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，加一抗 CD68、E-Cadherin、α-SMA，4℃孵育过夜之后，第 2 天进行二抗孵育，DAB 显色，苏木素复染，最后常规脱水、封片。采用 Image J 软件评估免疫组化目的蛋白含量，目的蛋白的表达量即为阳性染色区域（棕色染色区域）与拍摄视野的百分比（%），各组随机确定 3 个样本，各切片随机确定 8 个视野参与评分，同时计算。

1.4　统计学方法

所有数据均为计量资料，首先评估其呈正态分布与否，符合者以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）的形式表示，若非正态分布，呈现形式为中位数（四分位数）表示，即 $M(P25\sim P75)$。在对比多组间数据方面，若为正态分布，同时方差齐性，则进行单因素方差分析法（ANOVA）检验，两两对比选择 LSD 法，差异显著，具有统计学意义的标准为“$P<0.05$”，上述数据统计工作均在 SPSS 20.0 软件中完成，制图采用 Garphpad prism 8.0 完成。

2　结果

2.1　各组大鼠体重变化

在体重方面，对比未造模时，造模 4 周后各组间无明显差异（$P>0.05$，$P=0.05$），在体重差值上，各组间差异显著（$P<0.05$），各模型组实验动物体重与 Control 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），就体重前后差值而言，相较于 Control 组，M-A 组、M-B 组差异显著具有统计学意义（$P<0.05$），结果见表 1。

2.2　各组大鼠生化指标

2.2.1　各组肾功能比较

同 Control 组相比，另外 3 个模型组 sUA 表达水平示差异显著（$P<0.01$，$P<0.05$，$P<0.05$）。M-A 组、M-B 组及 M-C 组的大鼠对比于 Control 组，在 BUN 水平上差异不显著，无统计学意义（$P>0.05$），与 Control 组相比，M-B 组、M-C 组的 sCr 水平明显升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。结

果见表 2。

2.2.2 各组大鼠血脂结果比较

M-B 组的 TG 明显低于 Control 组($P<0.05$),而 3 个模型组的 TC 较 Control 组无明显差异($P>0.05$)。Control 组的 LDL-C、HDL-C,M-B 组的 HDL-C,M-C 组的 LDL-C 整体检验组间差异均不显著($P>0.05$)(见表 3)。

2.3 各组大鼠肾组织病理结果

2.3.1 HE 及 Masson

HE 染色结构表明,正常组大鼠在显微镜下观察到肾组织结构无异常,肾小管上皮细胞未见水肿,整齐排列,肾小球未见硬化且大小均匀,未见炎症细胞分布于肾间质,肾小管未见扩张、萎缩,形态正常,未见其他病理改变。而 M-A 组、M-B 组及 M-C 组相比于 Control 组,肾小球未见明显病理变化,此外,M-A 组中可见部分肾小管扩张,无肾小球萎缩等改变,在 M-B 组、M-C 组中,众多炎性细胞分布于肾间质,肾小管大幅扩张,此外,光镜下可见肾小管上皮细胞萎缩以及刷状缘脱落,细胞核数量大幅度下降,还观察到肾小管间质部位存在众多炎症细胞。在肾病理评分上,比较 M-A 组与 Control 组差异无统计学意义($P>0.05$),然而 M-B 组、M-C 组相较于 Control 组肾病理评分显着升高($P<0.01$)。通过 Masson 染色形态学观察可知,Control 组肾小球及肾间质红染,未见明显胶原纤维,M-A 组与 Control 组比可见少量的肾间质出现蓝紫色胶原纤维沉积($P<0.05$)。而 M-B 组、M-C 组可见明显的胶原纤维沉积于肾小球和肾间质 CVF 升高($P<0.01$)(图 1~图 3)。

2.3.2 炎症 CD68 的表达变化

CD68 属于巨噬细胞标记蛋白其中之一,可反映巨噬细胞的浸润程度,从而了解肾间质的炎症情况。其中棕色部分为 CD68 阳性表达区域,利用 CD68 表达面积与整个视野面积百分比值(%)来评估肾间质炎症。与 Control 组相比,M-A 组可见少量棕色表达部分($P<0.05$),M-B、M-C 组可见众多巨噬细胞浸润,具有明显的肾间质炎症反应($P<0.01$)(表 4、图 4~图 7)。

表 1 各组大鼠造模前后体重比较($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 1 Comparison of body weight of rats before and after modeling

组别 Groups	造模前体重(g) Body weight before modeling	造模后体重(g) Body weight after modeling
正常组 Control group	232.40±16.74	395.60±27.22
模型 A 组 M-A group	237.00±18.38	358.20±25.27
模型 B 组 M-B group	241.80±20.99	358.00±20.10
模型 C 组 M-C group	247.80±28.42	393.00±37.47

注:与 Control 组比较,$P>0.05$。

Note. Compared with the control group, $P>0.05$.

表 2 造模 4 周后各组大鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐水平变化情况($\bar{x}\pm s$,$n=5$)

Table 2 Changes in serum uric acid, urea nitrogen and creatinine levels of rats in each group for 4 consecutive weeks

组别 Groups	血尿酸(μmol/L) Serum uric acid	尿素氮(mmol/L) Blood urea nitrogen	血肌酐(mmol/L) Serum creatinine
正常组 Control group	84.75±17.05	7.18±1.07	35.00±5.16
模型 A 组 M-A group	503.00±92.65**	7.52±0.87	47.80±9.88
模型 B 组 M-B group	482.25±136.50*	6.35±1.18	54.50±16.54*
模型 C 组 M-C group	475.75±99.08*	6.02±1.10	61.50±7.72**

注:与 Control 组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

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

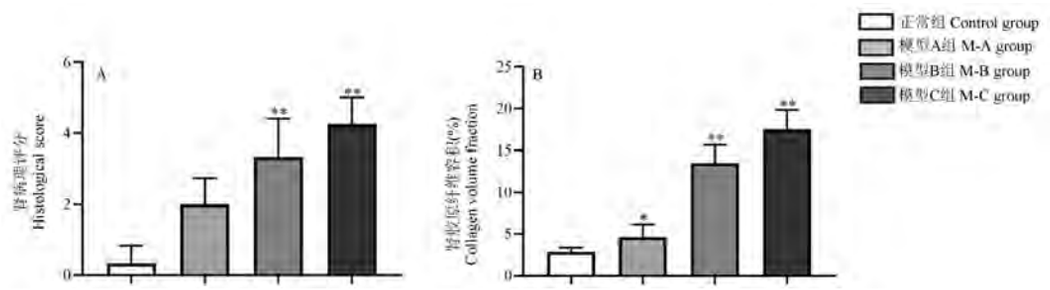
表 3 连续 4 周造模各组大鼠血脂水平变化情况,($\bar{x}\pm s$,$M(P25\sim P75)$,$n=5$)

Table 3 Changes in blood lipid levels of rats in each group for 4 consecutive weeks

组别 Groups	甘油三酯 TG(mmol/L)	总胆固醇 TC(mmol/L)	低密度脂蛋白 LDL-C(mmol/L)	高密度脂蛋白 HDL-C(mmol/L)
正常组 Control group	0.77±0.19	1.02±0.43	0.12(0.11~0.12)	0.48(0.44~0.49)
模型 A 组 M-A group	0.71±0.21	1.21±0.21	0.13(0.12~0.15)	0.53(0.47~0.58)
模型 B 组 M-B group	0.49±0.19*	1.04±0.10	0.12(0.11~0.13)	0.45(0.42~0.51)
模型 C 组 M-C group	0.67±0.72	1.15±0.11	0.11(0.10~0.12)	0.55(0.47~0.58)

注:与 Control 组比较,*$P<0.05$。

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

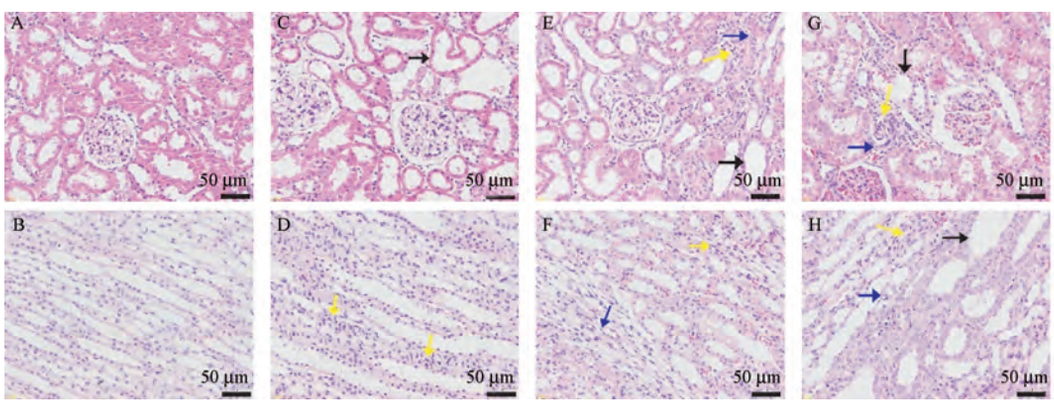


注：A：各组大鼠肾病理评分比较；B：各组大鼠肾胶原纤维容积比较。图 A、B 四组依次代表造模 4 周后正常组、模型 A 组、模型 B 组和模型 C 组的肾组织病理变化趋势。与正常组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 1　各组大鼠肾病理结果比较

Note. A, Comparison of the renal histological scores of rats in each group. B, Comparison of the kidney collagen volume fraction of rats in each group. Figures A and B represent the pathological changes of the kidney tissues of the control group, M-A group, M-B group and M-C group 4 weeks after modeling. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 1　Comparison of pathological results of rat kidney tissues in each group



注：A：正常组肾皮质；B：正常组肾髓质；C：模型 A 组肾皮质；D：模型 A 组肾髓质；E：模型 B 组肾皮质；F：模型 B 组肾髓质；G：模型 C 组肾皮质；H：模型 C 组肾髓质。黑色箭头：肾小管扩张；黄色箭头：肾炎性细胞浸润；蓝色箭头：肾小管上皮细胞脱落。

图 2　各组大鼠肾病理形态学变化

Note. A, Renal cortex in control group. B, Renal medulla in control group. C, Renal cortex of M-A. D, Renal medulla in M-A. E, Renal cortex of M-B. F, Renal medulla in M-B. G, Renal cortex of M-C. H, Renal medulla M-C. Black arrows, Dilatation of renal tubules. Yellow arrows, Nephritic cell infiltration. Blue arrows, Exfoliation of epithelial cells in renal tubules.

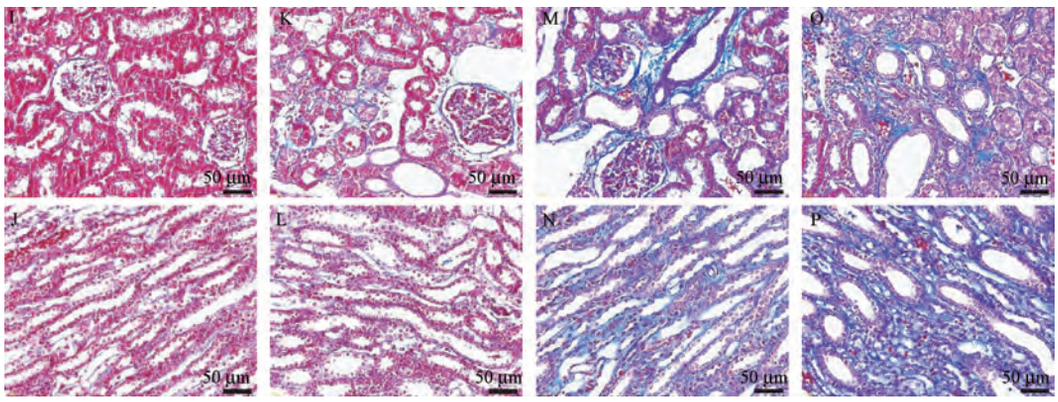
Figure 2　Pathological changes of the kidneys in each group

2.3.3　上皮细胞-间充质转分化及纤维化的变化

E-Cadherin（E-钙粘蛋白）阳性表达区域为细胞膜和（或）细胞质，作为上皮细胞标志物，其阳性表达率越低，说明上皮细胞数量愈低，上皮细胞-间充质细胞转分化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）程度愈甚。相比于 Control 组大鼠，M-A 组 E-Cadherin 表达量有所下降，但统计学没有意义（$P>0.05$），而 M-B、M-C 组可见明显的棕色表达量降低（$P<0.01$）（表 4、图 4～图 7）。α-SMA（α-平滑肌肌动蛋白）是肌成纤维细胞、纤维细胞受损激活和表型转化的标志蛋白，其表达增加，可使肾纤维化的进展更快[8]。与 Control 组相比，M-A 组可见少量的 α-SMA 的表达（$P<0.05$），此外，M-A 组、M-B 组表达量明显增加（$P<0.01$）（见表 4、图 4～图 7）。

3　讨论

目前常用于高尿酸造模的方法有抑制尿酸酶活性如氧嗪酸类药物及 Uox 基因敲除两种，尿酸的前体物质腺嘌呤法和次黄嘌呤法，增加黄嘌呤氧化酶活性的酵母法以及经过体内嘌呤代谢尿酸法。单纯应用氧嗪酸钾很难诱导大鼠出现 UAN，加大氧嗪酸钾剂量又会存在增加动物死亡率的风险[9]；腺嘌呤虽然可以引起血尿酸、血肌酐的升高，其代谢产物 2,8-二羟基腺嘌呤可直接沉积于肾小管，损伤肾，与尿酸所引起的肾损伤并不一致[10-11]；酵母虽可干扰体内尿酸代谢，升高血尿酸，但是酵母溶液



注:I:正常组肾皮质;J:正常组肾髓质;K:模型 A 组肾皮质;L:模型 A 组肾髓质;M:模型 B 组肾皮质;N:模型 B 组肾髓质;O:模型 C 组肾皮质;P:模型 C 组肾髓质。蓝色为胶原纤维部分。

图 3 各组大鼠肾 Masson 染色

Note. I, Renal cortex in control group. J, Renal medulla in control group. K, Renal cortex of M-A. L, Renal medulla in M-A. M, Renal cortex of M-B. N, Renal medulla in M-B. O, Renal cortex of M-C. P, Renal medulla M-C. Collagen fibers are shown in blue.

Figure 3 Masson staining of kidney of rats in each group

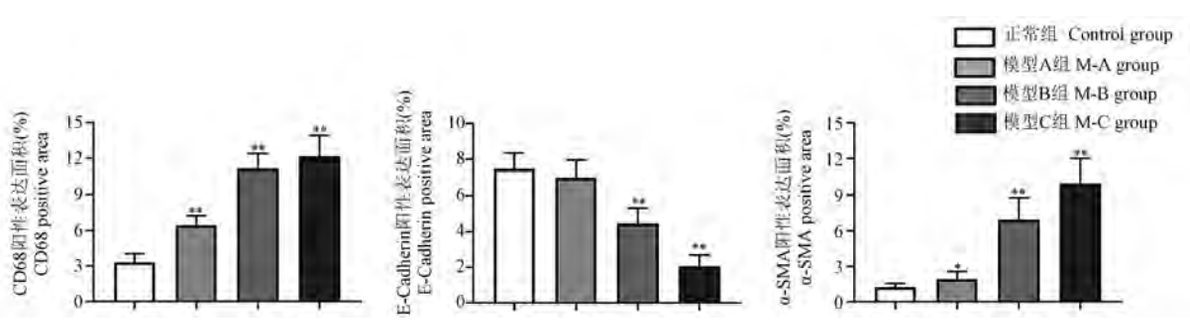
表 4 各组大鼠 CD68、E-Cadherin、α-SMA 阳性面积百分比($\bar{x}\pm s$,%,$n=5$)

Table 4 Percentage of CD68, E-Cadherin and α-SMA positive area of rats in each group

组别 Groups	CD68	E-Cadherin	α-SMA
正常组 Control group	3. 30±0. 73	7. 50±0. 87	1. 22±0. 34
模型 A 组 M-A group	6. 41±0. 84 **	6. 99±0. 99	1. 94±0. 64 *
模型 B 组 M-B group	11. 16±1. 28 **	4. 44±0. 86 **	6. 95±1. 79 **
模型 C 组 M-C group	12. 17±1. 79 **	2. 06±0. 86 **	9. 95±2. 09 **

注:与 Control 组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

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



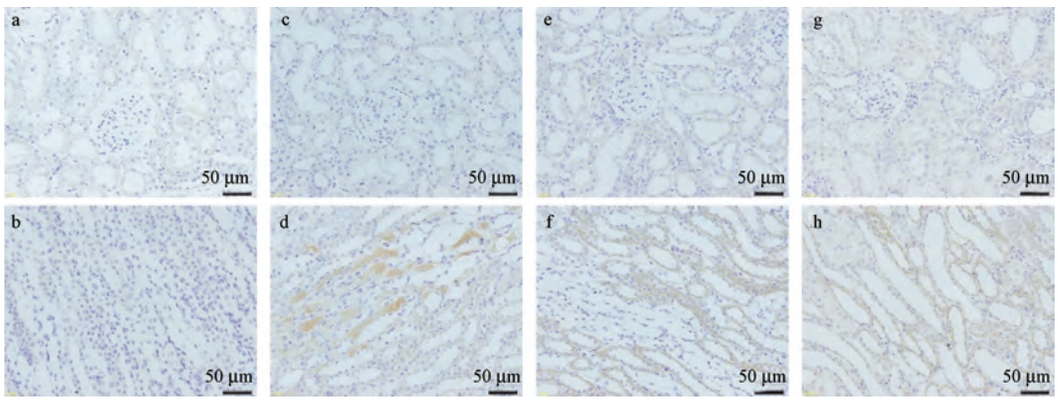
注:图表中依次代表造模 4 周后正常组、模型 A 组、模型 B 组和模型 C 组的肾组织免疫组化 CD68、E-Cadherin、α-SMA 蛋白阳性表达趋势。与正常组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$。

图 4 各组大鼠免疫组化 CD68、E-Cadherin、α-SMA 蛋白阳性表达面积

Note. Chart represents the positive expression trend of CD68, E-Cadherin, and α-SMA protein in the kidney tissue of the control group, M-A group, M-B group and M-C group 4 weeks after modeling. Compared with the control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$.

Figure 4 Immunohistochemical positive expression areas of CD68, E-Cadherin and α-SMA in each group

灌胃会引起动物饱腹感,且过多的灌胃次数无疑增加劳动成本,虽然有研究者将其混于饲料中饲喂,但是容易造成饲料浪费,且难准确掌握造模所用药物剂量,随着造模后期大鼠的状态不佳,食量明显减少,血尿酸升高程度不稳[12]。然而,以上方法皆有需完善之处。使用氧嗪酸钾联合不同尿酸浓度的方法灌胃,不仅可以抑制尿酸在大鼠体内分解代谢,而且通过直接摄入尿酸,在大幅度提升 sUA 水平的同时,肾损伤成模期限缩短,此外,尿酸该 UAN 模型中致肾损伤的唯一因素,且较于腺嘌呤法,该方式所致肾损伤程度更轻[6]。该种造模方式所引起的病变过程以及肾损伤程度均接近于人类

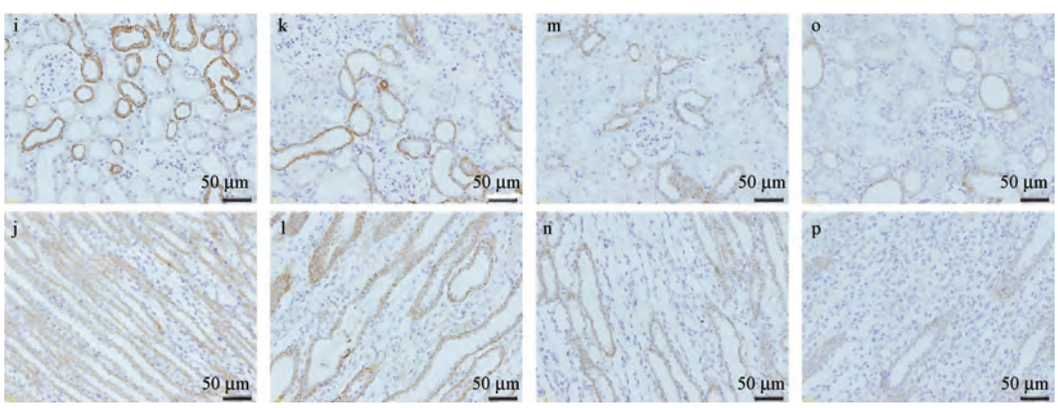


注：a：正常组肾皮质；b：正常组肾髓质；c：模型 A 组肾皮质；d：模型 A 组肾髓质；e：模型 B 组肾皮质；f：模型 B 组肾髓质；g：模型 C 组肾皮质；h：模型 C 组肾髓质。棕色所示为阳性表达区。

图 5　各组大鼠免疫组化 CD68 蛋白阳性表达

Note. a, Renal cortex in control group. b, Renal medulla in control group. c, Renal cortex of M-A. d, Renal medulla in M-A. e, Renal cortex of M-B. f, Renal medulla in M-B. g, Renal cortex of M-C. h, Renal medulla M-C. Brown area is the positive expression area.

Figure 5　Immunohistochemical positive expression of CD68 protein in each group



注：i：正常组肾皮质；j：正常组肾髓质；k：模型 A 组肾皮质；l：模型 A 组肾髓质；m：模型 B 组肾皮质；n：模型 B 组肾髓质；o：模型 C 组肾皮质；p：模型 C 组肾髓质。棕色所示为阳性表达区。

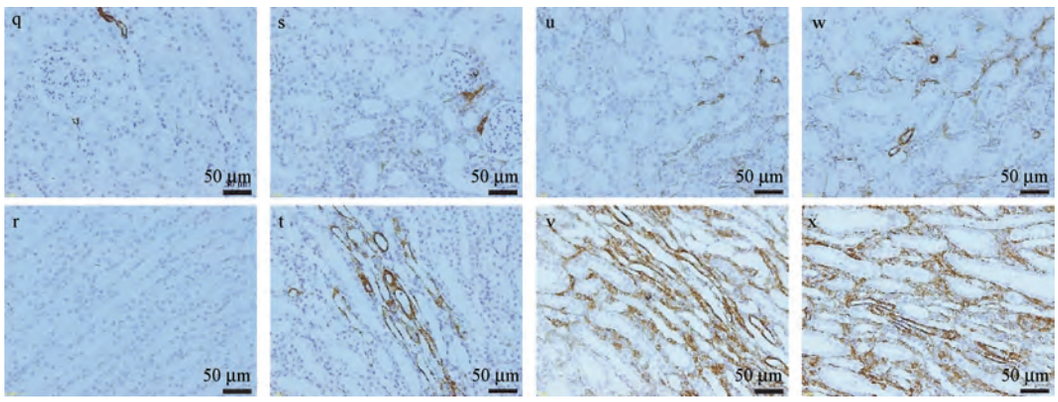
图 6　各组大鼠免疫组化 E-Cadherin 蛋白阳性表达

Note. i, Renal cortex in control group. j, Renal medulla in control group. k, Renal cortex of M-A. l, Renal medulla in M-A. m, Renal cortex of M-B. n, Renal medulla in M-B. o, Renal cortex of M-C. p, Renal medulla M-C. Brown area is the positive expression area.

Figure 6　Immunohistochemical positive expression of E-Cadherin protein in each group

UAN[13]。既往文献报道，大部分研究者选取氧嗪酸钾与尿酸混合成饲料或者氧嗪酸钾饲料饲喂联合尿酸灌胃，但饲喂方法易使大鼠产生饱腹感，食欲受限，造成不稳定的模型，不利于探究后续的药物干预实验[14]。国内研究人员尝试以不同剂量的氧嗪酸钾和尿酸制成的悬液形式对小鼠进行灌胃，1 周后观察到 sUA 显着增加且无肾损伤。我国也有不同剂量的氧嗪酸钾和尿酸混悬液灌胃的方法，1 周后小鼠 sUA 明显升高，但未观察到肾组织明显损伤[15]。通过灌胃该方式可控性较强，因此，我们决定选用氧嗪酸钾与不同剂量尿酸混合给予实验大鼠灌胃方式造模，保证造模药物精确摄入，同时使灌胃次数减少。

本研究结果显示，与正常组相比（163.20 ± 24.55），氧嗪酸钾联合低剂量、中剂量尿酸（121.20 ±22.82、116.20±17.63）造模前后体重差值明显降低，考虑在造模药物刺激下，大鼠食欲受限，而氧嗪酸钾联合高剂量尿酸（145.20±31.49）组差异不明显，考虑组内差异较大。灌胃 4 周后，氧嗪酸钾（750 mg/kg）联合低剂量（150 mg/kg）、中剂量（300 mg/kg）及高剂量（600 mg/kg）尿酸组大鼠较于正常组 sUA 水平明显升高约 6 倍，但是各模型组间的



注:q:正常组肾皮质;r:正常组肾髓质;s:模型 A 组肾皮质;t:模型 A 组肾髓质;u:模型 B 组肾皮质;v:模型 B 组肾髓质;w:模型 C 组肾皮质;x:模型 C 组肾髓质。棕色所示为阳性表达区。

图 7 各组大鼠免疫组化 α-SMA 蛋白阳性表达

Note. q, Renal cortex in control group. r, Renal medulla in control group. s, Renal cortex of M-A. t, Renal medulla in M-A. u, Renal cortex of M-B. v, Renal medulla in M-B. w, Renal cortex of M-C. x, Renal medulla M-C. Brown area is the positive expression area.

Figure 7 Immunohistochemical positive expression of α-SMA protein in each group

sUA 水平在并未存在尿酸剂量依赖性。BUN 和 sCr 作为常用评估肾功能的生化指标,常用来评估肾功能情况,在造模 4 周后,氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸组较正常组 sCr 水平分别升高约 1.5 倍、1.7 倍。在此研究中所采用的 UAN 大鼠模型相比于腺嘌呤诱导 UAN 模型的方法,肾功能不全程度相对更轻[11,16]。造模 4 周后,各模型组 BUN 水平对比于正常组,升高不显著,考虑各组肾功能不全程度可能与此有关。有研究显示 BUN 可被肾小管重吸收,只有当肾小球滤过率降低在 60%以上时,BUN 才会大幅升高,且对于肾功能判断,sCr 敏感程度高于 BUN[17]。此外,我们发现 UAN 大鼠的血脂也有所改变通过我们的观察显示,氧嗪酸钾联合低剂量未出现 TG 明显变化,当出现肾功能减退时,氧嗪酸钾联合中剂量和高剂量尿酸反而降低了血清 TG 水平,其中氧嗪酸钾联合中剂量尿酸 TG 降低更为显著,而氧嗪酸钾联合中剂量尿酸组的血尿酸水平也高于高剂量尿酸组,说明尿酸本身对大鼠甘油三酯代谢存在影响,目前具体机制并尚不明确。既往临床报道 HUA 或 UAN 患者易伴发高 TG 血症[18-19],而我们的研究与之相反。与其他 UAN 造模方法相比较,考虑可能与造模药物中所选用的尿酸相关,因为尿酸可不通过肝的嘌呤代谢,从而直接导致 sUA 水平上升。

此外,我们构建的 UAN 大鼠肾病变部位主要集中在肾小管间质,肾组织病理 HE 染色显示,与正常组相比,氧嗪酸钾联合低剂量尿酸组中仅出现部分肾小管扩张,未见萎缩及炎症浸润,而氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸组可见明显的肾小管扩张以及萎缩的肾小管上皮细胞、脱落的刷状缘和细胞核数量大幅降低,肾间质区分布着大量的炎性细胞。此外,经由 Masson 染色结果发现,氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸蓝色胶原纤维所占比例明显增加。CD68 作为炎症蛋白,我们研究结果显示氧嗪酸钾联合低剂量、中剂量、高剂量尿酸组的大鼠肾 CD68 表达量均有所增加,这与以往报道结果相似,尿酸可以激活肾组织和肾小管上皮细胞中 NLRP3 炎性小体的活化和凋亡[20],致因可能为尿酸对肾小管上皮细胞刺激所致。另外肾小管间质区被大量炎性细胞浸侵,尤其是巨噬细胞,而尿酸可激活巨噬细胞中 LR4/MyD88/NFκB 通路,同时多种炎症细胞因子被释放,如 IL-1β、TNF-α、MCP-1 等[21]。此外,,而肾小管 EMT 作为肾小管间质纤维化的早期标志,在肾小管间质纤维化发生之前可存在,而肾小管间质纤维化则是慢性肾病的主要特性之一。研究显示,尿酸诱导大鼠肾小管上皮细胞中 α-SMA 以及波形蛋白表达的增加而降低 E-Cadherin 的表达,说明了 EMT 的发生[22],而尿酸盐性肾病也能刺激 TGF-β 的产生和激活 NLRP3 炎性小体从而调节肾炎症和纤维化[23]。鉴此我们检测了 E-Cadherin 和 α-SMA 在该 UAN 模型大鼠肾中的表达变化,氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸组的大鼠肾 E-Cadherin表达量较正常组明显降低,而 α-SMA 达量均有所增加,说明氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量

尿酸组的大鼠都有不同程度的损伤。在尿酸刺激下,肾小管细胞可产生分泌促纤维化前体物质,如 NF-κB 通路被尿酸激活后,能够促进肾小管上皮细胞赖氨酰氧化酶、细胞间黏附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 的表达,导致细胞外基质合成提高,由此引发间质纤维化[24]。

氧嗪酸钾(750 mg/kg)联合低剂量(150 mg/kg)、中剂量(300 mg/kg)、高剂量(600 mg/kg)尿酸在干预大鼠 4 周后,皆会导致大鼠 sUA 水平大幅度上调,其中氧嗪酸钾联合低剂量尿酸即出现轻微的炎症变化,但氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸炎症变化较为明显,且只有氧嗪酸钾联合中剂量、高剂量尿酸才有显著的 EMT 改变和肾间质纤维化改变。综上所述,大鼠肾功能异常和肾病理损伤的情况均只出现在氧嗪酸钾联合中、高剂量尿酸组,而且,在造模 4 周的期限中,中、高剂量模型组中肾损伤程度差异尚不明显,由此,我们认为氧嗪酸钾(750 mg/kg)联合中剂量尿酸(300 mg/kg)连续灌胃诱导大鼠 4 周可作为构建 UAN 大鼠模型较为理想的方法。

参考文献:

[1] Fathallah-Shaykh SA, Cramer MT. Uric acid and the kidney [J]. Pediatr Nephrol, 2014,29(6): 999-1008.

[2] Yang WX, Ma Y, Hou YL, et al. Prevalence of hyperuricemia and its correlation with serum lipids and blood glucose in physical examination population in 2015 - 2018: a retrospective study [J]. Clin Lab, 2019,65(8): 10.

[3] 冯学轩, 刘月姝, 饶子亮, 等. 急、慢性高尿酸血症模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2020,30(1): 74-80.

[4] Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, et al. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat [J]. Am J Nephrol, 2003, 23(1): 2-7.

[5] Xu W, Huang Y, Li L, et al. Hyperuricemia induces hypertension through activation of renal epithelial sodium channel (ENaC) [J]. Metabolism, 2016, 65(3): 73-83.

[6] 霍帅. 高尿酸肾病患者血液代谢组学分析及肾茶治疗高尿酸肾病的实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.

[7] Wang S, Fang Y, Yu X, et al. The flavonoid-rich fraction from rhizomes of Smilax glabra Roxb. ameliorates renal oxidative stress and inflammation in uric acid nephropathy rats through promoting uric acid excretion [J]. Biomed Pharmacother, 2019,111:162-168.

[8] 谢盛彬, 王伟铭, 陈楠. UUO 模型大鼠肾间质纤维化动态进展及 α-SMA、TGF-β_1 和 VDR 表达变化 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2010, 30(7): 752-757.

[9] Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, et al. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat [J]. Am J Nephrol, 2003, 23(1): 2-7.

[10] 孟彦, 张豪, 贺宁, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾脏病大鼠模型的骨与矿物质代谢异常 [J]. 中国比较医学杂志, 2018,28(1): 8-15.

[11] Claramunt D, Gil-Peña H, Fuente R, et al. Chronic kidney disease induced by adenine: a suitable model of growth retardation in uremia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 309(1): F57-F62.

[12] 周道远, 陈敏, 刘岩. 不同造模剂诱导大鼠高尿酸血症模型的可行性比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(10): 23-26.

[13] 何敏, 周宏, 黄小平. 尿酸性肾病所致慢性肾功能不全的特点 [J]. 中国实验诊断学, 2000, 4(6): 287-288.

[14] Xu W, Huang Y, Li L, et al. Hyperuricemia induces hypertension through activation of renal epithelial sodium channel (ENaC) [J]. Metabolism, 2016, 65(3): 73-83.

[15] 王凯. 高尿酸血症的代谢组学研究及尿酸性肾损伤动物模型的构建 [D]. 上海:上海应用技术学院, 2016.

[16] 李秀花, 赵丽君, 李娜, 等. 腺嘌呤诱导幼鼠慢性肾功能衰竭模型建立的实验研究 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(11): 978-981.

[17] 麦志周, 蔡琳琳, 甘广芳. 血清胱抑素 C 与血清肌酐、尿素氮在老年人肾功能评价中的对比 [J]. 医学检验与临床, 2010, 21(2): 27-28, 44.

[18] Zaragoza-Garcia O, Navarro-Zarza JE, Maldonado-Anicacio JY, et al. Hypertriglyceridaemic waist is associated with hyperuricaemia and metabolic syndrome in rheumatoid arthritis patients [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(1): 722-729.

[19] 张燕子, 张艾莎, 隋晓露, 等. 高尿酸血症肾病患者炎性因子 IL-1β、IL-18 表达的研究 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(23): 2429-2434.

[20] Li G, Guan C, Xu L, et al. Scutellarin ameliorates renal injury via increasing CCN1 expression and suppressing NLRP3 inflammasome activation in hyperuricemic mice [J]. Front Pharmacol, 2020,11:584942.

[21] Kang DH, Nakagawa T, Feng L, et al. A role for uric acid in the progression of renal disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2002,13(12): 2888-2897.

[22] Tao M, Shi Y, Tang L, et al. Blockade of ERK1/2 by U0126 alleviates uric acid-induced EMT and tubular cell injury in rats with hyperuricemic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(4): F660-F673.

[23] Wang YJ, Chen YY, Hsiao CM, et al. Induction of autophagy by pterostilbene contributes to the prevention of renal fibrosis via attenuating NLRP3 inflammasome activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 436.

[24] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222.

〔收稿日期〕2021-01-28

周至品,农汝楠,覃乐,等. 三叶香茶菜介导 IκB-α 磷酸化对 CCl_4 致大鼠肝纤维化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 10-15.
Zhou ZP, Nong RN, Qin L, et al. *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by downregulating IκB-α phosphorylation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 10-15.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 002

三叶香茶菜介导 IκB-α 磷酸化对 CCl_4 致大鼠肝纤维化的影响

周至品[1],农汝楠[2],覃 乐[3],刘代华[1],王竟静[3],陈 勇[3],王晓源[1*]

(1.广西医科大学附属柳州市人民医院,广西 柳州 545006;2.右江民族医学院,广西 百色 533000;
3.广西中医药大学,南宁 530001)

【摘要】 目的 探讨三叶香茶菜通过影响 IκB-α 及其磷酸化下调核转录因子(nuclear transcription factor-κB, NF-κB)信号通路减轻四氯化碳诱导大鼠肝纤维化。**方法** 采用 CCl_4 肝纤维化大鼠模型,生化检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、羟脯氨酸(HYP),ELISA 检测转化生长因子 β1(TGF-β1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)水平、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α),荧光定量 PCR 法检测大鼠肝组织 Toll 样受体 4(TLR4)mRNA、NF-κB p65 mRNA、NF-κB 抑制蛋白-α(IκB-α)mRNA 的表达,Western blot 法检测大鼠肝组织中 TLR4、NF-κB p65、p-IκB-α 蛋白表达,HE 染色评价肝组织病理损害。**结果** 与模型组相比较,三叶香茶菜能够显著抑制肝纤维化大鼠中 ALT、HYP、TGF-β1、α-SMA、IL-6、TNF-α 水平,改善大鼠肝组织病理损害,显著抑制肝纤维化大鼠 TLR4 mRNA、NF-κB p65 mRNA 的表达,上调 IκB-α mRNA 的表达,下调 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达,下调 p-IκB-α 蛋白的表达。**结论** 三叶香茶菜下调IκB-α 磷酸化,抑制 NF-κB 信号通路的活化,达到抗肝慢性炎症损伤作用。

【关键词】 三叶香茶菜;肝纤维化;IκB-α;p-IκB-α;NF-κB
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0010-06

Isodon ternifolius (D. Don) Kudo alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by downregulating IκB-α phosphorylation

ZHOU Zhipin[1], NONG Runan[2], QIN Le[3], LIU Daihua[1], WANG Jingjing[3], CHEN Yong[3], WANG Xiaoyuan[1*]
(1. Liuzhou People's Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545006, China. 2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000. 3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001)

【Abstract】 Objective To investigate whether the *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo attenuates carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver fibrosis in rats by downregulating the nuclear transcription factor-κB (NF-κB) signaling pathway through interference with IκB-α phosphorylation. **Methods** Hepatic fibrosis was induced in rats with CCl_4. Biochemical analysis was used to detect alanine aminotransferase (ALT) and hydroxyproline (HYP), and the enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect transforming growth factor (TGF-β1), α-smooth muscle actin (α-SMA), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels in sera. Fluorescence quantitative PCR was used to

[基金项目]国家自然科学基金项目(81760751);柳州市科技计划项目(2020NB0201B078);柳州市人民医院引进高层次人才科研启动基金项目(LRYGCC202104);广西自然科学基金项目(2021GXNSFAA075020);广西研究生教育创新计划资助项目(YCXJ2021009)。
[作者简介]周至品(1976—),男,博士,主任药师,硕士研究生导师,研究方向:中药药理与临床药学研究。E-mail:gxzhouzhipin@126.com
[通信作者]王晓源(1972—),女,学士,主任医师,研究方向:重症医学研究工作。E-mail:wangxiaoyuan1025@163.com

detect Toll-like receptor 4 (TLR4), NF-κB p65, IκB-α mRNA expression, and Western blot were used to analyze TLR4, NF-κB p65, and phosphorylated (p)-IκB-α protein expression in rat liver tissues. Hematoxylin-eosin staining was used to evaluate histopathological damage in the rat livers. **Results** Compared with that in the model group, the pathological damage to the livers of rats treated with *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo extracts was ameliorated; the levels of ALT, HYP, TGF-β1, α-SMA, IL-6 and TNF-α in the serum of rats with liver fibrosis treated with *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo extracts were significantly reduced; the expression of TLR4 and NF-κB p65 mRNA were significantly inhibited; IκB-α mRNA was significantly upregulated; and the expression of TLR4, NF-κB p65 and p-IκB-α protein was downregulated. **Conclusions** *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudon alleviated liver fibrosis by downregulating IκB-α phosphorylation and inhibiting activation of the NF-κB signaling pathway.

【Keywords】 *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo; hepatic fibrosis; IκB-α; p-IκB-α; NF-κB

三叶香茶菜(*Isodon ternifolius*(D. Don)Kudo)为唇形科植物牛尾草,为广西瑶药材[1],可全草入药,药性甘、微苦,凉,具利湿疏肝、清热解毒的功效,多用于急慢性肝炎及早期肝硬化等疾病。前期的研究表明三叶香茶菜有抵抗大鼠肝纤维化作用,能够显著下调肝纤维化大鼠 TGF-β1 的表达[2-3]。三叶香茶菜能降低大鼠肝组织中 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)与核转录因子(nuclear transcription factor-κB, NF-κB)表达及入核,下调 IL-1β、TNF-α、IL-6 的细胞因子水平[4-5]。但三叶香茶菜如何抑制 TLR4/NF-κB 的的活化仍有待进一步研究。研究表明 IκB-α 与 NF-κB 结合不利于 NF-κB 活化入核,而 IκB-α 磷酸化水解与 NF-κB 分离,NF-κB 即活化入核,促进炎症因子的表达,引起细胞炎症反应[6]。因此,本研究拟以 IκB-α 分子及其磷酸化蛋白为靶点,进一步研究三叶香茶菜抗肝纤维化大鼠 NF-κB 信号通路活化的作用机制,为三叶香茶菜的利用提供新的理论。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级 SD 大鼠,96 只,雌雄各半,体重为 180~200 g(±20%),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0002]。动物饲养于广西中医药科学实验中心动物房[SYXK(桂)2019-0001]。本研究经广西中医药大学伦理委员会批准(DW20190329-05),实验设计及实施过程中严格遵循动物实验的 3R 原则。

1.2　主要试剂

药材来源于广西金秀县,并由广西中医药大学梁子宁教授鉴定为三叶香茶菜。秋水仙碱(20180804)购自广东彼迪药业有限公司;ALT(20190727)、HYP(20190728)生化试剂盒均购于南京建成生物工程研究所公司;TGF-β1(TAEJCJYV2W)、α-SMA(QPPHWEUQE8)、IL-6(ZCN5LZ69HT)、TNF-α(9G5HET75U2)ELISA 试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;TLR4(bs-20594R)、p-IκB alpha(bsm-52169R)、NF-κB p65(bs-20159R)抗体均购于 Bioss 公司;β-actin 抗体(ab8227)购于 abcam 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　动物造模及给药

取 SPF 级 SD 大鼠 96 只,随机分成 6 组,每组 16 只,即对照组、模型组、秋水仙碱(0.2 mg/kg)组、三叶香茶菜高剂量(80 g/kg)组、三叶香茶菜中剂量(40 g/kg)组、三叶香茶菜低剂量(20 g/kg)组(按生药量计)。除对照组外,模型组、秋水仙碱组、三叶香茶菜高剂量、中剂量、低剂量组分别给予皮下注射 40% CCl_4 花生油混合溶液,首剂量为 5 mL/kg,后调整为 3 mL/kg,2 次/周,连续注射 12 周。造模 4 周后,正常组灌胃生理盐水,其余各组给予相应药物灌胃,给药 1 次/日,治疗 8 周。末次给药后,禁食不禁水 12 h 大鼠麻醉后,腹主动脉取血,分离肝组织[5]。

1.3.2　指标检测

(1)HE 染色　取肝组织,福尔马林固定,石蜡包埋并切片,切片 2 mm 厚,HE 染色,显微镜下观察肝组织病理情况。

(2)生化法　采用酶标仪测定血清中 ALT 活力及 HYP 水平,操作均严格按照试剂盒说明。

(3)ELISA 法　严格按照 ELISA 试剂盒操作要求,测定血液中 TGF-β1、α-SMA 纤维相关因子及 IL-6、TNF-α 炎症因子水平。

(4)荧光定量 PCR　取肝组织,提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,制备 DNA 模版,最后荧光定量 PCR 反应。所有引物均由上海生工生物工程技术

服务有限公司合成,引物信息见表 1。

(5) Western blot 取肝组织,提取组织蛋白。100℃变性 10 min,凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜,一抗,4℃孵育 12 h,二抗,37℃孵育 1 h,ECL 显色,曝光成像,得到灰度值,计算相对表达。

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±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两组间差异比较方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时采用 T_2 检验;计数资料用非参数秩和检验比较分析。检验水准 $\alpha=0.05$,$\alpha=0.01$。

2 结果

2.1 三叶茶香菜对大鼠肝组织慢性病理损害的保护作用

光镜下,对照组肝小叶完整清晰,肝细胞围绕中央静脉,呈放射性排列,未见坏死,无炎性细胞浸润,未见纤维组织增生。模型组出现肝小叶结构破坏,肝细胞索排列紊乱,纤维间隔增厚,肝细胞变性,部分坏死,假小叶形成。秋水仙碱组及三叶香茶菜组肝组织损伤程度叫模型组明显减轻,肝细胞变性、炎细胞浸润、坏死情况有所改善。病理见图 1,评分表见表 2。

2.2 三叶香茶菜对肝纤维化大鼠 ALT、HYP 水平的影响

ALT、HYP 是反应肝损伤及纤维化相关的生化指标。生化结果发现,模型组较对照组大鼠血清 ALT、HYP 水平有显著升高($P<0.01$);与模型组比,秋水仙碱组、三叶香茶菜高、中剂量组 ALT 的活力水平明显降低($P<0.01$),三叶香茶菜中、低剂量组 HYP 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表 3。

2.3 三叶香茶菜对肝纤维化大鼠 IL-6、TNF-α、TGF-β1、α-SMA 表达影响

炎症因子及纤维化化相关因子 IL-6、TNF-α、TGF-β1、α-SMA 与肝纤维化密切相关。ELISA 结果显示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 IL-6、TNF-α、TGF-β1、α-SMA 的表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组相比较,秋水仙碱组及三叶香茶菜高、中、低剂量组 IL-6、TGF-β1、α-SMA 表达水平显著降低($P<0.05$,$P<0.01$),秋水仙碱组和三叶香茶菜中剂量组 TNF-α 的表达水平显著降低($P<0.01$),三叶香茶菜高、低剂量大鼠血清中 TNF-α 的水平较模型组有下降,但差异不具有统计学意义,见表 4。结果表明,三叶香茶菜能降低炎症因子 IL-6、TNF-α 及 TGF-β1、α-SMA 纤维化相关因子的水平,抑制肝纤维化。

2.4 三叶香茶菜对大鼠肝组织 TLR4/NF-κB 信号通路表达的影响

RT-qPCR 和 Western blot 结果均表明,与对照组相比,模型组 TLR4、NF-κB p65 表达水平明显升高($P<0.05$)。RT-qPCR 结果发现,与对组组比,模型组 IκB-α mRNA 无统计学差异,但是有下降趋势,而 Western blot 结果发现 p-IκB-α 表达水平升高($P<0.05$)。RT-qPCR 和 Western blot 结果均表明三叶香茶菜组较模型组 IκB-α 表达水平显著升高($P<0.05$),TLR4、NF-κB p65、p-IκB-α 蛋白水平显著降低($P<0.05$),见图 2。综上,结果表达三叶香茶菜抑制了 IκB-α 的磷酸化从而抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的活化。

表 1 Real-time PCR 引物序列

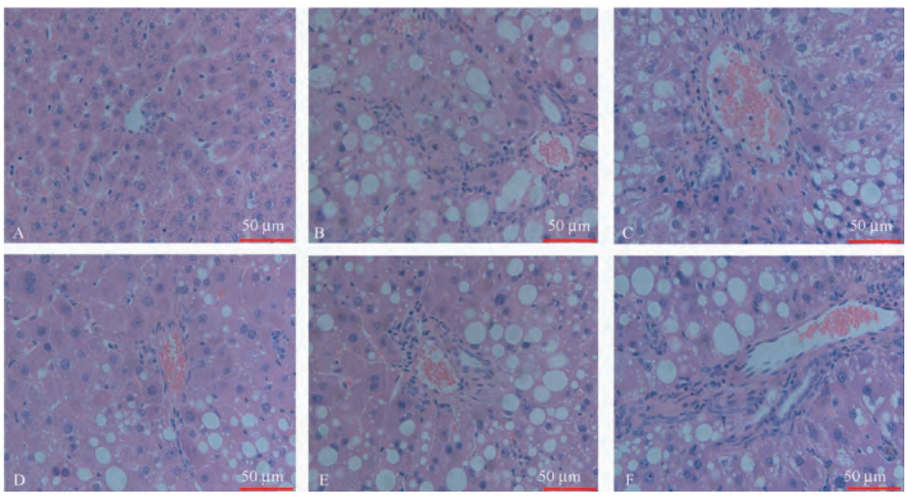
Table 1 Real-time PCR primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence	长度(bp) Length
ACTB	F:5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTC-3' R:5'-CAGCTCAGTAACAGTCCGCC-3'	136
TLR4	F:5'-GAGGACAATGCTCTGGGGAG-3' R:5'-ATGGGTTTTAGGCGCAGAGT-3'	153
IκB-α	F:5'-CCCAAGTACCCGGATACAGC-3' R:5'-GGGCAACTCATCTTCCGTGA-3'	124
NF-κB p65	F:5'-ACAGAGGAAACGCCAGAADC-3' R:5'-AATGCAATCCCACCGTAAGC-3'	183

表 2 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠肝组织病理损害程度影响($n=8$)

Table 2 Effect of *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo on the damage of liver tissue of the rats with liver fibrosis induced by CCl_4

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	肝病理损害程度 Degree of liver damage					平均秩次 Mean rank	χ^2 值 χ^2 value
		−	+	++	+++	++++		
对照组 Control gourp	/	8	0	0	0	0	4.50	$\chi^2=35.126$
模型组 Model group	/	0	0	1	1	6	42.31	$P<0.01$
秋水仙碱组 Colchicine group	0.0002	0	5	2	1	0	23.31	/
三叶香茶菜高剂量组 High dose *Isodon ternifolius* group	80	0	4	1	2	1	27.69	/
三叶香茶菜中剂量组 Medium dose *Isodon ternifolius* group	40	0	4	2	2	0	25.88	/
三叶香茶菜低剂量组 Low dose *Isodon ternifolius* group	20	0	5	2	1	0	23.31	/



注：A：对照组；B：模型组；C：秋水仙碱组；D：三叶香茶菜高剂量组；E：三叶香茶菜中剂量组；F：三叶香茶菜低剂量组。

图 1　三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠肝组织病理损害抵抗作用(HE 染色)

Note. A, Control gourp. B, Model group. C, Colchicine group. D, High dose *Isodon ternifolius* group. E, Medium dose *Isodon ternifolius* group. F. Low dose *Isodon ternifolius* group.

Figure 1　Effect of *Isodon ternifolius* (D.Don) Kudo on liver damage of the rats with liver fibrosis induced by CCl_4 (HE staining)

表 3　三叶香茶菜对 CCl_4 诱导肝纤维化大鼠 ALT、HYP 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3　Effect of *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo on ALT and HYP level in rats with liver fibrosis induced by CCl_4

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	*n*	丙氨酸氨基转移酶(U/L) ALT	羟脯氨酸(μg/mg prot) HYP
对照组 Control gourp	/	16	30.9±7.1**	0.233±0.018**
模型组 Model group	/	12	166.2±52.0	0.425±0.094
秋水仙碱组 Colchicine group	0.0002	12	117.9±16.0**	0.313±0.062*
三叶香茶菜高剂量组 High dose *Isodon ternifolius* group	80	16	94.2±34.5**	0.352±0.126
三叶香茶菜中剂量组 Medium dose *Isodon ternifolius* group	40	14	117.0±17.0**	0.331±0.072*
三叶香茶菜低剂量组 Low dose *Isodon ternifolius* group	20	12	139.4±26.0	0.284±0.028**

注：与模型组比较，*P<0.05，** P<0.01。

Note. Compared with model group, *P<0.05, ** P<0.01.

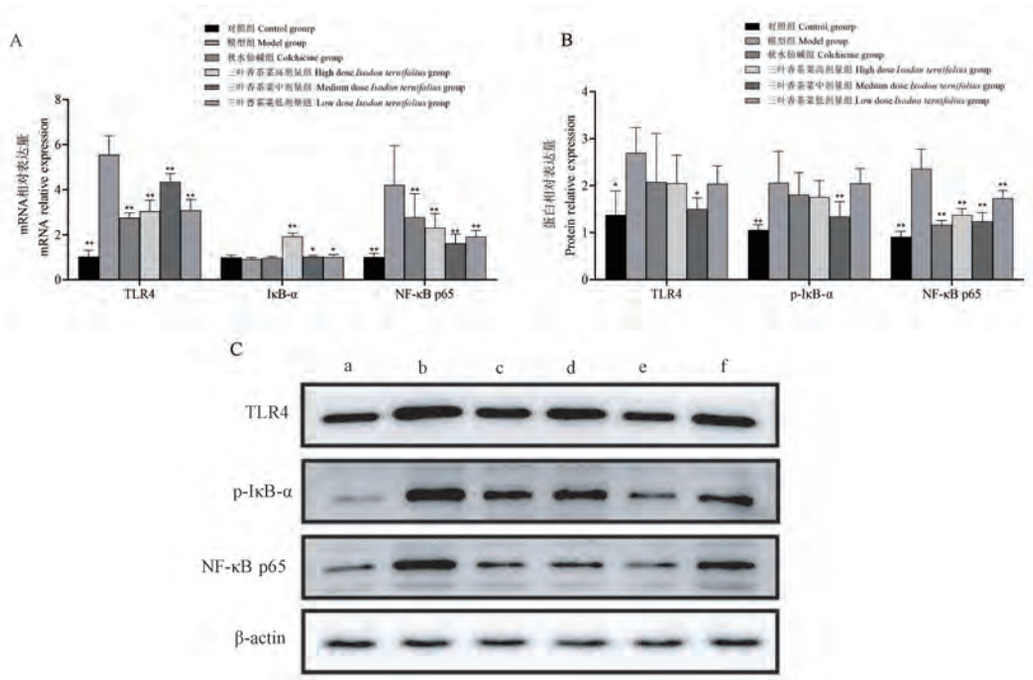
表 4　三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠 IL-6、TNF-α、TGF-β1、α-SMA 水平的作用($\bar{x}\pm s$)

Table 4　Effect of *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo on the IL-6, TNF-α, TGF-β1, α-SMA in rats with liver fibrosis induced by CCl_4

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	*n*	白介素 6 (ng/mL) IL-6	肿瘤坏死因子 α (pg/mL) TNF-α	转化生长因子 β1 (ng/mL) TGF-β1	α-平滑肌肌动蛋白 (ng/mL) α-SMA
对照组 Control gourp	/	16	174.0±11.2**	88.8±16.2**	2.5±0.4**	16.9±3.9**
模型组 Model group	/	12	235.1±17.8	156.1±14.7	5.0±0.6	43.1±4.1
秋水仙碱组 Colchicine group	0.0002	12	207.9±14.6**	139.9±14.7*	3.6±0.6**	19.3±4.1**
三叶香茶菜高剂量组 High dose *Isodon ternifolius* group	80	16	196.8±13.9**	141.8±9.9	4.3±0.3*	23.8±6.7**
三叶香茶菜中剂量组 Medium dose *Isodon ternifolius* group	40	14	204.4±10.8**	111.4±14.4**	4.3±0.5*	22.8±7.0**
三叶香茶菜低剂量组 Low dose *Isodon ternifolius* group	20	12	211.1±9.8**	147.0±18.2	4.8±0.5	19.6±5.6**

注：与模型组比较，*P<0.05，** P<0.01。

Note. Compared with model group, * P<0.05, ** P<0.01.



注:A:荧光定量 PCR 检测 TLR4、IκB-α、NF-κB p65 信号蛋白 mRNA 相对表达量。B:Western blot 检测 TLR4、p-IκB-α、NF-κB p65 信号蛋白相对表达量;C:蛋白印迹条带图。a:对照组;b:模型组;c:秋水仙碱组;d:三叶香茶菜低剂量组;e:三叶香茶菜中剂量组;f:三叶香茶菜高剂量组。与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 2 三叶香茶菜对肝纤维化大鼠 TLR4/NF-κB 信号蛋白及 mRNA 表达的影响

Note. A, Relative mRNA expression of TLR4, IκB-α and NF-κB p65 were detected by real-time qPCR. B, Western blot was used to detect the relative expression of TLR4, p-IκB-α and NF-κB p65 signaling proteins. C, Western blot strip. a, Contral group. b, Model group. c, Colchicine group. d, Low dose *Isodon ternifolius* group. e, Medium dose *Isodon ternifolius* group. f, High dose *Isodon ternifolius* group. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2 Effect of *Isodon ternifolius* (D. Don) Kudo on the expression of TLR4/NF-κB signal protein and mRNA in liver fibrosis rat

3 讨论

为进一步明确三叶香茶菜对 TLR4/NF-κB 信号通路的调控,本研究采用 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化模型,研究了三叶香茶菜对 TLR4、NF-κB p65、IκB-α、p-IκB-α 信号蛋白的影响。本研究结果表明,经三叶香茶菜治疗后,治疗组大鼠肝组织慢性损害明显改善。三叶香茶菜能降低血清 IL-6、TNF-α 炎症因子以及 TGF-β1、α-SMA 纤维化相关因子水平,下调肝组织中的 TLR4、NF-κB p65,上调 IκB-α mRNA 表达,抑制 IκB-α 磷酸化水平。

TLR4 是一种识别病原相关分子模式中的识别受体,它是最早发现的第一个 Toll 样受体相关蛋白[7],具有识别病原相关分子模式(PAMPs)及损伤相关分子模式(DAMPs)的作用[8]。TLR4 活化后激活下游的 NF-κB 信号通路,而 NF-κB 是重要的炎症转录因子,其激活可增强炎症反应的基因转录,致大量促炎因子 IL-6、TNF-α 等释放,发生炎症反应,促进肝组织损伤[9]。研究表明 TLR4 在肝纤维化的进展中发挥重要作用[10],TLR4/NF-κB 是调控 HSC 及炎性细胞激活的信号通路,参与肝损伤时调控炎症细胞因子的形成[11]。TNF-α 是 TLR4 下游重要的促炎因子[12],其具有诱导炎性细胞因子及趋化因子发生炎症级联效应的作用,还能够促进纤维化因子的表达[13],增加 ECM 在肝的沉积,加速纤维化的进程。NF-κB 是 Rel 蛋白家族的成员之一,其主要以同源或异源的二聚体的形式存在。具有对 DNA 识别、二聚化及核定位等生物学功能。未活化的 NF-κB 主要存在于细胞质中,以 p65 亚基形式与 IκB-α(NF-κB 的抑制蛋白)结合后以三聚体形式存在于细胞浆中[14]。当受到细胞因子、LPS、氧自由基等应激刺激时,促进 NF-κB 的活化释放炎症因子导致肝细胞损伤[15]。

NF-κB 信号激活过程包括 NF-κB 诱导激酶(NIK)激活 IκB 激酶(IKK-α),致使 IκB-α(NF-κB 抑制蛋白)磷酸化后降解,NF-κB 复合物解离,最后

致使 NF-κB 活化后进入细胞核促进其与相应的靶基因结合,导致一系列效应基因的表达,如 IL-1β、TNF-α、IL-6 等炎性细胞因子的合成与释放,引起细胞炎症、细胞增殖、形态改变、细胞分化、凋亡等[16]。而 IκB 为 NF-κB 的抑制分子,IκB 分子由 N 端和 C 端组成,N 端含有磷酸化和泛素化位点是信号反应区,C 端是能够组成与 NF-κB 亚基 RHD 结合的位点。其 IκB 蛋白均具有氨基酸的锚蛋白重复序列,其作用是与 NF-κB 同源结构域 RHD 相结合,从而隐藏 NF-κB 的核定位序列,抑制其 NF-κB 进入细胞核发生转录和翻译。相关研究发现,慢性乙型肝炎患者肝组织中的 NF-κB 的表达增加与肝纤维化的发生发展成正相关[17]。研究表明,NF-κB 的活化可以受到许多因素的抑制,其主要是通过抑制 IκB 的磷酸化及降解,上调 IκB 的表达或直接作用于 NF-κB 等途径抑制其活性[18]。研究表明,在肝中 IKK/NF-κB 信号的激活通过巨噬细胞介导慢性炎症加重肝纤维化[19]。当 IκB 被抑制,LPS 诱导小鼠模型的肝纤维化程度明显减轻,其机制是通过阻断 NF-κB 信号通路的活化,从而抑制炎症因子及纤维化相关因子的释放[20]。因此,增加 IκB-α 的表达及抑制其磷酸化都可以弱化 NF-κB 活化转核,抑制 TNF-α、IL-6 及 TGF-β 的合成和分泌,减轻肝纤维化的进展[21]。

综上表明,三叶香茶菜具有抗肝纤维化作用,其机制是通过升高 IκB-α 基因表达,下调 IκB-α 蛋白磷酸化水平,抑制了 NF-κB 活化转核,阻断 TLR4/NF-κB 信号通路的活化,从而抑制下游炎症细胞因子的表达,减弱肝的炎症损伤及纤维相关因子产生,达到抗肝纤维化作用。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)[M]. 南宁: 广西科学出版社, 2014.

[2] 覃洪含, 夏星, 王勤, 等. 三叶香茶菜对大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1372-1373.

[3] 夏星, 覃洪含, 王勤, 等. 三叶香茶菜防治大鼠肝纤维化作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 238-241.

[4] 周至品, 肖喜泉, 王勤, 等. 三叶香茶菜对 CCl_4 肝纤维化大鼠 NF-κB/IL-6 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 150-153.

[5] 周至品, 肖喜泉, 王勤, 等. 三叶香茶菜对四氯化碳致肝纤维化大鼠 TLR4 信号通路的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(2): 183-186, 262.

[6] Dorrington MG, Fraser IDC. NF-κB signaling in macrophages: dynamics, crosstalk, and signal integration[J]. Front Immunol, 2019, 10: 705.

[7] Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins[J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(6): 1-7.

[8] Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261.

[9] Guzzo C, Ayer A, Basta S, et al. IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes[J]. J Immunol, 2012, 188(2): 864-873.

[10] 王登妮, 徐军全, 宋维芳, 等. 肝纤维化过程中 Toll 样受体 4 在肝脏的表达分布及意义[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(6): 17-20, 38, 85.

[11] Rocha SW, De França ME, Rodrigues GB, et al. Diethylcarbamazine reduces chronic inflammation and fibrosis in carbon tetrachloride-(CCl_4-) induced liver injury in mice[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 696383.

[12] Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 177(2): 112-120.

[13] Beringer A, Miossec P. IL-17 and TNF-α co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells[J]. Clin Exp Immunol, 2019, 198(1): 111-120.

[14] Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, et al. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases[J]. Hepatol Int, 2010, 4(4): 659-672.

[15] 梁磊, 马畅, 刘捷, 等. 制动致福利损伤大鼠肝细胞中 NF-κB 的表达[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(11): 28-31.

[16] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF-κB system[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3): 227-241.

[17] 李伟伟, 王全楚, 宋新文, 等. 核转录因子 κB p65 与肝炎肝纤维化的相关性分析[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(27): 1886-1888.

[18] Kanarek N, Ben-Neriah Y. Regulation of NF-κB by ubiquitination and degradation of the IκBs[J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 77-94.

[19] Sunami Y, Leithäuser F, Gul S, et al. Hepatic activation of IKK/NF-κB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation[J]. Hepatology, 2012, 56(3): 1117-1128.

[20] Wei J, Shi M, Wu WQ, et al. IκB kinase-beta inhibitor attenuates hepatic fibrosis in mice[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(47): 5203-5213.

[21] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.

〔收稿日期〕2021-04-25

孙晓峰,黄欣怡,曾贵荣,等. 膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响及左归丸含药血清干预作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 16-21.
Sun XF, Huang XY, Zeng GR, et al. Effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and intervention with serum containing Zuogui pill components [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 16-21.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 003

膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响及左归丸含药血清干预作用

孙晓峰[1],黄欣怡[1],曾贵荣[2],龚力民[3*],乔 江[4],阳松威[3],周 琳[5]

(1.湖南中医药大学医学院,长沙 410208;2.湖南省药物安全评价研究中心 & 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室,长沙 410331;3.湖南中医药大学药学院,长沙 410208;
4.湖南中医药大学附属第一医院妇产科,长沙 410007;5.长沙医学院,长沙 410219)

【摘要】 目的 探讨膜细胞对化疗损伤性颗粒细胞的影响以及左归丸含药血清的干预作用。**方法** 制备左归丸含药血清,培养大鼠卵巢颗粒细胞和膜细胞,分 8 组,分别是(1)空白对照组;(2)共培养组;(3)ZGW 血清组;(4)ZGW 血清+共培养组;(5)模型组;(6)模型+共培养组;(7)模型+ZGW 血清组;(8)模型+ZGW 血清+共培养组。实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 Bax、Caspase-3、Beclin-1、p62、LC3B 在转录水平和翻译水平上的表达。**结果** 模型组的 Beclin-1、LC3B、Bax 及 Caspase-3 基因在转录水平及翻译水平上均有高表达,加入 10%左归丸含药血清处理或与膜细胞共培养可下调上述基因的表达;p62 基因的表达较对照组降低,加入 10%左归丸含药血清处理或与膜细胞共培养可上调模型组 p62 基因表达。当实验组与膜细胞共培养时加入 10%左归丸含药血清后,5 种基因表达的变化程度更明显。**结论** 膜细胞能缓解体外颗粒细胞的化疗性损伤,且与左归丸含药血清有协同作用,与抑制颗粒细胞自噬和减少其凋亡有关。

【关键词】 左归丸;化疗损伤;颗粒细胞;膜细胞;自噬;凋亡
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0016-06

Effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and intervention with serum containing Zuogui pill components

SUN Xiaofeng[1], HUANG Xinyi[1], ZENG Guirong[2], GONG Limin[3*], QIAO Jiang[4], YANG Songwei[3], ZHOU Lin[5]

(1. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.
2. Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Changsha 410331.
3. College of Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208. 4. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007. 5. Changsha Medical College, Changsha 410219.)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of theca cells on granulosa cells injured by chemotherapy and the intervention effect of serum containing Zuogui pill (ZGW). **Methods** Serum containing Zuogui pill components was

[**基金项目**]国家自然科学基金(81774362,81303004);湖南省自然科学基金(2018JJ2290)。
[**作者简介**]孙晓峰(1975—),女,汉族,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:生殖内分泌疾病及肿瘤基础性研究工作。E-mail: 2642724115@ qq.com
[**通信作者**]龚力民(1980—),男,汉族,副教授,硕士生导师,研究方向:中药品质评价研究。E-mail: 5065451@ qq.com

prepared. Granulosa and theca cells were cultured and divided into 8 groups, including blank control group, coculture group, ZGW serum group, ZGW serum+coculture group, model group, model+coculture group, model+ZGW serum group and model+ZGW serum+coculture group. The expression levels of Bax, Caspase-3, Beclin 1, p62 and LC3B were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Beclin-1, LC3B, Bax and Caspase-3 were highly expressed in the model group at the transcriptional and translational levels, which were downregulated after adding 10% serum containing Zuogui pill components or co-culturing with theca cells. The gene expression of p62 was lower in the model group than that in the control group, and was upregulated by adding 10% serum containing Zuogui pill components or co-culturing with theca cells. When the experimental group was co-cultured with theca cells, the expression of these genes changed more substantially after the addition of 10% serum containing Zuogui pill components. **Conclusions** Theca cells alleviated the chemotherapy-induced injury of granulosa cells *in vitro* and demonstrated a synergistic effect with serum containing Zuogui pill components. These effects were related to the inhibition of autophagy and reduction in apoptosis of granulosa cells.

【**Keywords**】 Zuogui pill; chemotherapy injury; granulosa cells; theca cells; autophagy; apoptosis

女性因使用化疗药物所导致卵巢储备功能在 40 岁之前衰竭称为化疗性卵巢早衰(premature ovarian failure, POF),可导致继发性闭经并伴随血促性腺激素升高和雌激素下降所引起的一系列症状,此类患者罹患骨质疏松、心血管疾病等疾病风险性也明显增加。随着肿瘤疾病的明显年轻化以及病人对生育和生活质量的要求,如何改善化疗性卵巢早衰愈受关注[1-2]。发育中的卵泡由卵母细胞(oocyte, OC)、颗粒细胞(granulosa cells, GC)及膜细胞(theca cell, TC)组成,三者相互作用维持卵泡的生长发育以及卵巢的功能[3-4]。GC 为 OC 提供支持和营养,TC 与 GC 密不可分,为优势卵泡提供稳定的雌激素微环境,同时也是女性雌激素的主要来源。化疗药物的效果取决于它对快速分裂细胞的破坏能力,常用的化疗药物环磷酰胺对卵巢损伤作用不仅表现为其对生长期卵泡中 GC 增殖和 OC 发育的破坏,也可以通过损伤 DNA 的方式破坏静止期的原始卵泡,从而减小原始卵泡池的大小,降低卵巢储备。本团队及其他研究均提示化疗性 POF 动物模型中 GC 凋亡率上升,而左归丸可减少 GC 凋亡率,在一定程度上恢复卵巢功能[5-6]。环磷酰胺的体外活性成分磷酰胺氮芥(phosphoramide mustard,PM)在体外可通过促进凋亡和自噬过程损伤 GC;此种损伤能被 10%左归丸(ZGW)含药血清通过影响 GC 自噬和凋亡过程所缓解[7],目前关于 TC 的研究较少,其作用往往被小觑。本研究进一步探讨 TC 对化疗损伤性 GC 的影响以及左归丸含药血清对 TC 和 GC 共培养的干预机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 20 只,体重 250~270 g,8 周龄,用于制备含药血清,由湖南省斯莱克景达实验动物有限公司提供[SCXK(湘)2019-0015],动物饲养于湖南省药物安全评价研究中心 SPF 环境[SYXK(湘)2020-0015]。动物实验经湖南省药物安全评价研究中心伦理委员会批准(2020014),过程中遵循实验动物学的 3R 原则。

1.1.2 细胞

原代大鼠卵巢 GC(赛百慷上海生物技术股份有限公司,批号:iCell20191027)。原代大鼠卵巢 TC(赛百慷上海生物技术股份有限公司,批号:iCell201912025)。

1.2 主要试剂与仪器

左归丸由熟地、菟丝子、枸杞、川牛膝、山茱萸、山药、鹿角胶、龟板胶组成,购自北京同仁堂。按原配方比制成含 1 g/mL 生药的浸膏。磷酰胺氮芥(江苏倍达, 20180908);GC 专用培养基(iCell, PriMed-iCell-028);TC 专用培养基(iCell, PriMed-iCell-042);RIPA 蛋白裂解液(碧云天, P0013B);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天,P0012S);二抗(Anti Rabbit IgG/HRP, Abclonal, AS014,);β-actin 内参(Abclonal, AC026);兔抗 Beclin-1(Abclonal, A7353);兔抗 Caspase-3(Abclonal, A19654);兔抗 Bax(Abclonal, A19684);兔抗 p62(Abclonal, A19700);兔抗 LC3B(Abclonal, A19665);High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits(Thermo Fisher Scientific, EP0742);PowerUp SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific,A25742)。引物(上海生工)。Fast Pure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit(Vazyme,RC101-01);化学发光仪(博路腾);倒置显微镜(OLYMPUS IX71);电泳仪(北京六一);实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher,7500);分光光度计(Thermo Fisher,NanoDrop Lite)。

1.3 实验方法

1.3.1 左归丸含药血清制备与给药

SD 大鼠随机分 2 组:左归丸含药血清组和正常血清组各 10 只。1 g/mL 的左归丸浸膏,按照 245.7 g/(kg·d)剂量(根据成人与大鼠体表面积的换算公式计算出的大鼠用药量,相当于临床等效剂量的 9 倍),每天分 2 次给左归丸含药血清组动物连续灌服 3 d,正常血清组每天分 2 次给予等量纯净水连续灌服 3 d,两组于第 3 天末次灌胃后的 2~2.5 h,麻醉后腹主动脉进行采血,静置 30 min 后,离心并分离血清置于-20℃保存,实验前于 56℃、30 min 环境灭活,使用 0.22 μm 滤器过滤后使用。

1.3.2 造模与分组

分为 8 组:(1)空白对照组:10%正常血清专用培养基培养 48 h;(2)共培养组:10%正常血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,培养 48 h;(3)ZGW 血清组:10% ZGW 血清专用培养基培养 48 h;(4)ZGW 血清+共培养组:10% ZGW 血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,培养 48 h;(5)模型组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10%正常血清专用培养基继续培养 24 h;(6)模型+共培养组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10%正常血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,继续培养 24 h。(7)模型+ZGW 血清组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10% ZGW 血清专用培养基继续培养 24 h;(8)模型+ZGW 血清+共培养组:向 10%正常血清专用培养基中加入 PM,浓度为 30 μmol/L,培养 24 h 后,换液加入 10% ZGW 血清专用培养基,并插入培养用 TC 细胞的小室于孔板之上,继续培养 24 h。各组均在 37℃,5% CO_2 细胞培养箱培养。利用 0.4 μm 孔径的聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)-based 小室进行细胞共培养试验,具体方法如下:先分别制备 TC 细胞和 GC 细胞的细胞悬液,进行细胞计数,每组取 3×10^5个细胞,放至 1.5 mL 无菌 EP 管中,并用其各自专用培养基补齐至 600 μL。向 6 孔板中加入 2.4 mL 含有 10%正常血清的 GC 细胞专用培养基,同时加入 200 μL 事先准备的 GC 细胞悬液;上面放细胞小室,先向小室中加入 1.3 mL 含有 10%正常血清的 TC 细胞专用培养基,将 200 μL 的细胞悬液轻轻加入小室的上室中,尽量使细胞均匀分布到小室孔内(注意:保证上下室液体相互接触)。

1.3.3 qRT-PCR 法检测各组目的基因 mRNA 表达

根据试剂盒要求提取细胞总 RNA,检测 RNA 纯度及浓度后,使用琼脂糖电泳法检测 RNA 完整性。参照试剂盒操作说明,将 1 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA 后进行扩增,反应条件为 95℃、10 min,95℃、10 s,60℃、30 s,72℃、15 s,循环次数为 40 次。参照文献[8]方法分析实验数据,以 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法(*ct* 表示基本循环值)测定各目的 mRNA 基因相对表达量。试验重复 3 次。各组目的基因引物序列见表 1。

1.3.4 Western blot 检测各组目标蛋白的表达

弃培养基,用 1 mL PBS 缓冲液漂洗细胞 2 次,吸掉 PBS,用胰酶将细胞消化,使用移液枪反复吹打制成细胞悬液,取细胞悬液置于 EP 管内,1000 r/min 的速度离心 5 min 后,去上清,转移至无菌的 1.5 mL EP 管中。每管加入 200 μL 细胞裂解液 RIPA,用移液枪吸打,将细胞沉淀充分打散至溶液澄清,放入-80℃冰箱反复冻融 2 次后用超声破碎仪破碎细胞,放入提前预冷到 4℃的离心机,12000 r/min,离心 10 min;将上清转移到新的 1.5 mL EP 管中,做好标记待用。取 80 μg 蛋白样品量,加入 6×SDS 混合,置于 105℃高温变性 10 min,剩余的蛋白样品置于-80℃保存。变性后的各组蛋白经 SDS 凝胶电泳(2~3 h)、转膜(90 min)、封闭(60 min)、孵一抗(孵育 4~6 h 或 4℃过夜)、洗膜(10 min×3 次)、孵二抗(60 min)、再次洗膜(10 min×3 次)后。使用 ECL 显影液进行显影后,在 Tanon-5200 系统中,加入化学发光底物检测荧光信号,进行成像分析。定性和定

表 1 各组引物序列

Table 1 Primer sequence of each group

引物名称 Primer name	正向引物(5' to 3') Forward primer	反向引物(5' to 3') Reverse primer
Beclin-1	CGACATCTGGCACAGTGGACAGTTTG	AGCATGGAGCAGCAACACAGTC
LC3B	GTCAGCGTCTCCACACCAATCTC	TCCTGGGAGGCATAGACCATGTAC
p62	TGATTGAGTCCCTCTCCCAGATGC	CCGCTCCGATGTCATAGTTCTTGG
Bax	GATGCGTCCACCAAGAAGCTGAG	CACGGCGGCAATCATCCTCTG
Caspase-3	GTGGAGGCCGACTTCTTGTATGC	TGGCACAAAGCGACTGGATGAAC

量分析各组条带 Beclin-1、LC3B、Bax、Caspase-3 及 p62 的表达。实验重复 3 次，结果取 3 次平均值。

1.4　统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件处理数据，计量资料以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据符合正态性和方差齐性，各组间均数比较采用单因素方差分析法；若数据不符合正态性或方差齐性，采用 Kruskal-Wallis 秩和检验方法比较各组间均值。以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

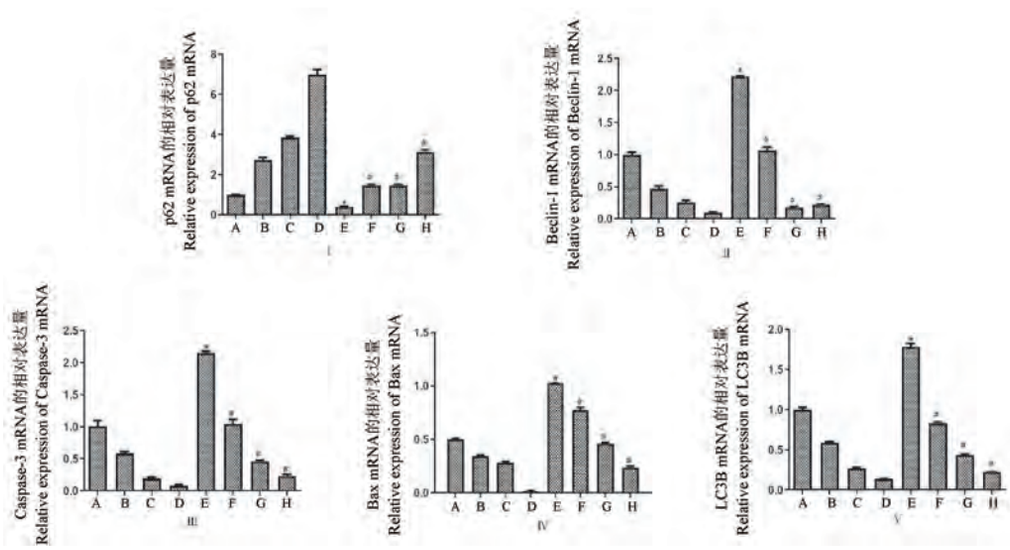
2　结果

2.1　各组目标蛋白 mRNA 基因表达

由图 1 中结果所示，用 PM 处理大鼠卵泡 GC 后，GC 中的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 表达增加，p62 的表达水平下降；而左归丸给药能显著降低 PM 处理后 GC 升高的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 水平，同时升高 PM 处理后 GC 降低 p62 的 mRNA 表达水平；加入 TC 细胞与 GC 细胞共培养，同样可以使化疗损伤性的 GC 细胞中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平降低，p62 的表达水平升高，且在模型组中同时加入共培养及左归丸含药血清处理后，Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平较单纯使用共培养或左归丸含药血清处理的更低，而 p62 的表达水平更高。以上差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2　各组目标蛋白表达

由图 2 中结果所示，用 PM 处理大鼠卵泡 GC 后，GC 中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的蛋白表达增加，p62 的表达水平下降；而左归丸给药能降低 PM 处理后 GC 升高的 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的水平，同时升高 PM 处理后 GC 降低的 p62 表达水平；加入 TC 细胞与 GC 细胞共培养，同样可以使 GC 细胞中 Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的表达水平降低，p62 的表达水平升高。且在模型组中同时加入共培养及左归丸含药血清处理后，Beclin-1、LC3B、Bax 以及 Caspase-3 的蛋白表达水平较单纯使用共培养或左归丸含药血清处理的更低，而 p62 的表达水平更高。以上差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。

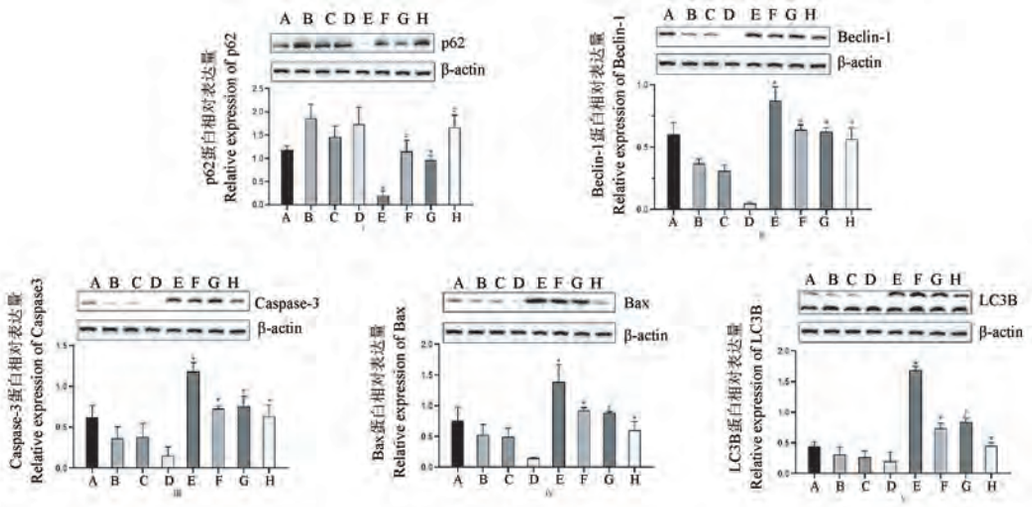


注：I：p62 mRNA 的表达；II：Beclin-1 mRNA 的表达。III：Caspase-3 mRNA 的表达；IV：Bax mRNA 的表达；V：LC3B mRNA 的表达。与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$。A：空白对照组；B：共培养组；C：ZGW 血清组；D：ZGW 血清+共培养组；E：模型组；F：模型+共培养组；G：模型+ZGW 血清组；H：模型+ZGW 血清+共培养组。

图 1　各组目的基因 mRNA 表达量

Note. I, Expression of p62 mRNA. II, Expression of Beclin-1 mRNA. III, Expression of Caspase-3 mRNA. IV, Expression of Bax mRNA. V, Expression of LC3B mRNA. Compared with the blank control group, $^{*}P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$. A, Blank control group. B, Coculture group. C, ZGW serum group. D, ZGW serum+coculture group. E, Model group. F, Model+coculture group. G, Model+ZGW serum group. H, Model+ZGW serum+coculture group.

Figure 1　mRNA expression of target gene in each group



注：I：p62 蛋白的表达；II：Beclin-1 蛋白的表达；III：Caspase-3 蛋白的表达；IV：Bax 蛋白的表达；V：LC3B 蛋白的表达。与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$。A：空白对照组；B：共培养组；C：ZGW 血清组；D：ZGW 血清+共培养组；E：模型组；F：模型+共培养组；G：模型+ZGW 血清组；H：模型+ZGW 血清+共培养组。

图 2 各组目的蛋白表达

Note. I, Expression of p62 protein. II, Expression of Beclin-1 protein. III, Expression of Caspase-3 protein. IV, Expression of Bax protein. V, Expression of LC3B protein. Compared with the blank control group, $^{*}P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$. A, Blank control group; B, Coculture group. C, ZGW serum group. D, ZGW serum+coculture group. E, Model group. F, Model+coculture group. G, Model+ZGW serum group. H, Model+ZGW serum+coculture group.

Figure 2 Expression of target proteins in each group

3 讨论

作为广谱抗肿瘤药物的环磷酰胺，不仅对各种实体瘤、白血病有效，而且是目前应用的各种免疫抑制剂中作用最强、应用最多的药物之一，由于其良好的临床疗效，应用范围日益广泛[9]，但其副作用也不容忽视，包括脱发、骨髓抑制、损伤卵巢功能等。本实验以 PM（环磷酰胺的体外活性成分）处理 GC 建立化疗损伤性 GC 模型，并尝试将 TC 与 GC 共培养发现：自噬启动因子 Beclin-1、微管结合蛋白轻链 3（LC3B）、凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 在 PM 作用的 GC 中，较对照组在转录水平及翻译水平上有高表达，10%左归丸含药血清处理及与 TC 共培养处理可下调上述蛋白在模型组中的表达；然而自噬受体蛋白 p62 的表达较对照组降低，与 TC 共培养或在培养基中加入 10%左归丸含药血清可上调模型组 GC 中 p62 蛋白及其对应 mRNA 的表达。且当 GC 与 TC 共培养处理的同时加入 10%左归丸含药血清后上述蛋白及其对应的 mRNA 的表达变化程度更明显。

自噬是一种溶酶体依赖的细胞内降解系统，在多种生理过程中起着重要的作用，在心血管疾病、肿瘤等各类疾病的发生发展中存在失衡状态[10-11]。Beclin-1 是自噬启动关键因子；LC3B 则是自噬过程的标志物，主要参与了自噬小体的形成；p62 可在自噬时降解，能反映自噬的强弱。当 LC3B 升高，p62 同时降低，则表明自噬流通畅[12-13]。凋亡是一种自主调节的细胞死亡过程，其特征是细胞收缩、膜泡出现、DNA 断裂和凋亡小体的形成，主要有 2 种途径：外源性或死亡受体途径、内源性或线粒体途径。这 2 条通路最终都通过由 Caspase-3 的裂解启动的执行通路。同时 Bax 蛋白不仅能作为 Caspase-3 的上游调控机制，调节其活性，也能作为 Caspase-3 的底物，在其下游机制发挥促凋亡作用，两者相互联系又相互制约，都是重要的促凋亡基因[14]。自噬和凋亡都是典型的程序性细胞死亡类型，通常发生在同一个细胞内。自噬的顺序先于凋亡，自噬是否诱导或抑制凋亡取决于细胞类型、刺激性质和持续时间[15]。本实验结果中模型组 Beclin-1、LC3B 基因表达上升的同时，p62 基因表达下降，说明 PM 损伤 GC 过程中自噬流通畅，此过程中 Bax 和 Caspase-3 基因表达的上升也提示 GC 凋亡。

TC 位于 GC 的周围，源于卵巢的基质细胞，内含大量脂类物质和滑面内质网并存在丰富的 LH 受

体。既往研究提示其不仅为卵泡提供结构支持,所分泌的雄激素也是 GC 合成雌激素的原料[16]:在 TC 产生大量雄激素及其诱导的芳香化酶活化的前提下,卵泡刺激素和黄体生成素相互协调,才可产生雌激素的爆发,同时 OC 即将完成第一次减数分裂,完成优势卵泡最后阶段的发育。此外 TC 还可分泌各种生长因子调控卵巢闭锁过程[17],对抗 GC 凋亡,但关于 TC 对化疗损伤性 GC 的影响及其具体机制的相关研究甚少。本实验证明 TC 能缓解 PM 作用于 GC 引起的化疗性损伤,且与左归丸含药血清有协同作用。PM 对 GC 的损伤以及左归丸含药血清和 TC 对 GC 的保护作用中都存在自噬与凋亡现象,且可能存在“自噬-凋亡”交叉对话,补充了 TC 对 GC 又一作用以及左归丸治疗化疗性 POF 的作用机制。但关于左归丸含药血清与 TC 共培养协同作用的具体机制、左归丸含药血清和 TC 通过哪些作用位点影响 GC 的自噬与凋亡过程,GC 与 TC 之间是否还有其他相互作用等问题仍待下一步实验阐明。

参考文献:

[1] Stachs A, Hartmann S, Gerber B. Preservation of fertility or ovarian function in patients with breast cancer or gynecologic and internal malignancies [J]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 2017, 77(8): 861-869.

[2] Mauri D, Gazouli I, Zarkavelis G, et al. Chemotherapy associated ovarian failure [J]. Front Endocrinol, 2020, 11 11: 572388.

[3] Casarini L, Lazzaretti C, Paradiso E, et al. Membrane Estrogen Receptor (GPER) and follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) heteromeric complexes promote human ovarian follicle survival [J]. iScience, 2020, 23(12): 101812.

[4] Asiabi P, Dolmans MM, Ambroise J, et al. *In vitro* differentiation of theca cells from ovarian cells isolated from postmenopausal women [J]. Hum Reprod, 2020, 35(12): 2793-2807.

[5] Tuan RS, O´Brien T. Expression of concern: human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure [J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 240.

[6] 阳松威, 孙晓峰, 贺又舜, 等. 左归丸对化疗致卵巢早衰小鼠卵巢功能的影响 [J]. 中成药, 2016, 38(4): 717-722.

[7] 孙晓峰, 刘涛, 曾贵荣, 等. 左归丸对磷酰胺氮芥体外诱导损伤颗粒细胞自噬与凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 1-6.

[8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[9] Kim J, You S. Extended adverse effects of cyclophosphamide on mouse ovarian function [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2021, 22(1): 3.

[10] Gao J, Chen X, Shan C, et al. Autophagy in cardiovascular diseases: role of noncoding RNAs [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 23: 101-118.

[11] Yamazaki T, Bravo-San Pedro JM, Galluzzi LM, et al. Autophagy in the cancer-immunity dialogue [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 169: 40-50.

[12] Bresciani A, Spiezia MC, Boggio R, et al. Quantifying autophagy using novel LC3B and p62 TR-FRET assays [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194423.

[13] Wang BJ, Tang YD, Yu BY, et al. Expression of autophagy-related factor p62 for lung cancer diagnosis and prognosis: A systematic review and meta-analysis [J]. Math Biosci Eng, 2019, 16(6): 6805-6821.

[14] 许国平, 杨鹏, 祁宏. Bcl-2 蛋白家族调节凋亡和自噬信号通路的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(6): 1127-1134.

[15] Ichimiya T, Yamakawa T, Hirano T, et al. Autophagy and autophagy-related diseases: a review [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 8974.

[16] Imamichi Y, Sekiguchi T, Kitano T, et al. Diethylstilbestrol administration inhibits theca cell androgen and granulosa cell estrogen production in immature rat ovary [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8374.

[17] 文冬梅. E_2 与 FSH 对水牛卵泡颗粒细胞/内膜细胞增殖和凋亡的影响 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.

〔收稿日期〕2021-03-06

韩笑,姚明江,任建勋,等. 银杏蜜环口服溶液对大鼠心肌微血管内皮细胞血管新生能力的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 22-28.
Han X, Yao MJ, Ren JX, et al. Effect of Yinxing Mihuan oral solution on angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 22-28.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 004

银杏蜜环口服溶液对大鼠心肌微血管内皮细胞血管新生能力的影响

韩 笑[1],姚明江[1],任建勋[1],付建华[1],任钧国[1],金 龙[1],郭 浩[1],赵步长[2],王益民[2],刘建勋[1*]

(1.中国中医科学院西苑医院基础医学研究所,北京市中药药理重点实验室,北京 100091;
2.西安步长中医心脑病医院,西安 710082)

【摘要】 目的 观察银杏蜜环口服溶液(简称银蜜)对 CMECs(大鼠心肌微血管内皮细胞)增殖、迁移、细胞小管形成及 VEGF(血管内皮生长因子)、CD31(血小板-内皮细胞粘附分子)蛋白表达的影响,探讨银蜜的体外血管新生能力。**方法** 培养 CMECs,分为对照组、银蜜高(2.6 mg/mL)、中(1.3 mg/mL)、低(0.6 mg/mL)剂量组。CCK-8 法检测 CMECs 增殖能力;细胞划痕实验检测 CMECs 迁移能力;Matrigel 血管形成实验检测 CMECs 成管能力;Western blot 检测 VEGF、CD31 蛋白表达。**结果** 与对照组相比,银蜜高、中、低剂量均能显著促进 CMECs 增殖;且银蜜高组细胞增殖率显著高于银蜜中、低组。划痕 6 h 后银蜜高组细胞迁移率显著高于对照组,银蜜中、低组细胞迁移率大于对照组,但无统计学差异;划痕 24 h 后银蜜高、中、低组 CMECs 迁移率均显著升高,银蜜高组细胞迁移率高于银蜜中、低组。银蜜高组 CMECs 网眼数、网眼面积、交叉点数显著优于对照组、银蜜中、低组。银蜜高、中组 VEGF、CD31 蛋白表达量显著升高。**结论** 银杏蜜环口服溶液可促进 CMECs 的增殖、迁移和体外血管成环,同时促进 VEGF 和 CD31 蛋白表达,且药效随银蜜剂量的增加而增强,提示银杏蜜环口服溶液具有显著的促进体外血管新生能力。

【关键词】 银杏蜜环口服液;银杏叶提取物;蜜环菌;血管新生
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0022-07

Effect of Yinxing Mihuan oral solution on angiogenesis of rat cardiac microvascular endothelial cells

HAN Xiao[1], YAO Mingjiang[1], REN Jianxun[1], FU Jianhua[1], REN Junguo[1], JIN Long[1], GUO Hao[1], ZHAO Buchang[2], WANG Yimin[2], LIU Jianxun[1*]

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China.
2. Xi'an Buchang Traditional Chinese Cardio-cerebrovascular Disease Hospital, Xi'an 710082)

【Abstract】 Objective To determine the effects of Yinxing Mihuan (YM) oral solution on the proliferation, migration, tubule formation and protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD31 in rat cardiac

[**基金项目**]国家科技重大专项(2017ZX09301018)。
[**作者简介**]韩笑(1976—),女,副研究员,研究方向:中药药理学研究。E-mail: hxfresh@ sina.com
[**通信作者**]刘建勋(1955—),男,教授,研究方向:中药药理和中药化学研究。E-mail: liujx0324@ sina.com

microvascular endothelial cells (CMECs) and whether YM promotes angiogenesis *in vitro*. **Methods** CMECs were cultured and divided into a control group and YM high dose (2.6 mg/mL), YM medium dose (1.3 mg/mL) and low dose (0.6 mg/mL) YM groups. The cell counting CCK-8 assay was used to measure proliferation, and the scratch test was used to detect the migration of CMECs. A Matrigel-based angiogenesis assay was used to detect tube formation by CMECs, and Western blot were used to detect the expression of VEGF and CD31. **Results** Compared with that in the control group, the high, medium and low YM doses significantly promoted the proliferation of CMECs, and the proliferation rate in YM high dose YM group was significantly higher than that in YM medium and low dose YM groups. Six hours after scratching the CMEC monolayer, the migration rate of CMECs in YM high dose YM group was significantly higher than that in the control group; the migration rates of CMECs in YM medium and low dose YM groups were increased, but there was no significant difference compared with the control group. Twenty-four hours after scratching the monolayer, the migration rates of CMECs in YM high, medium and low dose groups were significantly increased compared with that in the control group. The Matrigel matrix number, area and cross points for CMECs in YM high dose group were significantly improved compared with those in YM medium and low dose YM groups. Compared with that in the control group, the expression of VEGF and CD31 in YM high and medium dose YM groups was significantly increased. **Conclusions** YM can promote proliferation, migration, angiogenesis and expression of VEGF and CD31 proteins in CMECs *in vitro*. These effects were dose-dependent, suggesting that YM has a significant ability to promote angiogenesis.

【Keywords】 Yinxing Mihuan oral solution; ginkgo biloba extract; *Armillaria mellea*; angiogenesis

血管新生在胚胎发育、组织修复、心室重构、肿瘤等生理病理过程中具有重要作用。近年来缺血性血管疾病的防治从单纯改变病变血管供血,转向如何促进侧支循环的建立,因而促血管新生成为缺血性血管疾病的治疗新方向[1]。心肌微血管内皮细胞是心肌与血液交换能量的主要屏障,可合成多种细胞因子和活性物质,维持正常心肌的功能,参与心肌缺血后血管新生[2]。很多中药可以促进血管新生、促进侧支循环,在治疗缺血性心脑血管疾病方面具有良好的应用前景[3]。

银杏蜜环口服溶液主要由银杏叶提取物和天麻蜜环菌组成,银杏叶提取物有活血化瘀通络之功,蜜环菌可镇静安神,临床用于治疗冠心病、心绞痛、缺血性脑血管疾病,可改善心脑缺血性症状[4-5]。药理研究显示,银杏蜜环口服溶液可保护急性心肌缺血大鼠[6]和犬[7],减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死[8],对缺氧复氧损伤脐静脉内皮细胞[9]、脑微血管内皮细胞损伤[10]具有保护作用,但是对血管新生方面的研究尚未见报道。本研究旨在观察银杏蜜环口服溶液对大鼠心肌微血管内皮细胞血管新生能力的影响,发掘银杏蜜环口服溶液治疗缺血性心血管疾病的药效机制。

1　材料和方法

1.1　细胞

大鼠心肌微血管内皮细胞 CMECs (Cat NO. C645, ATCC)。

1.2　主要试剂与仪器

银杏蜜环口服溶液(每 10 mL 含 30 mg 银杏叶提取物和 1000 mg 蜜环菌粉,邛崃天银制药有限公司提供,批号 190721);DMEM 培养基(GIBCO, 8119352);胎牛血清(Biowest, S14735S1820);胰蛋白酶消化液(Solarbio, T1300);青霉素-链霉素 SP (Gibco, 1894156);CCK-8 试剂盒(Dojindo, CK04);Matrigel 基质胶(Corning, 356237);RIPA 细胞裂解液(Solarbio, R0010);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio, 20191229);5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(KeyGEN BioTECH, 20160712);10×电泳缓冲液、10×电转移缓冲液、10×封闭洗涤液、封闭专用脱脂奶粉(北京普利来基因技术有限公司);化学发光检测试剂盒(Thermo Scientific, UI291092);VEGF 抗体(Abcam, A3098);CD31 抗体(Abcam, ab24590);β-actin 抗体(Proteintech, 66009-1);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(YUABIO, 127760);辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(YUABIO, 203700113)。

活细胞工作站(Olympus, IX81);酶标仪(BioTek SYNERGY4);电泳仪(BIO-RAD, Power Pac Univeral);凝胶成像仪(BIO-RAD, ChemiDoc™ XRS+)。

1.3　实验方法

1.3.1　CMECs 细胞培养

CMECs 细胞以 DMEM 高糖培养基(含 10%FBS 和 1%青/链霉素)培养,细胞生长至 80%融合时,胰

蛋白酶消化液消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3.2 分组及给药

分组:对照组、银杏蜜环口服溶液高剂量组(2.6 mg/mL,简称银蜜高)、中剂量组(1.3 mg/mL,简称银蜜中)、低剂量组(0.6 mg/mL,简称银蜜低)。对照组用 DMEM 培养基培养;银蜜高、中、低组适时(给药时间因实验不同而不同,具体见下)吸弃旧培养基,加入含药 DMEM 培养基。

1.3.3 CMECs 增殖检测

细胞增殖实验用 CCK-8 法。细胞以1×10^5/mL 的密度接种于 96 孔板,待细胞充分贴壁后,弃旧培养基,对照组换成 DMEM 培养基(每孔 100 μL),银蜜高、中、低剂量组分别换成含银蜜 2.6、1.3、0.6 mg/mL 的 DMEM 培养基(每孔 100 μL),将细胞放回培养箱继续培养。24 h 后取出加入 CCK-8 溶液每孔 10 μL,孵育 3 h,酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值,OD 值大小与活细胞的数量成正比。细胞增殖率(%)=(给药组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值×100%

1.3.4 CMECs 迁移检测

细胞迁移率借助细胞划痕法,比较各组细胞划痕面积愈合百分比(%),评价银杏蜜环口服液对 CMECs 迁移能力的影响。CMECs 以每孔5×10^5cells 的密度接种于 6 孔板内,待形成完全融合的单层细胞层后,用 200 μL 无菌枪头在孔中画“井”字型划痕无菌 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的脱落细胞碎片,确保划线后留下的间隙清晰可见。此时,对照组加入 DMEM 培养基,银蜜高、中、低剂量组分别换成含银蜜 2.6、1.3、0.6 mg/mL 的 DMEM 培养基,放回培养箱培养。于划痕后即刻(0 h)、划痕后 6 h、划痕后 24 h 显微镜观察横竖划痕交叉点四周的固定检测点,拍照,Image J 软件计算划痕面积。细胞迁移率(%)=(原划痕面积-残留面积)/原划痕面积×100%。

1.3.5 CMECs 体外成管实验

将 Matrigel 基质胶、24 孔板、枪头提前预冷。向预冷的 24 孔板中加入 Matrigel 基质胶(每孔 250 μL),放入培养箱 30 min 固化成胶。将 CMECs 接种于 Matrigel 基质胶包被好的 24 孔板中,放回培养箱待细胞贴壁后,对照组换成 DMEM 培养液,银蜜高、中、低剂量组分别换成含银蜜 2.6、1.3、0.6 mg/mL 的 DMEM 培养基继续培养 3 h。3 h 后倒置显微镜下观察细胞成管情况,每孔随机选取 5 个视野拍照。Image J 图像分析软件分析,以网眼数、网眼面积、交叉点数表示各组 CMECs 的成管能力。网眼和交叉点示意图见图 1。

1.3.6 CMECs CD31、VEGF 蛋白免疫印迹检测

CMECs 经药物处理后预冷的 RIPA 裂解液冰上超声裂解细胞,13000 r/min,4℃离心后取上清测蛋白浓度。取等量蛋白上样,SDS-PAGE 分离后,将蛋白转印至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h,CD31、VEGF 一抗(1∶1000),4℃冰箱孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1∶20000)室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次后,增强型化学发光试剂(ECL)显色,Image Lab 3.0 系统成像软件采集凝胶成像图片,分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

实验结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,SPSS 18.0 统计软件 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性应用 Tukey 检验,方差不齐采用 Tamhane’s $T2$ 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 银杏蜜环口服溶液对 CMECs 增殖的影响

与对照组相比,银蜜高、中、低剂量可显著促进 CMECs 增殖,具有统计学差异($P<0.05\sim0.001$);银蜜高促进细胞增殖生长的作用优于银蜜中、低组($P<0.001$);银蜜中剂量与低剂量组相比,未见统计学差异。结果提示银杏蜜环口服溶液对 CMECs 具有显著的增殖效应,见表 1。

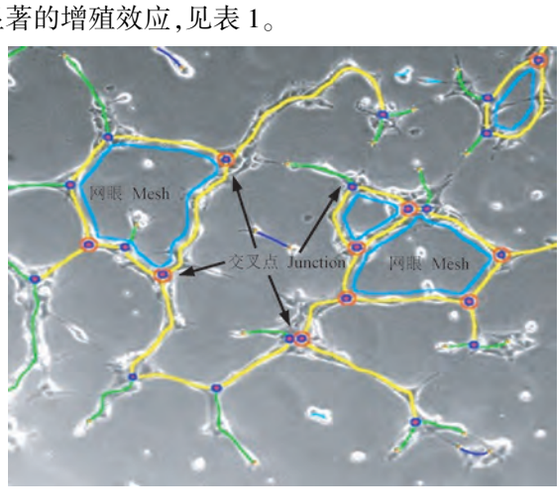


图 1 体外成管实验主要检测指标示意图

Figure 1 Schematic diagram of main detection indexes *in vitro* tube forming experiment

2.2　银杏蜜环口服溶液对 CMECs 迁移的影响

结果显示，6 h 时间点，银蜜高组细胞迁移率显著高于对照组，具有统计学差异（$P<0.001$），银蜜中、低组 CMECs 迁移率大于对照组，但无统计学差异（$P>0.05$）；在 24 h 时间点，银蜜高、中、低组细胞迁移率明显高于对照组，具有统计学差异（$P<0.001$），且银蜜高组迁移率显著高于银蜜中、低组（$P<0.001$）；银蜜中组迁移率高于银蜜低组（$P<0.001$）。提示银蜜可促进 CMECs 迁移，且促进 CMECs 迁移的能力随着银蜜剂量的增加而增强、随时药物作用时间的延长而增加。见表 2，图 2。

表 1　银杏蜜环口服溶液对 CMECs 增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 1　Effect of YM (Yinxing Mihuan oral solution) on proliferation of CMECs

组别 Groups	剂量 Dose	增殖率（%） Proliferation rate
对照组 Control group	/	0±0
银蜜高组 YM high dose group	2.6 mg/mL	34.0±4.9 $^{***\triangle\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$
银蜜中组 YM medium dose group	1.3 mg/mL	10.5±5.2 *
银蜜低组 YM low dose group	0.6 mg/mL	8.6±4.5 *

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$；与银蜜中组比较，$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$；与银蜜低组比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$。

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$. Compared with YM medium dose group, $^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$. Compared with YM low dose group, $^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$.

表 2　银杏蜜环口服溶液对 CMECs 迁移率（%）的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 2　Effect of YM on CMECs mobility rate

组别 Groups	剂量 Dose	6 h 迁移率（%） 6 h mobility rate	24 h 迁移率（%） 24 h mobility rate
对照组 Control group	/	6.5±5.7	22.1±6.0
银蜜高组 YM high dose group	2.6 mg/mL	15.1±3.3 ***	57.7±5.5 $^{***\triangle\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$
银蜜中组 YM medium dose group	1.3 mg/mL	13.0±8.8	44.9±5.6 $^{***\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$
银蜜低组 YM low dose group	0.6 mg/mL	11.7±4.7	31.4±2.9 ***

注：与对照组比较，$^{***}P<0.001$；与银蜜中组比较，$^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$；与银蜜低剂量组比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$。

Note. Compared with control group, $^{***}P<0.001$. Compared with YM medium dose group, $^{\triangle\triangle\triangle}P<0.001$. Compared with YM low dose group, $^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$.

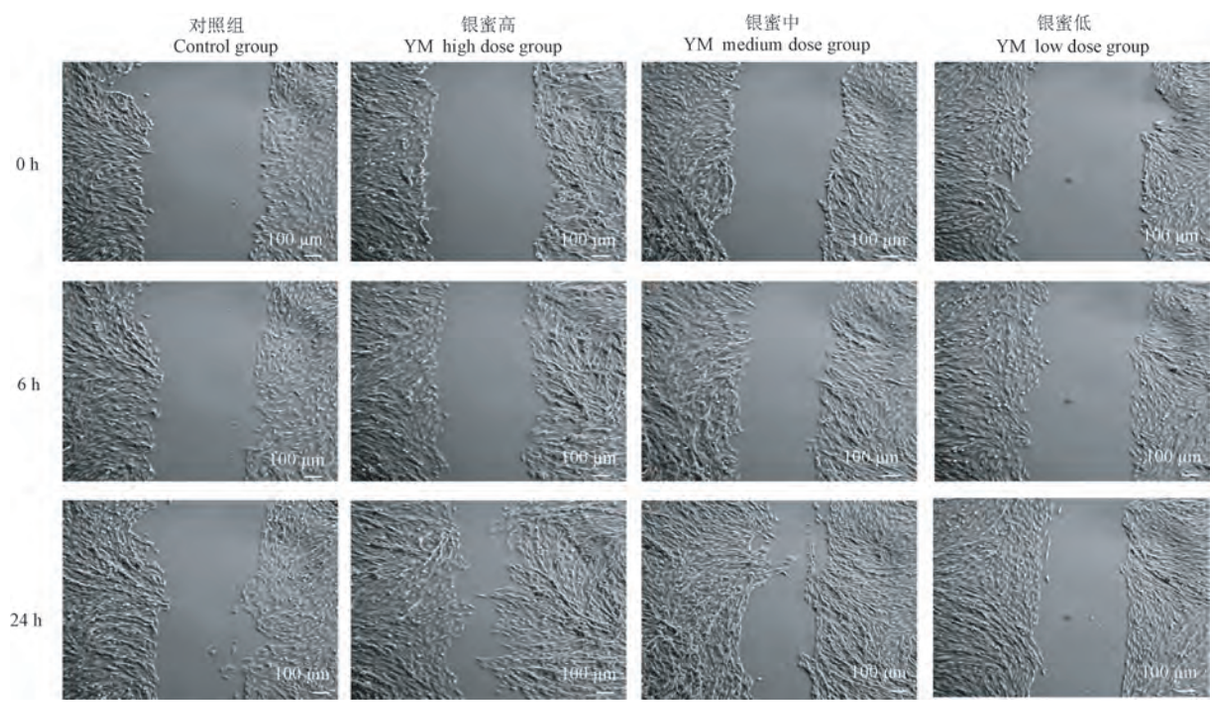


图 2　银杏蜜环口服溶液对 CMECs 迁移能力的影响

Figure 2　Effect of YM on migration ability of CMECs

2.3 银杏蜜环口服溶液对 CMECs 成管的影响

CMECs 细胞接种于 Matrigel 基质胶孔中后，刚开始呈圆形或卵圆形，30 min 后基本贴壁，1 h 后细胞逐渐伸展并伸出突起，3 h 后突起相互连接形成小管样结构。银蜜有良好的促进 CMECs 成管作用，且促 CMECs 成管的能力随药物剂量的增加而增强，见图 3、表 3。

网眼数及网眼面积结果显示，与对照组相比银蜜高、银蜜中组网眼数显著增多（$P<0.01$，$P<0.05$）、网眼面积更大（$P<0.01$，$P<0.05$），其中银蜜高组网眼的数量及面积与银蜜低组相比具有统计学差异（$P<0.05$）。银蜜低组网眼数量增多，但与对照组相比无统计学差异（$P>0.05$），网眼面积显著大于对照组（$P<0.05$）。交叉点数结果显示：银蜜高组细胞网状结构的交叉点显著多于对照组、银蜜中、低剂量组（$P<0.001$）；银蜜中、低组交叉点数高于对照组，银蜜中组与对照组相比有统计学差异（$P<0.05$）。

2.4 银杏蜜环菌口服溶液对 CMECs CD31、VEGF 蛋白表达的影响

结果显示，与对照组相比，银蜜高、银蜜中组 CD31、VEGF 蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$～0.001），银蜜低组 CD31 和 VEGF 表达有升高趋势，但统计学意义（$P>0.05$）；银蜜高组 CD31、VEGF 表达量显著高于银蜜中、低组（$P<0.001$），见图 4。

3 讨论

冠心病的死亡率呈逐年上升态势，建立有效的冠状动脉侧支循环可以在一定程度上缓解心肌缺血症状，降低患者的病死率[11-12]，而侧支循环的形成有赖于新生血管，血管新生能力是侧支循环建立的基础和关键[13]。治疗性血管新生成为缺血性心脏病治疗的新途径[14]。

银杏蜜环口服溶液主要有效物质为银杏叶提取物和天麻蜜环菌，其有银杏叶具有活血、化瘀、通络之功效，银杏叶提取物具有保护线粒体、抑制细胞凋亡、抗氧化、抗炎、扩张血管、改善血液循环的作用[15]；天麻蜜环菌与天麻共生，与天麻有相似的药理作用和临床疗效[16]，具有抗炎、抑制细胞凋亡、抑制血小板活化、抗血栓等药效[17]，与化瘀通络功效相似。银杏蜜环口服溶液临床用于治疗缺血性心血管疾病，但机制是否与促进心肌缺血区血管新生的作用少见报道。

血管生成是一个复杂过程，涉及激活期血管基底膜降解；血管内皮细胞的激活、增殖、迁移；重建形成新的血管和血管网等环节[18]。血管生成受机体多种因素如 CD31 和 VEGF 的调节。CD31 又称为血小板-内皮细胞粘附分子，存在于血管内皮细胞紧密连接处，CD31 胞内结构域的酪氨酸残基磷酸化，启动丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白

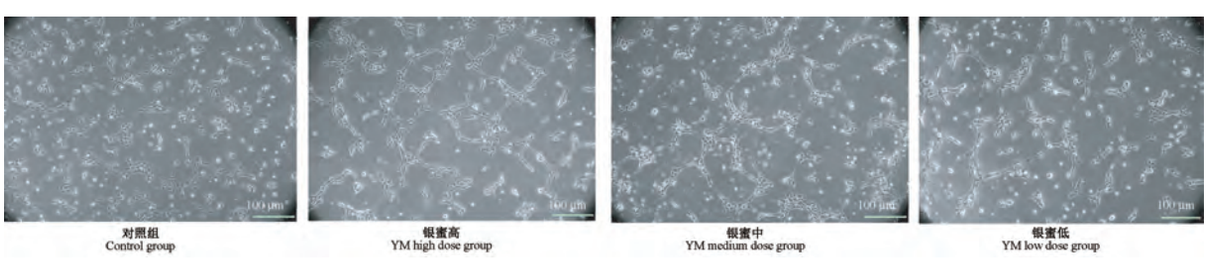


图 3 银杏蜜环口服溶液对 CMECs 小管形成的影响

Figure 3 Effect of YM on tubule formation of CMECs

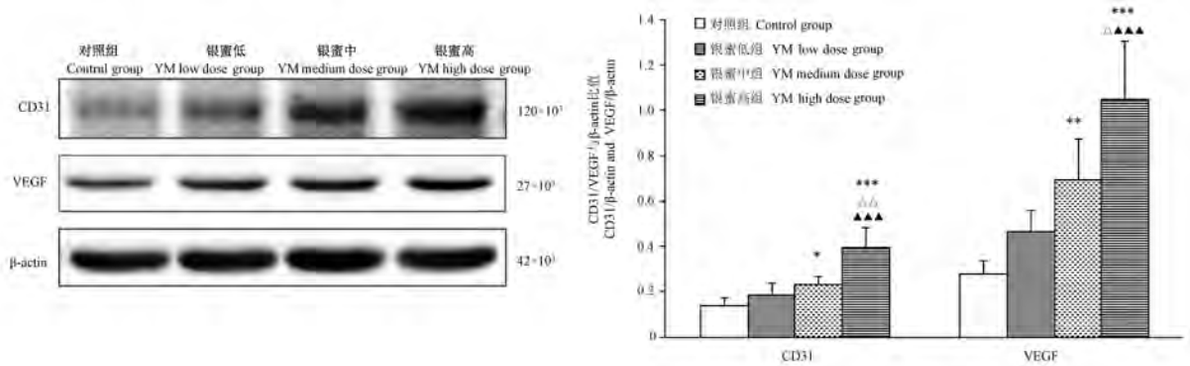
表 3 银杏蜜环口服溶液对 CMECs 网眼数、网眼面积、交叉点数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 3 Effect of YM on meshes number, meshes area and junctions of CMECs

组别 Groups	剂量 Dose	网眼数（个）Nb meshes (NO.)	网眼面积（像素）Meshes area (PX)	交叉点数（个）Nb junctions (NO.)
对照组 Control group	/	2±2	9585±8034	30±11
银蜜高 YM high dose group	2.6 mg/mL	10±6 ** ▲	112307±96316 ** ▲	60±16 *** △△△ ▲▲▲
银蜜中 YM medium dose group	1.3 mg/mL	5±3 *	35283±28857 *	41±12 *
银蜜低 YM low dose group	0.6 mg/mL	4±3	22072±13128 *	39±14

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与银蜜中组比较，$^{△△△}P<0.001$；与银蜜小组比较，$^{▲}P<0.05$，$^{▲▲▲}P<0.001$。

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with YM medium dose group, $^{△△△}P<0.001$. Compared with YM low dose group, $^{▲}P<0.05$, $^{▲▲▲}P<0.001$.



注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与银蜜中比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与银蜜低比较，$^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$。

图 4　银杏蜜环口服溶液对 CMECs CD31、VEGF 表达的影响

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with YM medium dose group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$. Compared with YM low dose group, $^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P<0.001$.

Figure 4　Effect of YM on the expression of CD31、VEGF in CMECs

激酶信号通路，调控细胞的增殖、分化、迁移和凋亡，促进血管生成[19]。VEGF 是血管内皮细胞的特异性有丝分裂剂，促进血管内皮细胞的增殖和迁移，抑制内皮细胞凋亡，增加血管的渗透性[20-21]，使血浆蛋白溢出凝结形成凝胶体，成为血管生成的临时基质，为内皮细胞迁移提供纤维网络，在促血管生成的调控中发挥重要作用[22-25]。

本研究观察银杏蜜环口服溶液对体外培养 CMECs 增殖、迁移及血管样管腔形成的影响；同时检测与血管生成密切相关的 CD31、VEGF 蛋白表达情况，综合评价银杏蜜环口服溶液体外促血管新生的能力及机制。实验结果提示，银蜜高、中、低剂量具有显著促进 CMECs 增殖、迁移和成管的药效，且药效随着银蜜实验剂量的增加而增强。同时，银蜜还可明显上调 CD31 和 VEGF 的蛋白表达，银蜜剂量越高，内皮细胞 CD31 和 VEGF 的蛋白表达量越高。

依据上述细胞学研究结果，可以推测银蜜促进细胞增殖的作用将为血管生成提供足够多的细胞、促进细胞迁移的能力则把增殖的内皮细胞迁移至需要生成血管的部位，为血管生成提供物质基础，之后银蜜促成管的作用将帮助机体利用输送过来的增殖细胞，组建管样网状结构。同时，银蜜刺激内皮细胞 CD31 和 VEGF 的表达，二者协同内皮细胞增殖、迁移、成管过程，并为血管网的生成提供临时基质和纤维网络，最终形成管腔样结构。

在 Matrigel 基质胶成管实验中，银蜜高剂量组网眼数量、网眼面积、交叉点数量都显著高于对照组、银蜜中、银蜜低剂量组。网眼数量越多，网眼面积越大，代表可能形成血管管腔越多，血管管径可能越粗，大口径的新生血管将有可能为缺血组织提供更多的血供，更为有效地发挥缺血代偿作用。交叉点越多，血管网状结构就越牢固越成熟。可见，银蜜高剂量显示出更好的促进 CMECs 体外成管的药效。

综上所述，银杏蜜环口服溶液可促 CMECs 增殖、迁移、成管，并能上调细胞 CD31 和 VEGF 的表达，具有良好的体外促血管新生的能力，其活血、化瘀、通络的功效及其治疗缺血性心脏病的药效机制与其促血管新生的作用具有一定相关性。促血管生成更深入的机制将在细胞及心肌缺血动物模型上进行。

参考文献：

[1] Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia [J]. Angiogenesis, 2008, 11(2): 121-140.

[2] 位庚, 郭勇英, 贾振华. 发育成熟心脏中血管内皮细胞和心肌细胞的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5647-5649.

[3] 郭浩, 李磊, 侯金才, 等. 中药促治疗性血管新生防治缺血性心脑血管疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 24-28.

[4] 闫洁, 袁森. 银杏蜜环口服溶液联合阿司匹林肠溶片和氯吡格雷治疗冠心病心绞痛的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1575-1578.

[5] 李广宣. 银杏蜜环口服溶液治疗风痰瘀血证脑梗死临床研究 [J]. 中医学报, 2013, 28(5): 737-738.

[6] 郭浩, 任建勋, 郝婷婷, 等. 银杏蜜环口服溶液对急性心肌缺血损伤大鼠的保护作用 [J]. 药学学报, 2017, 52(12): 1865-1870.

[7] 任建勋, 郭浩, 李磊, 等. 银杏蜜环口服溶液改善犬急性心

肌缺血的研究［J］. 世界中医药, 2018, 13(1): 21-24, 30.
［8］ 宋文婷, 刘建勋, 姚明江, 等. 银杏蜜环口服溶液减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死的实验研究［J］. 世界中医药, 2018, 13(1): 36-40.
［9］ 韩笑, 徐立, 刘建勋, 等. 银杏蜜环口服溶液作用 p38 MAPK 调节 eNOS/NO 信号途径保护人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤［J］. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 79-84.
［10］ 郑咏秋, 张业昊, 刘建勋, 等. 银杏蜜环口服溶液对缺氧缺糖再灌注诱导脑微血管内皮细胞和 SH-SY5Y 细胞炎性损伤的保护作用与机制［J］. 世界中医药, 2018, 13(1): 12-16.
［11］ Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target［J］. J Clin Invest, 2013, 123(1): 92-100.
［12］ Steg PG, Kerner A, Mancini GB, et al. Impact of collateral flow to the occluded infarct-related artery on clinical outcomes in patients with recent myocardial infarction: a report from the randomized occluded artery trial［J］. Circulation, 2010, 121(25): 2724-2730.
［13］ Ng R, Yeghiazarians Y. Post myocardial infarction cardiogenic shock: a review of current therapies［J］. J Intensive Care Med, 2013, 28(3): 151-165.
［14］ 施洋, 候宝林, 党晓玲, 等. 血管新生在心肌梗死中作用机制的研究进展［J］. 海峡药学, 2020, 32(1): 95-99.
［15］ Zhang Y, Liu J, Yang B, et al. Ginkgo biloba extract inhibits astrocytic lipocalin-2 expression and alleviates neuroinflammatory injury via the JAK2/STAT3 pathway after ischemic brain stroke［J］. Front Pharmacol, 2018, 9: 518.
［16］ 袁媛, 刘景圣, 蔡丹. 蜜环菌化学成分与药理作用的研究进展［J］. 农产品加工(学刊), 2008, 5: 46-49.
［17］ 沈寿东, 沈明花. 蜜环菌多糖对动脉血栓大鼠炎症反应和细胞凋亡的影响［J］. 延边大学医学学报, 2018, 41(1): 4-7.
［18］ Kalkunte S, Brard L, Granai CO, et al. Inhibition of angiogenesis by vitamin D-binding protein: Characterization of anti-endothelial activity of DBP-maf［J］. Angiogenesis, 2005, 8(4): 349-360.
［19］ Wang Y, Sheibani N. PECAM-1 isoform-specific activation of MAPK/ERKs and small GTPases: implications in inflammation and angiogenesis［J］. J Cell Biochem, 2006, 98(2): 451-468.
［20］ Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells［J］. J Bio Chem, 1998, 273(21): 13313-13316.
［21］ Kieran MW, Kalluri R, Cho YJ. The VEGF pathway in cancer and disease: responses, resistance, and the path forward［J］. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(12): a006593.
［22］ Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition［J］. Cell Signal, 2007, 19(10): 2003-2012.
［23］ Rong SL, Lu YX, Liao YH, et al. Effects of transplanted myoblasts transfected with human growth hormone gene on improvement of ventricular function of rats［J］. Chin Med J, 2008, 121(4): 347-354.
［24］ Chung HJ, Kim JT, Kim HJ, et al. Epicardial delivery of VEGF and cardiacstem cells guided by 3-domensional PLLA mat enhancing cardiac regeneration and angiogenesis in acute myocardial infaction［J］. J Control Release, 2015, 205: 218-230.
［25］ Cheng Y, Jiang S, Hu R, et al. Potential mechanism for endothelial progenitor cell therapy in acute myocardial infaction: activation of VEGF-PI3K/Akte-NOS pathway［J］. Ann Clin Lab Sci, 2013, 43(4): 395-401.

〔收稿日期〕2021-03-26

欧宝芳,别亚男,陈千晴,等. 改良后 Hulth 法和Ⅱ型胶原酶注射法建立兔膝骨关节炎模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 29-37.
Ou BF, Bie YN, Chen QQ, et al. Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 29-37.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 005

改良后 Hulth 法和Ⅱ型胶原酶注射法建立兔膝骨关节炎模型的比较研究

欧宝芳[1],别亚男[2],陈千晴[1],陈柏羽[1],许佳欢[1],谢水林[3*],吴少瑜[1*]

(1.南方医科大学药学院,广州 510515;2.广东药科大学生命科学与生物制药学院,广州 5114362;
3.华南理工大学生物科学与工程学院,广州 510006)

【摘要】 目的 对比分析兔膝骨关节炎(knee osteoarthritis,KOA)模型两种常用造模方法的差异,为不同类型膝骨关节炎动物模型的选择提供参考。**方法** 将 9 只健康新西兰大白兔随机分为 3 组:空白组、改良后 Hulth 组、胶原酶组。改良后 Hulth 组和胶原酶组分别给予改良后 Hulth 法、关节腔内注射胶原酶干预,1 周后每日促使其活动,6 周后进行 Lequesne MG 评分、X-ray、Micro-CT、Pelletier 评分、Mankin 评分、ELISA 检测,观察膝关节大体及病理改变。**结果** 与空白组相比,两种造模方法的兔膝关节软骨表面均出现缺损;病理结果显示软骨层出现裂隙,番红 O 染色减退,潮线扭曲并伴有血管通过;ELISA 结果显示空白组、改良后 Hulth 组和胶原酶组血清内 TNF-α 含量分别为(624. 99±17. 82),(1140. 56±129. 81)和(1480. 69±492. 08) pg/mL,血清内 IL-1β 含量分别为(30. 23±0. 25),(46. 67±0. 71)和(46. 82±1. 04) pg/mL,改良后 Hulth 组和胶原酶组与空白组相比,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。另外,改良后 Hulth 组膝关节伴有骨赘生成,股骨内髁软骨损伤更为严重,而胶原酶组损伤部位主要为胫骨内髁。**结论** 两种造模方法均能构建理想的 KOA 模型。改良后 Hulth 法的损伤程度更严重;胶原酶诱导的模型损伤方式更接近人 KOA 进程与发病机制。

【关键词】 膝骨关节炎;改良后 Hulth 法;胶原酶法;动物模型
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0029-09

Comparison of the modified Hulth model and intra-articular type II collagenase injection as established rabbit models of knee osteoarthritis

OU Baofang[1], BIE Yanan[2], CHEN Qianqing[1], CHEN Boyu[1], XU Jiahuan[1], XIE Shuilin[3*], WU Shaoyu[1*]
(1. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. 2. School of Life Science and Biopharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511436. 3. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To compare and analyze the differences between two commonly used modeling method for rabbit knee osteoarthritis (KOA) and provide references for the selection and establishment of different types of animal models for knee osteoarthritis. **Methods** Nine healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups:

[**基金项目**]广东省企业科技特派员项目(GDKTP2020041900);广东省医学科学技术研究基金项目(A2020449)。
[**作者简介**]欧宝芳(1997—),女,硕士研究生,研究方向:骨与软组织再生与修复。E-mail:oubao623@ 163.com
[**通信作者**]吴少瑜(1980—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:具有抗肿瘤作用的新化合物筛选和机制研究。
E-mail:wushaoyu@ smu.edu.cn
谢水林(1980—),男,实验师,研究方向:实验动物学。E-mail:xsl@ scut.edu.cn *共同通信作者

blank group, modified Hulth group and collagenase group. The model groups were treated with a modified Hulth method or intra-articular injection of collagenase. After 1 week, the rabbits were encouraged to move daily. After 6 weeks, they were evaluated using Lequesne MG scores, X-rays, micro-computed tomography, Pelletier scores, Mankin scores and enzyme-linked immunosorbent assays, and then the gross and pathological changes in the knee were observed. **Results** Compared with that in the blank group, the cartilage surface of the rabbit knee joints in the two model groups displayed defects. The pathological result showed that the cartilage layer appeared to be cracked, safranin O staining was decreased, the tide line was distorted, and the blood vessels passed. The concentrations of TNF-α in serum from the blank group, modified Hulth group, and collagenase group were (624.99 ± 17.82), (1140.56 ± 129.81) and (1480.69 ± 492.08) pg/mL, and the IL-1β concentrations in serum were (30.23 ± 0.25), (46.67 ± 0.71) and (46.82 ± 1.04) pg/mL, respectively. The modified Hulth and collagenase groups showed statistically significant differences compared with that in the blank group (all $P<0.05$). In addition, the modified Hulth group was accompanied by osteophyte formation in the knee joint and more serious damage in the medial femoral condyle cartilage, while the medial tibial condyle was the main injury in the collagenase group. **Conclusions** Both modeling method can be used to construct an ideal KOA model. The degree of damage using the modified Hulth method was more serious, while the collagenase-induced model was closer to the process and pathogenesis of human KOA.

【**Keywords**】 knee osteoarthritis; modified Hulth method; collagenase method; animal models

膝骨关节炎(KOA)是一种常见的以关节软骨退变为特征的致残性疾病[1],2000 年 1 月至 2019 年 12 月我国 40 岁及以上人群膝骨关节炎患病率为 20.50%[2]。炎症引起的软骨细胞紊乱、细胞外基质分解及关节不稳定是 KOA 发生的主要诱因[3]。目前大部分治疗方法只能缓解疾病症状,未能修复关节软骨组织,因此建立 KOA 动物模型对研究其发病机制及治疗方式具有重要意义。

目前常用的 KOA 造模方法有 Hulth 法[4]、改良后 Hulth 法[5]、ACLT[6]、关节腔内注射药物(包括胶原酶[7]、碘乙酸盐[8]、木瓜蛋白酶[9])、关节制动[10]等。KOA 造模常用的动物载体有大鼠、小鼠、家兔、豚鼠、犬、猪等[11]。改良后 Hulth 法和关节腔内注射Ⅱ型胶原酶法两种方法都较为常用,但尚未有研究报道比较两种造模方法之间的差异。本研究旨在分析比较两种造模方法之间的异同点,为不同类型膝骨关节炎动物模型的选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级健康成年新西兰雄性大白兔 9 只,6 月龄,体重 2.5~2.7 kg,由南方医科大学实验动物中心提供[SCXK(粤)2016-0041]。所有新西兰大白兔购入后饲养于广州华腾生物医药科技有限公司[SYXK(粤)2020-0237],分笼独立饲养,动物可自由进食及饮水,环境温度维持在 20℃~25℃,湿度维持在 40%~60%,模拟自然光照 12 h/d。动物实验及研究过程遵循 3R 原则,给予动物人道主义关怀,并得到了广州华腾生物医药科技有限公司实验动物伦理委员会的批准(HTSW201003)。

1.2 主要试剂与仪器

速眠新Ⅱ(敦化市圣达动物药品有限公司,20210301);Ⅱ型胶原酶(美国 Sigma 公司);EDTA 脱钙液(北京索莱宝科技有限公司);苏木素(美国 Sigma 公司);伊红染液(天津光复精细化工有限公司);番红 O-固绿染液(武汉赛维尔生物科技有限公司);兔 TNF-α 酶联免疫分析试剂盒(CUSABIO,武汉华美生物工程有限公司);兔 IL-1β 酶联免疫分析试剂盒(H002,南京建成生物工程研究所有限公司)。C 型臂 X 射线仪(GE9900,美国通用电气公司);微计算机断层扫描(Micro-CT 80476,荷兰 MILabs 公司);组织切片机(RM2245,上海徕卡 Leica 公司);光学显微镜(舜宇光学科技(集团)有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔膝骨关节炎模型分组及构建

9 只新西兰大白兔随机均分为以下 3 组:空白组、改良后 Hulth 组、Ⅱ型胶原酶组。术后 1 周开始驱赶各组动物进行运动,每天 30 min。

改良后 Hulth 组:采用改良后 Hulth 法[12]构建兔膝骨关节炎模型。固定家兔后,0.1 mL/kg 速眠新Ⅱ(生理盐水 1∶1 稀释)臀部肌肉注射镇静,再 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉。将兔仰卧位固定在无菌手术台上,备皮消毒铺巾,沿髌韧带内侧做长约 3 cm 纵行切口,逐层切开皮肤、筋膜层和关节囊,将髌骨外翻,将兔右腿屈膝 45°后切断内侧副韧带和前

交叉韧带,剔除内侧半月板,行抽屉试验确认前交叉韧带完全断裂。用生理盐水清洗关节腔后复位髌骨,可吸收缝线逐层缝合。术后予青霉素臀部肌肉注射预防感染,连续 3 d,每次 80 万单位。

Ⅱ型胶原酶组:于实验第 1、4 天按上述方法麻醉兔后进行备皮消毒,将兔膝关节屈曲 45°,于髌韧带内侧凹陷处进针,当出现落空感时,表明已进入关节腔内,注射 0.5 mL(4 mg/mL)Ⅱ型胶原酶溶液(经 0.22 μm 无菌过滤器过滤)。注射结束后用棉球压住注射针眼处并再次屈伸膝关节使Ⅱ型胶原酶溶液充分浸润至整个关节腔内。注射过程严格按照无菌操作要求。

1.3.2　Lequesne MG 评分

术后 1 周开始用国际骨关节炎 Lequesne MG 指数[13]作为模型评定标准之一,每周进行 2 次 Lequesne MG 评分,持续 6 周。包括疼痛刺激反应程度、步态、关节活动范围和关节肿胀程度 4 个方面,每部分分为 4 个等级,Ⅰ级为 0 分,Ⅱ级为 1 分,Ⅲ级为 2 分,Ⅳ级为 3 分,总分大于等于 3 分为造模成功。

1.3.3　X-ray

使用 C 型臂 X 射线仪(GE9900)对术后 6 周的各组兔进行影像学评估,透视千伏电压和管电流分别设置为 54 kVp,1.04 mA。兔麻醉后仰卧位放置于手术台上,右膝关节伸直位拍摄正位片,即腓骨小头横径 1/3~2/3 与胫骨重叠;屈膝 30°拍摄膝关节侧位片,即股骨内侧髁与外侧髁重叠,边缘间距小于 1.5 cm[14]。

1.3.4　Micro-CT

使用 Micro-CT 对术后 6 周各组兔的膝关节进行断层扫描,通过重建三维图像来显示骨组织在空间的分布,扫描电压和电流分别设置为 100 kV 和 200 μA,扫描后进行重建,重建的图像分辨率为 16 μm。对兔实行安乐死后,在兔膝关节上下 3 cm 处用锐利器械切断,将股骨髁和胫骨平台取下,4%多聚甲醛内固定 48 h 后拍摄 Micro-CT。

1.3.5　兔膝关节大体观察及 Pelletier 评分

各组兔于术后 6 周安乐死后,按构模手术入路切开膝关节囊,肉眼大体观察右后膝关节软骨并采用 Pelletier 评分[15]评估软骨损伤情况:(1)0 分:关节面完整,色泽如常;(2)1 分:关节面粗糙,有小的裂隙且色泽灰暗;(3)2 分:关节面糜烂,软骨缺损深达软骨表中层;(4)3 分:关节面溃疡形成,缺损深达软骨深层;(5)4 分:软骨剥脱,软骨下骨质暴露。

1.3.6　HE 染色观察关节软骨组织形态变化

兔膝关节 4%多聚甲醛中固定 48 h,EDTA 脱钙液 37℃脱钙 3 周后,取股骨内髁、股骨外髁、胫骨内髁和胫骨外髁的软骨中央区继续脱钙 1 周,经脱水,石蜡纵向包埋后切成 2 μm 的切片,并用苏木素和伊红染液进行染色,光学显微镜下观察病变情况。

1.3.7　番红 O-固绿染色 及 Mankin 评分

兔膝关节石蜡切片后经番红 O 和固绿染液染色,光学显微镜下观察病变情况,并对番红 O-固绿染色结果进行 Mankin 评分[16],包括软骨结构、软骨细胞、基质染色、潮线完整性 4 个方面。

1.3.8　ELISA 检测兔血清炎性因子水平

各组兔于术后 6 周耳缘静脉采血,收集于促凝管中,4℃静置 30 min 后,3000 r/min 离心 10 min 收集上清。根据试剂盒说明书检测血清中 TNF-α 和 IL-1β 的含量。

1.4　统计学方法

实验数据应用 IBM SPSS 25.0 进行分析。正态或近似正态分布的计量资料使用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述,偏态资料使用中位数(四分位间距)[M(IQR)]进行统计描述。采用单因素方差分析、重复测量方差分析和 Kruskal-Wallis H 检验进行组间差异分析,采用 LSD-t 检验、Dunn's 检验进行组间多重比较。结果均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

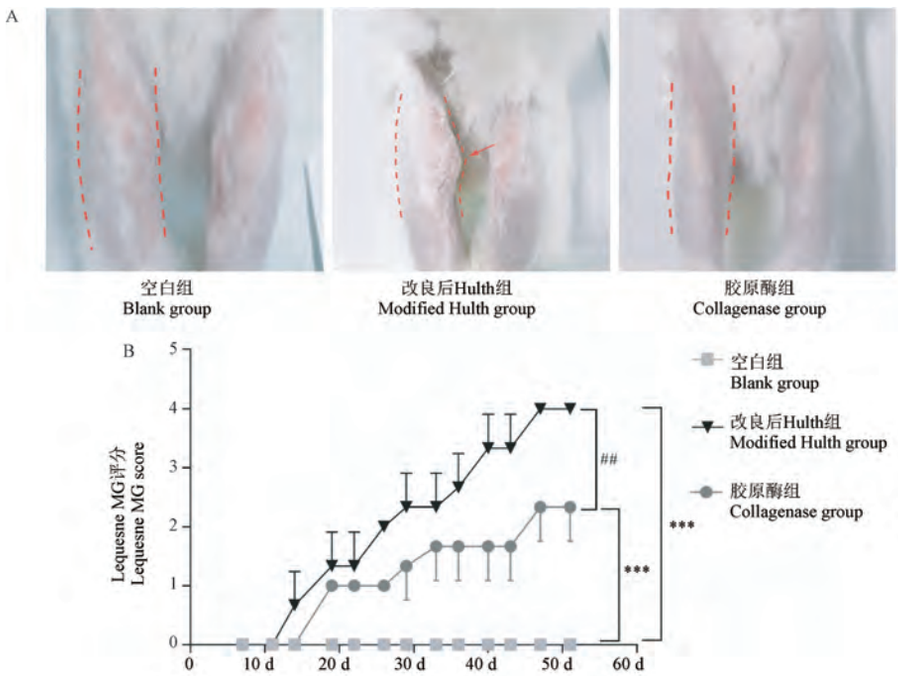
2　结果

2.1　3 组兔膝关节一般情况观察

改良后 Hulth 法模型组的右侧膝关节内侧伴有骨性突出,质地坚硬;胶原酶模型组右侧膝关节处未发现骨性变化,但伴有肌肉松弛的情况(图 1A)。两种造模方法患肢均出现奔跑时轻度跛行,膝关节轻度肿胀,骨性标记变浅,Lequesne MG 评分都显著高于空白组($P<0.01$),改良后 Hulth 法模型组评分高于胶原酶模型组($P<0.01$)(图 1B)。

2.2　3 组兔膝关节影像学情况观察

X-ray 显示改良后 Hulth 法模型组的膝关节间隙变窄,膝关节内侧有骨赘形成,未见游离体生成;胶原酶模型组 X-ray 征象则并不明显(图 2A)。Micro-CT 评估软骨下骨质的微小变化(图 2B),Micro-CT 平扫显示,相比于空白组,两组模型组均出现软骨下骨硬化,主要表现为骨小梁增粗增多,三维重建结果显示两组模型组均存在骨重建,骨畸



注:A:膝关节外观形态。膝关节外观线条用红色虚线标注,红色箭头所指为骨性突出部分。B:膝关节 Lequesne MG 评分。与空白组比较,*** $P<0.001$;与改良后 Hulth 组比较,## $P<0.01$。

图 1 3 组兔膝关节外观形态及 Lequesne MG 评分结果($n=3$)

Note. A, Appearance of the knee joint. Appearance line of the knee joint is marked with a red dotted line. Red arrow points to the bony protrusion. B, Lequesne MG score of the knee joint. Compared with the blank group, *** $P<0.001$. Compared with modified Hulth group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Appearance and Lequesne MG score results of the knee joint in three groups

形,改良后 Hulth 法模型组有明显的骨赘增生和骨刺形成。

2.3 3 组兔膝关节软骨大体观察

空白组的软骨表层光滑平整,呈透亮有光泽的蓝白色,无裂纹及缺损。改良后 Hulth 法模型组显示在软骨的中央区,关节软骨面异常粗糙,软骨表面缺损并伴有骨赘形成,关节腔可见淡黄色积液。胶原酶模型组软骨表面缺损粗糙,无光泽,磨损严重,但未见骨赘生成(图 3A)。与空白组相比,两种方法建立的模型组的 Pelletier 评分显著升高($P<0.05$),但两组模型组相比 Pelletier 评分无统计学差异($P>0.05$)(图 3B)。

2.4 3 组兔膝关节病理切片观察软骨组织形态

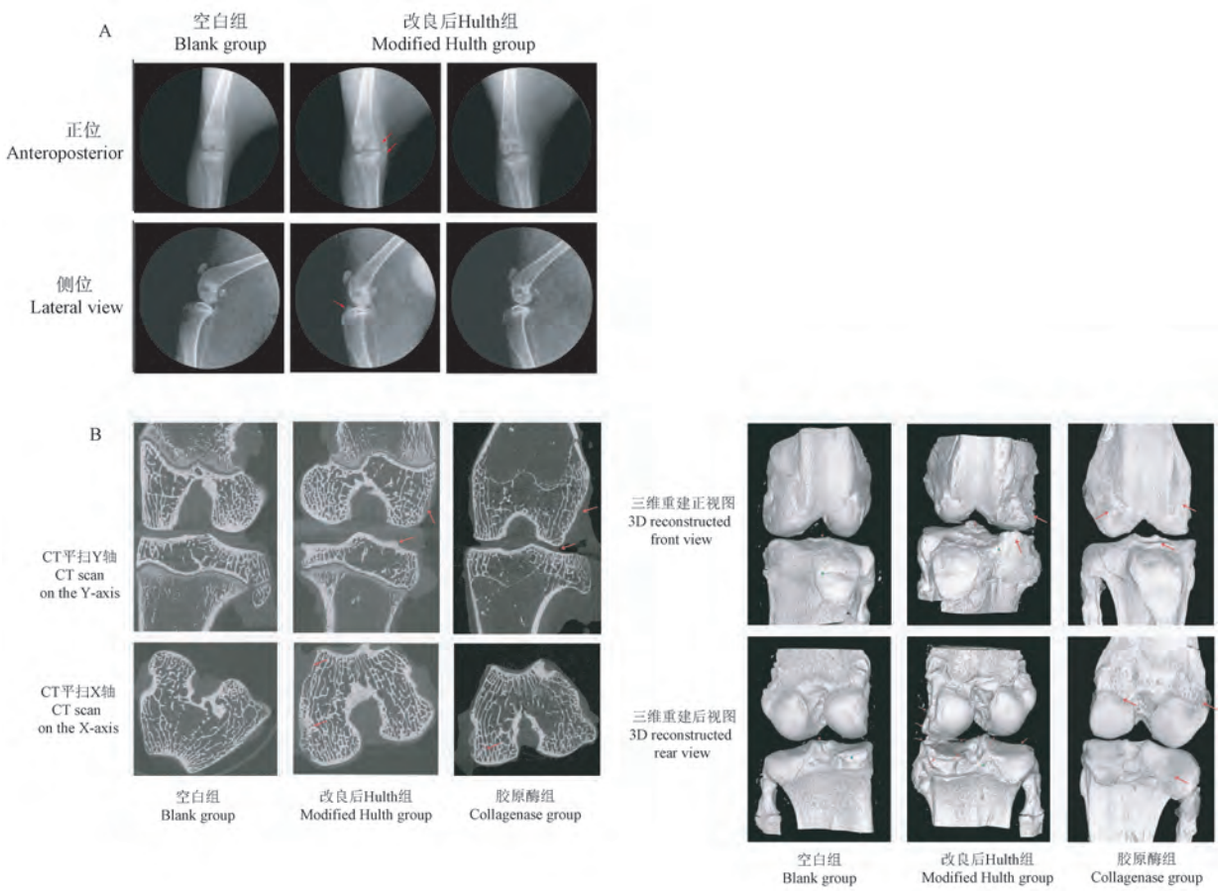
HE 染色结果显示,空白组关节软骨表面平整光滑,表面区、移行区、辐射区和矿化区四层结构清晰,排列规律,细胞分布及染色均匀,潮线完整,无血管通过。改良后 Hulth 法模型组关节软骨表面损毁严重,软骨层脱落,各结构层次紊乱。股骨内外髁裂隙深达辐射区,可见大量软骨细胞克隆,细胞分布及排列不规律,总数减少,潮线扭曲前移并且伴有血管长入。胶原酶模型组软骨表面较平整少裂隙,软骨细胞排列紊乱,数量减少,大量炎性细胞浸润,并伴随大量血管通过(图 4)。

番红 O-固绿染色结果与 HE 染色结果一致,空白组关节软骨基质呈红色,细胞核和胶原纤维呈绿色,潮线清晰规律,软骨和软骨下骨界限清晰,红绿色对比明显。两组模型组软骨基质区均出现番红 O 染色减退甚至染色丢失,固绿染色明显,局部出现细胞成簇现象(图 5)。

与空白组相比,两组模型组软骨 Mankin 评分较高($P<0.01$)。改良后 Hulth 法模型组 Mankin 评分从胫骨到股骨,外侧到内侧逐渐升高,显示股骨区软骨退变更严重。胶原酶模型组则胫骨区软骨退变更严重(图 6)。

2.5 3 组兔血清中 TNF-α 和 IL-1β 的表达水平比较

ELISA 检测结果显示,两组模型组的 TNF-α 和 IL-1β 水平均高于空白组(图 7 和表 1,$P<0.05$),胶原酶模型组的 TNF-α 水平高于改良后 Hulth 法模型组(图 7A)。

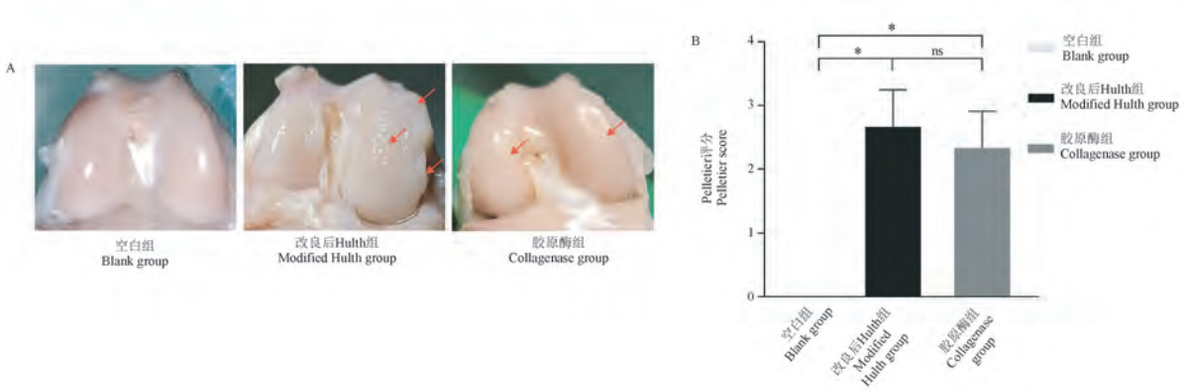


注：A：X-ray 正侧位片；B：Micro-CT 平扫和三维重建。红色箭头：新生骨赘及骨刺。

图 2　3 组兔膝关节 X-ray 和 Micro-CT 结果

Note. A, Anteroposterior and lateral X-ray images. B, Micro-CT scan and 3D reconstruction. Red arrow, New osteophytes and bone spurs.

Figure 2　X-ray and Micro-CT results of the knee joint in three groups

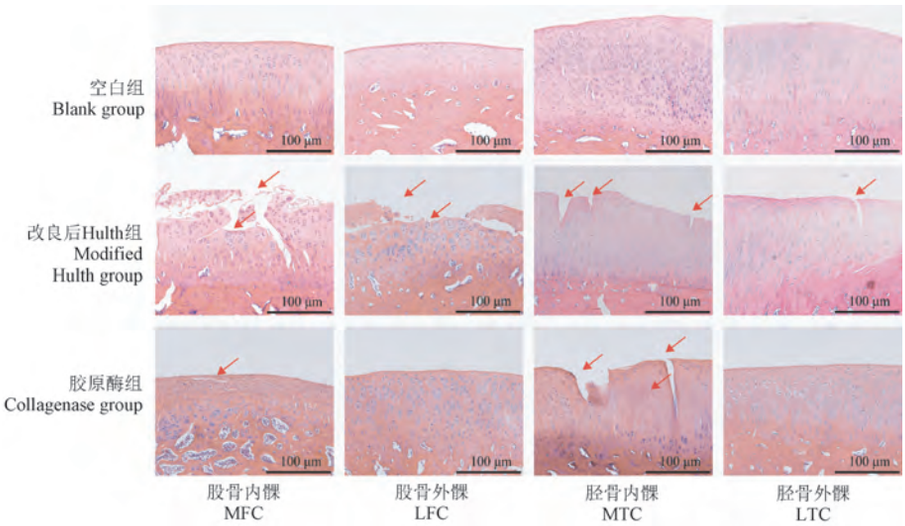


注：A：解剖后膝关节大体观察结果。红色箭头：新生骨赘及软骨磨损部位。B：膝关节软骨 Pelletier 评分。与空白组比较，$^{*}P<0.05$；与改良后 Hulth 组比较，$^{ns}P>0.05$。

图 3　3 组兔膝关节软骨大体观察及 Pelletier 评分结果（$n=3$）

Note. A, General observation results of the knee joint after anatomy. Red arrow, New osteophytes and cartilage wear. B, Pelletier score of knee cartilage. Compared with the blank group, $^{*}P<0.05$. Compared with modified Hulth group, $^{ns}P>0.05$.

Figure 3　General observation and Pelletier score results of knee cartilage in three groups

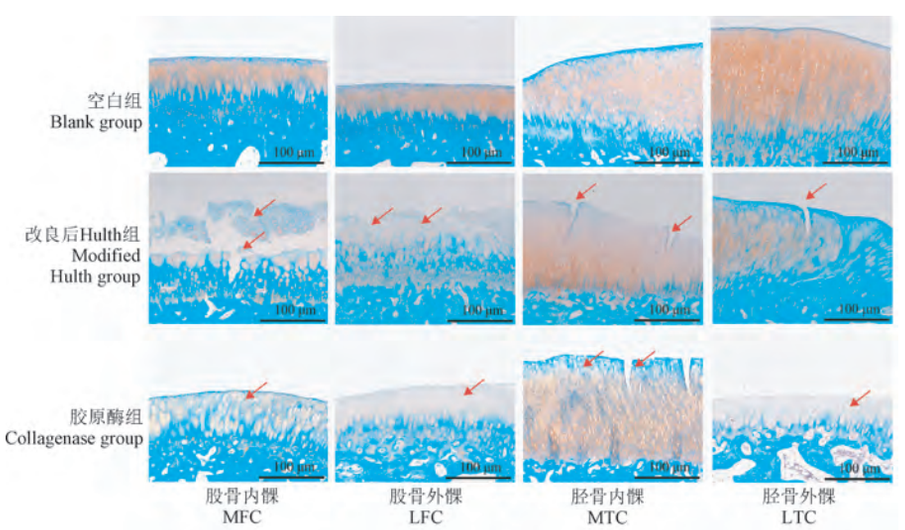


注:红色箭头所指为病变部位。

图 4 三组兔膝关节软骨 HE 染色

Note. Red arrow points to the lesion.

Figure 4 HE staining of knee cartilage in three groups



注:红色箭头所指为病变部位。

图 5 三组兔膝关节软骨番红 O-固绿染色

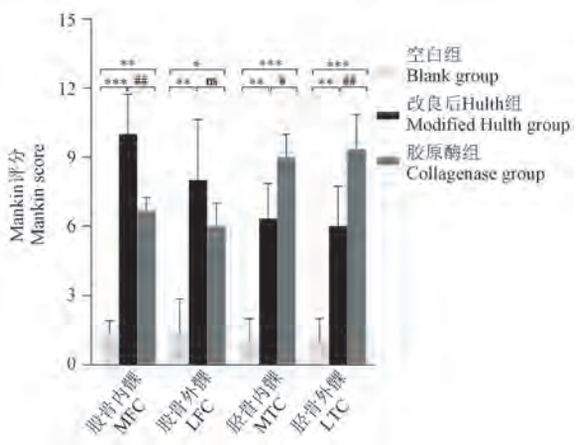
Note. Red arrow points to the lesion.

Figure 5 Safranin O-Fast Green staining of knee cartilage in three groups

3 讨论

疾病动物模型是重大疾病机制研究、新型治疗方式开发、药物筛选与评价不可或缺的支撑条件[17]。理想的疾病动物模型至少需满足与人类疾病相似的 3 个一致性特征:疾病发病机理同源性、行为表象一致性、药物治疗反应性[18]。目前用作 KOA 模型的动物载体有大小鼠、兔、猪和非人灵长类动物。其中家兔的关节结构与人类似,关节腔体积较小鼠更大,关节和组织更易提取[19],是早期骨关节炎模型的适宜载体。构建兔 KOA 模型的方法也多种多样,主要有:(1)手术造模法;(2)自发性骨关节炎模型;(3)关节腔药物诱导法;(4)关节制动法。

改良后的 Hulth 法[20]是最常用的关节内手术造模法之一,通过将膝关节韧带等维持稳定的组织切断或切除,使关节出现不同程度的稳态失衡,其在传统的 Hulth 法的基础上进行改良,即切断前交叉韧带、内侧副韧带和切除内侧半月板,减小对动物的损伤,能较好地观察 KOA 周围组织早中期的病理表现,是 KOA 研究中最常用到的手术类模型。



注：Mankin 评分。与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与改良后 Hulth 组比较，$^{ns}P>0.05$，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 6　Mankin 评分结果（$n=3$）

Note. Mankin scores. Compared with the blank group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with modified Hulth group, $^{ns}P>0.05$, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 6　Mankin score results of knee cartilage in three groups

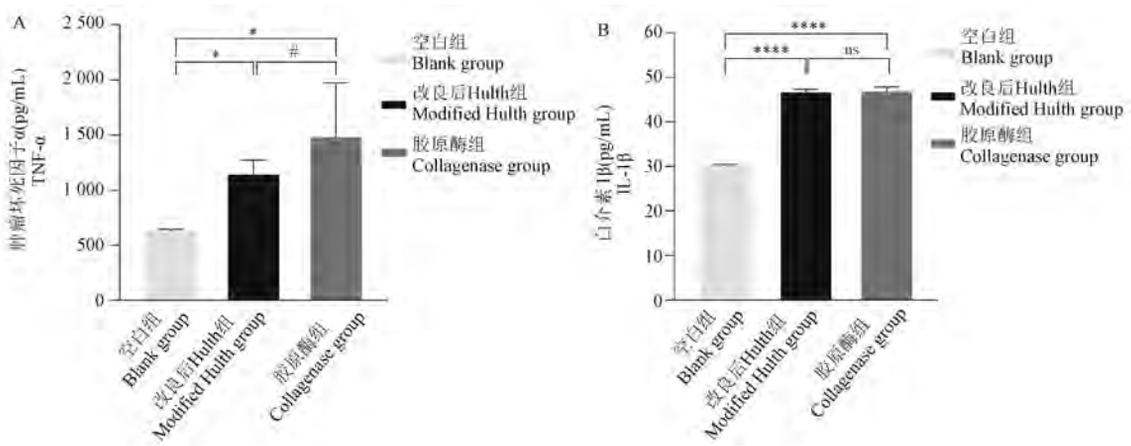
表 1　三组兔血清中 TNF-α 和 IL-1β 的表达水平比较

Table 1　Comparison of the expression levels of TNF-α and IL-1β in three groups of rabbit serum

组别 Groups	肿瘤坏死因子 α TNF-α（pg/mL）	白介素 1β IL-1β（pg/mL）
空白组 Blank group	624.99±17.82	30.23±0.25
改良后 Hulth 组 Modified Hulth group	1140.56±129.81 *	46.67±0.71 ****
胶原酶组 Collagenase group	1480.69±492.08 $^{*\#}$	46.82±1.04 $^{****\ ns}$

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{****}P<0.0001$；与改良后 Hulth 组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{ns}P>0.05$。

Note. Compared with the blank group, $^{*}P<0.05$, $^{****}P<0.0001$. Compared with modified Hulth group, $^{\#}P<0.05$, $^{ns}P>0.05$.



注：A：肿瘤坏死因子 α（TNF-α）表达水平。B：白介素 1β（IL-1β）表达水平。与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{****}P<0.0001$；与改良后 Hulth 组比较，$^{ns}P>0.05$，$^{\#}P<0.05$。

图 7　三组兔血清中 TNF-α 和 IL-1β 表达水平结果（$n=3$）

Note. A, Tumor necrosis factor α (TNF-α) expression level. B, Interleukin 1β (IL-1β) expression level. Compared with the blank group, $^{*}P<0.05$, $^{****}P<0.001$. Compared with modified Hulth group, $^{ns}P>0.05$, $^{\#}P<0.05$.

Figure 7　Results of TNF-α and IL-1β expression level in serum of three groups of rabbits

关节腔药物诱导法是直接在关节腔内注射能诱导炎症的化合物或药物，造成关节软骨、半月板或韧带的局部损伤。这种 KOA 模型具有实验周期短、重复性好、创伤性小、便于操作的优点，能避免手术法易造成的感染问题[21]。

本研究成功构建了使用改良后的 Hulth 法或关节腔注射胶原酶诱导的兔 KOA 模型，并通过多种实验检测方法比较两种造模方法的异同点。两种造模方法的动物体重在术后均出现降低，1 周后体重恢复稳步增长趋势。Pelletier 评分主要反映关节软骨表面的退变程度[15]，如关节面磨损、缺损的程度。两种造模方法的兔关节软骨均出现一定程度的粗糙和缺损，这与 Ge 等[22]的结果一致。改良后 Hulth 法模型组可见膝关节内侧伴有骨性突出，X 线及 Micro-CT 可见明显的骨赘形成。胶原酶组肉眼未见骨性突出，患侧肌肉松弛和萎缩并不在 Lequesne MG 评分标准内，故其评分稍低于改良后的 Hulth 组，且胶原酶以诱导软骨退变为主，故 X 线及 Micro-

CT 未见明显变化。

软骨组织病理学是评价 KOA 模型是否成功的主要指标[23]。在组织形态学方面多使用光学显微镜进行观察,HE 为常规的染色手段,另外还有针对于软骨基质的特殊染色[24]。本研究利用番红 O-固绿染色结合 Mankin 软骨组织形态学评分对关节软骨进行病理学评估,结果显示改良后 Hulth 法的病理损伤主要在股骨髁部,表现为严重的软骨脱落和软骨基质丢失,其原因应与手术造成的关节内侧联合不稳定有关[25];胶原酶法的病理损伤主要在胫骨平台,主要表现为软骨细胞凋亡和软骨基质丢失,这与关节腔内注射时的进针位点有关[26]。

在 KOA 发展中,炎性因子参与破坏关节内微环境的稳态[27]。TNF-α 是一种多功能炎性因子,是诱导 KOA 软骨细胞凋亡的主要细胞因子[28],能刺激细胞生成 PGE2 和 IL-1β,引起关节疼痛和抑制软骨蛋白多糖合成[29]。

综上,改良后 Hulth 法构建的 KOA 模型主要表现为骨赘生成、股骨髁部软骨脱落和大量软骨细胞克隆形成,软骨损伤程度更为严重;关节腔注射胶原酶诱导的 KOA 模型主要表现为软骨表面缺损,胫骨平台软骨基质丢失和炎性因子升高,相比于改良后的 Hulth 法更为简便,创伤性小,更接近人的 KOA 进程与发病机制,研究者可根据实验的具体要求,采用最合适的造模方法。

参考文献:

[1] Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, et al. Osteoarthritis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16072.

[2] 张莹莹, 李旭东, 杨佳娟, 等. 中国 40 岁及以上人群骨关节炎患病率的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(4): 407-414.

[3] 黄磊, 罗超, 宋嘉琪, 等. 间充质干细胞来源外泌体在骨关节炎治疗中的作用 [J]. 生理科学进展, 2020, 51(5): 362-366.

[4] 刘晓辰, 付维力. 骨关节炎动物模型的选择 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(11): 1769-1776.

[5] Liang Y, Chen S, Yang Y, et al. Vasoactive intestinal peptide alleviates osteoarthritis effectively via inhibiting NF-κB signaling pathway [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 25.

[6] He Z, Li H, Han X, et al. Irisin inhibits osteocyte apoptosis by activating the Erk signaling pathway *in vitro* and attenuates ALCT-induced osteoarthritis in mice [J]. Bone, 2020, 141: 115573.

[7] Van DSCM, Blom AB, Walgreen B, et al. IL-1β-mediated activation of adipose-derived mesenchymal stromal cells results in PMN reallocation and enhanced phagocytosis: a possible mechanism for the reduction of osteoarthritis pathology [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1075.

[8] Li H, Guo H, Lei C, et al. Nanotherapy injoints: Increasing endogenous hyaluronan production by delivering hyaluronan synthase 2 [J]. Adv Mater, 2019, 31(46): e1904535.

[9] 谭启钊, 牛国栋, 赵振达, 等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 450-455.

[10] 摆雪, 张洪平, 刘俊昌, 等. 石膏铁丝固定法建立兔膝痹模型 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(18): 2603-2608.

[11] 吴强, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 膝骨性关节炎动物模型选择与制备的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 125-130.

[12] Gu W, Shi Z, Song G, et al. MicroRNA-199-3p up-regulation enhances chondrocyte proliferation and inhibits apoptosis in knee osteoarthritis via DNMT3A repression [J]. Inflamm Res, 2021, 70(2): 171-182.

[13] Pas HI, Winters M, Haisma HJ, et al. Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature [J]. Br J Sports Med, 2017, 51(15): 1125-1133.

[14] 刘健. 膝骨关节炎软骨下骨 X 光片图像分析 [D]. 青岛: 青岛大学, 2015.

[15] Pelletier JP, Jovanovic D, Fernandes JC, et al. Reduced progression of experimental osteoarthritis *in vivo* by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(7): 1275-1286.

[16] Aso K, Shahtaheri SM, Hill R, et al. Associations of symptomatic knee osteoarthritis with histopathologic features in subchondral bone [J]. Arthritis Rheumatol, 2019, 71(6): 916-924.

[17] 苏先芝, 刘一斐, 孔文娟, 等. 三种早发性卵巢功能不全小鼠造模方法的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 725-732.

[18] 臧凝子, 庞立健, 李品, 等. 特发性肺间质纤维化急性加重大鼠模型造模方法研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3064-3070.

[19] Huang K, Cai HL, Zhang PL, et al. Comparison between two rabbit models of posttraumatic osteoarthritis: a longitudinal tear in the medial meniscus and anterior cruciate ligament transection [J]. J Orthop Res, 2020, 38(12): 2721-2730.

[20] Li X, Zhang Z, Liang W, et al. Tougu Xiaotong capsules may inhibit p38 MAPK pathway-mediated inflammation: *in vivo* and *in vitro* verification [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112390.

[21] Resende VAC, Neto AC, Nunes C, et al. Higher age, female gender, osteoarthritis and blood transfusion protect against periprosthetic joint infection in total hip or knee arthroplasties: a systematic review and meta-analysis [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2021, 29(1): 8-43.

[22] Ge C, Mohamed F, Binrayes A, et al. Selective role of discoidin domain receptor 2 in murine temporomandibular joint development and aging [J]. J Dent Res, 2018, 97(3): 321-328.

[23] 贺蓉, 杨依霏, 徐启华, 等. 尪痹片对骨性关节炎模型动物膝关节组织形态学的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 142-148.
[24] 于斐, 雷鸣, 曾晖, 等. 特殊染色技术在骨关节炎关节软骨形态学研究中的比较 [J]. 中国矫形外科杂志, 2015, 23(19): 1801-1807.
[25] Gougoulias N, Sakellariou A. When is a simple fracture of the lateral malleolus not so simple? How to assess stability, which ones to fix and the role of the deltoid ligament [J]. Bone Joint J, 2017, 99(7): 851-855.
[26] 罗裕强, 史占军, 唐元, 等. 给药位点差异对透明质酸在膝关节软骨表面覆盖范围的影响 [J]. 中华骨科杂志, 2015, 35(11): 1159-1167.
[27] Zhou QF, Cai YZ, Lin XJ. The dual character of exosomes in osteoarthritis: antagonists and therapeutic agents [J]. Acta Biomater, 2020, 105: 15-25.
[28] 陈后煌, 邵翔, 李俐, 等. 肿瘤坏死因子 α 诱导大鼠软骨细胞凋亡模型的建立及鉴定 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(4): 527-531.
[29] Wu Y, Wang Z, Fu X, et al. Geraniol-mediated osteoarthritis improvement by down-regulating PI3K/Akt/NF-κB and MAPK signals: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106713.

〔**收稿日期**〕2021-08-19

Animal Models and Experimental Medicine, *AMEM* 专栏文章推介

Animal Models and Experimental Medicine 简称 *AMEM*, 从 2021 年 12 月(第四期)起, 陆续刊出系列文章, 发表在专栏文章版块, 旨在为杰出的基础医学科学成果提供国际交流共享平台, 并及时对学术热点问题进行报道, 增加期刊国际学术影响力。

本期热点问题聚焦于 2019 年度诺贝尔生理学或医学奖。威廉·凯林、彼得·拉特克利夫和格雷格·塞门扎因为发现“细胞如何感知和适应供氧环境变化”而获得了 2019 年度的诺奖。当细胞由于通气不足等因素导致氧气需求超过氧气供应时, 就会低氧。一些慢性疾病如: 慢性阻塞性肺病、心血管疾病、肿瘤等都能造成低氧的细胞内环境。动脉粥样硬化和肺动脉高压和心力衰竭等心脑血管疾病是造成我国成人致死率最高的疾病, 常诱发组织缺氧。我国成人中预计近 1 亿人患有慢阻肺, 慢阻肺引起的肺部气流限制也会造成组织低氧, 进而影响病人的日常生活, 甚至导致劳动力丧失, 最终还可能发展为呼吸衰竭或肺源性心脏病。此外我国有近千万人口居住在高原之上。每年还有着大量的游客去往高原旅游, 由于高原低氧而诱发的高原病也严重危害国人的健康。因此研究低氧适应的分子机制对这些疾病的预防和治疗有重大的意义。

AMEM 在 2021 年的第四期推出了低氧适应的专栏, 从器官缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制, 到高原和穴居地下生活动物低氧适应, 再到低氧激活的信号通路, 从不同角度, 不同水平对有机体的低氧反应及其低氧适应这一热点领域进行了深入探讨。其中的封面文章是哈佛医学院, Schepens 眼科研究所的杨梦璐等系统阐述了角膜在缺氧条件下的病理变化及缺氧适应机制, 并对该领域目前使用的动物模型及未来的研究方向进行了讨论[1]。以色列海法大学的 Eviatar 教授等综述了不同缺氧环境下的哺乳动物通过调节生理活动、基因表达和基因突变的方式来维持机体的代谢水平, 重点对高原哺乳动物及以色列地下啮齿动物科进行介绍, 有助于我们了解哺乳动物对低氧环境的适应的方式, 以此作为人类缺氧适应研究的借鉴[2]。郑州大学的王振龙等综述了小型哺乳动物在长期缺氧环境的耐受方式, 重点介绍了生物体通过生理生化改变、活性氧 ROS 的激活、HIF-1 调控、血管内皮生长因子(VEGF)和促红细胞生成素(EPO)的表达等方式应对缺氧环境, 并且对低氧适应动物的组学现状以及抗癌症机制进行深入探讨, 为人类缺氧疾病的研究提供了合适的实验动物模型[3]。

参考文献:

[1] Pang K, Lennikov A, Yang M. Hypoxia adaptation in the cornea: Current animal models and underlying mechanisms [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 300-310.
[2] Li F, Qiao Z, Duan Q, et al. Adaptation of mammals to hypoxia [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 311-318.
[3] Li M, Pan D, Sun H, et al. The hypoxia adaptation of small mammals to plateau and underground burrow conditions [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(4): 319-328.

陈俊,周赤忠,张玲,等. 长链非编码 RNA TUG1 调控 miR-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用机制[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 38-45.
Chen J, Zhou CZ, Zhang L, et al. Role of the long non-coding RNA TUG1 in the regulation of miR-137 and neural injury in rats with focal cerebral ischemia[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 38-45.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 006

长链非编码 RNA TUG1 调控 miR-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用机制

陈 俊[1],周赤忠[1],张 玲[2],乔 木[1*]

(1.武汉市普仁医院,武汉 430081;2.武汉科技大学医学院,武汉 430081)

【摘要】 目的 探究长链非编码 RNA(LncRNA)牛磺酸上调基因 1(TUG1)调控微小 RNA(miR)-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用。**方法** 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向位点;Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,模型成功大鼠随机分为模型组、si-NC 组(10 μL si-NC)、si-TUG1 组(10 μL si-TUG1)、si-TUG1+anti-miR-NC 组(si-TUG1 和 anti-miR-NC 各 10 μL)、si-TUG1+anti-miR-137 组(si-TUG1 和 anti-miR-137 各 10 μL),每组 12 只。另取 12 只设为假手术组。5 d 1 次,注射 3 次,第 16 天检测。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测海马区 TUG1、miR-137 水平情况;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死情况;苏木精-伊红(HE)、尼氏染色观察海马神经元形态;蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测海马区蛋白酪氨酸激酶 1(JAK1)、信号转导子和转录激活子 1(STAT1)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(BCL2)、BCL2 相关 X 蛋白(BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase3)蛋白水平。**结果** Starbase 分析发现 miR-137 与 TUG1 存在互补的结合位点,并经双荧光素酶验证。模型组海马区神经元层次紊乱,神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失等现象,尼氏体数量减少;si-TUG1 组神经元数量有所增加、神经元形态有所恢复,尼氏体数量增多;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组神经元形态破坏严重,间隙变大、数量减少。与假手术组相比,模型组、si-NC 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积升高($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积降低($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积升高($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 干扰 TUG1 可上调 miR-137 实现对局灶性脑缺血大鼠神经元形态及凋亡的缓解,从而实现对神经损伤的保护。

【关键词】 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1;微小 RNA-137;局灶性脑缺血;神经损伤
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0038-08

Role of the long non-coding RNA TUG1 in the regulation of miR-137 and neural injury in rats with focal cerebral ischemia

CHEN Jun[1], ZHOU Chizhong[1], ZHANG Ling[2], QIAO Mu[1*]
(1. Wuhan Puren Hospital, Wuhan 430018, China. 2. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430018)

[**基金项目**]湖北省卫生和计划生育委员会科研项目立项合同(WJ2017F033)。
[**作者简介**]陈俊(1987—),男,硕士,研究方向:脑血管颅脑疾病。E-mail:362746557@qq.com
[**通信作者**]乔木(1984—),男,硕士,研究方向:脑血管颅脑疾病。E-mail:3312801453@qq.com

【Abstract】 **Objective** To explore the role of the long non-coding RNA (lncRNA) taurine up-regulated gene 1 (TUG1) in the regulation of microRNA (miR)-137 and nerve injury in rats with focal cerebral ischemia. **Methods** The dual luciferase assay was used to identify the target sites of miR-137 and TUG1. A rat model of focal cerebral ischemia was established using the Longa thread bolt method. Ischemic rats were randomly divided into the following groups (n = 12): model group, small interfering RNA (si)-negative control (NC) group (10 μL si-NC), si-TUG1 group (10 μL si-TUG1), si-TUG1 + anti-miR-NC group (10 μL si-TUG1 and 10 μL anti-miR-NC), si-TUG1 + anti-miR-137 group (10 μL si-TUG1 and 10 μL anti-miR-137). Another group of 12 rats were used in the sham surgery group. Once every 5 days, three injections and detection on the 16th day. The levels of TUG1 and miR-137 in the hippocampus were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Cerebral infarction was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. The morphology of hippocampal neurons was observed by hematoxylin-eosin and Nissl staining, and the protein levels of JAK1, STAT1, B-cell lymphoma-2 (BCL-2), BCL-2-associated X protein (BAX) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (caspase3) were detected by Western blot. **Results** Starbase analysis showed that there were complementary binding sites between miR-137 and TUG1, which were verified by the double luciferase assay. In the model group, neurons in the hippocampus were disordered, the number of neurons was decreased, neuronal gaps were larger, some neurons underwent nuclear pyknosis or dissolution, nucleoli disappeared, and the number of Nissl bodies decreased. In the si-TUG1 group, the number of neurons increased, the morphology of neurons recovered, and the number of Nissl bodies increased. Compared with that in the si-TUG1 group, damage to the neurons in the si-TUG1 + anti-miR-137 group was more serious, neuronal gaps were larger, and the number of neurons decreased. Compared with those in the sham surgery group, the cerebral infarction volume; TUG1 RNA; and JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 protein levels in the hippocampus were higher in the model and si-NC groups (P<0.05), and the levels of miR-137 and BCL-2 protein were lower (P<0.05). Compared with that in the model and si-NC groups, the levels of TUG1, JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 in the hippocampus and cerebral infarction volume in the model and si-NC groups were lower (P<0.05), and the miR-137 and BCL-2 levels in the hippocampus were higher (P<0.05). Compared with that in the si-TUG1 and si-TUG1 + anti-miR-NC groups, TUG1 RNA and JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 protein in the hippocampus and cerebral infarction volume were higher in the model and si-NC groups (P<0.05), and the level of miR-137 and BCL-2 protein in the hippocampus were lower (P<0.05). **Conclusions** Interfering with TUG1 lncRNA upregulated miR-137 and alleviated neuronal ischemic morphology and apoptosis in rats with focal cerebral ischemia, thus protecting against nerve injury.

【Keywords】 long non-coding RNA taurine up-regulated gene 1; microRNA-137; focal cerebral ischemia; nerve injury

缺血性脑卒中发生率占脑卒中发生率的 60%~80%,脑供血不足和氧气缺乏均导致脑损伤[1]。脑供血不足、氧缺乏等造成脑功能受到影响、神经功能缺损等,具有高致残率、致死率、复发率,已成为脑卒中死亡的主要原因之一[2]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA,lncRNA)参与缺血性脑卒中神经元抗凋亡、抗炎等过程,为脑卒中的靶标治疗提供依据[3]。牛磺酸上调基因 1(taurine up-regulated gene 1,TUG1)是神经系统发育的重要调控因子,在氯胺酮诱导的神经元毒性中,干扰 TUG1 可降低海马神经元凋亡和活性氧水平、并增加神经元存活能力,从而降低氯胺酮的神经毒性作用[4],但具体机制尚不清楚。微小 RNA(microRNA,miRNA)作为重要的调节剂,miR-137 充当神经元分化 miRNA,在神经功能中发挥重要作用[5];在缺血性脑卒中中表达降低影响神经元凋亡[6],但与 TUG1 之间关系尚未发现研究。因此,Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,干扰 TUG1 探究其对神经元损伤的影响,初步探讨 TUG1 影响缺血性脑卒中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

80 只健康 SD 大鼠(北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2017-0006]),SPF 级、7~9 周龄、雄性,体重(280±30)g。大鼠在温度 22℃、湿度 50%左右条件下饲养。实验动物在武汉华联科生物技术有限公司[SYXK(鄂)2018-0104]单独隔离暂养 1 周进行实验。动物实验研究经武汉市普仁医院伦理委员会审批(2019L014),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠海马神经元购自基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

TUG1-MUT、TUG1-WT、miR-137 mimic、miR-137 NC、si-NC、si-TUG1、anti-miR-NC、anti-miR-137 均购自广州锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒、蛋白酪氨酸激酶 1(januskinase 1,JAK1)、信号转导子和转录激活子 1(Signal transducer and activator of transcription 1,STAT1)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2,BCL2)、BCL2 相关 X 蛋白(BCL2 associated X protein,BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Cystein-asparate protease 3,caspase3)均购自英国 abcam 公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride,TTC)染色试剂盒、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒、尼氏染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。7500 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR,RT-qPCR)仪购自美国 ABI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 双荧光素酶验证 miR-137 与 TUG1 的靶向关系

Starbase 分析发现:miR-137 与 TUG1 存在结合位点;将 miR-137 与 TUG1 结合处位点序列、结合处突变位点序列分别克隆重组至 pGL3-basic 荧光素酶报告载体上,构建 TUG1 野生型(TUG1-WT)及突变型(TUG1-MUT),分别与 miR-137 mimic 或 miR-137 NC 共转染至海马神经元中,检测各组荧光素酶相对活性。

1.3.2 实验分组及处理

参考文献[7]采用 Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,腹腔注射 2.5%戊巴比妥钠麻醉大鼠,大鼠仰卧固定在鼠板上,消毒颈部、备皮后纵向切开皮肤,暴露出颈外动脉(external carotid artery,ECA)、左侧颈总动脉(common carotidartery,CCA),近心端缝合线结扎,动脉夹夹闭颈内动脉(internal carotidartery,ICA),距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口后,插一根直径为 0.24 mm 拴线,插向 ICA,拴线尾端逐层缝合,2 h 后拔出栓线。Longa 分级法对大鼠进行神经功能缺损评分,1~3 分为制备成功的模型[8],成功 60 只,将其随机分为模型组(model group)、si-NC 组(si-NC group)、si-TUG1 组(si-TUG1 group)、si-TUG1+anti-miR-NC 组(si-TUG1+anti-miR-NC group)、si-TUG1+anti-miR-137 组(si-TUG1+anti-miR-137 group),每组 12 只。另 12 只大鼠假手术组(sham operation group),仅分离 CCA、ECA、ICA。

si-NC 组、si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组、si-TUG1+anti-miR-137 组各组分别在 Bregma 后 3 mm、中线旁开 2.2 mm、深度 2.5 mm 注射 10 μL si-NC、10 μL si-TUG1、si-TUG1 和 anti-miR-NC 各 10 μL、si-TUG1 和 anti-miR-137 各 10 μL,假手术组和模型组相同部位注射 10 μL 生理盐水。5 d 1 次,第 16 天检测下列指标。

1.3.3 样本采集与处理

每组随机选 6 只大鼠取全脑,TTC 染色检测脑梗死情况;剩余 6 只取脑组织中海马区,部分 4%多聚甲醛中固定,剩余-80℃冰箱保存。

1.3.4 RT-qPCR 检测海马区 TUG1、miR-137 水平情况

-80℃冰箱组织,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录成第一链 cDNA。设计上下游引物序列,TUG1(F:5'-TACGTCCCGTGCCTCCTGAT-3'、R:5'-AGGGCTGTGCTGAATCTGGG-3'),miR-137(F:5'-GCGCGCTTATTGCTTAAGAATAC-3'、R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3')。反应体系:2× Mix 10 μL,cDNA 1 μL,F/R(均为 10 μmol/L)各 0.5 μL,补 ddH_2O 至 20 μL。反应条件:94℃、60 s;95℃、30 s,(TUG1:59℃、40 s,miR-137:59℃、35 s),45 个循环。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算 TUG1、miR-137 相对表达水平。

1.3.5 TTC 染色检测脑梗死情况

全脑置于-20℃冰箱冰冻 15 min 后冠状位切片,每个脑组织切片 5 片,脑片置于 2% TTC 中 37℃恒温水浴锅中避光孵育 30 min,弃去 TTC,置于 4%多聚甲醛中 4℃固定 24 h,拍照后用 Image pro 软件进行分析处理,计算脑梗死体积。脑梗死体积=全脑梗死体积/全脑体积×100%。

1.3.6 HE 染色观察海马神经元形态

多聚甲醛中固定的海马组织切片(厚度:6 μm),苏木精染色、乙醇盐酸分色、伊红复染,显微镜下观察海马区神经元形态。

1.3.7 尼氏染色观察神经元形态

1.3.6 中切片,二甲苯及梯度乙醇脱蜡、入预热 56℃的 1%甲苯胺蓝染色 60 min,经蒸馏水漂洗、95%乙醇分化、脱色数秒,显微镜下观察神经元形态。

1.3.8　蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白水平

-80℃取海马组织后提取总蛋白。分离蛋白、转膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h;对应加入一抗 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3、GAPDH,4℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育 2 h;凝胶成像分析系统拍照后定量分析。

1.4　统计学方法

计量数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,统计学软件 GraphPad 8.0 对数据进行分析,多组间比较行单因素方差分析,组间两两比较行 *SNK-q* 法。$P<0.05$ 差异有统计学意义。

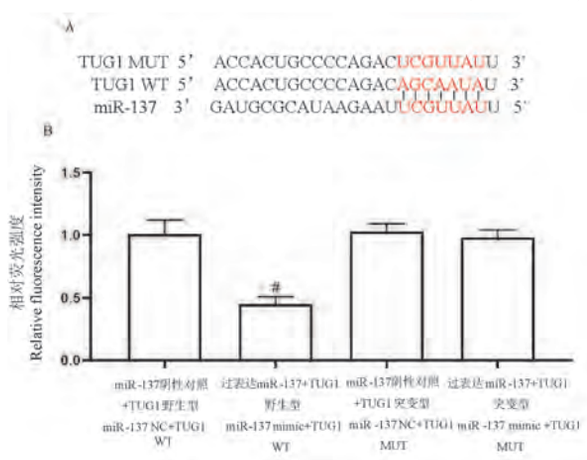
2　结果

2.1　双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向关系

miR-137 与 TUG1 存在互补的结合位点,如图 1A。与 miR-137 NC+TUG1 WT 相比,miR-137 mimic +TUG1 WT 荧光素酶相对活性下降($P<0.05$)。见图 1B。

2.2　各组海马区 TUG1、miR-137 水平

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1 + anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平升高($P<0.05$),



注:A:miR-137 与 TUG1 的结合位点,红色的碱基是结合位点;B:荧光素酶相对活性的比较。与 miR-137 NC+TUG1 WT 比较,$^{\#}P<0.05$。

图 1　双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向关系($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Note. A, Binding site of miR-137 with TUG1. Red base is the binding site. B, Comparison of relative luciferase activity. Compared with the miR-137 NC+TUG1 WT, $^{\#}P<0.05$.

Figure 1　Dual luciferase identification of the targeting relationship between miR-137 and TUG1

miR-137 水平降低($P<0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 TUG1 水平降低($P<0.05$),miR-137 水平升高($P<0.05$),si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平降低($P<0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平升高($P<0.05$),miR-137 水平降低($P<0.05$)。见图 2A、2B。

2.3　各组脑梗死情况

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组 si-TUG1+anti-miR-137 组脑梗死体积升高($P<0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组脑梗死体积下降($P<0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组脑梗死体积升高($P<0.05$)。见图 3A、3B。

2.4　各组海马区神经元 HE 染色情况

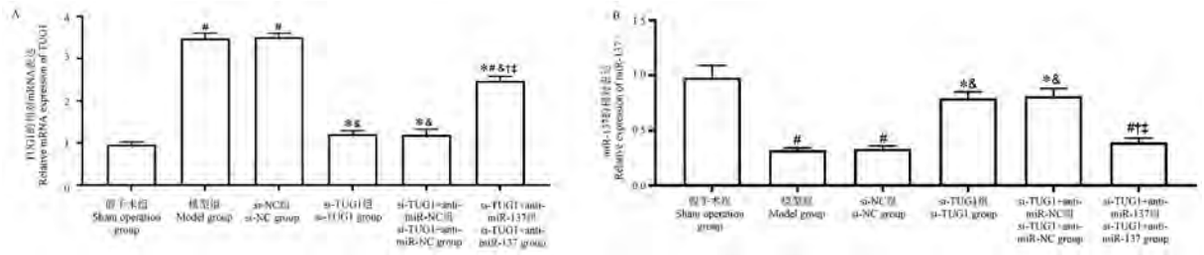
假手术组神经元未见异常,排列整齐、层次清晰,核膜、核仁清晰可见;模型组、si-NC 组层次紊乱,神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失等现象;si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元数量有所增加、神经元形态有所恢复;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元间隙变大、数量减少。见图 4。

2.5　各组海马区神经元尼氏染色情况

假手术组神经元排列整齐且致密、神经元内尼氏体充盈;模型组、si-NC 组神经元排列紊乱、间隙大,核膜、核仁模糊不清,尼氏体数量减少;si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元形态有所恢复,尼氏体数量增多;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元形态破坏严重。见图 5。

2.6　各组海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达情况

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 BCL2 蛋白水平降低,JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$),si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 JAK1、STAT1、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 BCL2 蛋白水平升高,JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平降低($P<0.05$),si-TUG1+

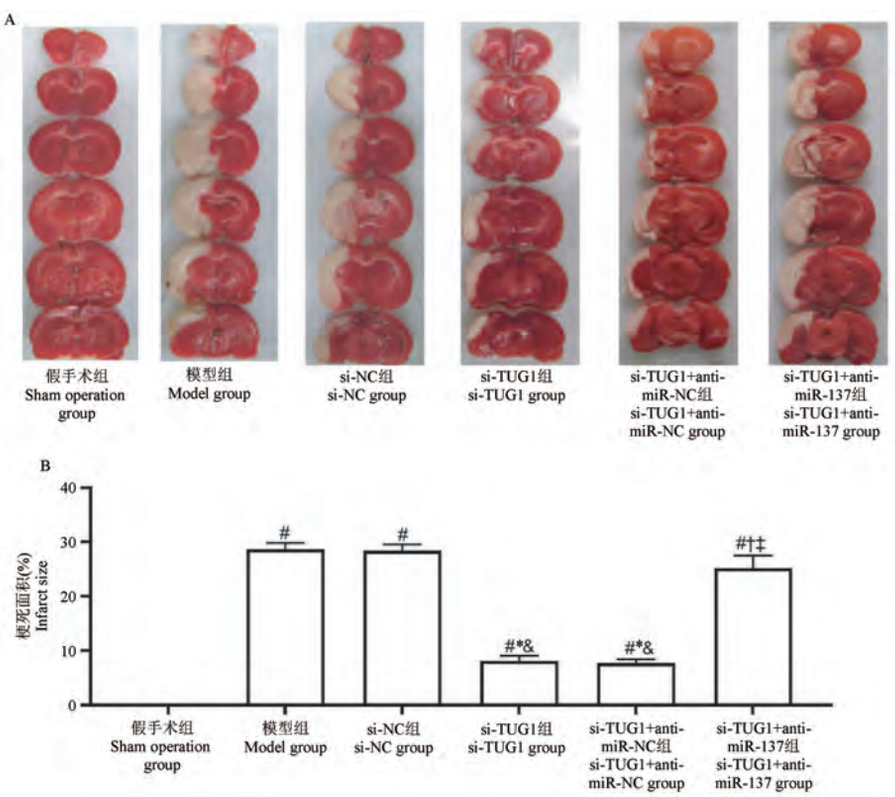


注：A：海马组织中 TUG1 水平；B：海马组织中 miR-137 的水平。与假手术组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与 si-NC 组比较，$^{\&}P<0.05$；与 si-TUG1 组比较，$^{\dagger}P<0.05$；与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较，$^{\ddagger}P<0.05$。

图 2 海马区 TUG1、miR-137 水平（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. A, TUG1 level in the hippocampus. B, miR-137 level in the hippocampus. Compared with sham operation group, $^{\#}P<0.05$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$. Compared with si-NC group, $^{\&}P<0.05$. Compared with si-TUG1 group, $^{\dagger}P<0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, $^{\ddagger}P<0.05$.

Figure 2 TUG1 and miR-137 level in the hippocampus



注：A：脑组织切片 TTC 染色图片；B：梗死体积百分比。与假手术组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与 si-NC 组比较，$^{\&}P<0.05$；与 si-TUG1 组比较，$^{\dagger}P<0.05$；与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较，$^{\ddagger}P<0.05$。

图 3 大鼠脑梗死体积（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. A, Photographs of brain sections with TTC staining. B, Percentage of infarct volume. Compared with sham operation group, $^{\#}P<0.05$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$. Compared with si-NC group, $^{\&}P<0.05$. Compared with si-TUG1 group, $^{\dagger}P<0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, $^{\ddagger}P<0.05$.

Figure 3 Volume of cerebral infarction in rats

anti-miR-137 组海马区 JAK1、STAT1、caspase3 蛋白水平降低（$P<0.05$）；分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比，si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 BCL2 蛋白水平降低，JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平升高（$P<0.05$）。见图 6A、6B、6C、6D。

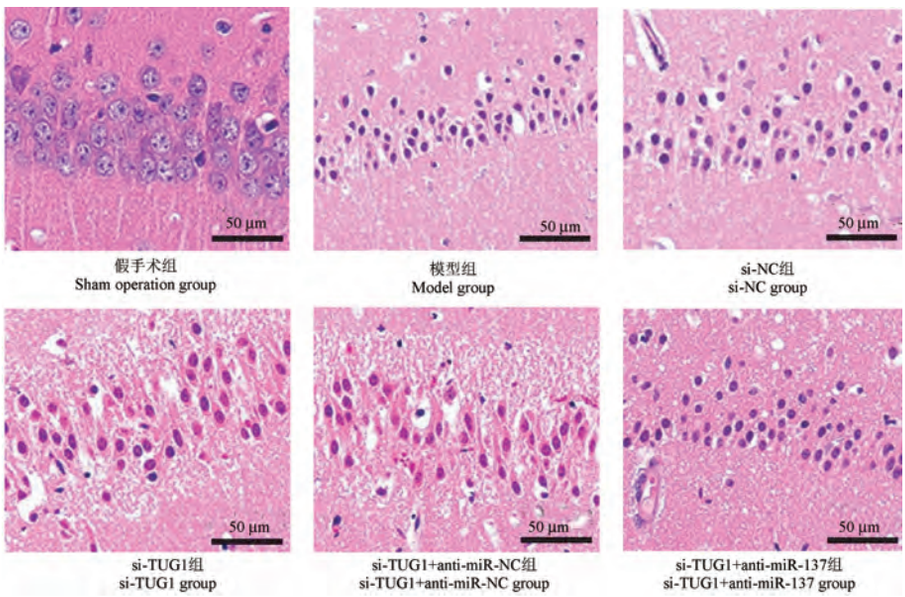


图 4　大鼠海马区神经元形态(HE 染色)

Figure 4　Neuron morphology in the hippocampus of rats (HE staining)

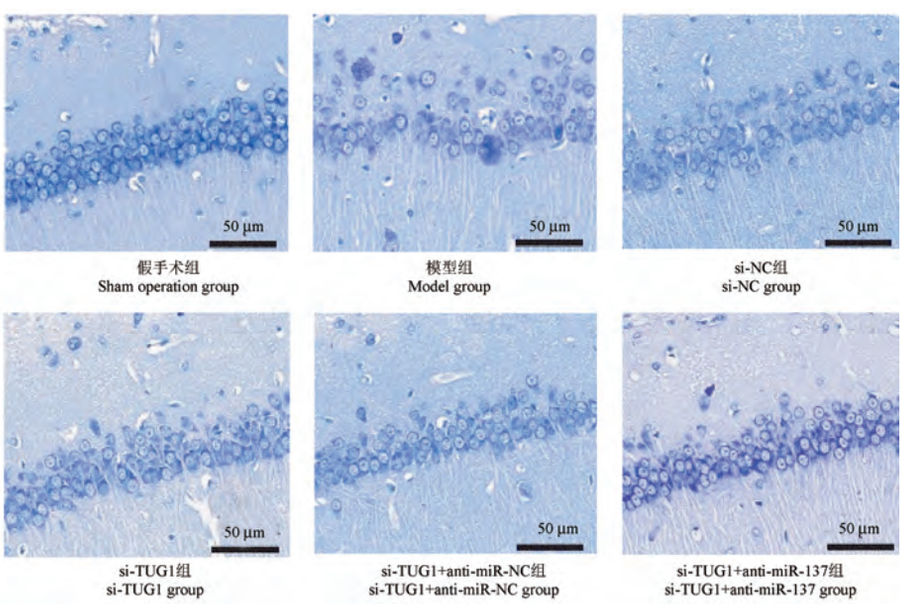


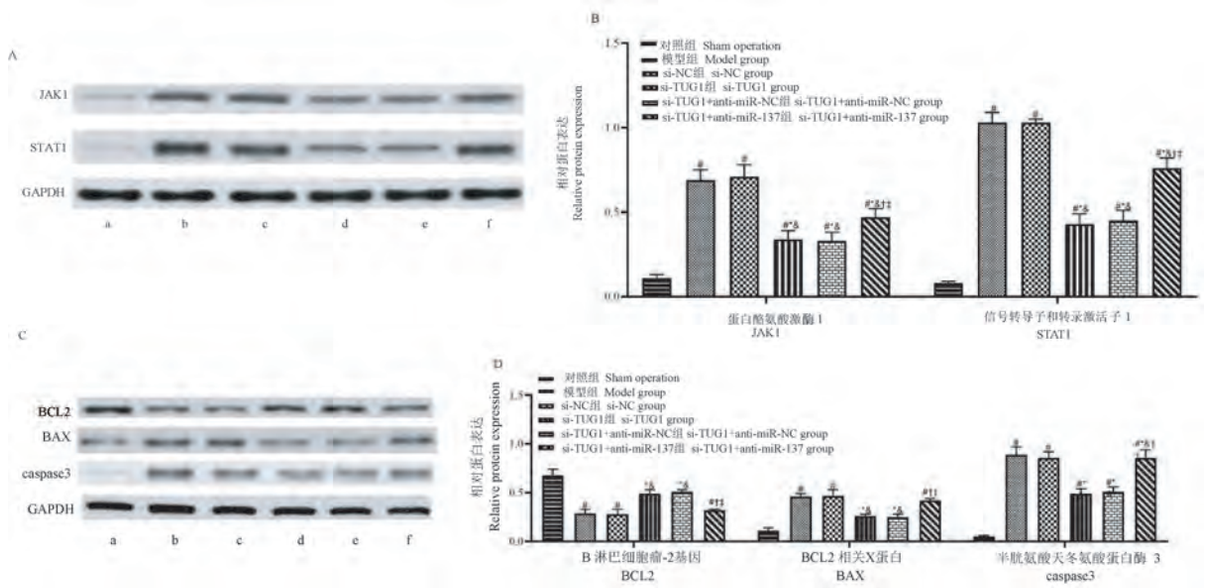
图 5　大鼠海马区神经元形态(尼氏染色)

Figure 5　Neuronal morphology in the hippocampus of rats (Nissl staining)

3　讨论

缺血性脑卒中中脑组织血液动力学、能量代谢、离子均发生变化,导致细胞毒素积累,导致炎症反应、细胞凋亡等,导致多种神经功能损伤,出现后遗症包括语言障碍、肢体偏瘫、认知功能障碍等,好发于中老年人,在青年人中发病呈上升趋势[9-10]。本研究 Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,TTC 染色发现,脑组织脑梗死体积升高;HE 染色、尼氏染色检测大鼠海马区神经元发现,海马区神经元排列紊乱、神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失明显,提示局灶性脑缺血后大鼠海马区神经元损伤明显。

缺血性脑卒中为医学上研究热点,但目前尚无特效药物治疗[11]。基因层面直到蛋白层面均参与缺血性脑卒中病理生理过程,且大部分基因转录为非编码蛋白 RNA,其中 LncRNA 为长度超过200 nt 的 RNA 分子,在脑缺血后卒中发病机制、再灌注损



注:A、B:JAK1、STAT1 蛋白在海马中的表达;C、D:海马组织中 BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达。a:假手术组;b:模型组;c:si-NC 组;d:si-TUG1 组;e:si-TUG1+anti-miR-NC 组;f:si-TUG1+anti-miR-137 组。与假手术组比较,$^{\#}P<0.05$;与模型组比较,$^{*}P<0.05$;与 si-NC 组比较,$^{\&}P<0.05$;与 si-TUG1 组比较,$^{\dagger}P<0.05$;与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较,$^{\ddagger}P<0.05$。

图 6 海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达情况($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

Note. A/B, JAK1 and STAT1 protein expression in hippocampus. C/D, Protein expression of BCL2, BAX and caspase3 in hippocampus. a, Sham operation group. b, Model group. c, si-NC group. d, si-TUG1 group. e, si-TUG1+anti-miR-NC group. f, si-TUG1+anti-miR-137 group. Compared with sham operation group, $^{\#}P<0.05$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$. Compared with si-NC group, $^{\&}P<0.05$. Compared with si-TUG1 group, $^{\dagger}P<0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, $^{\ddagger}P<0.05$.

Figure 6 JAK1, STAT1, BCL2, BAX and caspase3 protein expression in hippocampus

伤等都具有重要作用,有望成为治疗卒中的新靶点和思路[12]。TUG1 作为首次在小鼠视网膜细胞中发现的 LncRNA,在缺血性脑卒中中高表达,可以损伤细胞[13];TUG1 可通过靶向 miR-221-3p/SPRED2 轴逆转 LPS 诱导的细胞凋亡和巨噬细胞炎症,在细胞凋亡和炎症反应中发挥作用[14];TUG1 过表达促进心肌细胞凋亡并预测心肌梗死的预后不良[15]。本研究发现,与假手术组相比,模型组海马区 TUG1 水平升高,神经元损伤现象明显,提示 TUG1 在缺血性脑卒中中表达升高,可能促进神经元损伤从而影响疾病。且 TUG1 与 miR-137 存在靶位点,本文干扰 TUG1,在干扰 TUG1 的基础上抗 miR-137,观察抗 miR-137 对 TUG1 的影响。

miRNA 属于非编码 RNA 中小非编码 RNA,长度为 18~25 nt,广泛存在于真核生物中,通过一系列过程转化为成熟 RNA,miRNA 具有高度保守性、时序性、组织特异性,具有作为生物标记物的潜在优势[16]。miR-137 在缺血性脑卒中表达下调,且 BCL2 等作为 miR-137 的靶基因,参与卒中后抑郁过程[17]。BCL2、BAX、caspase3 作为影响细胞凋亡的基因,其中 BCL2 作为抑制凋亡基因;BAX 具有促凋亡作用;caspase3 是细胞凋亡的关键执行因子,通过水解天冬氨酸残基 C 末端的肽键,激活下游 caspase 酶或分解细胞内相关底物蛋白,导致 BCL2 等抗凋亡蛋白酶解、凋亡蛋白 BAX 等细胞外基质和细胞骨架等的修复,促使细胞凋亡[18]。本研究发现,与假手术组相比,模型组海马区 miR-137 水平降低;与模型组相比,si-TUG1 组海马区 miR-137 水平升高、脑梗死体积降低、神经元形态有所缓解,提示缺血性脑卒中干扰 TUG1 后可以升高 miR-137 的表达,缓解神经元状态,实现对疾病的保护。进一步验证 JAK1/STAT1 通路的作用发现,模型组 JAK1/STAT1 通路蛋白处于激活状态,而 miR-137 通过调节 JAK1/STAT1 信号通路减轻大鼠局灶性脑缺血损伤[19];线粒体途径细胞凋亡受 JAK1/STAT1 信号通路的调控,活化的 STAT1 可以调节凋亡途径关键因子 BCL2、BAX 的表达[20]。激活后的 STAT1 抑制 BCL2 的表达、促进 BAX 的表达从而促进神经元凋亡。干扰 TUG1 后 JAK1、STAT1 蛋白表达水平降低,提示干扰 TUG1 后促进 miR-137 的表达从而抑

制 JAK1/STAT1 通路蛋白活化,使 JAK1/STAT1 通路蛋白对 BCL2、BAX 的作用降低,神经元凋亡得以缓解。在 si-TUG1 的基础上抑制 miR-137 表达可逆转 si-TUG1 的效果。

综上所述,干扰 TUG1 后可上调 miR-137,从而缓解局灶性脑缺血大鼠神经元形态及凋亡,缓解神经损伤。本研究首次验证 TUG1 与 miR-137 在神经元中的关系,但 LncRNA 与 miRNA 之间关系复杂,亦可能通过别的 miRNA 发挥作用,是本研究接下来研究重点。

参考文献:

[1] 程建华, 黄一睿, 肖美娟, 等. 急性缺血性脑卒中大鼠脑组织中 Th17/Treg 的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 758-763, 768.

[2] Fan AP, Khalil AA, Fiebach JB, et al. Elevated brain oxygen extraction fraction measured by MRI susceptibility relates to perfusion status in acute ischemic stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(3): 539-551.

[3] Zhang X, Zhu XL, Ji BY, et al. LncRNA-1810034E14Rik reduces microglia activation in experimental ischemic stroke [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 75.

[4] Cao C, Zhang Y, Zhang Z, et al. Small interfering lncrna-tug1 (situg1) decreases ketamine-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons [J]. Int J Neurosci, 2019, 129(10): 937-944.

[5] Velasco MX, Kosti A, Guardia GDA, et al. Antagonism between the RNA binding protein Musashi1 and miR-137 and its potential impact on neurogenesis and glioblastoma development [J]. RNA, 2019, 25(7): 768-782.

[6] Chen F, Zhang L, Wang E, et al. LncRNA GAS5 regulates ischemic stroke as a competing endogenous RNA for miR-137 to regulate the Notch1 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(1): 184-190.

[7] Duan X, Gan J, Peng DY, et al. Identification and functional analysis of microRNAs in rats following focal cerebral ischemia injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 4175-4184.

[8] Hyakkoku K, Umeda N, Shimada S, et al. Post-stroke pain caused by peripheral sensory hypersensitization after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2019, 1715: 35-40.

[9] Massard C, Soria JC, Krauss J, et al. First-in-human study to assess safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the anti-CD27L antibody-drug conjugate AMG 172 in patients with relapsed/refractory renal cell carcinoma [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 83(6): 1057-1063.

[10] Gungor L, Polat M, Ozberk MB, et al. Which ischemic stroke subtype is associated with hyperhomocysteinemia [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(7): 1921-1929.

[11] Jiang J, Wang Y, Liu B, et al. Challenges and research progress of the use of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke [J]. Brain Dev, 2018, 40(7): 612-626.

[12] 李子付, 洪波, 刘建民. 长链非编码脱氧核糖核酸在脑血管疾病中的研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志, 2015, 12(2): 105-108.

[13] Chen S, Wang M, Yang H, et al. LncRNA TUG1 sponges microRNA-9 to promote neurons apoptosis by up-regulated Bcl2l11 under ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(1): 167-173.

[14] Hu L, Ye H, Liao J. LncRNA TUG1 reverses LPS-induced cell apoptosis and inflammation of macrophage via targeting MiR-221-3p/SPRED2 axis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(12): 2458-2465.

[15] Li B, Wu Y. LncRNA TUG1 overexpression promotes apoptosis of cardiomyocytes and predicts poor prognosis of myocardial infarction [J]. J Clin Pharm Ther, 2020, 45(6): 1452-1456.

[16] Vychytilova-Faltejskova P, Svobodova Kovarikova A, Grolich T, et al. Microrna biogenesis pathway genes are deregulated in colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4460-4473.

[17] 鲁豫, 田小军, 史莉瑾, 等. MiR-137 在缺血性卒中后抑郁患者外周血中的表达及其临床意义 [J]. 临床神经病学杂志, 2017, 30(3): 217-220.

[18] Luo Y, Fu X, Ru R, et al. Cpg oligodeoxynucleotides induces apoptosis of human bladder cancer cells via Caspase-3-Bax/Bcl-2-p53 axis [J]. Arch Med Res, 2020, 51(3): 233-244.

[19] Zhang M, Ge DJ, Su Z, et al. miR-137 alleviates focal cerebral ischemic injury in rats by regulating JAK1/STAT1 signaling pathway [J]. Hu Exp Toxicol, 2020, 39(6): 816-827.

[20] Fan S, Sun JB, Li R, et al. Lycopene protects myocardial ischemia injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3096-3104.

〔收稿日期〕2020-12-17

楚瑞雪,孙先桃,王惠. 基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 46-52.
Chu RX, Sun XT, Wang H. Effects of naringenin on microglial activation in oxygen-induced retinopathy based on the miR-223/NLRP3 axis[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 46-52.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.02.007

基于 miR-223/NLRP3 轴研究柚皮素对氧诱导视网膜病变中小胶质细胞活化的影响

楚瑞雪*,孙先桃,王 惠

(郑州大学附属儿童医院,河南省儿童医院,郑州儿童医院眼科,郑州 450000)

【摘要】 目的 基于微小 RNA(miR)-223/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)轴探讨柚皮素(NAR)对氧诱导视网膜病变(OIR)中小胶质细胞活化的影响。**方法** 150 只 7 日龄(P7)C57BL/6J 幼鼠分为常氧组、OIR 组、NAR 组、NAR+阴性对照组、NAR+miR-223 拮抗剂组,每组 30 只。除常氧组外,其余各组幼鼠及其母鼠在 P7~P12 移至氧气体积分数(75±2)%封闭氧箱中,连续 5 d,P12 返回正常氧环境中;常氧组在正常氧环境中常规饲养。NAR 组幼鼠腹腔注射 100 mg/(kg·d) NAR,NAR+阴性对照组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂阴性对照,NAR+miR-223 拮抗剂组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂,常氧组、OIR 组每天腹腔注射等体积 CMC、P12 尾静脉注射等体积生理盐水。实时荧光定量 PCR(RT-qRCR)检测视网膜中 miR-223 水平;幼鼠眼底行荧光素眼底血管造影(FFA);苏木精-伊红(HE)染色观察视网膜形态;免疫荧光检测视网膜中小胶质细胞标志物钙离子结合蛋白-1(Iba-1)情况;Western blot 检测视网膜中 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、白细胞介素(IL)-1β 及 IL-18 蛋白表达情况。**结果** OIR 组出现血管破裂,荧光漏在视网膜中,视网膜泛白,血管出现收缩,视网膜厚度变厚、细胞排列松散,部分出现细胞缺失现象、血管新生现象;NAR 组、NAR+阴性对照组血管破裂现象缓解,视网膜泛白现象减轻,但视网膜细胞仍松散;NAR+miR-223 拮抗剂组血管破裂,荧光漏在视网膜中,视网膜泛白明显,视网膜细胞松散严重、细胞缺失明显。与常氧组相比,OIR 组视网膜中 miR-223 水平降低($P<0.05$),视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平升高($P<0.05$);与 OIR 组相比,NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 miR-223 水平升高($P<0.05$),视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比,NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 miR-223 水平降低($P<0.05$),视网膜中 Iba-1 水平、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平升高($P<0.05$)。**结论** NAR 能够升高miR-223 的表达进而抑制 NLRP3 炎症体的表达,从而缓解小胶质细胞过度活化现象,实现对 OIR 的缓解。

【关键词】 微小 RNA-223/核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 轴;柚皮素;氧诱导视网膜病变;小胶质细胞活化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022) 02-0046-07

Effects of naringenin on microglial activation in oxygen-induced retinopathy based on the miR-223/NLRP3 axis

CHU Ruixue*, SUN Xiantao, WANG Hui

(Department of Ophthalmology, Children's Hospital Affiliated of Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of naringenin (NAR) on microglial activation in oxygen-induced retinopathy (OIR) based on the microRNA (miR)-223/nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3

[基金项目]河南省科技攻关项目(LHGJ20190953)。

[作者简介]楚瑞雪(1985—),女,硕士,主治医师,研究方向:小儿眼科。E-mail:rxchu0371@163.com

(NLRP3) axis. **Methods** Seven-day-old (P7) C57BL/6J mice (n = 150) were divided into normoxia, OIR, NAR, NAR + negative RNA control and NAR + miR-223 antagomir groups with 30 mice per group. Except for mice in the normoxic group, the young mice and their mothers were moved to a closed oxygen box with an oxygen volume fraction of (75 ± 2)% for 5 consecutive days from P7~P12 and subsequently returned to a normoxic environment; the normoxic group was raised in a normoxic environment. The 12-day-old mice in the NAR groups were injected intraperitoneally with 100 mg/(kg·d) NAR. The mice in the NAR + negative RNA control group were also injected with 2.5 mg/kg miR-223 negative control RNA via the tail vein, and mice in the NAR + miR-223 antagomir group were injected with 2.5 mg/kg miR-223 antagomir via the tail vein. Mice in the normoxic and OIR groups were intraperitoneally injected with an equal volume of carboxymethyl cellulose and tail vein-injected with an equal volume of normal saline each day. For evaluation of retinas in the young mice, real time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the level of miR-223; fundus fluorescein angiography was performed; hematoxylin eosin staining was used to observe morphology; immunofluorescence was used to detect the expression of the microglia marker calcium binding protein-1 (Iba-1); and Western blot were used to detect the expression NLRP3, cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1), interleukin (IL)-1β and IL-18. **Results** In the OIR group, blood vessels were ruptured, fluorescence leaked in the retina, the retinas were white, blood vessels were contracted, the retinas were thickened, cell arrangement was loose, and some cells were missing and angiogenesis occurred. In the NAR and NAR + negative RNA control groups, vascular rupture and retinal whitening were alleviated, but retinal cells were still loosely arranged. In the NAR + miR-223 antagomir group, vessels were ruptured, fluorescence leaked in the retina, retinal whitening was obvious, and retinal cells were severely loosened and missing. Compared with that in the normoxic group, miR-223 levels in retinas of the OIR mice decreased (P<0.05), and the retinal levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1β, IL-18 increased (P<0.05). Compared with that in the OIR group, miR-223 levels in the retinas from the NAR and NAR + negative RNA control groups increased (P<0.05), and retinal levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 decreased (P<0.05). Compared with that in the NAR and NAR + negative control groups, retinal levels of miR-223 in the NAR + miR-223 antagomir group decreased (P<0.05), and the levels of Iba-1, NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 increased (P<0.05). **Conclusions** NAR increased the expression of miR-223 and inhibited components of the NLRP3 inflammasome, thus alleviating the over-activation of microglia and reducing OIR.

【**Keywords**】 microRNA-223/nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 axis; naringenin; oxygen-induced retinopathy; microglial activation

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是发生在早产儿、低出生质量儿的视网膜血管异常增生疾病,现已成为儿童致盲和视力损伤的主要原因[1]。目前治疗 ROP 的主要方法包括抗血管内皮生长因子、激光术、冷凝术等,但治疗后部分患儿仍出现视觉异常甚至失明现象[2],因此,探求更有效的治疗方法是临床上 ROP 治疗关键。随着研究深入,发现小胶质细胞异常活化可以影响视网膜新生血管的形成,且炎症能够激活小胶质细胞异常活化[3-4],推测炎症可能是 ROP 形成的原因之一。柚皮素(naringenin, NAR)作为抗炎、抗氧化的黄酮类化合物,能够通过抑制小胶质细胞的活化从而缓解小鼠记忆功能[5],但其在 ROP 中的作用机制尚未发现研究。微小 RNA(microRNA, miR)-223 在单核/巨噬细胞和胚胎干细胞分化、破骨细胞形成等方面发挥重要作用,研究发现,上调 miR-223 后可以抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3)炎症体表达,进而可以改善脂多糖诱导的小胶质细胞的过度活化现象[6],推测 NAR 亦可能通过 miR-223/NLRP3 轴发挥作用。因此,本文建立氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy, OIR)模型,通过体内实验观察 NAR 对 OIR 的影响,并初步探讨其作用机制,为临床上 ROP 的治疗提供参考依据。

1　材料和方法

1.1　实验动物

30 只健康成年 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(雌性:雄性=2∶1),8 周龄,体重(23±2)g,均购自中国医学科学院医学生物学研究所[SCXK(滇)K2019-0002]。小鼠均在郑州大学(药物研究院)动物实验室饲养[SYXK(豫)2018-0004],饲养条件:单个分笼饲养,均在温度(25.0±0.5)℃、湿度(45±5)%、12 h 光照 12 h 黑暗条件下自由饮食摄水,并保持饲养环境透气、干净。20 只雌性小鼠和 10 只雄性小鼠

适应性饲养 1 周后,按雌雄 2∶1 合笼交配,雌性小鼠怀孕后取出单独饲养,并足日龄产下幼鼠,其中 150 只幼鼠母乳喂养至 7 日龄(postnatal 7,P7),进行随机分组,开始后续实验。实验动物符合 3R 原则,经本院动物伦理审查委员会审查(IACUC:2020090123),符合动物伦理。

1.2 主要试剂与仪器

羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose,CMC)(伊士曼,执行标准:GB/T5005-2001);NAR(美国 Sigma 公司,批号:192025,纯度≥95%);miR-223 拮抗剂阴性对照、miR-223 拮抗剂均购自广州锐博生物科技公司;miRNA 提取分离试剂盒、miRNA 反转录试剂盒(TIANGEN,批号分别为:20201006、20201205);荧光素钠注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号:20190206);一抗小胶质细胞标志物钙离子结合蛋白-1(ionized calcium binding adapter-1,Iba-1)、NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteinyl aspartate specific proteinase-1,Caspase-1)、白细胞介素(interleukin,IL)-1β、IL-18,Alexa Fluor® 488 标记的荧光二抗(英国 abcam 公司,批号分别为:12-NOV-2019、05-DEC-2020、26-JAN-2020、08-Nov-2019、02-NOV-2020、09-FEB-2020)。眼底荧光造影仪(上海伊沐医疗器械有限公司,型号:SK-650B);实时荧光定量 PCR(real time quantitative PCR,RT-qPCR)仪(美国 ABI 公司,型号:StepOnePlus);蛋白凝胶成像仪(赛默飞世尔,型号:iBright CL750)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物建模与分组

实验前所有幼鼠均用眼科裂隙灯观察眼部,均未发现异常。150 只幼鼠按照随机数字表法分为常氧组、OIR 组、NAR 组、NAR+阴性对照组、NAR+miR-223 拮抗剂组,每组 30 只。除常氧组外,其余各组参考文献[7],幼鼠及其母鼠在 P7~P12 移至封闭氧箱中,氧气体积分数(75±2)%,连续 5 d,P12 返回正常氧环境中。常氧组在正常氧环境中常规饲养。

250 mg CMC 溶于 ddH_2O 中,定容至 100 mL 过夜。1.0 g NAR 溶于含 CMC 的溶剂中,定容 100 mL,配置成 10 mg/mL 溶液备用。NAR 组幼鼠腹腔注射 100 mg/(kg·d) NAR,NAR+阴性对照组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂阴性对照,NAR+miR-223 拮抗剂组在 NAR 基础上 P12 尾静脉注射 2.5 mg/kg miR-223 拮抗剂,常氧组、OIR 组每天腹腔注射等体积 CMC、P12 尾静脉注射等体积生理盐水。P17 检测幼鼠各项指标。

1.3.2 RT-qRCR 检测视网膜中 miR-223 水平

每组随机取 10 只,小心取下视网膜,置于-80℃冰箱保存备用;miRNA 提取试剂盒提取 miRNA,非变性凝胶电泳检测提取质量,miRNA 反转录试剂盒将 miRNA 反转录成 cDNA。miR-223 上游引物:5'-GGTGGTGAATACCCTCCTG-3',下游引物:5'-GTCTGTCCGTGGTGCTGA-3';U6 上游引物:5'-AAGACGGGCGGAGAGAAACC-3',下游引物:5'-CGTTGACTCCGACCTTCACC-3'。RT-qPCR 仪检测 miR-223 水平。20 μL 反应体系:50 ng/μL cDNA 1 μL,10 μmol/L 上游引物/下游引物 0.5 μL/0.5 μL,2×Hi SYBR Green QPCR Mix 10 μL,ddH_2O 8.0 μL。反应条件:95℃、5 min;94℃、50 s,59℃、30 s,40 个循环,72℃、10 min。$2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 miR-223 水平。

1.3.3 荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography,FFA)检查

每组随机取 10 只,幼鼠散瞳、2 mL/kg 10%荧光素钠注射液腹腔注射,待荧光素钠循环至眼底时,眼底荧光造影仪以视盘和激光光凝为中心对幼鼠行 FFA 检查。

1.3.4 HE 染色观察视网膜形态

每组取剩余 10 只,处死后取眼球,置于 4%多聚甲醛中固定。左眼球石蜡包埋后平行眼轴方向连续切片(切片厚度 5 μm),切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木精染色、1%盐酸乙醇分色后,伊红染色,再经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,封片观察。

1.3.5 免疫荧光检测视网膜中 Iba-1 表达情况

4%多聚甲醛中固定的右眼球在 4℃经 20%和 30%蔗糖溶液脱水,冰冻切片机平行眼轴方向连续切片(切片厚度 6 μm),切片经 0.3% Trition 处理 30 min,加入山羊血清 37℃封闭 1 h,随后加入一抗 Iba-1(1∶1000),第 2 天洗去一抗滴加荧光二抗(1∶500)室温孵育 1 h,统计单位面积 Iba-1 阳性细胞数。

1.3.6 Western blot 检测视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白表达情况

-80℃中取出视网膜,加 100 μL 组织匀浆液匀浆,10000 r/min 4℃离心 20 min,上清(即为总蛋白)置于新的离心管中,每孔上样 20 μg,凝胶电泳分离

蛋白,PVDF 膜转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,PBST 清洗后分别添加一抗 NLRP3(1 ∶ 1000)、Caspase-1(1 ∶ 1000)、IL-1β(1 ∶ 500)、IL-18(1 ∶ 500),4℃孵育过夜;PBST 清洗后加入对应二抗,室温孵育 1 h。DAB 显色试剂盒避光显色,蛋白凝胶成像仪拍照和定量分析。

1.4　统计学方法

统计学软件 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析,计量数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 *SNK-q* 法。$P<0.05$,差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NAR 对视网膜中 miR-223 水平的影响

与常氧组相比,OIR 组视网膜中 miR-223 水平降低($P<0.05$);与 OIR 组相比,NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 miR-223 水平升高($P<0.05$);分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比,NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 miR-223 水平降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2　NAR 对 FFA 的影响

常氧组荧光分布均匀;OIR 组出现血管破裂(黑色箭头),荧光漏在视网膜中,视网膜泛白,血管出现收缩;NAR 组、NAR+阴性对照组血管破裂现象缓解,视网膜泛白现象减轻;NAR+miR-223 拮抗剂组血管破裂,荧光漏在视网膜中,视网膜泛白明显。见图 1。

2.3　NAR 对视网膜形态的影响

常氧组各层次细胞排列整齐且紧密;OIR 组视网膜厚度变厚、细胞排列松散,部分出现细胞缺失现象、血管新生现象(黑色箭头);NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜变厚、细胞松散现象存在,未见新生血管;NAR+miR-223 拮抗剂组细胞松散严重、细胞缺失明显。见图 2。

2.4　NAR 对视网膜中 Iba-1 表达的影响

与常氧组相比,OIR 组视网膜中 Iba-1 水平升高($P<0.05$);与 OIR 组相比,NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 Iba-1 水平降低($P<0.05$);分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比,NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 Iba-1 水平升高($P<0.05$)。见图 3、表 1。

2.5　NAR 对视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达的影响

与常氧组相比,OIR 组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平升高($P<0.05$);与 OIR 组相比,NAR 组、NAR+阴性对照组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 NAR 组、NAR+阴性对照组相比,NAR+miR-223 拮抗剂组视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 4、表 2。

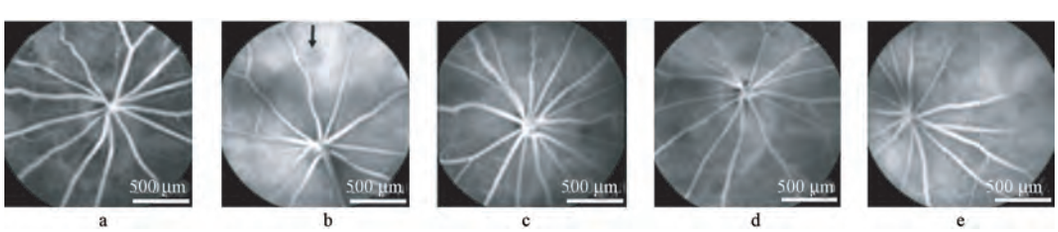
表 1　5 组视网膜中 miR-223 水平及 Iba-1 表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1　Comparison of miR-223 levels and Iba-1 in the retinas of the 5 groups

组别 Groups	miR-223	Iba-1(cells/mm^2)
常氧组 Normal oxygen group	1.01±0.12	15.35±2.71
OIR 组 OIR group	0.38±0.05$^{\#}$	83.43±11.75$^{\#}$
NAR 组 NAR group	0.74±0.07*	28.56±3.16*
NAR+阴性对照组 NAR+negative control group	0.75±0.06*	30.15±4.48*
NAR+miR-223 拮抗剂组 NAR+miR-223 antagomir group	0.26±0.03$^{\triangle\blacktriangle}$	76.18±8.15$^{\triangle\blacktriangle}$

注:与常氧组相比,$^{\#}P<0.05$;与 OIR 组相比,$^{*}P<0.05$;与 NAR 组相比,$^{\triangle}P<0.05$;与 NAR+阴性对照组相比,$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with normal oxygen group, $^{\#}P<0.05$. Compared with OIR group, $^{*}P<0.05$. Compared with NAR group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with NAR+negative control group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

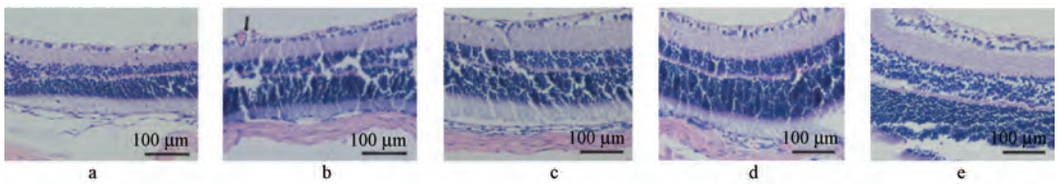


注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。黑色箭头表示血管破裂。

图 1　5 组幼鼠 FFA 情况

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagomir group. Black arrow indicates vessel rupture.

Figure 1　FFA situation of the young mice of 5 groups

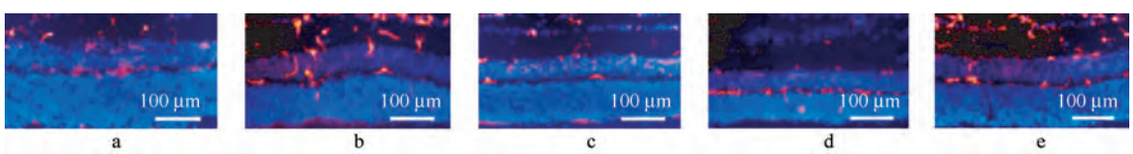


注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 2 5 组幼鼠视网膜形态情况(HE 染色)

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR + negative control group. e, NAR + miR-223 antagomir group.

Figure 2 Morphology of retina in the young mice of 5 groups(HE staining)

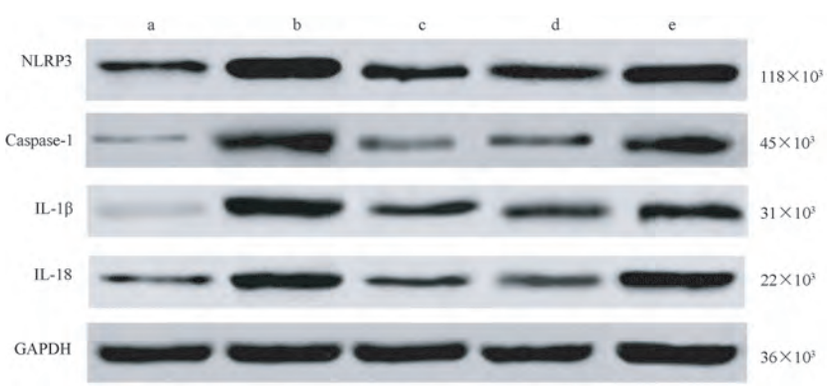


注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 3 5 组幼鼠视网膜中 Iba-1 表达情况(免疫荧光)

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagomir group.

Figure 3 Iba-1 expression in the retina of the young mice of 5 groups(immunofluorescence)



注:a:常氧组;b:OIR 组;c:NAR 组;d:NAR+阴性对照组;e:NAR+miR-223 拮抗剂组。

图 4 5 组幼鼠视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达情况

Note. a, Normal oxygen group. b, OIR group. c, NAR group. d, NAR+negative control group. e, NAR+miR-223 antagomir group.

Figure 4 NLRP3, Caspase-1, IL-1β, IL-18 protein expression in the retina of young mice in the 5 groups

表 2 5 组幼鼠视网膜中 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Comparison of NLRP3, Caspase-1, IL-1β and IL-18 protein expression in the retina of young mice in the 5 groups

组别 Groups	NLRP3	Caspase-1	IL-1β	IL-18
常氧组 Normal oxygen group	0.56±0.08	0.09±0.01	0.05±0.01	0.21±0.03
OIR 组 OIR group	1.13±0.12$^{\#}$	1.56±0.17$^{\#}$	1.73±0.18$^{\#}$	1.03±0.11$^{\#}$
NAR 组 NAR group	0.69±0.08*	0.24±0.03*	0.45±0.05*	0.31±0.03*
NAR+阴性对照组 NAR+ negative control group	0.70±0.06*	0.26±0.04*	0.46±0.06*	0.32±0.04*
NAR+miR-223 拮抗剂组 NAR+miR-223 antagomir group	1.02±0.05$^{\triangle\blacktriangle}$	1.05±0.10$^{\triangle\blacktriangle}$	0.81±0.09$^{\triangle\blacktriangle}$	0.93±0.08$^{\triangle\blacktriangle}$

注:与常氧组相比,$^{\#}P<0.05$;与 OIR 组相比,$^{*}P<0.05$;与 NAR 组相比,$^{\triangle}P<0.05$;与 NAR+阴性对照组相比,$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with normal oxygen group, $^{\#}P<0.05$. Compared with OIR group, $^{*}P<0.05$. Compared with NAR group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with NAR+ negative control group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

3　讨论

ROP 又称晶状体后纤维增生症，是视网膜正常血管化停滞，新生血管异常增生，严重情况下会牵拉视网膜脱落，损害视力，甚至失明，即使患儿未失明，视网膜光感受器细胞发育异常，患儿出现斜视、弱视、屈光不正等的几率也极高[8]。随着研究深入，发现感染在 ROP 发生、发展中起一定作用，骨髓造血干细胞来源的巨噬细胞迁移至视网膜中并分化成小胶质细胞。小胶质细胞能够参与免疫系统的免疫监视，损伤情况下小胶质细胞激活，在初期可以作为抗原呈递细胞，吞噬坏死的视网膜神经节细胞碎片，但小胶质细胞过度激活还可分泌一系列炎症因子，发挥炎症作用[9-10]。且在 ROP 中小胶质细胞过度活化传递缺氧信号，促进视网膜血管新生[11]。本研究以小鼠出生 7 d 幼鼠为研究对象，OIR 处理模拟 ROP 症状，研究发现，OIR 中 FFA 可见血管破裂严重，荧光漏在视网膜中，视网膜泛白，血管出现收缩现象；HE 染色可见视网膜出现血管新生现象、细胞排列紊乱，提示 OIR 在一定程度上可以模拟 ROP 现象。研究发现，小胶质细胞主要集中在神经纤维层、内核层和外丛状层，本研究对小胶质细胞标志物 Iba-1 免疫荧光染色发现，在常氧组中仅有少量活化的小胶质细胞，可能用于对正常代谢的视网膜碎片进行清理，但在 OIR 组中视网膜相同部位出现大量活化的小胶质细胞，可能影响血管破裂、增生。中医作为传统医学，中草药的治疗对于疾病意义重大，其中 NAR 作为中药中重要成分，广泛存在于植物和中药中，研究发现，其在糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤、细胞凋亡等过程中发挥重要作用[12]。在本研究中，NAR 可以减轻血管新生现象，降低小胶质细胞活化现象，从而缓解 OIR，但其具体机制尚需进一步研究。

miRNA 存在于哺乳动物体内，通过转录后基因表达从而参与调控表观遗传[13]，miR-223 一直认为是与造血、免疫相关的特异性 miRNA，miR-223 存在于血管内皮细胞中，在血管新生中处于下调状态，能够拮抗血管新生[14]；作为髓系细胞中表达 miRNA，能够调控免疫细胞发育和维持免疫细胞稳态[15]，能够通过调控多种炎症相关因子表达从而调控单核细胞的分化和巨噬细胞极化[16]。NLRP3 作为 miR-223 的靶基因之一[17]，是中枢神经系统炎症小体，可触发炎症反应过程，在 OIR 视网膜中处于高表达状态[18]。NLRP3 可以与效应分子结合形成成熟的炎症小体和成熟的 Caspase-1，Caspase-1 作为 IL-1β、IL-18 特异有效的蛋白酶，激活后的 Caspase-1 能够促进炎症因子 IL-1β、IL-18 的表达，IL-1β、IL-18 进一步发挥致炎促损伤作用[19-20]。本研究发现，在 OIR 视网膜中 miR-223 处于低表达状态，NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平均升高，提示在 OIR 中 miR-223 表达降低，从而升高 NLRP3 的表达，发挥作用。NAR 组较 OIR 组视网膜中 miR-223 水平升高、NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平降低，而在 NAR 组的基础上添加 miR-223 拮抗剂后可以逆转上述过程，提示 NAR 能够升高 miR-223 水平、降低 NLRP3、Caspase-1、IL-1β、IL-18 蛋白水平，实现对小胶质细胞活化的缓解，进而抑制血管新生。

综上所述，NAR 能够上调 miR-223 的表达进而抑制 NLRP3 炎症小体的表达，缓解视网膜炎症作用，进而缓解小胶质细胞过度激活，实现对 OIR 的保护。但 miR-223 下游靶基因众多，亦可能通过别的基因发挥作用，且小胶质细胞过度激活机制复杂，需进一步研究发现其机制。

参考文献：

[1] Mirjalili A, Manaviat MR, Noori-Shadkam M. Evaluation of the oral propranolol effect on retinopathy of prematurity: randomized clinical trial [J]. J Pediatr, 2020, 163(6): 1570-1577.

[2] Arima M, Fujii Y, Sonoda KH. Translational research in retinopathy of prematurity: from bedside to bench and back again [J]. J Clin Med, 2021, 10(2): 331.

[3] Ma W, Silverman SA, Zhao L, et al. Absence of TGFβ signaling in retinal microglia induces retinal degeneration and exacerbates choroidal neovascularization [J]. Elife, 2019, 8: e42049.

[4] Liu Y, Dai Y, Li Q, et al. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia [J]. Neurosci Let, 2020, 736: 135279.

[5] 张德松，徐胜春. 柚皮素对 APP/PS1 转基因小鼠淀粉样斑块沉积和胶质细胞活化的抑制作用 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(1): 20-24.

[6] Tatan B. Dimethyl fumarate ameliorates NLRP3 inflammasome activation induced by LPS and ATP in murine microglia [J]. Inflammasomes, 2019, 351(17): 457-463.

[7] Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(3): 576-585.

[8] Li JO, Liu H, Ting DSJ, et al. Digital technology, tele-medicine and artificial intelligence in ophthalmology: A global perspective [J]. Prog Retin Eye Res, 2021, 82: 100900.

[9] Moseman EA, Blanchard AC, Nayak D, et al. T cell engagement of cross-presenting microglia protects the brain from a nasal virus infection [J]. Sci Immunol, 2020, 5(48): eabb1817.

[10] Liu R, Xu NG, Yi W, et al. Electroacupuncture attenuates inflammation after ischemic stroke by inhibiting NF-κB-mediated activation of microglia [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8163052.

[11] Goebel U, Scheid S, Spassov S, et al. Argon reduces microglial activation and inflammatory cytokine expression in retinal ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(1): 192-198.

[12] 徐辉勇, 陈金鹏, 章剑. 柚皮素对糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤, 细胞凋亡及 Nrf2-ARE 的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 128-132.

[13] Qin L, Zhong M, Adah D, et al. A novel tumour suppressor lncRNA F630028O10Rik inhibits lung cancer angiogenesis by regulating miR-223-3p [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(6): 3549-3559.

[14] Shao J, Fan G, Yin X, et al. A novel transthyretin/STAT4/miR-223-3p/FBXW7 signaling pathway affects neovascularization in diabetic retinopathy [J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 498: 110541.

[15] Roffel MP, Bracke KR, Heijink IH, et al. miR-223: a key regulator in the innate immune response in asthma and COPD [J]. Front Med, 2020, 7: 196-213.

[16] Qu H, Liu R, Chen J, et al. Aerobic exercise inhibits CUMS-Depressed mice hippocampal inflammatory response via activating hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF-κB pathway [J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(8): 2676.

[17] Long FQ, Kou CX, Li K, et al. MiR-223-3p inhibits rTp17-induced inflammasome activation and pyroptosis by targeting NLRP3 [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24): 14405-14414.

[18] Sui A, Chen X, Shen J, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 ameliorates retinal neovascularization and leakage by reversing the IL-1β/IL-18 activation pattern in an oxygen-induced ischemic retinopathy mouse model [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 901.

[19] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP 3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.

[20] Zuo W, Tian R, Chen Q, et al. miR-330-5p inhibits NLRP3 inflammasome-mediated myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting TIM3 [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2020, 35(4): 691-705.

〔收稿日期〕2021-03-23

杨奇涛,吴殷囡,汪玉馨,等. 骨肽类注射剂类过敏反应评价研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 53-59.
Yang QT, Wu YN, Wang YX, et al. Evaluation of anaphylactoid reactions induced by osteopeptide injections [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 53-59.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 008

骨肽类注射剂类过敏反应评价研究

杨奇涛[1,2],吴殷囡[2,3],汪玉馨[2*],孟长虹[2],宗卫峰[2],陆益红[2],史清水[1,2*]

(1.中国药科大学,南京 211198;2.江苏省食品药品监督检验研究院,南京 210019;
3.徐州医科大学药物分析教研室,江苏 徐州 221004)

【摘要】 目的 采用小鼠耳廓蓝染实验对骨肽类注射剂类过敏反应进行评价,探究不同剂量的骨肽类注射剂引起类过敏反应的情况。**方法** 分别以磷酸组胺、组胺盐酸盐、组胺作为阳性药,筛选适宜的阳性模型;对不同剂量下的骨肽类注射剂进行小鼠耳廓蓝染实验,以蓝染率及伊文思蓝(evans blue,EB)升高率作为类过敏评价指标。**结果** 以磷酸组胺作为阳性药建立的阳性模型,具有明显的类过敏反应。部分骨肽类注射剂在高、中剂量下呈不同程度的阳性反应,低剂量下均呈阴性反应。**结论** 通过小鼠耳廓蓝染实验得到的检测结果,直观评价了不同剂量下骨肽类注射剂的类过敏反应,对其他复杂基质药物类过敏反应的评估和研究具有借鉴意义。

【关键词】 类过敏反应;小鼠耳廓蓝染实验;磷酸组胺;骨肽类注射剂;安全性评价
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0053-07

Evaluation of anaphylactoid reactions induced by osteopeptide injections

YANG Qitao[1,2], WU Yinnan[2,3], WANG Yuxin[2*], MENG Changhong[2], ZONG Weifeng[2], LU Yihong[2], SHI Qingshui[1,2*]
(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China. 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019.
3. Department of Pharmaceutical Analysis, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

【Abstract】 Objective The mouse ear blue staining test was used to evaluate anaphylactoid reactions to different injected doses of osteopeptide. **Methods** The positive model was selected by using histamine phosphate, histamine hydrochloride and histamine as the positive drugs. Mouse ear blue staining tests were performed by injecting different doses of osteopeptide. The rate of blue staining and the rising rate of evans blue were used as the indices for evaluating the anaphylactoid reactions. **Results** The positive model established by histamine phosphate as the positive drug exhibited obvious anaphylactoid reactions. The osteopeptide injections showed positive reactions to various degrees at high and medium doses and negative reactions at low doses. **Conclusions** Based on the result of the mouse ear staining test, the anaphylactoid reactions to osteopeptide injections at different doses were intuitively evaluated. These data may be used as a reference for the evaluation of anaphylactoid reactions of other complex matrix preparations.

【Keywords】 anaphylactoid reaction; mouse ear blue staining test; histamine phosphate; osteopeptide injections; safety evaluation

类过敏反应的临床表现有皮疹、瘙痒、荨麻疹、寒战、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、胸闷、呼吸困难、血压下降以及过敏性休克等,与 I 型过敏反应相似,容易混淆,其发生于首次给药后 30 min 内,无需 IgE 介

[**基金项目**]江苏省实验动物协会科研课题(DWXH201902);江苏省药品监督管理局科研计划课题(202119)。
[**作者简介**]杨奇涛(1995—),男,硕士研究生,研究方向:药理毒理研究。E-mail:qitaoyang@163.com
[**通信作者**]汪玉馨(1984—),女,副主任药师,研究方向:药理毒理研究。E-mail:wyx_carrie@163.com
史清水(1964—),男,主任药师,研究方向:药理与药品检验研究。E-mail:qsshi@126.com * 共同通信作者

导[1-2]。骨肽类制剂为多组分生化药,以猪或牛的四肢骨提取物制成,或与全蝎提取物混合制成复方骨肽制剂,成分包括活性肽、肽类活性因子、有机钙、磷、无机钙、无机盐、微量元素、氨基酸等[3-4]。临床该制剂主要通过静脉注射或肌肉注射给药,用于骨折、骨关节炎、风湿、类风湿关节炎等疾病的治疗[5-6]。国家药品不良反应监测中心在《药品不良反应信息通报》中对骨肽和复方骨肽注射剂的安全问题进行了通报[7]。近年来,对骨肽类注射剂不良反应病例分析发现,其不良反应的临床表现有过敏性休克、皮疹、瘙痒、胸闷、心慌、呼吸困难、寒战、发热、等过敏性反应,还包括消化系统、血液系统的损害[8]。骨肽类注射剂的不良反应中,给药 30 min 内发生的不良反应占比较多(40%以上)[9]。由于前期本课题组采用全身主动过敏实验法对骨肽类注射剂的过敏反应进行评估,结果均为阴性,故在本研究进一步采用类过敏相关模型考察骨肽类注射剂与类过敏反应的相关性,对骨肽类制剂的临床安全用药及其不良反应的阐述和发生机制研究具有重要意义。

类过敏反应机制在体内较为复杂,可能与补体系统或膜表面受体介导肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒释放活性物质,导致毛细血管通透性增加有关[10]。在此基础上,细胞脱颗粒实验、大鼠蓝斑皮肤实验、小鼠耳廓蓝染实验等方法在类过敏反应研究中有相关报道[11-13]。其中小鼠耳廓蓝染实验由类过敏物质与伊文思蓝(evans blue,EB)混合经静脉注射入体内后,EB 迅速与血浆蛋白结合,在类过敏相关物质影响下,体内毛细血管通透性增加,导致 EB 随血浆蛋白渗出血管,表现为小鼠耳廓蓝染[14],该检测法操作简便,但在阳性药物选择与剂量、实验方法及评价指标未有明确的标准,因此,本课题通过阳性药筛选,建立了适宜的阳性模型,并将其用于骨肽类注射剂的类过敏反应评价研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 246 只,体重 20~22 g,5~6 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。动物饲养于江苏省食品药品监督检验研究院屏障系统内[SYXK(苏)2019-0047],本研究经江苏省食品药品监督检验研究院实验动物福利伦理审查委员会审批(JSIFDC2020-04),实验动物按 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

骨肽注射液(企业 A、B、C)、复方骨肽注射液(企业 A、D)、骨肽氯化钠注射液(企业 E)、注射用骨肽(企业 E、F)、注射用骨瓜提取物(企业 G、H)、骨瓜提取物注射液(企业 I、H);磷酸组胺(中国食品药品监督检验研究院,批号:150510-201313);组胺(北京百灵威科技有限公司,批号:LK90T46);组胺二盐酸盐(德国 LGC 公司,批号:G165368);0.9%氯化钠溶液(中国大冢制药有限公司、批号:8J95D4);伊文思蓝(上海 Sigma-Aldrich 公司,批号:MKCF0851);甲酰胺(上海 Sigma-Aldrich 公司,批号:94024020)。

XP6 型/XS205DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);Synergy H1 多功能酶标仪(美国博腾 Bio Tek 公司);XiangYi L-550 低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及给药

(1)溶液配制

天平称取 EB 2 g,溶解于 100 mL 0.9%氯化钠溶液,超声 10~15 min,直至充分溶解,然后用 0.22 μm 滤膜过滤得到 2% EB 溶液,用于配制含 EB 的各组药液。

阴性对照组:含 0.16% EB 的 0.9%氯化钠溶液。

阳性对照组:高剂量组:(1)组胺:以 0.9%氯化钠溶液为溶剂,配制成浓度为 1 mg/mL(含 0.16% EB)的溶液;(2)磷酸组胺:以 0.9%氯化钠溶液为溶剂,按照分子量折算,配制含组胺 1 mg/mL(含 0.16% EB)的溶液;(3)组胺盐酸盐:以 0.9%氯化钠溶液为溶剂,按照分子量折算,配制成含组胺 1 mg/mL(含 0.16% EB)的溶液;低剂量组:(1)组胺:以 0.9%氯化钠溶液为溶剂,配制成浓度为 0.5 mg/mL(含 0.16% EB)的溶液;(2)磷酸组胺:以 0.9%氯化钠溶液为溶剂,按照分子量折算,配制为含组胺 0.5 mg/mL(含 0.16% EB)的溶液。

样品组:高剂量组:骨肽类注射剂按照其规格用 0.9%氯化钠溶液配制为 5 mg/mL(含 0.16% EB)的药液。中剂量组:骨肽类注射剂按照其规格用 0.9%氯化钠溶液配制为 2.5 mg/mL(含 0.16% EB)的药液。低剂量组:骨肽类注射剂按照其规格用 0.9%氯化钠溶液配制为 1 mg/mL(含 0.16% EB)的药液。骨肽氯化钠注射液的原液浓度为 1

mg/mL 故实验中设置了 1 mg/mL 与 0.5 mg/mL 两个剂量组。

(2)实验分组

小鼠按照体重随机分组,每组 6 只,每只小鼠尾静脉给予 0.5 mL 药液。阴性对照组给予 0.9% 氯化钠溶液(含 0.16% EB);阳性对照组,分别给予高剂量及低剂量的组胺(含 0.16% EB)、磷酸组胺(含 0.16% EB)、组胺盐酸盐(含 0.16% EB);样品组,分别给予相应的高、中、低剂量含 0.16% EB 的样品溶液。

1.3.2　实验指标选择

(1)小鼠耳廓蓝染率测定

给药 30 min 后处死小鼠。观察并记录各组出现耳廓蓝染色的动物数量,计算各组耳廓蓝染的发生率。

(2)小鼠耳廓 EB 渗出量测定

EB 标准曲线配制:将 10 mg EB 溶于 10 mL 甲酰胺中,配制得浓度为 1 mg/mL 的备用溶液。取 200 μL 备用溶液用 20 mL 甲酰胺稀释得到浓度为 10 μg/mL 的工作液。

观察并记录小鼠的耳廓蓝染情况后,处死并立即沿耳根部剪去双耳后,剪成小块,用 2 mL 甲酰胺浸没,室温浸泡 48 h,提取耳廓中渗出 EB 染料,各组双耳 EB 渗出量及升高率的测定:浸泡 48 h 后离心 15 min,转速为 3000 r/min。在 96 孔培养板中加入 200 μL 各组上清液,以等量甲酰胺作为空白对照,用酶标仪在 620 nm 下测定吸光度(A)值。根据标准曲线计算 EB 含量,将其换算 2 mL 甲酰胺中所含有 EB 染料的总渗出量,并计算 EB 升高率。EB 升高率=(给药组 EB 含量-阴性对照组 EB 含量)/阴性对照组 EB 含量×100%。

本实验中设定的类过敏反应判断标准如下:a:耳廓蓝染发生率≥30%;b:耳廓 EB 升高率≥50%。以上 2 项条件均符合时,类过敏反应判断为阳性。

1.4　统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 软件对所有实验数据进行统计分析采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示各组实验数据。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　阳性模型的建立

利用 3 种组胺标准品(磷酸组胺、组胺、组胺盐酸盐)建立阳性模型,结果见表 1。结果发现各组高低剂量阳性对照组蓝染发生率均为 100%,同时其 EB 渗出量相比阴性对照组都明显升高且升高率大于 50%,类过敏反应均判定为阳性(图 1)。考虑到实验过程中静脉注射高剂量组胺盐酸盐,30 min 内小鼠存在呼吸加快、轻微抽搐等情况,无法判定类过敏的产生是否由组胺盐酸盐引起,因此在低剂量考察时,未将其纳入考察对象。比较了低剂量组胺与磷酸组胺的类过敏结果发现,磷酸组胺的蓝染情况与 EB 升高率更为明显,且低剂量下的 EB 升高率与其高剂量组相差不大。综上,后期选择低剂量的磷酸组胺作为骨肽类注射剂类过敏考察的阳性对照模型药物。

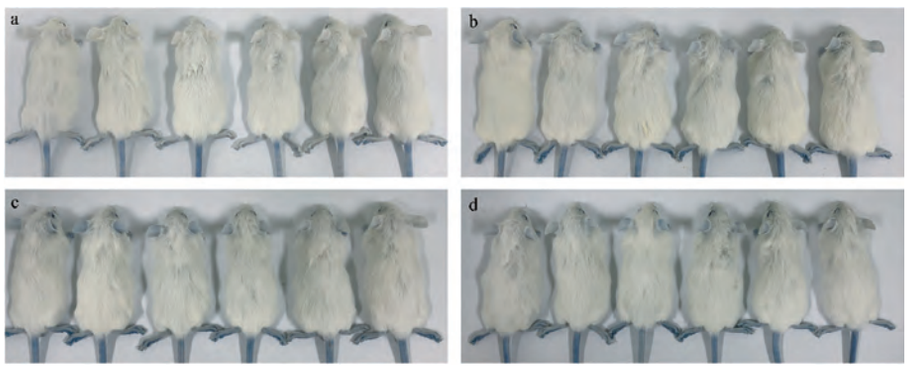
表 1　不同剂量的阳性对照的耳廓蓝染结果($n=6$)

Table 1　Ear blue staining results of different doses of positive control

组别 Groups	剂量 Dose	蓝染发生率(%) Incidence of blue staining	EB 升高率(%) Rising rate of EB	实验结果 Test results
阴性对照 Negative control	/	0	0	-
组胺 Histamine	高剂量组 High-dose group	100	270.83±30.92	+
	低剂量组 Low-dose group	100	272.78±107.93	+
磷酸组胺 Histamine phosphate	高剂量组 High-dose group	100	456.69±126.82	+
	低剂量组 Low-dose group	100	475.97±161.23	+
组胺盐酸盐 Histamine hydrochloride	高剂量组 High-dose group	100	475.28±130.21	+
	低剂量组 Low-dose group	/	/	/

注:"-":类过敏反应阴性;"+":类过敏反应阳性。

Note. "-", Negative anaphylactoid reaction. "+", Positive anaphylactoid reaction.

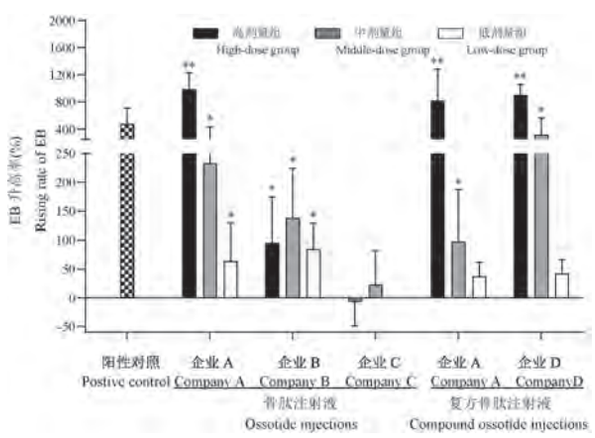


注:a:阴性对照组;b:组胺组;c:磷酸组胺组;d:组胺盐酸盐组。

图 1 阳性模型典型耳廓蓝染图(高剂量组)

Note. a, Negative control group. b, Histamine group. c, Histamine phosphate group. d, Histamine hydrochloride group.

Figure 1 Typical ear blue staining of positive model (High-dose group)



注:“ * ”:EB 升高率大于 50%且小于阳性对照组的 EB 升高率;“ ** ”:EB 升高率大于阳性对照组的 EB 升高率。

图 2 不同企业的骨肽类注射液耳廓蓝染实验 EB 升高率

Note. “ * ”, Rising rate of EB is more than 50% and less than that of the positive control group. “ ** ”, Rising rate of EB is more than that of the positive control group.

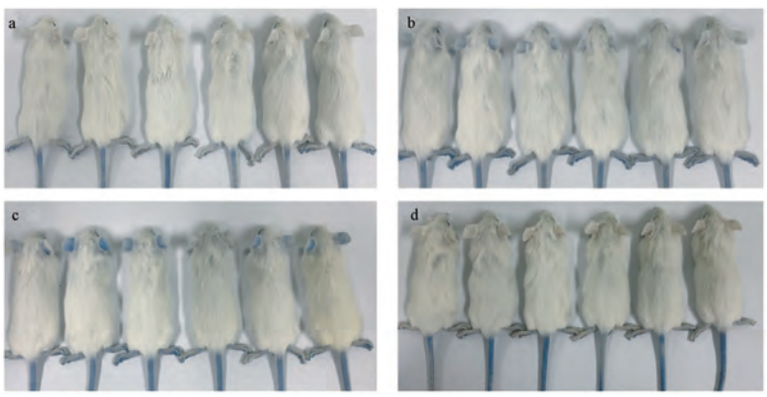
Figure 2 Rising rate of EB in ear blue staining experiment of osteopeptide injections from different companies

2.2 骨肽类注射液类过敏反应的考察

根据骨肽注射液及复方骨肽注射液的临床用药浓度,设置高剂量组药液浓度为 5 mg/mL;中剂量组药液浓度为 2.5 mg/mL;低剂量组药液浓度为 1 mg/mL。综合比较了骨肽类注射液在小鼠耳廓蓝染实验中观察记录的耳廓蓝染发生率及计算所得的 EB 升高率(见表 2)。高剂量(5 mg/mL)下,不同企业间骨肽类注射液引起的类过敏反应具有一定差异,企业 B 骨肽注射液的 EB 升高率大于 50%,企业 A 骨肽注射液和复方骨肽注射液、企业 D 复方骨肽注射液的 EB 升高率大于 50%且大于阳性对照组,以上各组蓝染发生率均大于 30%,故类过敏反应均呈阳性;企业 C 骨肽注射液 EB 升高率低于 50%且无蓝染发生,类过敏反应呈阴性。中剂量(2.5 mg/mL)下,企业 A 骨肽注射液和复方骨肽注射液、企业 B 骨肽注射液、企业 D 复方骨肽注射液的 EB 升高率相均大于 50%,同时蓝染发生率也大于 30%,上述企业的制剂类过敏反应仍呈阳性;其余骨肽类注射液结果判定为阴性。在低剂量(1 mg/mL)下,上述部分制剂小鼠蓝染实验结果虽然 EB 升高率大于 50%,蓝染发生率均低于 30%,各组结果判定均呈阴性。(见图 2、图 3)。

2.3 其他骨肽类注射剂类过敏反应的考察

骨肽注射液与复方骨肽注射液是临床上使用较多的骨肽类注射剂,除此之外还有多种其他的骨肽类注射剂,因此我们还利用小鼠耳廓蓝染模型考察了骨肽氯化钠注射液、注射用骨肽、骨瓜提取物注射液及注射用骨瓜提取物的类过敏反应(见表 3)。高剂量下,除了企业 E 的骨肽氯化钠注射液与企业 I 的骨瓜提取物注射液,其余 5 个骨肽类注射剂 EB 升高率均大于 50%,且蓝染发生率大于 30%,其中企业 G、H 的注射用骨瓜提取物与企业 F 的注射用骨肽 EB 升高率明显高于阳性对照组,故类过敏反应呈阳性。中剂量下,企业 G、H 的注射用骨瓜提取物与企业 H 的骨瓜提取物注射液 EB 升高率均大于 50%,且蓝染发生率大于 30%,类过敏反应判断仍为阳性,其余四组判定结果为阴性。在低剂量下,上述部分制剂小 EB 升高率虽然大于 50%,但各组的蓝染发生率均低于 30%,因此结果判定均呈阴性。(见图 4、图 5)。



注：a：阴性对照组；b：阳性对照组（磷酸组胺）；c：骨肽注射液组（企业 A）；d：骨肽注射液组（企业 C）。

图 3　不同企业的骨肽注射液典型耳廓蓝染图（高剂量组）

Note. a, Negative control group. b, Positive control group (Histamine phosphate). c, Ossotide injection group (Company A). d, Ossotide injection group (Company C).

Figure 3　Typical ear blue staining pictures of osteopeptide injections from different companies (High-dose group)

表 2　不同企业的骨肽类注射液的耳廓蓝染结果（$n=6$）

Table 2　Results of ear blue staining experiments of osteopeptide injections from different companies

制剂名 Name of preparation	生产企业 Companies	耳廓蓝染实验结果 Test results of ear blue staining								
		高剂量组 High-dose group			中剂量组 Middle-dose group			低剂量组 Low-dose group		
		蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results	蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results	蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results
骨肽注射液 Ossotide injection	A	100.00	988.33±239.35	+	50.00	232.94±200.53	+	16.67	63.72±65.62	−
	B	50.00	95.50±79.07	+	16.67	138.04±86.22	+	16.67	84.97±43.63	−
	C	0.00	−7.86±41.70	−	33.33	23.01±58.51	−	/	/	/
复方骨肽注射液 Compound ossotide injection	A	100.00	820.07±465.37	+	33.33	97.67±89.43	+	0.00	37.17±24.16	−
	D	100.00	903.80±151.00	+	100.00	317.92±243.08	+	0.00	42.48±23.45	−

注：“−”：类过敏反应阴性；“+”：类过敏反应阳性。

Note. “−”, Negative anaphylactoid reaction. “+”, Positive anaphylactoid reaction.

表 3　不同企业的其他骨肽类注射剂的耳廓蓝染结果（$n=6$）

Table 3　Results of ear blue staining experiments of other osteopeptide injections from different companies

制剂名 Name of preparation	生产企业 Companies	耳廓蓝染实验结果 Test results of ear blue staining								
		高剂量组 High-dose group			中剂量组 Middle-dose group			低剂量组 Low-dose group		
		蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results	蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results	蓝染发生率（%） Incidence of blue staining	EB 升高率（%） Rising rate of EB	结果 Results
骨肽氯化钠注射液 Ossotide sodium chloride injection	企业 E	0.00	6.30±52.66	−	0.00	−3.14±36.41	−	/	/	/
注射用骨肽 Ossotide for injection	企业 E	50.00	69.28±76.28	+	33.33	23.21±42.65	−	/	/	/
	企业 F	100.00	637.08±283.68	+	0.00	8.15±42.25	−	/	/	/
注射用骨瓜提取物 Gugua extract for injection	企业 G	83.33	962.39±647.40	+	50.00	98.92±97.18	+	16.67	71.69±68.83	−
	企业 H	100.00	2439.87±978.32	+	100.00	781.04±320.15	+	16.67	79.66±69.38	−
骨瓜提取物注射液 Gugua extract injection	企业 I	0.00	−15.76±37.79	−	0.00	−37.09±21.30	−	/	/	/
	企业 H	83.33	176.35±36.67	+	33.33	100.36±67.15	+	16.67	127.45±97.91	−

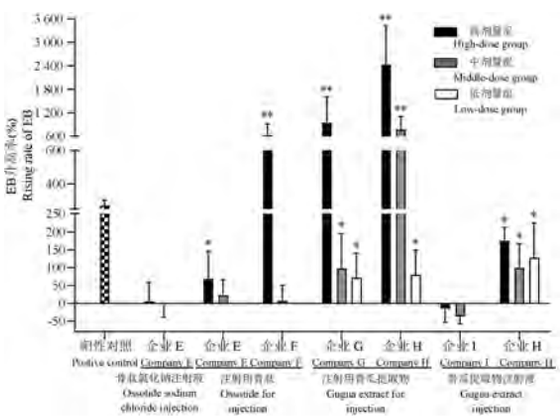
注：“−”：类过敏反应阴性；“+”：类过敏反应阳性。

Note. “−”, Negative anaphylactoid reaction. “+”, Positive anaphylactoid reaction.

3 讨论

根据临床数据显示[9,15],大部分的类过敏反应于给药 30 min 内发生,故小鼠耳廓蓝染实验中,将给药时间设为 30 min,观察耳廓蓝染情况,以与临床不良反应相关。同时本研究分析了制剂临床用药浓度与动物实验浓度的相关性。

骨肽注射液与复方骨肽注射液是常用的骨肽类注射剂,临床上常作为骨折、骨关节炎、风湿、类风湿关节炎等疾病的治疗或辅助治疗药物。骨肽注射液(临床用药剂量为 1.67 mg/kg)给药浓度由高到低折算后分别为临床用药剂量的 8.33 倍、4.17 倍、1.67 倍;复方骨肽注射液(临床用药剂量为 2.5 mg/kg)的给药浓度由高到低依次为临床用药浓度的 5.5 倍、2.75 倍、1.1 倍。结果表明,高、中剂量下,仅 1 批骨肽注射液呈阴性反应;低剂量下均呈阴性反应,蓝染发生率均低于 30%,但有 2 批骨肽注射液的 EB 升高率大于 50%。



注:“ * ”:EB 升高率大于 50%且小于阳性对照组的 EB 升高率;“ ** ”:EB 升高率大于阳性对照组的 EB 升高率。

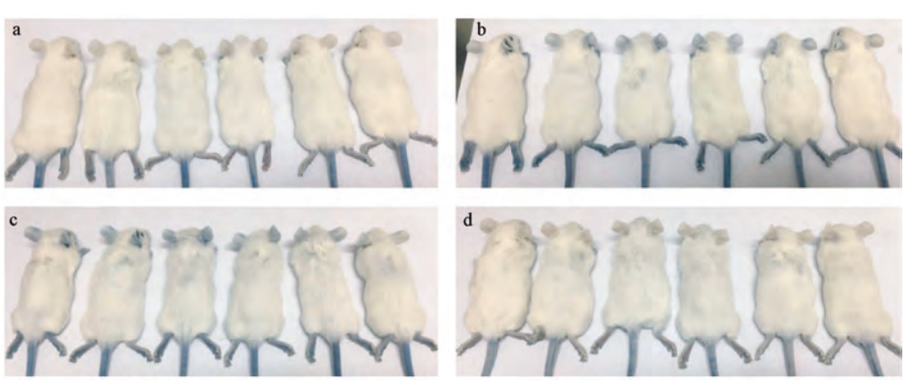
图 4 不同企业的其他骨肽类注射剂耳廓蓝染实验 EB 升高率

Note.“ * ”, Rising rate of EB is more than 50% and less than that of the positive control group. “ ** ”, Rising rate of EB is more than that of the positive control group.

Figure 4 Rising rate of EB in ear blue staining experiment of other osteopeptide injections from different companies

为了更好地评价骨肽类注射剂的类过敏反应相关性,利用小鼠耳廓蓝染模型对其他骨肽类注射剂(骨肽氯化钠注射液、注射用骨肽、骨瓜提取物注射液、注射用骨瓜提取物)进行类过敏评价。注射用骨肽、骨瓜提取物注射液、注射用骨瓜提取物的临床剂量都为 1.67 mg/kg,其给药浓度由高到低折算后分别为临床用药剂量的 8.33 倍、4.17 倍、1.67 倍,与骨肽注射液的实验结果相似,在高、中剂量下多数给药组存在不同程度的类过敏阳性情况,而在低剂量下类过敏反应均判定为阴性;而骨肽氯化钠注射液在原液浓度下类过敏反应呈阴性。

结合近年对药物的类过敏研究[16],在 1 倍临床用药剂量下,清开灵注射液、生脉注射液、鱼腥草注射液等均未呈现阳性反应,但清开灵注射液在 2 倍临床剂量下、生脉注射液在 1.67 倍临床剂量有轻微的类过敏阳性反应。骨肽注射液、注射用骨肽、骨瓜提取物注射液、注射用骨瓜提取物在临床剂量的 4.17 倍与复方骨肽注射液在临床剂量的 2.75 倍即呈有不同程度的阳性反应,故骨肽类注射剂可能存在类过敏风险。此外,类过敏反应具有明显的量效



注:a:阴性对照组;b:阳性对照组(磷酸组胺);c:注射用骨瓜提取物组(企业 H);d:骨肽氯化钠注射液组(企业 E)。

图 5 不同企业的其他骨肽类注射剂典型耳廓蓝染图(高剂量组)

Note. a, Negative control group. b, Positive control group (Histamine phosphate). c, Gugua extact for injection group (Company H). d, Ossotide sodium chloride injection group (Company E).

Figure 5 Typical ear blue staining pictures of other osteopeptide injections from different companies (High-dose group)

关系,单位时间内给予的药物浓度越高,类过敏发生的可能性越高,且程度逐渐加重[17-18];而骨肽类注射剂的类过敏反应也存在一定的量效关系,与之相符。因此骨肽类注射剂在临床用药时应注意用药浓度以及需要观察患者用药后的身体情况。

骨肽类注射剂的临床不良反应多发生于给药后 30 min,而在患者持续给药期间也会出现过敏样反应[9]。此外,胡青[19]发现骨肽类注射剂的临床不良反应与患者的给药量、基础病史、过敏史等诸多因素相关,故骨肽类注射剂的过敏样反应可能与类过敏反应与过敏反应均有关。本研究采用小鼠耳廓蓝染模型,通过观察小鼠首次给予骨肽类注射剂后的耳廓蓝染情况,考察骨肽类注射剂的类过敏反应,而对于骨肽注射剂的过敏反应需要采用相关模型进一步考察。综上,骨肽类注射剂的类过敏评估对其不良反应研究具有重要意义,也为临床用药给药浓度的选择、速度的控制,用药安全的保障提供参考和依据。

参考文献:

[1] 王新宇, 张艳仙, 蒋睿, 等. 药物不良反应 1055 份报告分析[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(7): 141-142.

[2] 费巧玲, 齐睿娟, 张小雨, 等. 经皮致敏小鼠肠道过敏模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 619-625.

[3] 杨泽岸, 张媛, 吴彦霖, 等. 基于生物活性测定的骨肽类制剂质量评价方法[J]. 中国药事, 2019, 33(4): 380-384.

[4] 吴彦霖, 张媛, 杨泽岸, 等. 骨肽原液促 UMR106 细胞增殖法的建立及验证[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(9): 1324-1328.

[5] 刘中均, 李霞, 段小云, 等. 丹红注射液联合骨肽注射液辅助治疗骨质疏松性骨折的疗效及对患者炎症反应和骨代谢的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(18): 3549-3552.

[6] 张卫东, 朱传奇, 郑哲, 等. 骨肽注射液联合富血小板血浆注射治疗膝关节骨关节炎的疗效探究[J]. 中国合理用药探索, 2020, 17(9): 71-75.

[7] 关注骨肽和复方骨肽注射剂的安全性问题(摘录)——药品不良反应信息通报(第 26 期)[J]. 中国社区医师, 2010, 26(14): 9.

[8] 黄美婷, 李建修, 郭柳清. 复方骨肽注射液不良反应发生的危险因素分析[J]. 北方药学, 2015, 12(11): 164-165.

[9] 李二平. 91 例骨肽和复方骨肽注射剂不良反应病例分析[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(9): 880-882, 886.

[10] 张帆, 王璐, 戚进, 等. 中药注射剂致类过敏反应评价模型研究进展[J]. 海峡药学, 2019, 31(9): 10-13.

[11] 陈勇灵, 蔡犇, 张巍, 等. 注射用红花黄色素基于细胞脱颗粒和急性类过敏模型的研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3792-3797.

[12] 黄怡文, 谢家骏, 杨艺帆, 等. 大鼠皮肤类过敏试验的组织学机制[J]. 中成药, 2019, 41(3): 548-553.

[13] 梁爱华, 李春英, 易艳, 等. 药物类过敏反应的临床前评价方法研究(Ⅰ)-小鼠类过敏反应评价方法的建立和验证[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1865-1870.

[14] 万梅绪, 宋美珍, 李智, 等. 小鼠耳廓蓝染类过敏检测方法用于注射益气复脉(冻干)的质控研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 405-410, 428.

[15] 董朱. 79 例骨肽注射液不良反应文献分析[J]. 中国药业, 2012, 21(5): 45-46.

[16] 易艳, 李春英, 张宇实, 等. 3 种中药注射剂类过敏反应评价及其机制探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(14): 2711-2716.

[17] 李伟, 武璐璐, 姜华, 等. 中药注射剂过敏及类过敏反应体外评价方法的初步建立[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(3): 416-419,423.

[18] 陈梦, 李伟, 王雪, 等. 药物类过敏反应发生机制及临床前评价方法研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(1): 51-59.

[19] 胡青. 注射用骨肽发生不良反应的危险因素分析[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(31): 122-123.

〔**收稿日期**〕2021-03-03

李艳艳,杨凤梅,王俊斌,等. 异丙肾上腺素诱导恒河猴心肌损伤模型的初步研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 60-65,93.
Li YY, Yang FM, Wang JB, et al. Preliminary study of an isoproterenol-induced myocardial injury model in rhesus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 60-65,93.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 009

异丙肾上腺素诱导恒河猴心肌损伤模型的初步研究

李艳艳[1],杨凤梅[1],王俊斌[1],陈丽雄[1],靳玮华[1],和占龙[1],杨 飞[2*],赵 远[1*]
(1.中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所,云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明 650118;
2.昆明市第三人民医院胸外科,昆明 650041)

【摘要】 目的 应用异丙肾上腺素诱导恒河猴心肌损伤模型方法的初步探索。**方法** 选用 11 只恒河猴分为高剂量组、低剂量组、对照组。模型组每次注射 ISO 剂量分别为 4. 6 mg/kg、3. 2 mg/kg,每天 2 次;对照组注射生理盐水 1 mL,每天 1 次。分别于注射后第 1、3、5、7 天及第 2、3、4、5 周进行彩色多普勒超声影像检查:左室舒张末期的室间隔厚度(IVSTd)、左室内径(LVEDD)、左室后壁厚度(LVPWTd),收缩末期的室间隔厚度(IVSTs)、左室内径(LVESD)、左室后壁厚度(LVPWTs)、及左心室短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)、左心室质量(LVM);心电仪检查心电图变化;同时进行谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肌酸肌酶(CK)、肌酸肌酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、血小板/淋巴细胞比值(PLR)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)等血液生理生化指标检测。**结果** 高剂量组在给药 1 周内,AST、ALT、LDH、CK、CK-MB、PLR、NLR 明显升高;IVSTd、IVSTs、LVPWTd、LVPWTs、LVEDD、LVESD 增加,EF、FS 降低。与高剂量组相比,低剂量组变化不明显。心电结果显示给药后至第 5 周持续出现 T 波、ST 段不同程度的改变。**结论** 皮下注射 ISO 可诱导恒河猴心肌损伤,心脏超声、心电图及血液学的综合指标可作为恒河猴无创心脏损伤模型的评价依据。

【关键词】 异丙肾上腺素;恒河猴;心肌损伤
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0060-06

Preliminary study of an isoproterenol-induced myocardial injury model in rhesus monkeys

LI Yanyan[1], YANG Fengmei[1], WANG Junbin[1], CHEN Lixiong[1], JIN Weihua[1], HE Zhanlong[1], YANG Fei[2*], ZHAO Yuan[1*]
(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China.
2. Department of Thoracic Surgery, Kunming Third People's Hospital, Kunming 650041)

【Abstract】 Objective To investigate the method of using isoproterenol (ISO) to induce myocardial injury in rhesus monkeys. **Methods** Eleven rhesus monkeys were selected and divided into a high-dose, low-dose and control group. The injections of ISO in the model groups were 4. 6 mg/kg (high-dose) and 3. 2 mg/kg (low-dose) and conducted twice per day. The control animals were injected with 1 mL of normal saline once per day. Color Doppler ultrasound imaging examinations were performed on days 1, 3, 5, 7 and weeks 2, 3, 4, and 5 after the injections and included: IVSTd, IVSTs, LVPWTd, LVPWTs, LVEDD, LVESD, EF, FS, LVM. Electrocardiography was used to measure the changes in cardiac electrical activity. AST, ALT, LDH, CK, CK-MB, PLR, NLR and other physiological and biochemical indicators

[基金项目]中国医学科学院协同创新项目(2018-I2M-3-002);国家重点研发计划(2021YFF0702804);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-024);国家非人灵长类实验动物资源库。
[作者简介]李艳艳(1985—),女,助理研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: 107070897@ qq.com
[通信作者]杨飞(1972—),男,副主任医师,研究方向:胸外科。E-mail: 809432624@ qq.com
赵远(1974—),男,主任技师,研究方向:实验动物学。E-mail: zy-315@ imbcams.com.cn *共同通信作者

in the blood were measured. **Results** In the high-dose group, AST, ALT, LDH, CK, CK-MB, PLR and NLR increased significantly within one week of ISO administration. Furthermore, IVSTd, IVSTs, LVPWTd, LVPWTs, LVEDD and LVESD increased, EF and FS decreased. Compared with that in the high-dose group, these values in the low-dose group were similar to the control group. The electrocardiography result showed that the T wave and ST segments changed to varying degrees by the fifth week after ISO administration. **Conclusions** Subcutaneous injection of ISO can induce myocardial injury in rhesus monkeys. These comprehensive indices of echocardiography, electrocardiography, and hematology can be used as the basis for evaluating non-invasive heart injury in rhesus monkeys.

【Keywords】 isoproterenol; rhesus monkey; myocardial injury

目前,心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)是致人类死亡的最常见的病因之一,是严重威胁健康的头号杀手[1]。动物模型作为研究心血管疾病的常用方法,对于揭示发病机制和评价干预效果极为重要。在心肌损伤动物模型的非临床研究中,常见以大鼠、小鼠、兔、犬、小型猪等为报道多见[2]。但非人灵长类动物心肌损伤模型的研究报道极其少见。由于恒河猴(*Macaca mulatta*)在许多生理方面与人类非常相似,因此被认为是研究人类生理和发病机理的最有价值的非人灵长类动物模型[3]。对于心血管疾病,特别是心脏病的研究,恒河猴是人类的重要替代品。恒河猴的心脏结构与人类非常相似,冠状动脉的分布与人类相似[4]。因此,恒河猴心肌损伤模型将为人类心脏疾病研究提供更好的替代方法。然而,恒河猴心肌损伤模型的一些详细特征以及与人类心肌疾病的比较数据并无报道。

异丙肾上腺素(isoproterenol,ISO)是一种构建心脏疾病动物模型的常用药物,通过加快心率、增强心肌耗氧量等引发心肌损伤,可导致大鼠出现许多与人类心脏病相似的代谢和形态学异常表现,如心肌损伤坏死、纤维化及心室重构,心脏功能下降。ISO 可用于药物性心肌损伤、缺血性心肌损伤、2 型心肌梗死等疾病的模拟研究[5-7]。目前皮下注射 ISO 诱导建立心肌损伤动物模型相关的研究较多,但使用的注射剂量差别很大,且未见用于恒河猴诱导心肌损伤模型的相关报道。本研究的目的是在恒河猴皮下注射 ISO 诱导建立心肌损伤动物模型,为人类心脏疾病致病机理、药物评价等提供基础。

1　材料和方法

1.1　实验动物

健康恒河猴 11 只,普通级,雄性,7~9 岁,体重 8~12 kg,来源于中国医学科学院医学生物学研究所[SCXK(滇)K2020-0005],动物饲养在中国医学科学院医学生物学研究所[SYXK(滇)K2020-0008]。实验操作及饲养在本单位实验动物部实验设施中进行。实验经中国医学科学院医学生物学研究所伦理委员会审核批准(DWSP201810002)。实验过程严格遵循 3R 原则和实验动物福利伦理要求。

1.2　主要试剂与仪器

ISO(大连美仑生物技术有限公司,MB5204-5 g);注射用生理盐水(昆明南疆制药有限公司,A19122606A);AST(批号 140219005)、ALT(批号 140120001)、LDH(批号 142719006)、CK(批号 142519011)、CK-MB(批号 142619006)等生化试剂(深圳迈瑞生物);溶血剂(批号 R9538)、稀释液(批号 G0082)等血常规试剂(Sysmex);复方氯胺酮注射液(江苏中牧倍康药业有限公司,20200102)。

Apogee 5300 彩色多普勒超声诊断仪(汕头市超声仪器研究所有限公司,中国);BS-200 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,中国);IE12 数字式心电图机(深圳邦健生物医疗设备股份有限公司,中国);Microfuge 20R 台式高速冷冻离心机(Thermo);XT-2000i 全自动五分类动物血液细胞分析仪(Sysmex)。

1.3　实验方法

1.3.1　动物分组及实验干预

实验恒河猴分为 3 组:高剂量组(H 组,$n=4$),低剂量组(L 组,$n=4$),对照组(C 组,$n=3$)。模型组动物大腿外侧皮下注射 ISO,H 组每次注射 ISO 1 mL(4.6 mg/kg),每天 2 次;L 组每次注射 ISO 1 mL(3.2 mg/kg),每天 2 次;C 组注射生理盐水 1 mL,每天 1 次。连续注射 5 周。

1.3.2　临床观察

注射 ISO 后每天观察记录动物饮食,精神状态、活动、毛色、粪便、死亡等情况。

1.3.3　心脏彩超检查

分别于注射后第 1、3、5、7 天及第 2、3、4、5 周对

所有动物进行彩色多普勒超声影像检查,将探头放置在胸骨左缘心脏区域,M 型超声束经过二尖瓣腱索,与室间隔、左室后壁保持垂直,频率为 2.5 MHz。分别测量左室舒张末期的室间隔厚度(IVSTd)、左室内径(LVEDD)、左室后壁厚度(LVPWTd),收缩末期的室间隔厚度(IVSTs)、左室内径(LVESD)、左室后壁厚度(LVPWTs)、及左心室短轴缩短率(FS,%)、射血分数(EF,%)、左心室质量(LVM,g)等心功能指标。

1.3.4 血液生化学检测

分别于注射后第 1、3、5、7 天及第 2~5 周对所有动物采集全血,分离血清,进行谷丙转氨酶(alanine amiotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、肌酸肌酶(creatine kinase,CK)、肌酸肌酶同工酶(creatine kinase-MB,CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)等指标检测。

1.3.5 血常规检测

分别于注射后第 1、3、5、7 天及第 2~5 周对所有动物采集全血,进行血常规检测,计算血小板/淋巴细胞比值(PLR)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)。

1.3.6 心电图检测

分别于注射后第 1、3、5、7 天及第 2~5 周对所有动物进行心电图检查,记录心电图。

1.4 统计学方法

应用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析,结果均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析进行组间比较,$P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 临床观察结果

恒河猴注射异丙肾上腺素后,饮水增加,呼吸频率加快,前期活动减少,后期恢复正常;精神状态未发生明显改变,毛色、粪便正常,无死亡等情况。

2.2 心脏彩超结果

心脏超声可以清晰显示恒河猴心脏结构。由心脏彩超可见,给药前心脏收缩节律正常,收缩有力,给药后逐渐出现左室后壁收缩无力、活动减弱(如图 1A~1C);高、低剂量组左室内径在给药后的前 1 周出现增大的变化趋势。室间隔厚度增宽;高剂量组左室后壁厚度在给药 3 d 后出现明显的增宽。左心功能指标 EF 和 FS 降低。见图 2A~2I。

2.3 血液生化学结果

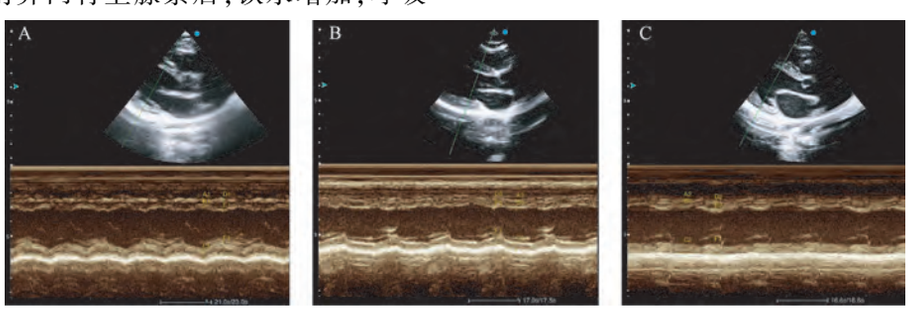
对给药后不同时间点的血清 AST、ALT、LDH、CK、CK-MB 检测发现,H 组 AST、ALT、LDH、CK 在第 1 天出现升高,第 3 天达到最高值,CK-MB 在第 1 天即出现最高值,而后逐渐下降恢复至给药前水平;H 组 AST 在第 3 天显著高于 C 组;H 组 ALT 在第 1 天、第 3 天显著高于 L 组;H 组 LDH 在第 1、3、5 天显著高于 C 组,第 3、7 天显著高于 L 组,L 组 LDH 在第 5 周显著高于 C 组($P<0.05$)。见图 3A~3E。

2.4 血液常规结果

计算不同时间点的血小板/淋巴细胞比值(PLR)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)得出,H 组在给药第 1 天 PLR、NLR 即出现明显升高,PLR 在第 5 天出现最高值,NLR 在第 1 天出现最高值;L 组 PLR、NLR 变化趋势不明显。见图 4A、4B。

2.5 心电图结果

实验前为正常心电图,给药后至第 5 周,持续出现 T 波、ST 段不同程度改变,主要表现:ST 段改变(II,III,avF,V4-V6 导联轻度下移),T 波改变(I,avL,V1-V6 导联平坦,倒置,负正双向)等,见图 5。

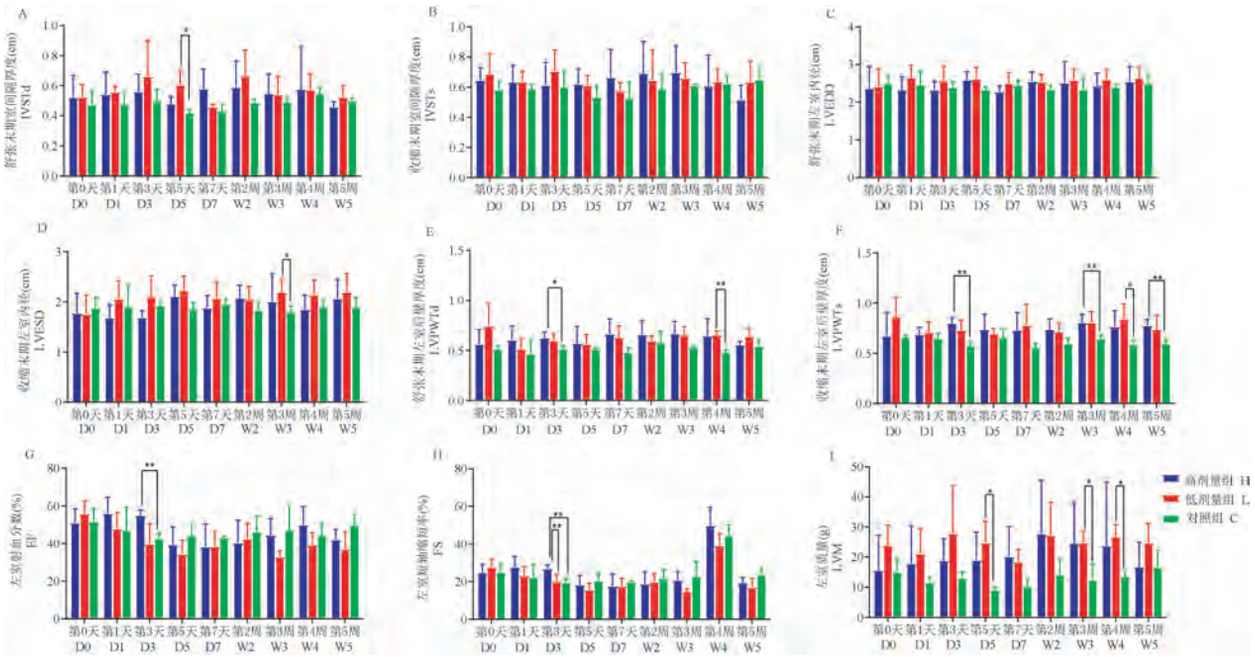


注:A:给药前;B:给药第 3 天;C:给药第 7 天。

图 1 心脏彩超结果

Note. A, Before administration. B, Dosing day 3. C, Dosing day 7.

Figure 1 Results of echocardiography

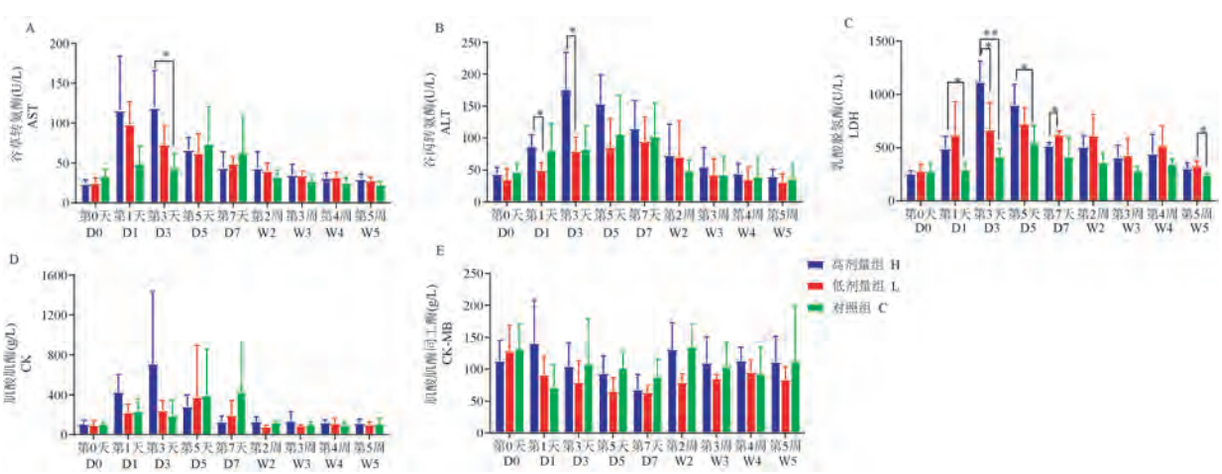


注：图中九组 bar 依次代表各组恒河猴注射 ISO 前及注射后第 1、3、5、7 天和第 2~5 周心功能指标。高剂量组、低剂量组、对照组三组间比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 2　ISO 对恒河猴左心室壁厚度及左心功能的影响

Note. Nine groups of bars in the figure show effect of ISO on heart in rhesus monkeys before injection, first, third, fifth, seventh days and second to fifth weeks after injection. Comparison among high-dose, low-dose and control groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2　Effect of ISO on left ventricular wall thickness and left ventricular function in rhesus monkeys



注：图中九组 bar 依次代表各组恒河猴注射 ISO 前及注射后第 1、3、5、7 天和第 2~5 周血液生化指标。高剂量组、低剂量组、对照组三组间比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$。

图 3　ISO 对恒河猴血液生化指标的影响

Note. Nine groups of bars in the figure show effect of ISO on blood biochemical indexes of rhesus monkeys before injection, first, third, fifth, seventh days and second to fifth weeks after injection. Comparison among high-dose, low-dose and control groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3　Effect of ISO on blood biochemical indexes of rhesus monkeys

3　讨论

ISO 是非选择性 β-肾上腺素受体激动剂，研究者普遍认可其具有诱发心室重构的作用，并得到广泛应用。炎症反应、内质网应激、氧化应激、自噬和凋亡等机制的相互联系、影响，直接和间接造成 ISO 性心肌损伤。ISO 常用于建立病理性心肌损伤、心肌肥厚、心肌梗死和心力衰竭等实验动物模型[8]。此法操作简单、模型稳定、成本低，已成为大鼠心肌肥大动物模型建立的常用方案之一[9]。目前，有关

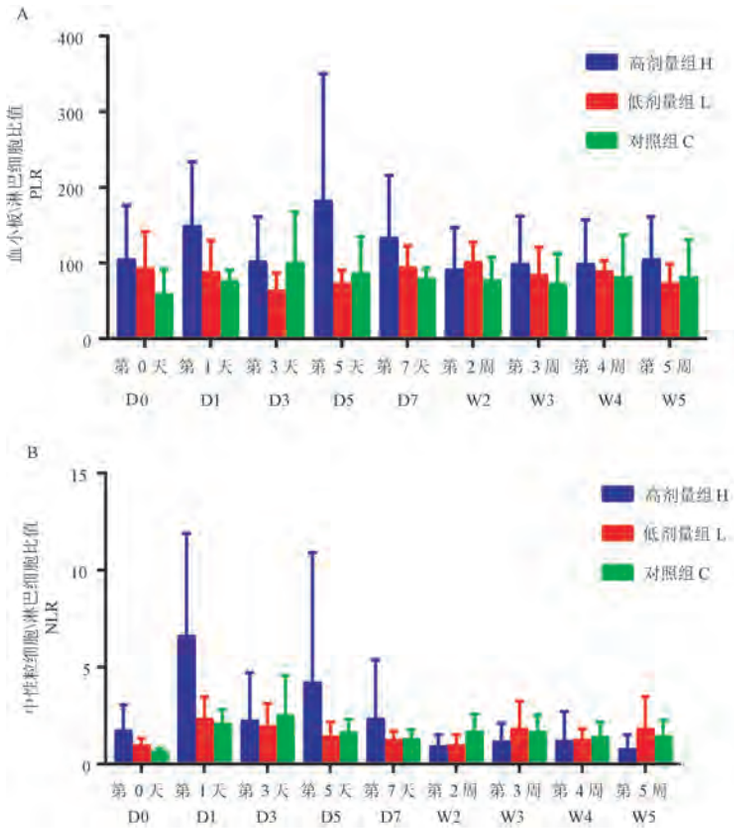


图 4 ISO 对恒河猴血液生理指标的影响

Figure 4 Effect of ISO on the blood physiological indexes of rhesus monkeys

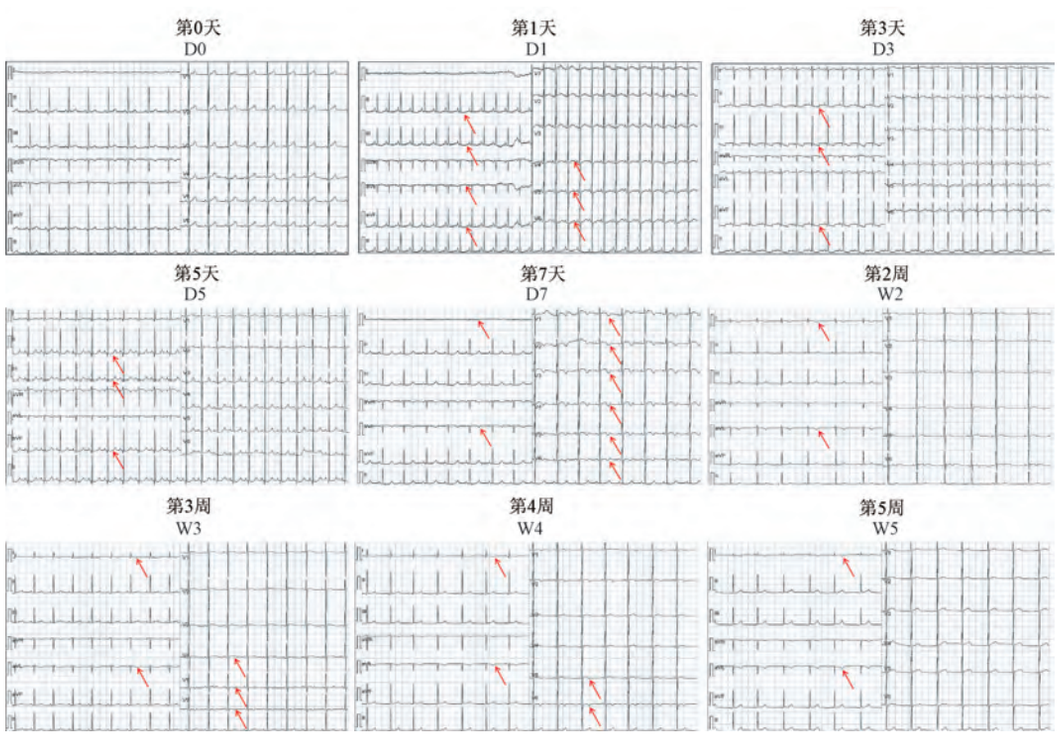


图 5 ISO 对恒河猴心电图的影响

Figure 5 Effect of ISO on the electrocardiogram of rhesus monkeys

恒河猴心肌损伤模型建立的报道较少。为探讨不同剂量对恒河猴心肌损伤模型构建的影响,本研究通过采用皮下注射高、低剂量的 ISO 诱导建立恒河猴心肌损伤模型。结果发现,两种剂量 ISO 处理后,恒河猴心脏均出现不同程度的损伤,但高剂量组各种指标变化更为明显。高剂量组在处理后的 1 周内出现心肌收缩活动减弱及心电图异常情况。另外,高、低剂量组恒河猴心脏 IVSTd、IVSTs、LVEDD、LVESD、LVPWTd、LVPWTs 表现为不同程度的增加,心功能指标 EF、FS 降低,高剂量组 LVM 在处理 2 周后出现明显增加。

AST 主要存在于心肌中,机体健康状态下,血清中 AST 水平较低。细胞损伤时,细胞膜通透性增加,AST 从胞浆内释放入血液。同时,炎症因子释放,心肌损伤进一步加剧[10]。ISO 通过影响 Ca^{2+} 通道,导致心肌收缩变强,需氧量增加,进而引起 DNA、蛋白质和膜脂质等细胞组分氧化,直接损伤心肌[8]。血清心肌酶 CK-MB、LDH 的水平可反映心肌损伤情况[11]。CK 同工酶的 CK-MB,主要存在于心肌细胞质中,能催化能量转化,为肌肉收缩提供直接的能量来源[12-13]。当 ISO 致使脂质膜破坏,大量 CK-MB 释放进入血液,而血清中 CK-MB 含量与心肌损伤程度正相关,能敏感反映心肌损伤的程度[14]。LDH 广泛分布在各种组织的细胞质中,以心、肾、骨骼肌最为丰富。当少量心肌细胞膜发生破坏,或心肌组织损伤、坏死时,血清中 LDH 活性即可升高[15]。本研究中,高剂量组 AST、CK-MB、LDH 等指标均在处理后 1~5 d 内出现明显增加,较低剂量组更早出现变化。该变化规律反映出高剂量组能更好的诱导恒河猴出现心肌损伤样的血液学指标变化。

近年,NLR 与各种心血管疾病的临床结局相关性已得到证实。其作为一种全身性炎性标志物即可直观反映炎症情况,又能反映免疫水平,更稳定地反映机体的炎症状态。中性粒细胞释放氧自由基,激活产生大量炎症介质,使血小板聚集率增加,导致血液持续高凝状态[16],增加心肌损伤面积。同时,作为心肌细胞损伤的主要途径,参与缺氧损伤、蛋白水解酶和其他炎症过程[17-18]。国外一项研究报告,PLR 是综合血液凝聚与炎症通路于一体的炎症指标,是多种疾病状态下出现不良心血管事件的危险因素[19]。另有文献报道,心肌损伤患者的 PLR 值显著高于无心肌损伤患者[20]。本研究中,H 组在给药第 1 天 PLR、NLR 即出现明显升高,PLR 在第 5 天出现最高值,NLR 在第 1 天出现最高值;L 组 PLR、NLR 变化趋势不明显。PLR、NLR 与 CK-MB、LDH 等指标变化规律一致,推测高剂量组较低剂量组出现更为严重的心肌损伤。

心电图是应用心电图机在体表记录心脏每个心动周期产生的电活动变化图形的技术,是临床上筛查和诊断心律失常和心血管疾病的最常用的检查技术之一,具有非侵入性、较强抗干扰能力、记录清晰、操作简便、经济有效等优点。心电图结果显示,给药后至第 5 周,持续出现 T 波、ST 段不同程度的改变,给药初期(1~5 d),ST 段压低,这与心肌缺血和心肌损伤有关,1 周后出现 ST 段抬高,T 波倒置,I、avL、V1-V6 导联、倒置,呈负正双向(见图 5)。从心电图特征性表现可以初步判断为心肌损伤。

本文对不同剂量 ISO 诱导恒河猴心肌损伤模型进行初步探讨,通过观察恒河猴心脏彩超、心电图的变化、以及 AST、ALT 及炎症因子 LDH、CK、CK-MB、PLR、NLR 等指标水平的变化,高剂量的 ISO 可成功诱导恒河猴心肌损伤;心脏超声、心电图及血液学的指标可作为恒河猴无创心脏损伤模型综合评价的依据。

参考文献:

[1] Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American heart association [J]. Circulation, 2019, 139(10): 56-528.

[2] 王成舟. 食蟹猴急性心肌梗死模型的建立及护理 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(4): 314-318.

[3] Tohno Y, Tohno S, Laleva L, et al. Age-related changes of elements in the coronary arteries of monkeys in comparison with those of humans [J]. Biol Trace Elem Res, 2008, 125(2): 141-153.

[4] Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, et al. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates [J]. JAMA, 1994, 271(4): 289-294.

[5] 王羽, 刘明洁, 付瑶, 等. 苏格木勒-3 汤对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚后 Caspase3/9 表达的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(5): 390-392, 397.

[6] 程杰坤, 孙小慧, 高莉萍, 等. 法舒地尔对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚的干预作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(5): 414-418.

[7] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardialinjury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141-151.

(下转第 93 页)

温翔宇,张军宏,朱存良. 七氟醚调控 NRF2/HO-1/HMGB1 通路减轻缺氧诱导的小胶质细胞炎症反应 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 66-73.
Wen XY, Zhang JH, Zhu CL. Sevoflurane regulates the NRF2/HO-1/HMGB1 pathway and reduces hypoxia-induced inflammatory responses in microglia [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 66-73.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 010

七氟醚调控 NRF2/HO-1/HMGB1 通路减轻缺氧诱导的小胶质细胞炎症反应

温翔宇[1*],张军宏[2],朱存良[3]

(1.甘肃省定西市人民医院麻醉科,甘肃 定西 743000;2.甘肃省定西市人民医院泌尿外科,甘肃 定西 743000;
3.湖南省娄底市中心医院,湖南 娄底 417000)

【摘要】 目的 探讨七氟醚对缺氧诱导的小胶质细胞炎症反应的影响,及对转录因子 NF-E2 相关因子 2(NRF2)及血红素加氧酶 1(HO-1)/高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)通路的调控作用。**方法** 缺氧不同时间(0、2、4、6、8、12 h)诱导 BV-2 小胶质细胞活化建立炎症模型,倒置显微镜观察细胞活化形态并计算活化细胞比例;Western blot 法检测小胶质细胞 NRF2、HO-1、HMGB1 及白介素 1β(IL-1β)蛋白表达水平,筛选最佳缺氧时间 8 h。观察缺氧 8 h 条件下七氟醚不同浓度(0%、2%、4%、6%)处理 30 min 对 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达的影响。将 BV-2 细胞分为正常对照组、缺氧诱导组、6%七氟醚组、SnPP 组(NRF2/HO-1 通路抑制剂-锡原卟啉)、6%七氟醚+SnPP 组,计算活化细胞比例并检测细胞 NRF2/HO-1/HMGB1 通路蛋白及核转录因子-κB p65(NF-κB p65)、磷酸化 NF-κB p65(p-NF-κB p65)、IL-1β 蛋白表达水平。**结果** 随着缺氧时间延长,活化细胞比例及 HMGB1、IL-1β 表达逐渐升高,NRF2、HO-1 蛋白在 8~12 h 时下降至最低水平($P<0.05$),实验选用 8 h 为缺氧诱导条件。随着七氟醚浓度升高,活化细胞比例、HMGB1、IL-1β 表达逐渐减少,NRF2、HO-1 逐渐升高($P<0.05$),且呈剂量依赖性,选取 6%七氟醚为处理浓度。与正常对照组比较,缺氧诱导组 NRF2、HO-1 表达降低,活化细胞比例、HMGB1、IL-1β、p-NF-κB p65/NF-κB p65 表达升高($P<0.05$)。6%七氟醚组上述指标变化与缺氧诱导组相反($P<0.05$);SnPP 组上述指标变化与缺氧诱导组一致且比缺氧诱导组严重($P<0.05$)。6%七氟醚+SnPP 组上述指标变化与 6%七氟醚组相反($P<0.05$)。**结论** 七氟醚可通过促进 NRF2/HO-1 活化,抑制 HMGB1 表达,来减轻缺氧诱导的 MG 活化及炎症反应进程。

【关键词】 七氟醚;缺氧;小胶质细胞;NRF2/HO-1/HMGB1 通路;炎症反应
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0066-08

Sevoflurane regulates the NRF2/HO-1/HMGB1 pathway and reduces hypoxia-induced inflammatory responses in microglia

WEN Xiangyu[1*], ZHANG Junhong[2], ZHU Cunliang[3]

(1. Department of Anesthesiology, Dingxi People's Hospital of Gansu Province, Dingxi 743000, China. 2. Department of Urology, Dingxi People's Hospital of Gansu Province, Dingxi 743000. 3. Loudi Central Hospital of Hunan Province, Loudi 417000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of sevoflurane on hypoxia-induced inflammatory responses of microglia and regulation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)/heme oxygenase 1 (HO-1)/high mobility group protein B1 (HMGB1) pathway. **Methods** BV-2 mouse microglia were activated by inducing hypoxia for 0, 2, 4, 6, 8 and 12 h to establish an inflammation model. The activated cells were observed by inverted microscope, and the

[基金项目]2020 年度娄底市科技创新项目(娄科发〔2020〕27 号)。
[作者简介]温翔宇(1983—),女,硕士,主治医师,研究方向:临床麻醉。E-mail:wxyzhjh83@163.com

proportion of activated cells was calculated. Western blot were used to detect the expression levels of NRF2, HO-1, HMGB1 and interleukin (IL)-1β proteins in microglia. The optimal hypoxia time was 8 h. BV-2 microglia were activated under hypoxic conditions for 8 h; treated with different concentrations of sevoflurane (0%, 2%, 4% and 6%) for 30 min; and NRF2, HO-1, HMGB1, IL-1β protein expression was observed. BV-2 cells were divided into a control group, hypoxia-induction group, 6% sevoflurane group, SnPP group (NRF2/HO-1 pathway inhibitor stannous porphyrin), and 6% sevoflurane + SnPP group. The ratio of activated cells was calculated, and the protein expression levels of NRF2, HO-1, HMGB1, nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65), phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65) and IL-1β were determined. **Results** With prolonged hypoxia time, the proportion of activated cells and expression of HMGB1 and IL-1β gradually increased, and NRF2 and HO-1 proteins decreased to the lowest level at 8 ~ 12 h ($P<0.05$). Therefore, the hypoxia-induction time of 8 h was chosen. With the increase in sevoflurane concentration, the proportion of activated cells and expression of HMGB1 and IL-1β gradually decreased, and NRF2 and HO-1 expression gradually increased ($P<0.05$). These effects were dose-dependent, and 6% sevoflurane was selected as the treatment concentration. Compared with that in the control group, the expression of NRF2 and HO-1 in the hypoxia-induced group decreased, and the proportion of activated cells and expression of HMGB1, IL-1β and p-NF-κB p65/NF-κB p65 expression increased ($P<0.05$). The changes in the above indices in the 6% sevoflurane group were opposite to those in the hypoxia-induced group ($P<0.05$). The changes in the SnPP group were consistent with those in hypoxia-induced group and were more serious than those in hypoxia-induced group ($P<0.05$). The changes in the above parameters in the 6% sevoflurane + SnPP group were opposite to those in 6% sevoflurane group ($P<0.05$). **Conclusions** Sevoflurane treatment reduced hypoxia-induced microglial activation and inflammatory processes by promoting NRF2/HO-1 activation and inhibiting HMGB1 expression.

【Keywords】 sevoflurane; hypoxia; microglia; NRF2/HO-1/HMGB1 pathway; inflammatory response

小胶质(microglia cells,MG)细胞可调节大脑发育及神经系统的损伤和修复,被称为大脑巨噬细胞[1]。MG 也是神经炎症反应关键介质,缺血、缺氧或炎症刺激状态下激活 MG,可清除坏死组织并发挥神经保护作用,但 MG 过度活化及死亡会释放大量炎性介质,并导致神经系统产生不可逆损伤[2-3]。探究 MG 活化及其活化后炎症反应机制,对神经系统疾病治疗具有一定临床意义。近来研究发现转录因子 NF-E2 相关因子 2(transcription factor NF-E2 related factor 2, NRF2)/血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1,HO-1)通路可参与机体抗氧化应激反应,并能通过抑制下游炎症通路高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1,HMGB1)/核转录因子-κB(nuclear transcription factor-κB,NF-κB)通路表达来发挥抗炎反应,进而参与多种疾病生理过程[4-5]。但 NRF2/HO-1/HMGB1 通路参与 MG 炎症反应过程的研究较少。目前临床常用麻醉剂-七氟醚能够促进 MG 活化,并抑制炎症反应来缓解创伤性脑损伤大鼠脑损伤进程[6],但有研究显示七氟醚能够诱导 MG 活化并促进其炎症反应[7]。因此对七氟醚的作用仍存在争议。本研究体外培养 MG,并给予缺氧及七氟醚处理,以期验证七氟醚对 MG 活化及炎症反应的调控作用,并从 NRF2/HO-1/HMGB1 通路阐明其调控炎症反应的分子生物学机制,为神经系统炎症性疾病的治疗提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　细胞

BV-2 小鼠 MG 细胞(货号:YCL-0493,武汉益普生物科技有限公司)。

1.2　主要试剂与仪器

七氟醚(批号:H20040772,美国 Abbott 公司);NRF2、HO-1、HMGB1、NF-κB p65、磷酸化 NF-κB p65(p-NF-κB p65)、白细胞介素 1β(interleukin-1β,IL-1β)等抗体(货号:ab156883、ab189491、ab32536、ab79523、ab239882、ab234437,美国 abcam)。麻醉气体监测仪(型号:Capnomac Datex AS/3,芬兰 Datex.Ohmeda 公司);光学显微镜(型号:SMZ745,日本尼康公司);化学发光仪(型号:GIS-500,杭州米欧仪器公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　细胞复苏与培养

取 BV-2 小鼠 MG 细胞进行常规复苏后,置于 5% CO_2、37℃、饱和湿度的恒温培养箱中,用 DMEM 培养基进行培养。每 2 d 更换 1 次培养基,5 d 后传代进行后续试验。

1.3.2　细胞分组与处理

取细胞制备成每升 5×10^8 个的细胞悬液接种至 96 孔板上,每孔 100 μL,用无血清培养基孵育 6 ~

12 h,贴壁同步化后换用含血清培养基进行培养,并进行如下分组处理:(1)置于缺氧培养箱(37℃、95% N_2、5% CO_2 混合气体)中进行培养,并设置缺氧不同时间(0、2、4、6、8、12 h)组,各组均在缺氧条件下处理后,置于倒置显微镜下观察细胞活化形态,并检测细胞活化比例及 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达水平,选出最佳缺氧时间 8 h;(2)设置七氟醚不同浓度(0、2%、4%、6%)组,并置于两侧各有一小孔的密闭容器中,一侧小孔接麻醉机,输入氧气(2 mL/min)和七氟醚,另一侧小孔端接麻醉气体监测仪测定七氟醚浓度达 0、2%、4%、6%后,维持 30 min 后,置于缺氧培养箱中缺氧 8 h,检测细胞活化比例及 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达水平;(3)设置正常对照组、缺氧诱导组、6%七氟醚组、SnPP 组[NRF2/HO-1 通路抑制剂-锡原卟啉(Sn-protoporphyrin, SnPP)]、6%七氟醚+SnPP 组;除正常对照组外,其余各组均置于缺氧条件下培养 8 h;6%七氟醚组在缺氧前给予 6%七氟醚处理 30 min;SnPP 组在缺氧处理前参照文献[8]向培养基中加入终浓度为 5 μmol/L 的 SnPP;6%七氟醚+SnPP 组加入 SnPP 并进行 6%七氟醚处理 30 min 后进行缺氧诱导。检测细胞活化比例及相关蛋白表达水平。

1.3.3 活化细胞比例检测

收集 1.3.2 项下各组细胞,置倒置显微镜下观察细胞形态。每组取 3 个不同视野计数,重复 3 次。MG 活化细胞比例=(多极型细胞数量+纺锤样双极细胞数量)/总细胞数量×100%。

1.3.4 Western blot 法检测细胞蛋白表达

收集 1.3.2 项下的各组细胞,加入细胞裂解液抽提总蛋白后,采用二喹啉甲酸法检测总蛋白浓度;将变性后的蛋白样品行电泳及转膜反应后;脱脂奶粉封闭聚偏氟乙烯膜 2 h 后,加入一抗(NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β、NF-κB p65、p-NF-κB p65 抗体,稀释倍数为 1∶1000,内参抗体为 GAPDH,稀释倍数为 1∶2000),在 4℃下孵育过夜;次日,加入稀释 5000 倍的二抗于室温下孵育 1 h。显影曝光后,化学发光成像分析系统拍照并分析灰度值。每组试验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 进行统计学分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较行 t 检验;多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 *SNK-q* 检验;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧不同时间对细胞形态、活化比例及 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 表达的影响

缺氧 0 h 时 MG 呈圆形或者椭圆形,随缺氧时间延长,MG 体积增大,出现多极或两极延长,分支样或纺锤样改变的细胞逐渐增多。与缺氧 0 h 相比,缺氧 2、4、6、8、12 h 活化细胞比例、HMGB1、IL-1β 蛋白表达增多($P<0.05$);NRF2、HO-1 蛋白表达在缺氧 2 h 时迅速升高,4 h 时迅速下降,并在 8~12 h 时下降至最低水平($P<0.05$)。缺氧 8 h 后活化细胞比例最多,8 h 与 12 h 相比,上述指标变化差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1~3。

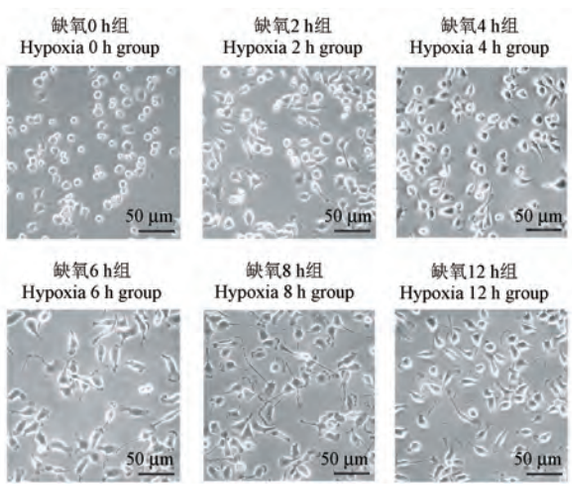
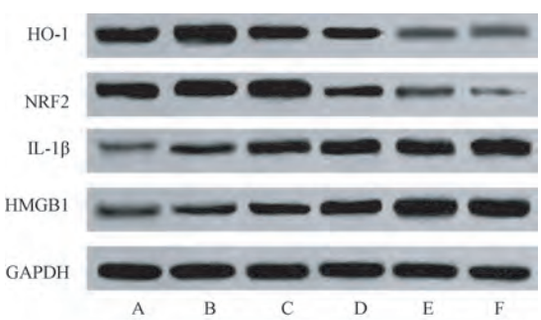


图 1 不同缺氧时间下 MG 形态变化图

Figure 1 Morphological changes of MG under different hypoxia time



注:A:缺氧 0 h 组;B:缺氧 2 h 组;C:缺氧 4 h 组;D:缺氧 6 h 组;E:缺氧 8 h 组;F:缺氧 12 h 组。

图 2 各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达免疫印迹图

Note. A, Hypoxia 0 h group. B, Hypoxia 2 h group. C, Hypoxia 4 h group. D, Hypoxia 6 h group. E, Hypoxia 8 h group. F, Hypoxia 12 h group.

Figure 2 Western blot of NRF2, HO-1, HMGB1 and IL-1β expression in each group

2.2　七氟醚不同浓度处理对 MG 活化比例及 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达的影响

七氟醚浓度为 0 时，MG 体积增大，细胞分支样或纺锤样改变的细胞较多。与 0 七氟醚处理组相比，2%、4%、6% 七氟醚处理组活化细胞比例、HMGB1、IL-1β 蛋白表达减少（$P<0.05$），NRF2、HO-1 蛋白表达升高（$P<0.05$），且呈剂量依赖性，见图4~7。

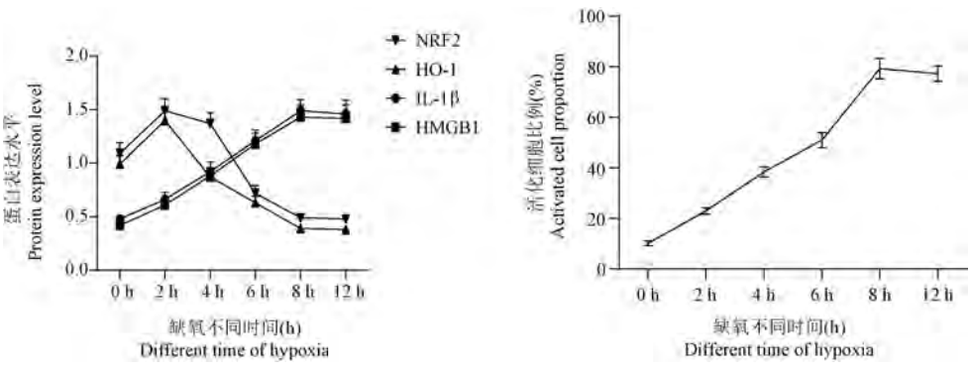


图 3　各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 表达及活化细胞比例比较

Figure 3　Comparison of expression levels of NRF2, HO-1, HMGB1, IL-1β and activated cell proportion in each group

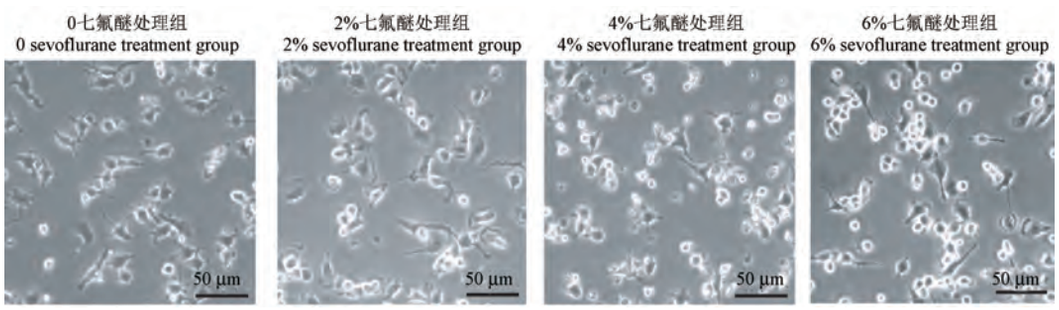
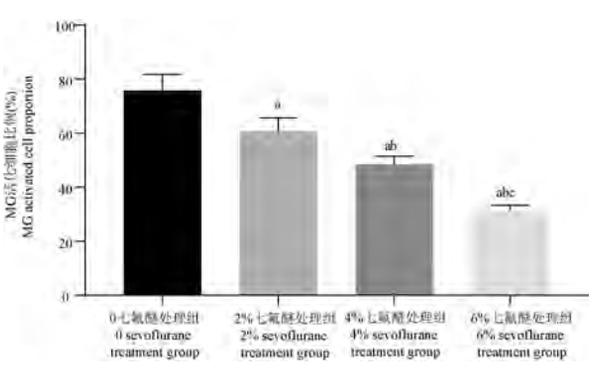


图 4　各组 MG 形态变化图

Figure 4　Morphological changes of MG in each group

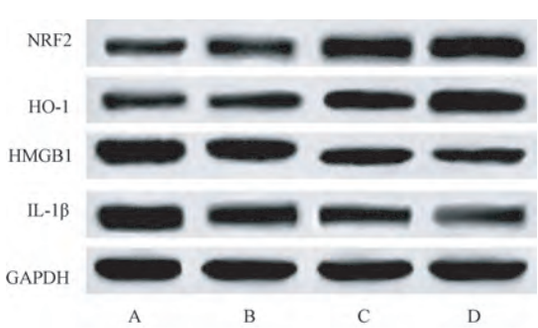


注：与 0 七氟醚处理组比较，$^{a}P<0.05$；与 2% 七氟醚处理组相比，$^{b}P<0.05$；与 4% 七氟醚处理组比较，$^{c}P<0.05$。

图 5　各组 MG 活化细胞比例比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. Compared with 0 sevoflurane treatment group, $^{a}P<0.05$. Compared with 2% sevoflurane treatment group, $^{b}P<0.05$. Compared with 4% sevoflurane treatment group, $^{c}P<0.05$.

Figure 5　Comparison of MG activated cell proportion in each group



注：A：0 七氟醚处理组；B：2% 七氟醚处理组；C：4% 七氟醚处理组；D：6% 七氟醚处理组。

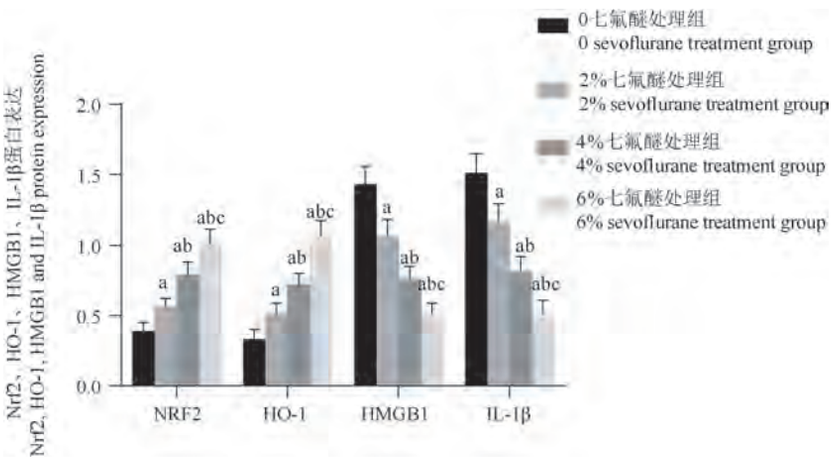
图 6　各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达免疫印迹图

Note. A, 0 sevoflurane treatment group. B, 2% sevoflurane treatment group. C, 4% sevoflurane treatment group. D, 6% sevoflurane treatment group.

Figure 6　Western blot of NRF2, HO-1, HMGB1 and IL-1β expression in each group

2.3 6%七氟醚与 SnPP 联合应用后对 MG 活化、NRF2、HO-1、HMGB1 及相关蛋白表达的影响

与正常对照组比较，缺氧诱导组活化细胞比例、HMGB1、IL-1β、p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白表达升高，NRF2、HO-1 蛋白表达降低（$P<0.05$）。6%七氟醚组上述指标变化与缺氧诱导组相反（$P<0.05$）；SnPP 组上述指标变化与缺氧诱导组一致且比缺氧诱导组变化更明显（$P<0.05$）。6%七氟醚+SnPP 组上述指标变化与 6%七氟醚组相反（$P<0.05$），见图 8～11。



注：与 0 七氟醚处理组比较，[a]$P<0.05$；与 2%七氟醚处理组相比，[b]$P<0.05$；与 4%七氟醚处理组比较，[c]$P<0.05$。

图 7 各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. Compared with 0 sevoflurane treatment group, [a]$P<0.05$. Compared with 2% sevoflurane treatment group, [b]$P<0.05$. Compared with 4% sevoflurane treatment group, [c]$P<0.05$.

Figure 7 Comparison of protein expression of NRF2, HO-1, HMGB1 and IL-1β in each group

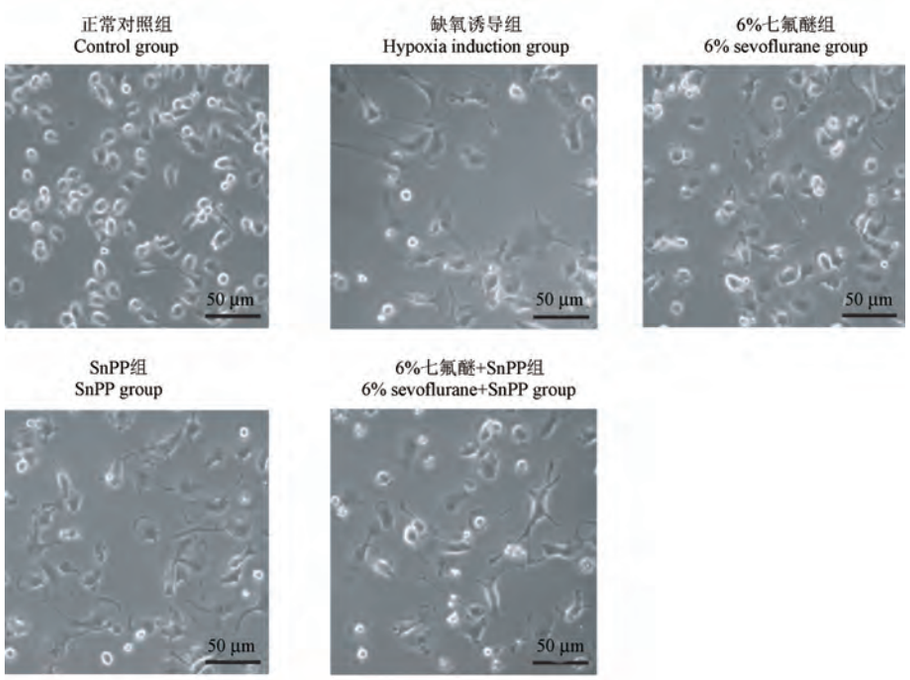
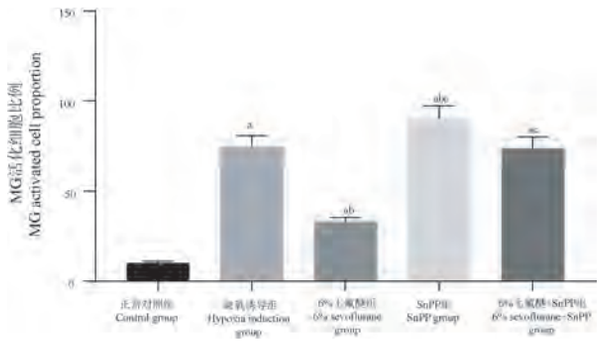


图 8 各组 MG 形态变化图

Figure 8 Morphological changes of MG

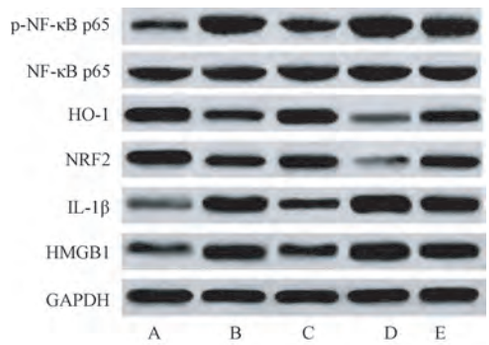


注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与缺氧诱导组比较，$^{b}P<0.05$；与 6%七氟醚组比较，$^{c}P<0.05$。

图 9　各组 MG 活化细胞比例比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. Compared with control group, $^{a}P<0.05$. Compared with hypoxia induction group, $^{b}P<0.05$. Compared with 6% sevoflurane group, $^{c}P<0.05$.

Figure 9　Comparison of the proportion of MG activated cells in each group

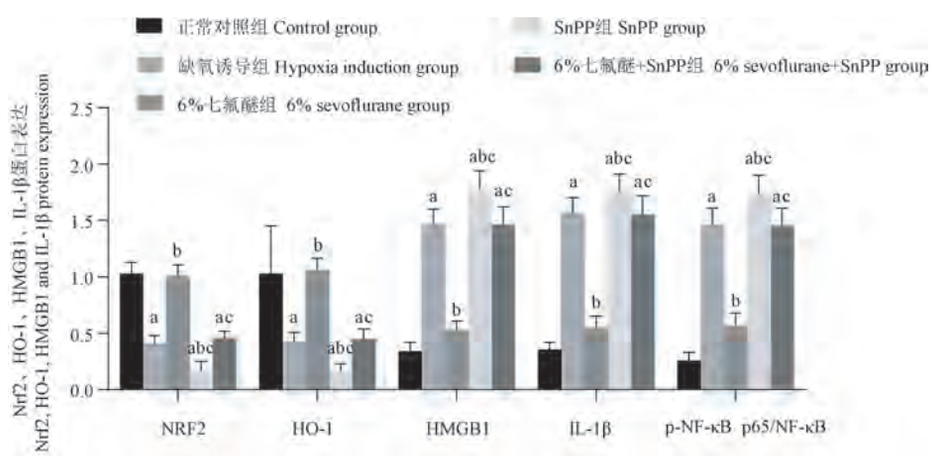


注：A：正常对照组；B：缺氧诱导组；C：6%七氟醚组；D：SnPP 组；E：6%七氟醚+SnPP 组。

图 10　各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达免疫印迹图

Note. A, Control group. B, Hypoxia induction group. C, 6% sevoflurane group. D, SnPP group. E, 6% sevoflurane+SnPP group.

Figure 10　Western blot of NRF2, HO-1, HMGB1 and IL-1β expression in each group



注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与缺氧诱导组比较，$^{b}P<0.05$；与 6%七氟醚组比较，$^{c}P<0.05$。

图 11　各组细胞 NRF2、HO-1、HMGB1、IL-1β 蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Note. Compared with control group, $^{a}P<0.05$. Compared with hypoxia induction group, $^{b}P<0.05$. Compared with 6% sevoflurane group, $^{c}P<0.05$.

Figure 11　Comparison of relative protein expression levels of NRF2, HO-1, HMGB1 and IL-1β in each group

3　讨论

MG 过度活化介导的炎症反应，是神经系统疾病发生发展的重要原因之一[9]。缺血缺氧、炎症、感染等病理刺激均可激活 MG，使 MG 由静息状态转变为活化状态而表现出促炎功能[10]。本研究于 37℃、5% CO_2 条件下模拟 MG 缺氧条件，发现缺氧（0、2、4、6、8、12 h）条件下，MG 出现分枝样或纺锤样改变，且 MG 活化细胞比例及促炎因子 IL-1β 释放在缺氧（2、4、6、8 h）内随着缺氧时间的延长而升高，并在 8～12 h 内稍有下降，与参考文献[11] MG 活化状态下的形态改变及参考文献[12]缺氧条件 IL-1β 的水平变化一致，表明缺氧 8 h 可稳定建立 MG 过度活化及炎症反应模型。近来研究发现，NRF2/HO-1/HMGB1 通路是参与机体氧化及炎症反应的经典通路之一，Yu 等[13]发现敲除 NRF2 基因后，

NRF2 下游靶基因 HO-1 介导的抗氧化反应减弱，NRF2 调控的炎症复合体－NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)激活，促进 HMGB1/NF-κB 调控的炎症通路活化，从而加重脓毒症小鼠肺组织炎症损伤进程。Tan 等[5]研究发现巨噬细胞中核因子 NRF2 的核易位可诱导 HO-1 表达，而用 HO-1 抑制剂 SnPP 能逆转 NRF2/HO-1 途径的激活，使脂多糖诱导的巨噬细胞中 NF-κB p65 核转移增多，促进巨噬细胞释放大量的促炎介质 HMGB1、IL-1β 等而加重炎症反应，提示 NRF2/HO-1/HMGB1 途径可能是炎症反应的重要途径之一。但 MG 过度活化介导的炎症反应过程中是否有 NRF2/HO-1/HMGB1 途径的参与，还不甚明确。本研究结果显示，随着缺氧时间的延长，NRF2、HO-1 蛋白表达持续降低，而促炎介质 HMGB1 的释放也逐渐升高，且 NRF2、HO-1 及 HMGB1 水平均于缺氧 8 h 时处于稳定状态，表明 NRF2/HO-1/HMGB1 途径参与缺氧诱导的 MG 活化及炎症反应过程。

近年来 MG 介导的慢性神经炎症反应越来越受到临床及患者的重视[14]。寻找特异性抑制 MG 过度活化及炎症反应的药物，来缓解和治疗神经系统炎症性疾病，也是广大学者研究的重要任务[15]。七氟醚为临床常用麻醉药，能够通过抑制炎症反应及氧化应激损伤缓解脑、肾、肺等多个脏器的缺血灌注损伤[16]，且张国栋等[6]及赵丹等[17]研究发现七氟醚能通过抑制脑缺血再灌注诱发的 MG 活化，来抑制大鼠脑组织炎症及氧化应激损伤而保护脑神经，提示七氟醚可能是抑制 MG 活化的有效药物之一。但陈颖等[7]及赵敏等[18]离体培养 MG 后研究结果显示七氟醚能诱导 MG 活化并促进炎症反应及 Dang 等[19]在体研究显示七氟醚能促进 MG 活化，与张国栋等[6]及赵丹等[17]七氟醚研究机制相反。七氟醚是促进还是抑制 MG 活化及炎症反应的机制仍存在争议。

本研究用缺氧处理 8 h 模拟 MG 活化及炎症反应状态后，用七氟醚不同浓度(2%、4%、6%)进行干预发现，随七氟醚浓度升高，MG 分枝样或纺锤样等活化状态改变明显减轻，MG 活化细胞比例及 IL-1β 释放也呈剂量依赖性降低且均显著低于 0 七氟醚处理组，提示七氟醚能够抑制缺氧条件下 MG 活化及炎症反应，这与 Yu 等[20]七氟醚抑制脂多糖诱导的 MG 活化发挥抗炎反应机制一致，推测可能七氟醚处理浓度及干预时间不同，对 MG 的影响也不同所致。本研究还发现，随七氟醚浓度升高，细胞中 NRF2、HO-1 蛋白表达逐渐升高，HMGB1 表达逐渐降低，预示七氟醚抑制缺氧诱导的 MG 活化及炎症反应作用，可能是通过促进 NRF2/HO-1 活化，抑制 HMGB1 表达来实现的。为证明这一结论，本研究用 SnPP 抑制 NRF2/HO-1 通路后，发现 SnPP 组随着 NRF2 及 HO-1 蛋白表达的降低，HMGB1 促炎介质表达显著升高及 NF-κB 炎症途径活化的同时，MG 活化细胞比例及 IL-1β 释放也进一步高于缺氧诱导组，提示抑制 NRF2/HO-1 活化，可促进 HMGB1/NF-κB 介导的炎症因子释放，进而促进 MG 活化及炎症反应。进一步分析发现，七氟醚对 MG 活化及炎症反应进程的抑制作用可被 SnPP 逆转，表明七氟醚的上述作用与促进 NRF2/HO-1 途径活化，抑制 HMGB1/NF-κB 炎症途径活化有关。

综上所述，七氟醚可通过促进 NRF2/HO-1 途径活化，抑制 HMGB1/NF-κB 炎症途径活化，减轻缺氧诱导的 MG 活化及炎症反应进程，为阐明 MG 活化及炎症反应的可能机制提供一定理论依据。但本研究还存在一定的不足，MG 活化及炎症反应的分子机制复杂，NRF2/HO-1/HMGB1 可能只是其中的一条调控机制，对于其他可能的分子机制还有待进一步验证。

参考文献：

[1] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 441-468.

[2] 邓佳丽, 丁维俊. 小胶质细胞活化抑制与中枢炎症反应关系的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(5): 1286-1290.

[3] Abe N, Nishihara T, Yorozuya T, et al. Microglia and macrophages in the pathological central and peripheral nervous systems [J]. Cells, 2020, 9(9): 2132.

[4] 高原, 于文慧, 张美君, 等. Nrf2/HO-1 信号通路与缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020,

26(4): 776-778.

[5] Tan Y, Wang Q, She Y, et al. Ketamine reduces LPS-induced HMGB1 via activation of the Nrf2/HO-1 pathway and NF-κB suppression [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 78(4): 784-792.

[6] 张国栋, 孙来广, 张家旗, 等. 七氟醚对大鼠创伤性颅脑损伤时小胶质细胞极化的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(9): 1143-1146.

[7] 陈颖, 孟诗雨, 彭书峻. 吸入麻醉药七氟醚对小胶质细胞活化的影响 [J]. 岭南急诊医学杂志, 2018, 23(1): 20-23.

[8] 狄艳琪, 曹剑, 刘璐, 等. 上调血红素氧合酶-1 对尿酸介导脂肪细胞功能障碍的影响及可能机制 [J]. 中华老年医学杂志, 2018, 37(1): 74-78.

[9] Thurgur H, Pinteaux E. Microglia in the neurovascular unit: blood-brain barrier-microglia interactions after central nervous system disorders [J]. Neuroscience, 2019, 405: 55-67.

[10] Lv Y, Sun B, Lu XX, et al. The role of microglia mediated pyroptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(4): 933-938.

[11] 方明楚, 林振浪. 氯喹通过抑制 NF-κB 和 MAPK 信号通路减轻脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞炎症反应 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1320-1326.

[12] 张洪喜, 吕水清, 王敦敬, 等. 青蒿琥酯对缺氧诱导的 BV-2 小胶质细胞激活的抑制作用及其可能机制 [J]. 中国医疗设备, 2017, 32(S1): 84-85.

[13] Yu Y, Yang Y, Yang M, et al. Hydrogen gas reduces HMGB1 release in lung tissues of septic mice in an Nrf2/HO-1-dependent pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 69: 11-18.

[14] 潘赫男, 李俐涛. 小胶质细胞与缺血性脑卒中研究进展 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(1): 45-47.

[15] 崔雨沙, 路欣, 李峰. 疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 132-136.

[16] 庞红利, 宋俊杰, 范军朝, 等. 七氟醚后处理对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及对 Toll 样受体 4/核因子-κB 信号通路的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(1): 21-25, 29.

[17] 赵丹, 袁林辉, 张静, 等. 七氟醚后处理对大鼠脑缺血-再灌注时氧化应激和炎症反应的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2017, 33(7): 688-692.

[18] 赵敏, 赵品, 葛娜, 等. DHA 对七氟醚诱导小胶质细胞活化的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(7): 823-825.

[19] Dang DD, Saiyin H, Yu Q, et al. Effects of sevoflurane preconditioning on microglia/macrophage dynamics and phagocytosis profile against cerebral ischemia in rats [J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(6): 564-571.

[20] Yu X, Zhang F, Shi J. Effect of sevoflurane treatment on microglia activation, NF-κB and MAPK activities [J]. Immunobiology, 2019, 224(5): 638-644.

〔收稿日期〕2020-12-03

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.
Zhong M, Zhang JY, Rao MR, et al. Effect of the LncRNA SNHG1 on the proliferation and metastasis of skin squamous cell carcinoma induced by interleukin-6 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 74-79.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 011

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

钟 咪*,张佳音,饶美荣,曾 芬

(江南大学附属医院皮肤科,江苏 无锡 214000)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA(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。**方法** 通过 qRT-PCR 检测 SNHG1 的相对表达;采用 CCK8 检测细胞活力;采用 Transwell 检测细胞的迁移和侵袭能力;采用 Western blot 检测 Ki67、MMP-2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达。**结果** 与正常皮肤细胞系 HaCaT,SNHG1 在皮肤鳞状细胞癌细胞系 A431、SCC13、SCL-1 中表达显著增加。不同浓度的 IL-6 诱导 A431 细胞后,SNHG1 相对表达量、细胞活力、迁移细胞数目和侵袭细胞数目显著增加,及上调 Ki67、MMP-2、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,下调 E-cadherin 蛋白表达,呈剂量依赖性。IL-6+si-SNHG1 组的 SNHG1 相对表达、细胞活力、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、Ki-67、MMP-2、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达显著低于 IL-6+si-NC 组,而 E-cadherin 蛋白表达显著高于 IL-6+si-SNHG1 组。**结论** 干扰 SNHG1 表达可以抑制 IL-6 诱导的皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化(EMT)。

【关键词】 SNHG1;IL-6;皮肤鳞状细胞癌细胞;增殖;转移
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0074-06

Effect of the LncRNA SNHG1 on the proliferation and metastasis of skin squamous cell carcinoma induced by interleukin-6

ZHONG Mi*, ZHANG Jiayin, RAO Meirong, ZENG Fen
(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of the long non-coding RNA (LncRNA) SNHG1 on the proliferation and metastasis of skin squamous cell carcinoma induced by interleukin (IL)-6. **Methods** The relative expression of SNHG1 was detected by qRT-PCR, and cell viability was detected using the cell counting kiT-8 assay. The migration and invasion ability of the cells was detected using the Transwell system, and protein expression of the proliferation marker Ki67, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), E-cadherin, N-cadherin and vimentin was detected by Western blot. **Results** Compared with that in the normal skin cell line HaCaT, the expression of SNHG1 was significantly increased in the skin squamous cell carcinoma lines A431, SCC13 and SCL-1. After A431 cells were treated with different concentrations of IL-6, the relative expression of SNHG1, cell viability, and number of migrating and invading cells increased significantly compared with that in untreated cells. Furthermore, the expression of Ki67, MMP-2, N-cadherin and vimentin protein was upregulated, whereas E-cadherin protein was downregulated after IL-6 treatment and the expression was dose-dependent. The relative expression of SNHG1, cell viability, number of migrating and invasive cells, and

[作者简介]钟咪(1982—),女,硕士,研究方向:皮肤病与性病。E-mail: iyvog80@ 163.com

expression of Ki-67, MMP-2, N-cadherin, and vimentin proteins in the IL-6+si-SNHG1 group were significantly lower than those in the IL-6+si-NC group and the expression of E-cadherin protein was significantly higher than that in the IL-6+si-SNHG1 group. **Conclusions** Interference with SNHG1 expression inhibited the proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of skin squamous cell carcinoma cells induced by IL-6.

【**Keywords**】 SNHG1; IL-6; skin squamous cell carcinoma; proliferation; metastasis

皮肤鳞状细胞癌又称为皮肤鳞癌,是临床皮肤科常见的、起源于皮肤表皮或附属器细胞的恶性肿瘤,占所有皮肤癌症的 20%~50%,虽然大多数患者通过外科手术切除,但是还会出现一部分的复发、转移和死亡等现象[1-2]。皮肤鳞状细胞癌发生转移时先扩散至淋巴结群,然后进一步扩散至全身,严重威胁人类的生命安全,目前临床上主要有外科手术、放射治疗、免疫治疗和化学治疗等方法,但是仍会出现一些不良预后影响患者的治疗效果[3-4]。长链非编码 RNA(LncRNA)在多种人类癌症中起着抑癌或促癌的功能,包括皮肤鳞状细胞癌[5]。小核糖体管家基因 RNA1(SNHG1)是从 UHG 转录而来的,位于 11 号染色体上,在多种癌症异常表达,如结直肠癌、肝癌、肺癌和前列腺癌等,而 SNHG1 高表达与晚期的肿瘤分期、肿瘤大小、TNM 分期和较短的总生存期密切相关,可以介导参与多种癌症细胞的增殖、迁移和侵袭等[6-7]。Liu 等[8]研究结果显示,SNHG1 在宫颈癌组织和细胞中高表达,SNHG1 siRNA 可以明显降低宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在大肠癌研究中结果显示,SNHG1 在大肠癌组织中高表达,与患者的总生存期有关,敲低 SNHG1 可以明显抑制大肠癌细胞的增殖[9],但在皮肤鳞状细胞癌中的研究机制尚不明确。IL-6 可从多种细胞(巨噬细胞、T 细胞等)内分泌而来,在免疫疾病和多种癌症中更具有一定的作用效果[10]。因此,本研究通过 IL-6 处理 A431 细胞,旨在探讨 SNHG1 对 IL-6 诱导皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 的作用及其作用机制。

1　材料和方法

1.1　细胞

正常皮肤细胞系 HaCaT 和皮肤鳞状细胞癌细胞系 A431、SCC13、SCL-1 购自上海细胞研究所。

1.2　主要试剂与仪器

重组人 IL-6(批号:041215-0J1017)购自美国 PeproTech 公司;胎牛血清(批号:JC40123)、DMEM 培养基(AB10201724)购自美国 Hyclone 公司;TRIzol 试剂盒(批号:CD203562GM)、反转录试剂盒(批号:43689132)、SYBR Green 试剂盒(批号:RR536A)购自日本 TaKaRa 公司;Lipofectamine™ 3000 试剂(批号:L3010015)购自美国 Thermo Fisher 公司;CCK-8 试剂盒(批号:190210)购自上海全式金公司;Ki67 抗体(批号:4023T)、MMP-2 抗体(批号:1592T)、E-cadherin 抗体(批号:3022T)、N-cadherin 抗体(批号:3321T)、Vimentin 抗体(批号:5637T)和 GAPDH 抗体(批号:2203T)购自美国 CST 公司;BCA 试剂盒(批号 P0037)、ECL 试剂盒(批号 P0072M)购自上海碧云天生物公司;Transwell 小室(批号 3369)购自美国 Millipore 公司;Matrigel 基质胶(批号 356514)购自购自美国 BD 公司;si-NC、si-SNHG1 和引物购自上海吉玛公司。

C1000 型聚合酶链反应扩增仪购自美国 Bio Rad 公司;H1M 全功能酶标仪购自美国伯腾公司;BX51 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司;SDS-PAGE 电泳仪购自北京六一生物公司。

1.3　实验方法

1.3.1　细胞培养和分组

取出冷冻保存的正常皮肤细胞系 HaCaT 和皮肤鳞状细胞癌细胞系 A431、SCC13、SCL-1,解冻后在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液内,然后在室温下、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内进行培养。观察细胞生长状态,待细胞生长至 85%时可进行消化传代培养。取对数生长期的 A431 细胞,调整细胞浓度(1×10^5 个/孔)铺板在 6 孔板内,采取不同浓度的 IL-6(0、0.5、5 和 50 ng/mL)处理细胞,记为不同 IL-6 浓度组,其中 0 ng/mL 记为对照组(Con),50 ng/mL 记为 IL-6 组。将 si-NC 和 si-SNHG1 参照 Lipofectamine™ 3000 试剂盒说明书转染至 A431 细胞内,然后采用 50 ng/mL 的 IL-6 处理,记为 IL-6+si-NC 组和 IL-6+si-SNHG1 组。

1.3.2　qRT-PCR 检测 SNHG1 的表达

取对数生长期 HaCaT、A431、SCC13、SCL-1 细胞和各组 A431 细胞,参照 TRIzol 法提取细胞的总 RNA,在紫外分光光度计下检测 RNA 的纯度和浓度。参照反转录试剂盒合成 cDNA 模板,然后 SYBR Green 试剂配置 PCR 反应体系进行 PCR 扩增。然

后以 18S rRNA 为内参，按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 SNHG1 的表达。SNHG1 的正向引物为：5'-AGGCTGAAGTTACAGGT-3'，反向引物为：5'-TTGGCTCCCAGTGTCTT-3'；18S rRNA 的正向引物为：5'-TACCACATCCAAGGAAGCA-3'，反向引物为：5'-TTTTCGTCACTACCTCCCCGG-3'。

1.3.3 CCK8 检测细胞活力

对数生长期的 A431 细胞，消化后调整细胞密度（4×10^3 个/孔）铺板在 96 孔板内，在室温下、5% CO_2 饱和湿度的培养箱内继续培养 48 h，然后在每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，1 h 后在酶标仪 450 nm 波长处检测各组细胞的吸光度值（OD），细胞活力（%）= 实验组吸光度 OD 值/对照组吸光度 OD 值 ×100%。

1.3.4 Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭

细胞迁移实验：取各组对数生长期的 A431 细胞，用不含血清的 DMEM 培养液制备成细胞悬液，密度为每毫升 5×10^4 个，Transwell 小室的上室加入 200 μL 的细胞悬液，然后在 Transwell 小室的下室加入 600 μL 的含有血清的 DMEM 培养液，在室温下 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内继续培养 24 h，取出小室后擦去没有迁移的细胞，采用 4% 甲醛固定及结晶紫染色，风干后在选择 3 个明亮视野于光学显微镜下观察细胞迁移数目，其中观察到的细胞即为迁移细胞数目。重复 3 次。

细胞侵袭实验：在培养液内按照比例稀释 Matrigel 基质胶，在 Transwell 小室的上室加入每孔 40 μL 稀释的 Matrigel 基质胶，继续培养 5 h 后，后续实验同上述迁移实验。

1.3.5 Western blot 检测 Ki67、MMP-2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达

取对数生长期的 A431 细胞，在冰上裂解蛋白，30 min 后采取 BCA 试剂盒检测定量总蛋白的浓度，取 50 μg 的上样蛋白进行凝胶电泳处理分离蛋白样品，将分离的蛋白样品转膜，采用 5% 脱脂牛奶封闭，培养 1 h 后加入一抗 Ki67、MMP-2、E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin，过夜孵育，加入二抗，2 h 后加入 ECL 电化学发光液，显影，采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，以 GAPDH 为内参。

1.4 统计学方法

所有试验设置 3 次重复，结果在 SPSS 22.0 软件中进行统计分析，计量资料以平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，四组间比较采用单因素方差分析，采用 SNK-q 检验组间比较。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SNHG1 在皮肤鳞状细胞癌细胞中的表达

与正常皮肤细胞系 HaCaT 相比，皮肤鳞状细胞癌细胞系 A431、SCC13、SCL-1 中 SNHG1 的相对表达量明显增加（$P<0.05$），见表 1。本研究通过选取差异较大的 A431 细胞进行后续实验。

2.2 不同浓度 IL-6 诱导 A431 细胞后 SNHG1 表达

选取不同浓度（0、0.5、5 和 50 ng/mL）的 IL-6 诱导 A431 细胞后，结果显示，随着 IL-6 浓度的增加，SNHG1 相对表达量逐渐增加（$P<0.05$）。见表 2。

2.3 不同浓度 IL-6 对 A431 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

选取不同浓度（0、0.5、5 和 50 ng/mL）的 IL-6 诱导 A431 细胞后，结果显示，随着 IL-6 浓度的增加，细胞活力、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、Ki67 和 MMP-2 蛋白表达逐渐增加（$P<0.05$）。见图 1、表 3。

表 1 SNHG1 在皮肤鳞状细胞癌细胞中的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）
Table 1 Expression of SNHG1 in skin squamous cell carcinoma

分组 Groups	SNHG1
HaCaT	1.02±0.08
A431	2.33±0.21*
SCC13	1.82±0.17*
SCL-1	1.55±0.13*
F	111.477
P	0.000

注：与 HaCaT 相比，*$P<0.05$。
Note. Compared with HaCaT, *$P<0.05$.

表 2 不同浓度 IL-6 诱导 A431 细胞后 SNHG1 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）
Table 2 Expression of SNHG1 in A431 cells induced by different concentrations of IL-6

IL-6 浓度 IL-6 concentration	SNHG1
0 ng/mL	0.92±0.07
0.5 ng/mL	1.27±0.11*
5 ng/mL	1.52±0.13*
50 ng/mL	2.11±0.18*
F	136.416
P	0.000

注：与 0 ng/mL 相比，*$P<0.05$。
Note. Compared with 0 ng/mL, *$P<0.05$.

2.4　不同浓度 IL-6 对 A431 细胞 EMT 的影响

选取不同浓度(0、0.5、5 和 50 ng/mL)的 IL-6 诱导 A431 细胞后,结果显示,随着 IL-6 浓度的增加,E-cadherin 蛋白表达逐渐降低($P<0.05$);而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达逐渐增加($P<0.05$)。见图 2、表 4。

2.5　干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与 Con 组相比,IL-6 组的 SNHG1 相对表达、细胞活力、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、Ki-67 和 MMP-2 蛋白表达明显增加($P<0.05$);与 IL-6+si-NC 组相比,IL-6+si-SNHG1 组的 SNHG1 相对表达、细胞活力、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、Ki-67 和 MMP-2 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图 3、表 5。

2.6　干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞 EMT 的影响

与 Con 组相比,IL-6 组的 E-cadherin 蛋白表达明显降低($P<0.05$);而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达明显增加($P<0.05$);与 IL-6+si-NC 组相比,IL-6+si-SNHG1 组的 E-cadherin 蛋白表达明显增加($P<0.05$);而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图 4、表 6。

表 3　不同浓度 IL-6 对 A431 细胞增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 3　Effects of different concentrations of IL-6 on the proliferation, migration and invasion of A431 cells

IL-6 浓度 IL-6 concentration	细胞活力(%) Cell viability	细胞迁移数目 Number of cell migration	细胞侵袭数目 Number of cell invasion	Ki67	MMP-2
0 ng/mL	47.3±3.7	36.5±2.7	32.1±2.5	0.95±0.07	0.97±0.08
0.5 ng/mL	61.5±5.3*	57.3±5.4*	51.4±3.7*	1.27±0.11*	1.39±0.14*
5 ng/mL	75.8±4.7*	93.1±7.2*	86.5±6.5*	1.61±0.17*	1.58±0.16*
50 ng/mL	88.3±6.2*	144.6±11.2*	138.7±10.8*	1.86±0.15*	1.76±0.17*
F	110.660	377.256	440.757	82.996	51.354
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与 0 ng/mL 相比,*$P<0.05$。

Note. Compared with 0 ng/mL, *$P<0.05$.

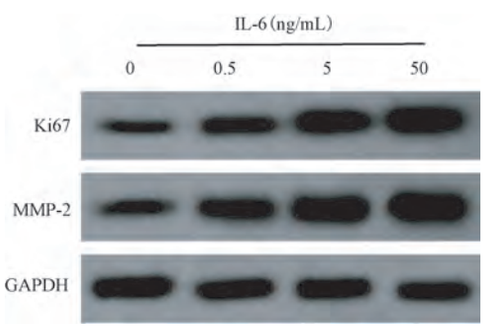


图 1　不同浓度 IL-6 对 A431 细胞中 Ki-67 和 MMP-2 蛋白表达的影响

Figure 1　Effect of different concentrations of IL-6 on Ki-67 and MMP-2 protein expression in A431 cells

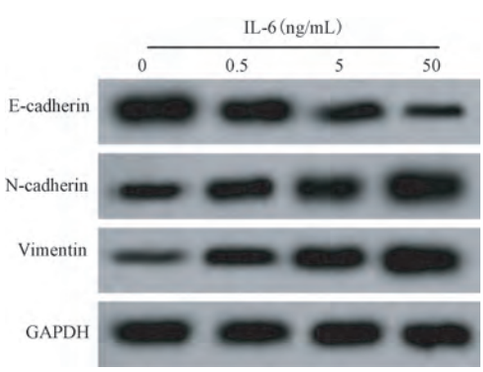


图 2　不同浓度 IL-6 对 A431 细胞 EMT 的影响

Figure 2　Effect of different concentrations of IL-6 on EMT of A431 cells

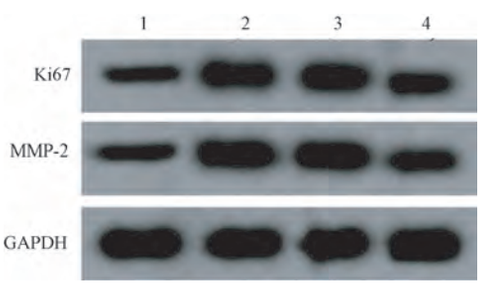
表 4　不同浓度 IL-6 对 A431 细胞 EMT 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 4　Effect of different concentrations of IL-6 on EMT of A431 cells

IL-6 浓度 IL-6 concentration	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
0 ng/mL	0.92±0.07	0.96±0.08	0.99±0.08
0.5 ng/mL	0.74±0.05*	1.25±0.14*	1.31±0.15*
5 ng/mL	0.57±0.05*	1.59±0.17*	1.77±0.17*
50 ng/mL	0.36±0.03*	1.83±0.18*	1.92±0.19*
F	190.528	60.052	69.709
P	0.000	0.000	0.000

注:与 0 ng/mL 相比,*$P<0.05$。

Note. Compared with 0 ng/mL, *$P<0.05$.



注:1:Con 组;2:IL-6 组;3:IL-6+si-NC 组;4:IL-6+si-SNHG1 组。

图 3　干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞中 Ki-67 和 MMP-2 蛋白表达的影响

Note. 1, Con group. 2, IL-6 group. 3, IL-6+si-NC group. 4, IL-6+si-SNHG1 group.

Figure 3　Effect of interference with SNHG1 on IL-6-induced Ki-67 and MMP-2 protein expression in A431 cells

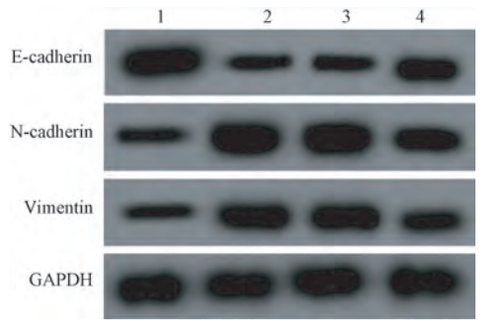
表 5 干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞增殖、迁移和侵袭的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 5 Effect of interference with SNHG1 on the proliferation, migration and invasion of A431 cells induced by IL-6

分组 Groups	SNHG1	细胞活力(%) Cell viability	细胞迁移数目 Number of cell migration	细胞侵袭数目 Number of cell invasion	Ki-67	MMP-2
Con	1.02±0.08	48.4±5.3	42.3±3.4	35.3±2.7	0.99±0.07	0.98±0.08
IL-6	2.36±0.24*	82.5±6.7*	116.7±9.7*	104.3±9.8*	1.72±0.17*	1.71±0.16*
IL-6+si-NC	2.32±0.21	83.9±7.1	110.4±10.5	97.8±7.5	1.70±0.16	1.68±0.17
IL-6+si-SNHG1	1.67±0.16#	66.8±5.2#	78.7±5.4#	65.4±5.2#	1.36±0.14#	1.42±0.13#
F	107.890	65.861	171.221	195.775	53.095	52.793
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001

注:与 Con 组相比,*$P<0.05$;与 IL-6+si-NC 组相比,#$P<0.05$。

Note. Compared with con group, *$P<0.05$. Compared with IL-6+si-NC group, #$P<0.05$.



注:1:Con 组;2:IL-6 组;3:IL-6 + si-NC 组;4:IL-6+si-SNHG1 组。

图 4 干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞 EMT 的影响

Note. 1, Con group. 2, IL-6 group. 3, IL-6+si-NC group. 4, IL-6 +si-SNHG1 group.

Figure 4 Effect of interference with SNHG1 on IL-6-induced EMT in A431 cells

表 6 干扰 SNHG1 对 IL-6 诱导 A431 细胞 EMT 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

Table 6 Effect of interfering with SNHG1 on IL-6-induced EMT in A431 cells

分组 Groups	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
Con	0.95±0.08	1.02±0.07	1.01±0.08
IL-6	0.43±0.04*	1.87±0.18*	1.87±0.17*
IL-6+si-NC	0.45±0.05	1.85±0.17	1.89±0.18
IL-6+si-SNHG1	0.71±0.06#	1.42±0.15#	1.38±0.14#
F	154.128	66.264	73.935
P	0.000	0.000	0.000

注:与 Con 组相比,*$P<0.05$;与 IL-6+si-NC 组相比,#$P<0.05$。

Note. Compared with con group, *$P<0.05$. Compared with IL-6+si-NC group, #$P<0.05$.

3 讨论

IL-6 细胞因子家族成员众多,主要由 IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、OSM、LIF、CNTF、CT-1 和 CLCF1 组成,IL-6 可以激活下游的细胞内的信号通路参与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 等生物学过程[11-12]。徐书方等[13]研究结果显示,IL-6 处理宫颈癌细胞后,miR-152 可以通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路抑制 IL-6 诱导宫颈癌细胞的增殖和侵袭。向飞等[14]研究结果显示,采用不同浓度的 IL-6 诱导食管癌细胞后,IL-6 呈剂量依赖性抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并下调 SOCS3、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达,过表达的 SOCS3 可以抑制 IL-6 诱导的增殖、迁移和侵袭,这与本研究结果相似。邵扬谦等[15]研究结果显示,IL-6 呈剂量和时间依赖性促进甲状腺癌细胞的 lnc TCF7 表达,选择 50 μg/L的 IL-6 处理甲状腺癌细胞后,明显促进甲状腺癌细胞的迁移和侵袭,下调 E-cadherin 蛋白表达,上调 Vimentin、Snail 和 Slug 蛋白表达,敲减 lnc TCF7 可以减缓 IL-6 诱导的甲状腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT。IL-6、IL-1β、IL-17A 和 OSM 等在皮肤鳞状细胞癌组织高表达,其中 OSM 差异较大,与 1 型免疫极化有关,可以促进正常角质形成细胞的增殖、迁移[16]。本研究结果显示,我们通过采取不同浓度的 IL-6 处理 A431 细胞后结果显示,IL-6 呈剂量依赖性诱导细胞活性、迁移细胞数目和侵袭细胞数目,以及上调 Ki67、MMP-2、N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,下调 E-cadherin 蛋白表达。E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 是 EMT 的标记蛋白,在癌症发展过程中,上皮肿瘤细胞可能会进行 EMT,导致细胞在形态和功能上发生改变,导致上皮标志物 E-cadherin 的丢失,导致细胞极性改变,促进间充质蛋白 N-cadherin 和 Vimentin 的表达[17]。上述结果显示,IL-6 可以促进 A431 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT。

越来越多的结果显示,LncRNA 可以作为皮肤鳞状细胞癌的生物标志物,如 LINC00319 在皮肤鳞状细胞癌组织和细胞中高表达,通过 χ^2 测试发现 LINC00319 高表达与肿瘤大小、晚期 TNM 分期和淋巴管浸润密切相关,LINC00319 通过上调 miR-1207-5p 抑制皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡,阻滞细胞周期[18]。LINC00162

(PICSAR)在皮肤鳞状细胞癌细胞中高表达,抑制 LINC00162 可以明显抑制皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖和迁移[19]。Mei 等[20]研究结果显示,通过微阵列分析筛选皮肤鳞状细胞癌样品中差异表达的 lncRNA,结果发现,LINC00520 低表达,LINC00520 通过靶向 EGFR 激活 PI3K/AKT 信号通路抑制皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移和侵袭,这与本研究结果不一致。李珊珊等[21]通过 qRT-PCR 和原位杂交检测 MALAT1 的表达,结果显示,MALAT1 在皮肤鳞癌组织中高表达,下调 MALAT1 可以明显抑制皮肤鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT。SNHG1 在多种癌症中异常表达,如 SNHG1 在胃癌组织中高表达,与 TNM 分期、淋巴结转移和较低的总生存率密切相关,干扰 SNHG1 可以明显抑制胃癌细胞的增殖[22],这说明 SNHG1 可以作为癌症的潜在生物标记物。本研究结果显示,SNHG1 在皮肤鳞状细胞癌细胞中高表达,采用不同浓度的 IL-6 处理 A431 细胞后,IL-6 呈剂量依赖性诱导 SNHG1 的表达,进一步实验结果显示,干扰 SNHG1 可以部分回复 IL-6 诱导的 A431 细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 的作用,这说明 SNHG1 可以参与 IL-6 诱导的皮肤鳞状细胞癌细胞的增殖和转移。

综上所述,IL-6 诱导皮肤鳞状细胞癌细胞中 SNHG1 表达上调,干扰 SNHG1 可以减缓 IL-6 诱导的增殖、迁移、侵袭和 EMT,为皮肤鳞状细胞癌提供新的诊断标志物。

参考文献:

[1] Waldman A, Schmults C. Cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2019, 33(1): 1-12.

[2] Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging [J]. J Am Acad Dermatol, 2018, 78(2): 237-247.

[3] 王晓晴, 刘珍如, 刘梦茜, 等. 原发性皮肤鳞状细胞癌淋巴结转移的评估与治疗 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2020, 36(11): 701-704.

[4] Manyam BV, Garsa AA, Chin RI, et al. A multi-institutional comparison of outcomes of immunosuppressed and immunocompetent patients treated with surgery and radiation therapy for cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Cancer, 2017, 123(11): 2054-2060.

[5] Wang Y, Sun B, Wen X, et al. The roles of lncRNA in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. Front Oncol, 2020, 10: 158.

[6] Thin KZ, Tu JC, Raveendran S. Long non-coding SNHG1 in cancer [J]. Clin Chim Acta, 2019, 494: 38-47.

[7] Xiao B, Huang Z, Zhou R, et al. The prognostic value of expression of the long noncoding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 1 (SNHG1) in patients with solid malignant tumors: A systematic review and meta-analysis [J]. Med Sci Moni, 2018, 24: 5462-5472.

[8] Liu Y, Yang Y, Li L, et al. LncRNA SNHG1 enhances cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer [J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(1): 38-43.

[9] Xu M, Chen X, Lin K, et al. The long noncoding RNA SNHG1 regulates colorectal cancer cell growth through interactions with EZH2 and miR-154-5p [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 141.

[10] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(10): a016295.

[11] Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(12): 773-789.

[12] Liu XL, Zhang XT, Meng J, et al. ING5 knockdown enhances migration and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via EGFR/PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways [J]. Oncotarget, 2017, 8(33): 54265-54276.

[13] 徐书方, 刘立秋, 张玉清, 等. miR-152 在 IL-6 诱导宫颈癌 Hela 细胞增殖和侵袭中的作用及其机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(11): 1338-1342.

[14] 向飞, 夏良钱. 过表达 SOCS3 抑制 IL-6 诱导的食管癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(5): 618-623.

[15] 邵扬谦, 周斌, 孙加强, 等. IL-6 通过诱导 lncTCF7 表达促进甲状腺乳头状癌 TPC-1 细胞上皮-间充质转化、迁移和侵袭 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2): 253-259.

[16] Simonneau M, Frouin E, Huguier V, et al. Oncostatin M is overexpressed in skin squamous-cell carcinoma and promotes tumor progression [J]. Oncotarget, 2018, 9(92): 36457-36473.

[17] Paolillo M, Schinelli S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4947.

[18] Li F, Liao J, Duan X, et al. Upregulation of LINC00319 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(12): 10393-10405.

[19] Piipponen M, Nissinen L, Farshchian M, et al. Long noncoding RNA PICSAR promotes growth of cutaneous squamous cell carcinoma by regulating ERK1/2 activity [J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(8): 1701-1710.

[20] Mei XL, Zhong S. Long noncoding RNA LINC00520 prevents the progression of cutaneous squamous cell carcinoma through the inactivation of the PI3K/Akt signaling pathway by downregulating EGFR [J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(4): 454-465.

[21] 李姗姗, 周良, 高琳, 等. 长链非编码 RNA MALAT1 促进皮肤鳞癌的发生和发展 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(4): 421-427.

[22] Hu Y, Ma Z, He Y, et al. LncRNA-SNHG1 contributes to gastric cancer cell proliferation by regulating DNMT1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 491(4): 926-931.

〔收稿日期〕2020-12-25

梁燕,刘龙丁,杨梦莉,等. ABSL-3 实验室中恒河猴饲养的微生物风险控制[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 80-86.
Liang Y, Liu LD, Yang ML, et al. Microbiological risk control for rhesus monkeys in animal biosafety level 3 laboratories[J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 80-86.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.02.012

ABSL-3 实验室中恒河猴饲养的微生物风险控制

梁 燕,刘龙丁,杨梦莉,李敬美,郭 磊,李 恒,郑惠文,李 菁,施海晶*

(中国医学科学院医学生物学研究所,昆明 650118)

【摘要】 目的 在动物生物安全三级(ABSL-3)实验室内以指示微生物对恒河猴饲养及冲洗过程所产生的浮游菌气溶胶进行模拟检测。**方法** 采用赛多利斯 Airport MD 8 便携式浮游菌采样仪对 ABSL-3 实验室猴笼地面排泄物及排水口滤篮处进行采样检测。检测方法包括:气溶胶活细胞检测及浮游菌 PCR 检测。**结果** (1)静止状态下有<5 个细菌生长;(2)饲养状态下,地面细菌培养计数达约 30 个/皿,酵母生长数为 1 个/皿,排水口的细菌计数>300 个/皿,伴有>10 个/皿酵母生长;(3)对比试验结果显示,严格按照清洁处理 SOP 操作较未遵循 SOP 而言,细菌及酵母生长明显减少,且在吸水垫上未检测到细菌 DNA。**结论** 在 ABSL-3 实验室严格执行恒河猴饲养清洁 SOP 能够有效控制微生物污染的风险。

【关键词】 ABSL-3;气溶胶;浮游菌检测
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0080-07

Microbiological risk control for rhesus monkeys in animal biosafety level 3 laboratories

LIANG Yan, LIU Longding, YANG Mengli, LI Jingmei, GUO Lei, LI Heng, ZHENG Huiwen, LI Jing, SHI Haijing*
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To simulate the detection of plankton-aerosols generated by the rearing and flushing of rhesus monkeys using standard operating procedure (SOP) for microbes in an animal biosafety level 3 (ABSL-3) laboratory. **Methods** The ground excreta and filter basket at the outlets of the monkey cages were measured during the stationary or feeding state. The SOP for feeding the monkeys and cleaning the cages was either not strictly followed or was strictly followed. A bacillus bacterium was used as the indicator microorganism and aerosols were collected using the Sedolis Airport MD 8 portable plankton sampler. The detection method included live cell cultures and PCR detection. **Results** (1) In the stationary state, there were < 5 bacteria. (2) In the feeding state, the bacterial culture count from the floor of the monkey cage was approximately 30/dish. The yeast growth number was 1/dish, and the bacterial count in the filter basket at the drain outlet was > 300/dish accompanied by the growth of > 10/dish. (3) The comparative test result demonstrated that the growth of bacteria and yeast was significantly reduced when strict SOP was followed for cleaning compared with not following the SOP. No bacterial DNA was detected on the absorbent mat. **Conclusions** The risk of microbiological contamination can be effectively controlled by strict implementation of SOPs for feeding and cleaning cages of rhesus monkeys in the ABSL-3 laboratory.

【Keywords】 ABSL-3; aerosol; phytoplankton detection

[基金项目]云南省卫生健康委员会医学学科带头人(D-2018037)。
[作者简介]梁燕(1975—),女,博士,副研究员,研究方向:生物安全及病毒免疫。E-mail:524952245@qq.com
[通信作者]施海晶(1971—),女,硕士,主任技师,研究方向:生物安全及病毒免疫。E-mail:shihj@imbcams.com.cn

近年来,埃博拉、尼帕、高致病性禽流感等疾病的爆发与蔓延,进一步引起了全世界卫生组织的高度重视和公众的广泛关注[1-3]。尤其新型冠状病毒肺炎更是受到了世界各国和世界卫生组织的高度重视[4]。为了研究这些致病性强、传染性高、目前尚无特异性预防和治疗的传染病的控制措施,许多国家先后建立了高等级生物安全实验室(BSL3/4 实验室)和高等级动物生物安全实验室(ABSL3/4 实验室)[5-8]。BSL3/4 实验室和 ABSL3/4 实验室在设计原则上基本一致,但由于动物实验的特殊性及其具有更高的风险性,使得 ABSL3/4 实验室在防护要求上更高于 BSL3/4 实验室。研究人员需经严格生物安全实验室操作规范培训,熟悉 ABSL-3/4 实验室操作及紧急事故处理办法,才能真正降低生物安全隐患,杜绝生物安全事故的发生[9-10]。

ABSL-3/4 实验室内饲养的实验动物为人工感染致死性或烈性感染性病原微生物的实验动物,其中,恒河猴由于其体型较大、动作敏捷、攻击性强、容易抓伤咬伤工作人员,从而给在 ABSL-3/4 实验室中恒河猴实验带来了极高的生物安全风险[11]。除此之外,实验过程中每日产生的饲养废弃物这个易被忽略的环节亦隐藏着极大的生物安全隐患。一般来说,恒河猴生物安全笼具是通过密封、负压、单向气流等措施来保证人和环境的安全。恒河猴每日均产生排泄物,但这些带有感染性病原微生物的排泄物极其可能通过气溶胶传播的方式给实验人员和环境带来极大的风险。因而,本文结合中国医学科学院医学生物学研究所大动物生物安全实验室的恒河猴饲养实验,以指示微生物对饲养过程中排泄物及冲洗过程所产生的浮游菌气溶胶进行模拟检测,同时对按照标准操作规程处理后的浮游菌进行检测,以资对 ABSL-3 实验室中恒河猴饲养废弃物的清洁消毒处理操作有效性进行评价分析。

研究选用芽孢杆菌为指示微生物,采用便携式浮游菌采样仪分别对静止状态下、活动(饲养)状态下、以及指示菌感染状态下是否按照 SOP 进行清洁消毒处理的猴笼地面及冲洗排水口处进行浮游菌采集及检测,从而对 ABSL-3 中恒河猴动物实验室的饲养及清洁标准操作规程的有效性进行评估及分析,以保证最大程度降低 ABSL-3 实验室中恒河猴动物实验的生物安全风险。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级雌性恒河猴 2 只,1~2 岁,体重 2.5~3 kg,来源于中国医学科学院医学生物学研究所医学灵长类研究中心[SCXK(滇)K2017-0002],饲养于中国医学科学院医学生物学研究所[SYXK(滇)K2015-0006]。实验内容经本单位动物实验伦理审查委员会审查通过(DWSP201804006),实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予实验动物人道的关怀。

1.2　主要试剂与仪器

细菌培养皿(sartorius stedim caso Agar TSA Agar BACTair™, lot 846106);酵母培养皿(sartorius stedim sabouraud Agar BACTair™, lot 846304);膜收集皿(sartoriusstedim Gelatinepisposables,批号 846106);芽孢杆菌(*Bacillus arophaeus* ATCC 9372, Microbiologics,批号 0953P);细胞周期试剂盒(Cell cycle staining kit(Multisciences),批号 70-CCS012);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根,批号 DP302)。Airport MD 8 便携式浮游菌采样仪(德国赛多利斯公司);流式细胞仪 CYTOFLEX(美国贝克曼公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　实验动物饲养

动物饲养于中国医学科学院医学生物学研究所 ABSL-3 实验室恒河猴笼具中,该实验室符合国标《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2008)和世界卫生组织《实验室生物安全手册》的要求。恒河猴笼具为开放式猴笼(见图 1),采用双层设计,内层含直饮水喷嘴,外层门为锁扣式,配有方便装卸的饲料盒,笼具下层设置托盘用于收纳猴排泄物及废弃物。笼具及托盘后方连接排水口,排水口近端放置一次性金属滤篮,用于收集可能导致堵塞的大颗粒排泄物。恒河猴每日早晚各喂食 1 次,并采用冲洗装置每日冲洗笼具。

1.3.2　ABSL3 实验室恒河猴饲养及清洁 SOP 及未遵循 SOP 的操作方法比较

根据《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2008)的规定,同时结合本 ABSL3 实验室猴笼装置具体情况,制定了符合要求的 ABSL3 实验室恒河猴饲养及清洁 SOP。

(1)猴笼地面铺置吸水垫:每日于猴笼地面铺

置吸水垫,长度环绕猴笼 1 周,宽度约 40 cm,以防止饲料或排泄物直接掉落于地面上。

(2)排泄物处置:如地面吸水垫上掉落实验猴排泄物,取吸水纸覆盖于排泄物上,在吸水纸上倾倒足量 84 消毒液原液,静置 10 min 后,将吸水垫卷曲包裹吸水纸,弃至废弃物收集桶,并铺置新的吸水垫。

(3)采用 ABSL-3 实验室冲洗装置每日清水冲洗猴笼 1 次,水量调至中档,轻柔冲洗,以所有排泄物全部冲净至排水口滤篮处为准。

(4)排水口滤篮内截留了冲洗的固体排泄物,倾倒足量 84 消毒液原液于排泄物上,静置 10 min 后,轻取滤篮置于垃圾袋中,弃至废弃物收集桶。

为验证严格执行 SOP 对 ABSL3 实验室恒河猴饲养的微生物风险控制效果,特与未遵循 SOP 的操作方法进行列表对比,见表 1。

1.3.3 采样方案设计

共 4 个采集状态(见表 2)。第 1 个采集状态为静止状态下采样;第 2 个为动态(饲养)状态下采样;第 3 个和第 4 个状态均在使用芽孢杆菌为指示微生物的状态下,将芽孢杆菌 10^7 spores/mL 分别滴至猴笼地面排泄物及冲水时排水口滤篮内的排泄物,其中采样状态 3 为未严格按照饲养及清洁标准操作规程进行的状态;采样状态 4 为严格按照标准操作规程处理后采样。

每个采集状态的采样均于不同时间点重复 3 次,最后取平均值进行菌落计数。

1.3.4 采样方法

采用赛多利斯 Airport MD 8 便携式浮游菌采样仪采集环境中的浮游菌(见图 2),使用方法详见说明书,每次采集 1000 L。分别内置细菌培养皿、酵母培养皿和膜收集皿。其中,采集后细菌培养皿置 30℃~35℃培养 3~5 d,酵母培养皿置 20℃~25℃培养 3~5 d,后进行菌落计数;膜收集皿则在采样完成后,将膜取出,用 30 mL PBS 溶解,4℃过夜,后 2000 r/min 离心弃沉淀,上清采用 50000 分子量超速离心管 3000 r/min 离心浓缩至终体积 1 mL。

注:*:排水口近端。

图 1 恒河猴笼具

Note. *, Proximal end of the drain.

Figure 1 Cage of rhesus monkeys

1.3.5 气溶胶活细胞检测

取浓缩的滤膜溶液,采用细胞周期试剂盒染色,具体操作参照说明书进行:100 μL 浓缩滤膜液,加入 1 mL DNA staining solution,及 10 μL permeabization solution,混匀,室温孵育 30 min 后,流式细胞仪上机检测。

1.3.6 浮游菌 PCR 检测

采用细菌组 DNA 提取试剂盒提取浓缩滤膜液的细菌 DNA,引物序列(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',338R:5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'),使用 ExTaq(TaKaRa)进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 统计学软件,对数据计算均值,以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行相关数据分析。

2 结果

2.1 静止状态下的气溶胶检测

在静止状态下,分别对动物室门入口处及猴笼地面进行浮游菌采集,流式细胞仪结果显示在未进行饲养活动的状态下,动物室门入口及猴笼地面的

图 2 赛多利斯 Airport MD 8 便携式浮游菌采样仪

Figure 2 Sartorius portable plankton sampler (Airport MD 8)

活性颗粒物均较少,其中,门入口处略高;重复培养结果显示,静止状态下有<5 个细菌生长,但无酵母生长;同时在入口及地面的细菌 DNA 检测也验证了上述结果。(见图 3)

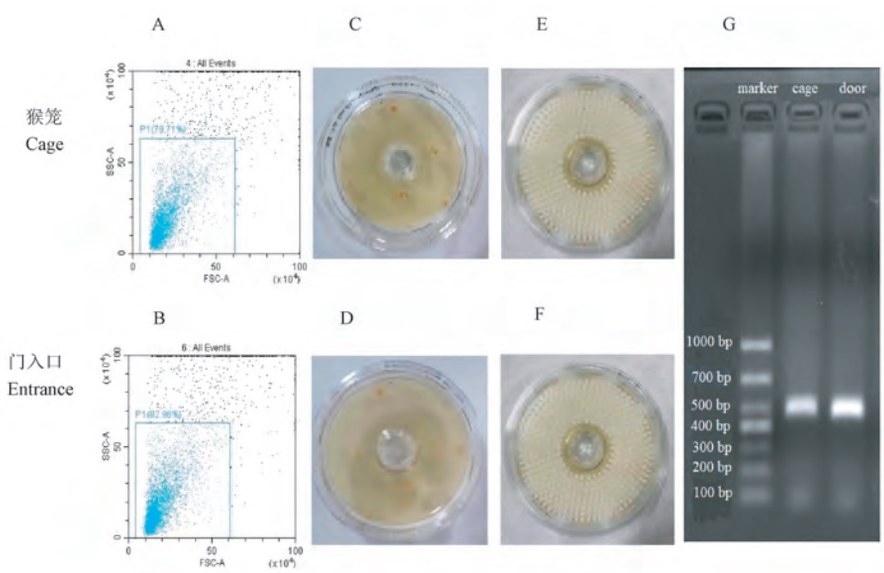
2.2　常规活动状态下的气溶胶检测

对饲养时猴笼地面进行浮游菌采集,流式细胞仪结果显示活性颗粒较静止状态略有升高,同时细菌培养计数达约 30 个/皿,酵母生长数均为 1 个/皿。而在冲洗猴笼时,排水口滤篮处的浮游菌活性颗粒明显增加,同时,细菌计数>300 个/皿,伴有>10 个/皿酵母生长。(见图 4)

表 1　严格执行 SOP 与未遵循 SOP 的操作方法比较

Table 1　Comparison of operation methods between strictly following the SOP and not following the SOP

操作要点 Operation points	SOP 要求 Requirements of SOP	未遵循 SOP 的操作方法 Not following SOP
地面铺置吸水垫 Floor with an absorbent pad	是 Yes	否 No
地面排泄物处置 Disposal of waste in floor	足量 84 消毒原液,静置 10 min Adequate amount of 84 disinfectant, standing for 10 minutes	适量 1∶100 稀释的 84 消毒液 Appropriate amount of 1∶100 diluted 84 disinfectant
猴笼冲洗方式 Way of flushing	水量调至中档,轻柔冲洗 Set the water level to medium and rinse gently	水量调至高档,快速冲洗 Water level to high grade and rinse quickly
滤篮内排泄物处置 Disposal of waste in filter basket	足量 84 消毒液原液,静置 10 min Adequate amount of 84 disinfectant, standing for 10 minutes	适量 1∶100 稀释的 84 消毒液 Appropriate amount of 1∶100 diluted 84 disinfectant



注:在静止状态下,分别对动物室猴笼地面及门入口处进行浮游菌采集。A/B:猴笼处或门入口处的气溶胶活细胞比例;C/D:猴笼处或门入口处的细菌培养皿生长情况;E/F:猴笼处或门入口处的酵母培养皿生长情况;G:猴笼处或门入口处的细菌 DNA 脂糖凝胶电泳检测。

图 3　ABSL-3 实验室静止状态下猴笼地面及动物室门入口处微生物检测分析

Note. In the stationary state, collecting the plankton in the floor of the monkey cage and at the door entrance. A/B, Proportion of aerosol living cells in the floor of the cage or at the door entrance. C/D, Growth of bacteria in petri dishes in the floor of the cage or at the door entrance. E/F, Growth of yeast culture dishes in the floor of the cage or at the door entrance. G, Detection of bacterial DNA by lipid and sugar gel electrophoresis in the floor of the cage or at the door entrance.

Figure 3　Detection and analysis of microorganism in ABSL-3 laboratory raised in the floor of the monkey cage and at the entrance of the animal chamber under the stationary state

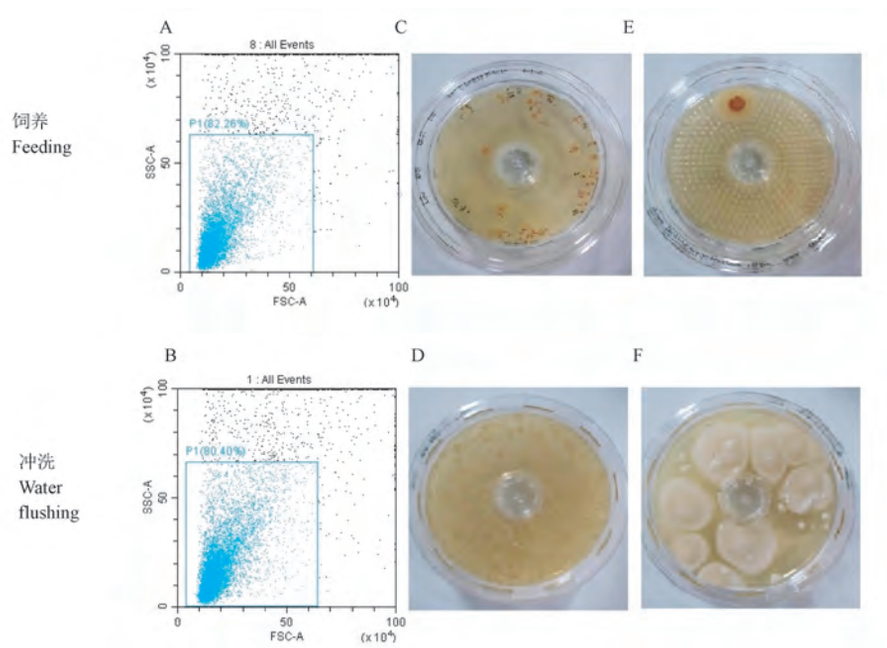
表 2 采样状态表

Table 2 Sampling time and state

取样时间 Sampling time	静止状态 Stationary state		活动状态 Active state		芽孢杆菌 10^7 spores/mL *Bacillus arophaeus*				ABSL-3 温度(℃) Temperature	ABSL-3 气压(Pa) Air pressure
					未按照 SOP No SOP		严格执行 SOP Strictly following the SOP			
	猴笼地面 Floor of the cage	门入口 Entrance	饲养 Feeding	冲洗 Flushing	饲养 Feeding	冲洗 Flushing	饲养 Feeding	冲洗 Flushing		
第 1 天 Day 1	+	+	/	/	/	/	/	/	20.0	−148
第 2 天 Day 2	/	/	+	+	/	/	/	/	20.5	−150
第 3 天 Day 3	/	/	/	/	+	+	/	/	20.5	−150
第 4 天 Day 4	/	/	/	/	/	/	+	+	21.0	−149

注:共计 4 个采样状态,每个采样状态均包含两个采样点。其中静止状态下采样点分别为动物室门入口处及猴笼地面,其余 3 个采样状态的采样点均分别为猴笼地面排泄物及冲洗时排水口滤篮处。

Note. There are four sampling states, each of which contains two sampling points. The sampling points in the stationary state were the floor of the monkey and the door entrance, and the sampling points of the other three states were the waste on the ground of the monkey cage and the filter basket of the drain outlet during flushing.



注:在饲养状态下,分别对猴笼地面饲养废弃物及冲洗时排水口滤篮处废弃物进行浮游菌采集。A/B:猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的气溶胶活细胞比例;C/D:猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的细菌培养皿生长情况;E/F:猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的酵母培养皿生长情况。

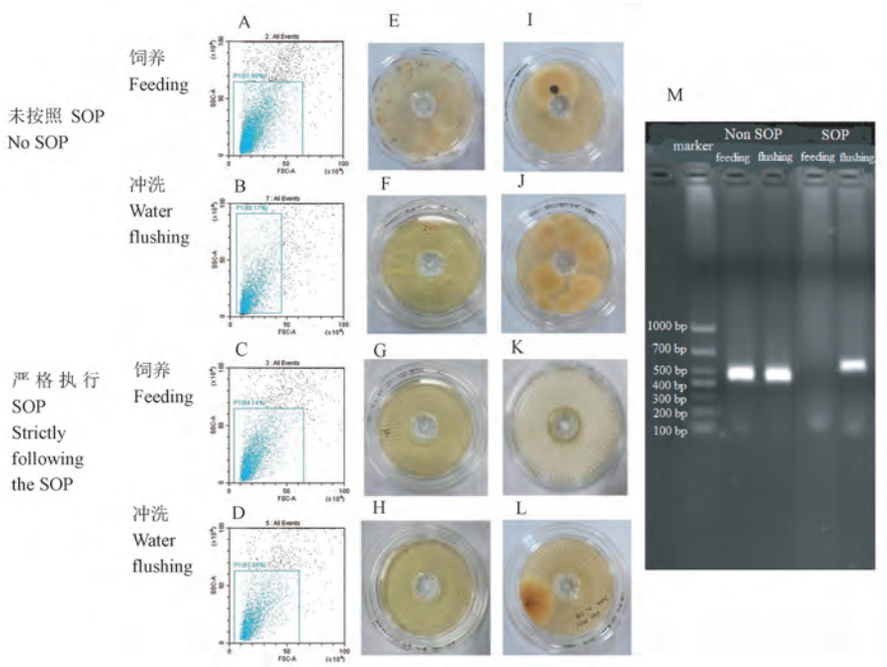
图 4 ABSL-3 实验室活动状态下猴笼地面饲养废弃物及冲洗时排水口滤篮处废弃物微生物检测分析

Note. Under the feeding condition, collecting the floating bacteria of feeding waste from the monkey cage floor or waste from the filter basket of the drainage outlet during water flushing. A/B, Proportion of aerosol living cells of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet during water flushing. C/D, Growth of bacterial petri dishes of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet during water flushing. E/F, Growth of yeast petri dishes of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet during water flushing.

Figure 4 Microbial detection and analysis of the waste in ABSL-3 laboratory raised on the ground of the monkey cage under the active condition and the waste at the filter basket of the drainage outlet during water flushing

2.3　采用芽孢杆菌指示菌后未按照或严格按照 SOP 操作的气溶胶检测

在人工将 10^7 spores/mL 的芽孢杆菌分别滴至猴笼地面上的排泄物及冲洗时排水口滤篮内的排泄物时，首先对未按照 SOP 进行消毒处理的猴笼地面排泄物及冲洗时排水口滤篮内的排泄物进行浮游菌采集，流式细胞仪结果表明气溶胶颗粒明显上升，同时细菌培养及细菌核酸检测均有大量细菌生长，并伴随酵母生长。而当我们严格按照饲养及清洁 SOP 程序对猴笼地面排泄物及冲洗时排水口滤篮内的排泄物进行处理后，结果显示气溶胶颗粒大大降低，同时细菌及酵母生长明显减少，且在饲养过程中的猴笼地面排泄物中没有检测到细菌 DNA。（见图 5）



注：以芽孢杆菌为指示微生物，分别未按照 SOP 和严格执行 SOP 的猴笼地面饲养废弃物及冲洗时排水口滤篮处废弃物进行浮游菌采集。A/B：未按照 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的气溶胶活细胞比例；C/D：严格执行 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的气溶胶活细胞比例；E/F：未按照 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的细菌培养皿生长情况；G/H：严格执行 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的细菌培养皿生长情况；I/J：未按照 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的酵母培养皿生长情况；K/L：严格执行 SOP 时，猴笼地面饲养废弃物或冲洗时排水口滤篮处废弃物的酵母培养皿生长情况。M：未按照 SOP 和严格执行 SOP 的猴笼地面饲养废弃物及冲洗时排水口滤篮处废弃物的细菌 DNA 脂糖凝胶电泳检测。

图 5　ABSL-3 实验室活动状态下未按照 SOP 和严格执行 SOP 猴笼地面饲养废弃物及冲洗时排水口滤篮处废弃物微生物检测分析

Note. *Bacillus* was used as the indicator microorganism, and the planktonic bacteria were collected from the waste raised on the ground of monkey cages and from the waste at the filter basket of the drainage outlet during flushing that did not follow the SOP or strictly followed the SOP. A/B, Proportion of aerosol living cells of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet when the SOP is not followed. C/D, Proportion of aerosol living cells of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet when the SOP is strictly implemented. E/F, Growth of bacterial petri dishes of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet during washing when SOP is not followed. G/H, Growth of bacterial petri dishes of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet when washing when SOP is strictly implemented. I/J, Growth of yeast culture dishes of the waste raised on the ground of the monkey cage or the waste at the filter basket of the drainage outlet during washing when SOP is not followed. K/L, Growth of yeast petri dishes of the waste raised on the ground of monkey cage or the waste at the filter basket of drainage outlet during washing when SOP is strictly implemented. M, Lipid and sugar gel electrophoresis detection of bacterial DNA from the waste raised on the ground of monkey cages and the waste at the filter basket of drainage outlet during washing that did not follow SOP or strictly followed SOP.

Figure 5　Microbial detection and analysis of waste in ABSL-3 laboratory raised on the ground of the monkey cage and at the filter basket of the drain outlet during flushing under the active state without following SOP or strictly following SOP

3 讨论

高致病性微生物所致的烈性传染病给人类的健康和生活带来了极大的危害,研究预防和治疗这些疾病的疫苗、药物是战胜疾病的重要手段,因而开展相应的动物实验就显得尤为重要了。其中,恒河猴因其与人缘关系较近,作为众多高致病性微生物最适宜的易感动物,成为了 ABSL-3 实验室中重要的实验动物模型之一。在 ABSL-3 实验室所进行的恒河猴实验中,存在着较多的生物安全隐患[12],除动物逃逸、抓咬、注射以及样本采集和解剖等诸如此类因实验操作可能带来的生物安全风险外,最容易被忽略却又易可能导致较高风险的莫过于常规饲养过程中产生的排泄物通过气溶胶的方式而对人或环境所造成的高致病性微生物传播,因而对 ABSL-3 实验室中恒河猴动物排泄物的清洁处理能否真正起到消除病原微生物传播风险的评估就具有更加突出的意义了。

通过对静止状态下 ABSL-3 实验室中恒河猴动物实验室的浮游菌采集检测结果分析可见,在无活动操作的情况下,无论是门入口处,还是猴笼地面,浮游菌检测均在可控范围之内,这个结果充分说明了整个实验室设施的负压状态可以保证将污染物有效控制在猴笼屏障设施内。而在活动状态下,也就是饲养状态时,随着恒河猴排泄物的出现,猴笼地面浮游菌检测呈现阳性,尤其是在进行猴笼清洁冲洗时,排水口滤篮处的浮游菌数量大幅度增加,并伴随酵母生长,这也充分说明了恒河猴饲养过程中产生的浮游菌及气溶胶确实为动物实验中一个非常重要的生物安全风险点,因而如何处理恒河猴排泄物以及这个处理是否行之有效就成为了恒河猴饲养及清洁操作规程的重要评价指标了。

因而,我们进行了重复对比试验来验证严格遵循执行恒河猴饲养及清洁操作规程是否能够真正有效控制通过排泄物导致的病原传播风险。对比试验结果显示,严格按照 SOP 操作较未遵循 SOP 而言,气溶胶颗粒大幅度降低,细菌及酵母生长明显减少,且在吸水垫上未检测到细菌 DNA,这个结果充分说明:首先,猴笼地面吸水垫的铺置可以将排泄物控制在一个较小的区域范围内,因而可以有效降低气溶胶的产生;其次,足量 84 消毒液原液的处理也是降低病原微生物气溶胶的有效手段。

气溶胶微粒为直接大约 0.05~500 mm 的极小分子分泌物,作为极分散的小微粒,它可携带病原微生物通过吸入的方式传播给人和环境。正因为如此,ABSL-3 实验室内可能存在的气溶胶传播引起了越来越多的关注[13],越来越多的研究者们认为气溶胶的传播已经成为人类病原微生物传播方式的头号杀手,并致力于 ABSL-3 实验室内气溶胶感染动物模型的研究[14-15]。本研究将关注点置于 ABSL-3 实验室恒河猴饲养过程中产生的排泄物可能导致的气溶胶污染,提出了 ABSL-3 实验室中恒河猴饲养及清洁的标准操作规程,并通过指示微生物的采样对比实验验证了严格执行标准操作规程在控制实验动物排泄物传播风险点的有效性。

参考文献:

[1] Vetter P, Kaiser L. Ebola: an uncontrolled outbreak despite vaccines and new treatments [J]. Rev Med Suisse, 2020, 16(690): 739-743.

[2] Ang BSP, Lim TCC, Wang L. Nipah virus infection [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(6): e01875-e01917.

[3] 韩辉, 伍波, 李海山, 等. 2020 年 10 月全球传染病疫情概要[J]. 疾病监测, 2020, 35(11): 970-972.

[4] WHO. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports [EB/OL]. 2020 [2020-10-31]. https:// www. who. int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/ situation-reports/.

[5] Appelt S, Jacob D, Rohleder AM, et al. Assessment of biorisk management systems in high containment laboratories, 18 countries in Europe, 2016 and 2017 [J]. Euro Surveill, 2020, 25(36): 2000089.

[6] WHO. Laboratory biosafety manual 3rd edition [EB/OL]. 2004 [2004-08-14]. https://www. who. int/publications/i/item/9241546506.

[7] 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例(国务院令第 424 号) [EB/OL]. 2004 [2004-11-12]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2005/content_63265.htm.

[8] 刘静, 李超, 柳金雄, 等. 高等级生物安全实验室在生物安全领域的作用及其发展的思考 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(1): 74-80.

[9] Klages C. IACUC and veterinary considerations for review of ABSL3 and ABSL4 research protocols [J]. ILAR J, 2022, 61(1): 3-9.

[10] Wan MP, Chao CY. Transport characteristics of expiratory droplets and droplet nuclei in indoor environments with different ventilation airflow patterns [J]. J Biomech Eng, 2007, 129(3): 341-354.

[11] 李晓燕, 卢选成, 武桂珍. 非人灵长类动物感染性实验生物风险分析 [J]. 中国公共卫生管理, 2011, 27(5): 482-483.

[12] 韩建保, 张高红, 郑永唐. 大动物生物安全三级实验室的生物安全隐患与对策 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(10): 918-919.

[13] Wedum AG. Control of laboratory airborne infection [J]. Bacteriol Rev, 1961, 25(3): 210-216.

[14] Pedrosa PB, Cardoso TA. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects [J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(6): e366-e376.

[15] 杜茜, 王洪宝, 刘克洋, 等. 病原微生物实验室实验操作产生气溶胶风险定量研究 [J]. 军事医学, 2015, 39(12): 926-928, 933.

〔收稿日期〕2021-03-24

夏宗霄,刘海鹏,张艳娇,等. 甲状腺疾病动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 87-93.
Xia ZX, Liu HP, Zhang YJ, et al. Research progress on animal models of thyroid disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 87-93.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 013

甲状腺疾病动物模型的研究进展

夏宗霄[1#],刘海鹏[2#],张艳娇[1],范 源[2*]

(1.云南中医药大学中药学院,昆明 650500;2.云南中医药大学第二附属医院,昆明 650216)

【摘要】 甲状腺疾病是一种临床上常见的内分泌疾病,其病因机制复杂多样。目前关于甲状腺疾病的研究主要局限于临床上的药效评价,对其发病机制研究较少,因此甲状腺疾病动物模型的建立对分析该类疾病的病理机制以及提高临床疗效有着较为重要的意义,成功的实验动物模型不仅能降低实验成本,还具有可行性、重复性高等特点。本文就近年来关于甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、桥本甲状腺炎、甲状腺癌等甲状腺疾病动物模型的建立方法做一总结归纳,并对各类模型的优缺点进行分析,为相关实验的开展提供理论依据。

【关键词】 甲状腺疾病;药物;核酸免疫;转基因;动物模型
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0087-07

Research progress on animal models of thyroid disease

XIA Zongxiao[1#], LIU Haipeng[2#], ZHANG Yanjiao[1], FAN Yuan[2*]
(1. School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China.
2. Second Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650216)

【Abstract】 Thyroid disease is a common endocrine system disease, and its etiology is complex and diverse. At present, research on thyroid diseases is mainly limited to the evaluation of clinical efficacy of drugs with few studies on the pathogenesis of this disease. Therefore, it is important to establish animal models of thyroid diseases for analyzing pathological mechanisms and improving the clinical efficacy of disease treatment. A successful experimental animal model can not only increase disease samples in a short period of time with low cost but also avoid harm to the human body. Furthermore, animal models have the advantage of stability. This review summarizes the method used to establish animal models of thyroid diseases in recent years, such as those for hypothyroidism, hyperthyroidism, hashimoto's thyroiditis, and thyroid cancer, and analyzes the advantages and disadvantages of various models to provide a theoretical basis for the development of related experiments.

【Keywords】 thyroid disease; medicine; nucleic acid (cDNA) immunization; transgene; animal model

目前全球范围内甲状腺疾病患病率显著增加,甲状腺疾病在临床上主要分为甲状腺功能减退症(甲减)、甲状腺功能亢进症(甲亢)、桥本甲状腺炎(hashimoto's thyroiditis, HT)、甲状腺癌等,但其具

[**基金项目**]国家自然科学基金地区基金项目(81360652);云南省科技厅科技计划项目-应用基础研究计划(202101AZ010001-015);云南省万人计划"名医"专项;云南省高校中西医结合防治甲状腺病重点实验室项目。
[**作者简介**]夏宗霄(1998—),男,在读硕士研究生,研究方向:中药药理应用与研究。E-mail:18381816250@163.com
刘海鹏(1973—),男,汉族,副主任医师,研究方向:2 型糖尿病及其相关慢性并发症。E-mail:1114914713@qq.com
#共同第一作者
[**通信作者**]范源(1966—),男,主任医师,教授,博士,硕士生导师,研究方向:帖类化合物治疗甲状腺癌的研究。
E-mail:1647909799@qq.com

体的发病机理仍尚未明确。甲状腺疾病作为临床上常见的内分泌疾病,其疾病的发生、发展与诸多因素有关,目前公认的主要疾病影响包括年龄、性别、吸烟、碘缺乏或碘过量、应激、遗传、自身免疫、环境等因素[1]。具调查统计甲减和亚临床甲减的患病率分别约为 0.1%~2%和 4%~10%[2],其中甲减患者的甲状腺激素分泌与合成不足,亚临床甲减患者的甲状腺激素在正常范围,但促甲状腺激素含量偏高,且会出现甲状腺肿大等症状。在欧洲和美国,甲亢的患病率大致相似分别为 0.7% 和 0.5%[3],亚甲亢的患病率为 0.4%~11%不等[4],其中甲亢患者甲状腺激素分泌与合成偏高,而亚甲亢患者甲状腺激素在正常范围,但促甲状腺激素含量偏低。HT 是一种常见的自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid disease,AITD),AITD 是一种甲状腺组织自身免疫紊乱的疾病,临床上表现为滤泡细胞萎缩、淋巴细胞浸润、甲状腺肿和纤维化。据统计 AITD 女性发病率为每 1 千人 3.5~5 例,而男性发病率为每 1 千人 0.6~1 例[5]。过去 30 年里,全球甲状腺癌的发病率显著增加,由 1975 年每 10 万人 5 例增加到 2015 年每 10 万人 15 例,特别是乳头状甲状腺癌,约占甲状腺癌的 85%[6]。目前关于甲状腺疾病动物模型研究较少,对甲状腺疾病的造模还处于一个逐步成熟的阶段,关于甲状腺疾病的病因、病理等尚未完全明确。因此建立重复性高、稳定性好的甲状腺疾病动物模型,对深入研究甲状腺疾病的发病机制以及早期的干预有着十分重要的意义。本文在查阅大量文献的同时结合团队前期造模经验对甲状腺疾病动物模型做一总结归纳,以期为相关实验的开展提供理论依据。

1 甲状腺功能减退(甲减)模型的建立

1.1 药物诱导的甲减模型

通常使用丙硫氧嘧啶(PTU)或甲巯咪唑(MMI)等抗甲状腺药物,减少机体甲状腺激素的合成建立甲减模型。Sun 等[7]喂养雌性 SD 大鼠含 PTU(2 mg/(kg·d))的饮用水 6 周,观测到大鼠行动迟缓且毛发变成棕黄色,用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测其血清水平,与正常组相比,甲减组血清 T3、T4 偏低,TSH 偏高($P<0.01$)。Li 等[8]喂养雄性 Wistar 大鼠甲减组含 MMI 的饮用水(60 mg/(kg·d))12 周,测得血清 T3、T4 显著降低($P<0.001$),TSH 升高($P<0.01$)。

药物诱导甲减是最常用的造模方法,且造模难度较小,成功率高。但若想要持续维持甲减状态,需连续不间断给予促甲状腺素药物维持高激素水平,否则药物会在体内逐渐消除使机体功能恢复正常。

1.2 甲状腺切除术甲减模型

Lee 等[9]将 6 周龄雄性 SD 大鼠分别进行甲状腺切除手术和垂体切除手术,并设立相同数量的假手术组。经过 1 周的手术适应期后,用 ELISA 法检测其血清水平,发现甲状腺切除组与其假手术相比血清 T3、T4 降低,TSH 升高($P<0.05$);垂体切除组与其假手术相比血清 T3、T4、TSH 均有所降低($P<0.05$)。Li 等[8]对雄性 Wistar 大鼠进行甲状腺切除手术,测得血清 T3、T4 显著降低($P<0.01$),TSH 升高($P<0.05$)。

用手术切除甲状腺造模比药物诱导耗时更短,但难度较高,手术不当容易造成大鼠死亡,若甲状腺切除不完全会对血清测定结果造成影响。

1.3 低碘诱导甲减模型

Alayoubi 等[10]将 SD 大鼠随机分为两组,低碘组给予碘缺乏鼠粮(含 20 μg/kg 碘化物),对照组给予碘正常鼠粮(含 200 μg/kg 碘化物),喂养观察 17 个月。1 个月后测得碘缺乏组血清 T3、T4 水平显著降低($P<0.001$),在 10 月时达到最低值,血清 TSH 则呈上升趋势,在 9~12 个月时达到最大值($P<0.001$)。因 SD 大鼠处于生长期,其甲状腺重量总是与年龄和体重呈正比,故采取超声三维成像来测量甲状腺体积占体重的比率,取平均值。经计算发现,在第 8 个月和第 14 个月时,该数值是对照组的两倍($P<0.05$)。Hu 等[11]将 BALB/c 小鼠随机分为两组:低碘组给予碘浓度为 20~40 mg/kg 的低碘饲料,对照组给予碘浓度为 300 mg/kg 的标准饲料,饲养观察 3 个月。采用 ELISA 法测得低碘组血清 T3、T4 水平显著降低,TSH 升高($P<0.001$)。用 HE 染色法检测缺碘小鼠的甲状腺组织,发现滤泡细胞肿大并呈柱状,免疫组织化学结果显示甲状腺激素转运体 8(monocarboxylate transporter 8,MCT8)在甲状腺滤泡细胞胞浆中有较高的表达。经实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测,低碘组 MTC8 mRNA 表达明显增高,为对照组的 1.36 倍($P<0.01$)。

低碘建立甲减模型较为简单,但用时较长。需要注意的是不能完全除碘,因为提供绝对不含碘的鼠粮会直接影响大鼠的正常发育以及器官功能,且

大鼠可能无法在研究期间存活。

2 甲状腺功能亢进(甲亢)模型的建立

通常使用左甲状腺素等药物提高机体甲状腺激素的合成,诱导甲亢模型的产生。Jeddi 等[12]将雄性 Wistar 大鼠随机分为甲亢组和对照组。在甲亢组的饮用水中添加左甲状腺素(12 mg/L),对照组给予蒸馏水,连续喂养 21 d。结果表明,甲亢组血清 T3、T4 水平显著升高,TSH 显著降低($P<0.001$)。Venediktova 等[13]对甲亢组雄性 Wistar 大鼠进行腹腔注射左甲状腺素(100 μg/100 g),共计 5 d;对照组注射同等体积的生理盐水。发现甲亢组血清 T3 和 T4 分别比对照组增加了 3 倍和 4 倍($P<0.05$)。刘树民等[14]分别对雌性 SD 大鼠灌胃左甲状腺素以及尾静脉注射小肠结肠炎耶尔森氏菌进行甲亢造模,发现左甲状腺素组造模初期 T3、T4、FT3、FT4 显著升高($P<0.05$),但 1 周后各激素水平随即恢复正常,经 HE 染色观察到甲状腺滤泡大小基本一致,滤泡胶质染色均匀,滤泡间质无水肿,与空白对照组无显著性差异。分别于第 7、14、25 天检测小肠结肠炎耶尔森氏菌模型组血清水平,发现在第 7 天时,血清 T3、T4 显著升高($P<0.05$),TSH 无明显差异,直到第 25 天时 TSH 明显升高,差异有统计学意义,经 HE 染色观察到甲状腺滤泡破坏,上皮细胞轻度增生且有少量的炎细胞存在。

3 桥本甲状腺炎模型的建立

3.1 自发性甲状腺炎模型

大部分自发性甲状腺炎造模所选取的实验动物是 NOD.H-2^{h4}小鼠。NOD.H-2^{h4}小鼠在 NOD 遗传背景下表达 H-2^{K} 和 I-A^{k} 基因,此种主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的单倍型(H-2^{K})是桥本甲状腺炎的易感性单倍型,因此 NOD 小鼠发生 HT 概率很高[15]。Braley-Mullen 等[16]喂养 7~8 周龄的 NOD.H-2^{h4}小鼠 0.05%碘化钠饮用水 23 周,在第 6 周时所有小鼠均发生了 HT,第 8 周时炎症达到最大程度,IgG1 和 IgG2b 抗体水平明显升高($P<0.05$)。He 等[17]喂养 5 周龄 NOD.H-2^{h4}小鼠 0.05%碘化钠饮用水,分别于 2、4、8 周对其甲状腺组织进行 HE 染色,发现甲状腺细胞在第 2 周开始凋亡($P<0.001$),在第 4 周 NOD.H-2^{h4}小鼠表现出 HT,喂养 16 周后炎症评分、抗甲状腺球蛋白抗体(anti-thyroglobulin antibody, TG-Ab)水平明显高于对照组($P<0.001$)。

该种模型造模成功率极高,实验操作十分简单,但疾病周期较长,需在 SPF 清洁等级下 IVC 独立通气笼中喂养,若是动物发生死亡会耗费大量的时间和金钱成本。

3.2 外源性甲状腺抗原免疫法

甲状腺球蛋白(thyroglobulin, Tg)是 HT 患者中过度表达的主要抗原,该种蛋白分子在甲状腺中含量特别丰富,占总蛋白的 75%~80%[18]。研究表明不同鼠类 H-2 基因不同,对桥本甲状腺炎的易感性也不尽相同。高应答的如 CBA/J(H-2^{k})和 SJL/J(H-2^{s})种系鼠;而低应答如 BALB/c(H-2^{d})和 C57BL/6(H-2^{b})种系鼠[19]。Wang 等[20]将 4 周龄 CBA/J 雌性小鼠随机分为两组,模型组皮下注射 200 μg 被完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)乳化的鼠甲状腺球蛋白(murine thyroglobulin, mTg)进行初次免疫,两周后用相同剂量的 m Tg 在不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)乳化下进行加强免疫,而对照组组小鼠则用相同剂量的磷酸盐缓冲盐水代替 mTg 免疫小鼠。结果表明对照组小鼠甲状腺滤泡均匀分布,无萎缩;而模型组小鼠甲状腺滤泡无序排列且伴有淋巴细胞浸润。具计算模型组小鼠 HT 的成膜率为 85.70%,甲状腺平均炎症得分为 2.29,经 ELISA 法测得模型组 TG-Ab 显著高于对照组($P<0.01$),但血清 T4 和 TSH 两组之间无显著性差异($P>0.05$)。李叙颖等[21]将雌性 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为对照组和模型组。对照组给予蒸馏水,模型组给予 0.64 g/L 的高浓度碘化钠碘水。在第 4 周的第 1 天和第 4 天,于造模组大鼠后足皮下多点注射 0.2 mL 初次免疫乳化剂(含 100 μg mTg);第 5~8 周后在大鼠四肢内侧及背部皮下多点注射 0.2 mL 加强免疫乳化剂(含 100 μg mTg),每周 1 次;对照组每次注射同等剂量蒸馏水。结果显示,与对照组相比模型组 TG-Ab、抗甲状腺过氧化物酶抗体(anti-thyroid peroxidase antibody, TPO-Ab)水平显著升高($P<0.01$),血清 T3、T4 水平降低,TSH 水平升高($P<0.05$)。Duan 等[22]选取 Wistar 大鼠进行造模,大鼠在第 1 天腹腔注射猪甲状腺免疫球蛋白(porcine thyroglobulin, pTg)进行初次免疫(150 μg pTg 溶于 75 μL 生理盐水中,并用等量的 CFA 进行乳化)。在第 7 天和第 21 天,大鼠进行注射 pTg 加强免疫(150 μg pTg 溶于 75 μL 生理盐水中,然后用等体积

IFA 乳化)。与生理盐水组相比,模型组 TG-Ab 水平均显著升高($P<0.05$)。

3.3 脾细胞体外活化移植免疫法

Fang 等[23]用 150 μg mTg 联合 15 μg 脂多糖(LPS)静脉注射 CBA/J 小鼠(每 10 d 1 次,共 2 次),抽取其脾细胞并在含有 25 μg/mL mTg 和 5 ng/mL IL-12 的培养基中培养,供活化使用,72 h 后将 3×10^7 个脾细胞静脉注射至经 500-rad 辐射的同源小鼠中,第 20 天后经 HE 染色甲状腺组织,观测到嗜中性粒细胞广泛浸润,严重等级为(4.8±0.2),血清 T4 水平较正常水平偏低(2.8±0.4 μg/dl<3.0 μg/dl)。

脾细胞体外活化移植免疫法通常用来诱导肉芽肿性自身免疫性甲状腺炎(granulomatous experimental autoimmune thyroiditis,G-EAT),该方法与外源性甲状腺抗原免疫法相比甲状腺淋巴细胞浸润程度更为严重,易发生肉芽肿病变,且该种炎症通常在第 60 天消退或进展为纤维化,这取决于第 20 天甲状腺损伤的程度[23]。

3.4 核酸免疫法(nucleic acid(cDNA)immunization,cDNA 免疫法)

核酸免疫法指克隆出人甲状腺球蛋白(human thyroglobulin,hTg)的全长 cDNA,再与腺相关病毒载体整合,将该腺病毒(5.0×10^9 个)溶于 50 μL 的磷酸缓冲溶液(含 10%甘油),注入小鼠的胫骨肌肉中。该种方法能使骨骼肌肉细胞大量摄取质粒 cDNA 并将其蛋白产物表达在细胞表面[24]。Faustino 等[25]选择雌性 CBA-J 小鼠作为核酸免疫的实验动物进行研究:模型组小鼠被表达 hTg 的腺病毒免疫(Ad-TG),阴性对照组被表达 lac-Z 的腺病毒免疫(Ad-LacZ),阳性对照组采取外源性甲状腺抗原免疫法,分别于第 1 天初次免疫和第 21 天加强免疫。结果表明,所有模型组小鼠 hTG 抗体均为阳性,与阴性对照组相比,实验组小鼠血清 hTg、mTg、mTPO 抗体水平显著提高($P<0.001$),但较阳性组抗体水平低。Jacobson 等[26]在 cDNA 免疫前将布比卡因注射到雌性 C3H/Hen 小鼠右侧股四头肌中,因肌毒剂被证实能够提高靶基因的表达[27],分为 2 组进行实验:对照组采用肌肉静脉注射含 hTg 的 cDNA,模型组采用电穿孔法注射含 hTg 的 cDNA,用 ELISA 法检测 TG-Ab 水平,发现与直接注射相比,电穿孔递送 cDNA 显著增加了再生肌肉中 TG-Ab 的水平($P<0.05$)。

cDNA 免疫法是一种建立 HT 动物模型的崭新途径,在开始产生免疫反应之前,以正确的构象将 hTg 呈递给了 T 细胞,且无需佐剂的参与,更接近地模拟出人类自身免疫性甲状腺炎的发生发展,除此外该种方法使得修改 hTg cDNA 的基因序列成为可能,这将为今后研究不同 hTg 序列变异对机体的影响提供重要实验基础。除肌肉直接递送核酸外,最新的超声递送系统不仅具有更高的安全性和有效性,同时将实验侵袭性降到了最低,对实验动物的伤害大大减少[28]。

4 甲状腺癌模型的建立

根据肿瘤起源及分化差异,甲状腺癌按病理类型主要分为:乳头状甲状腺癌(papillary thyroid carcinoma,PTC)、滤泡样甲状腺癌(follicular thyroid carcinoma,FTC)、甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma,MTC)、低分化癌以及间未分化性甲状腺癌(anaplastic thyroid cancer,ATC)等。大数据显示,在这些亚型中 PTC 是最常见的,约占所有甲状腺癌 80%,FTC 约占 10%~15%,ATC 约占 5%,其余少数为 MTC[29],其中 ATC 较分化良好的甲状腺癌转移程度更为严重,高达 70%的 ATC 患者会发生全身转移,肺是癌症转移中最常见的部位,占比高达 80%[30]。

4.1 诱发性肿瘤模型

诱发性肿瘤模型指采用化学、生物、物理等致癌手段,如用化学致癌剂、放射线、生物毒素等方法诱发实验动物产生致癌物,造成动物组织、器官或全身性的损伤,产生功能及代谢改变等异常状况。Zheng 等[31]将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,对第 2、3 组的动物分别给予致癌物,对照组(第 1 组)则在饮用水中添加赋形剂。第 2 组 SD 大鼠于腹膜内注射二乙基亚硝胺(DEN)(按重量计 100 mg/kg,溶解于生理盐水溶液中),第 3 组 SD 大鼠分别在在第 5、8、11 和 14 天腹膜内注射 4 次甲基亚硝脲(MNU)(按重量计 20 mg/kg,溶解于柠檬酸盐缓冲液中,溶液 pH 6.0),实验结果显示,所有模型组血清 TG-Ab 水平明显高于对照组($P<0.05$),所有模型组的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen,CEA)水平明显高于对照组($P<0.05$)。Dalke 等[32]将 F1 小鼠暴露于 I^{131} 中,发现受辐射照射的小鼠甲状腺癌变的概率明显高于未受辐射的对照组,大部分辐射小鼠的甲状腺存在单纯增生和复杂增生,较少部分发

展为 FTC。

诱发性肿瘤模型能在短时间内复制出数量较多的肿瘤模型，因而经常被研究者们采纳使用，其具有操作简单，成本低廉等特点。但由于该种模型通常是采用致癌药物迅速造模，难以观测肿瘤的动态发生、发展，只能用于简单的药效考察，不利于对甲状腺癌进行细胞及分子水平的研究。

4.2　基因工程小鼠模型

医学者们利用分子生物学对甲状腺癌进行不断探究发现，大多数甲状腺癌都伴随基因突变，包含原癌基因的激活性突变、融合性表达和抑癌基因的失活性突变或缺失。Pozdeyev 等[33] 对 779 例甲状腺癌患者进行了基因分析，发现 74% 的 PTC 患者 *BRAF* 基因发生了突变（特别是 *V600E* 和 *BRAF* 融合表达），42 例（9%）发生了 *RAS* 基因突变，34 例（7%）发生了 *RET* 基因突变，10% 的患者发生了抑癌基因 *TP*53 缺失，而大多数 FTC 患者则是发生了 *RAS* 基因突变（43/65 例，66%），其中 14% 发生了 *PTEN* 基因缺失，12% 发生了 *TP*53 和 *RBM*10 基因缺失，未分化甲状腺癌两个最常见的突变基因是 *TP*53 和 *TERT*（均为 65%）。

Knauf 等[34] 将 *Tg-BRAF*^{V600E} 系（*Tg-BRAF*2 和 *Tg-BRAF*3）表达于转基因 FVB/N 小鼠，让携带该基因的片段注入受精的 FVB/N 小鼠卵中，使之假孕，通过 qRT-PCR 法和 Southern blot 印迹杂交法确认胚胎小鼠已整合该转基因，最后将该胚胎小鼠与野生型 FVB/N 小鼠杂交，从中稳定产生 *BRAF*^{V600E} 突变株系。实验结果表明 *Tg-BRAF*2 和 *Tg-BRAF*3 小鼠的甲状腺组织中均存在 *BRAF*^{V600E} mRNA，尤其是在 *Tg-BRAF*2 小鼠中最为明显。5 周后，*Tg-BRAF*2 小鼠的 TSH 水平显著升高，雄性小鼠平均比对照组高出 80 倍，而 *Tg-BRAF*3 小鼠 TSH 水平较正常组增加 2 倍，血清 T3 水平有所下降但无统计学意义（$P>0.05$）。对 *Tg-BRAF*2 小鼠的甲状腺进行组织学检测，发现肿瘤累积甲状腺腺体两叶呈多灶性，肿瘤细胞显示出人类乳头状癌的核特征，其中 *Tg-BRAF*2、*Tg-BRAF*3 发展成 PTC 的概率分别为 93% 和 35%。McFadden 等[35] 将 *TPOCreER* 小鼠与含有 Cre 诱导的等位基因 *BRAF*^{V600E}、*BRAF*^{CA} 的同源小鼠杂交，后给予他莫昔芬数周（简称 TB 组），组织学检测表明其甲状腺肿瘤具有 TPC 相似的乳头状形态和核特征，免疫组织化学显示细胞外调节蛋白激酶磷酸化表达增加。将 *Trp*53 等位基因与 TB 组杂交形成 TBP 三转基因小鼠后，表现出更为严重的 TPC（癌细胞体积变大，局灶性坏死增多），另有 50% 转变为 ATC，其中 5/26 只动物发生了肺转移（19%），说明 *TP*53 基因的缺失会增加 PTC 到 ATC 转变的概率。

甲状腺癌基因工程小鼠模型使人类对甲状腺疾病的研究已深入到细胞及分子水平，可以直接按照研究目的设计和培育所需的小鼠，这无疑是构建了人类对甲状腺癌原癌基因、抑癌基因、机制靶点等研究的桥梁，为发病机制、药物筛选和临床医药研究提供了宝贵的实验基础。但基因调控机制往往十分复杂，目前基因工程小鼠模型提供的信息还很局限，转基因小鼠的出现是否会导致新的癌基因产生，有待进一步研究。

4.3　异种移植甲状腺癌模型

异种移植甲状腺癌模型是指将人甲状腺瘤细胞皮下注射（异位移植）或甲状腺内注射（原位移植）到免疫缺陷小鼠中。张乐乐[36] 对雌性 BALB/c 裸鼠右后肢腹侧皮下注射 TPC-1 和 SW579 细胞悬液，发现接种 SW579 细胞的小鼠均未成瘤，接种 TPC-1 细胞裸鼠瘤体体积在第 5 天后达到了 500 mm^2，经 HE 染色并在高倍镜观察肿瘤细胞，可以看到细胞核形状不规则且染色加深，并可见紊乱的核分裂象。Kim 等[37] 静脉注射戊巴比妥钠（50 mg/kg）麻醉小鼠，将 5 μL 未分化甲状腺癌细胞株（ARO、DRO、和 C643 细胞系）悬浮液注射到 8～12 周大的雄性 athymic 裸鼠的甲状腺或者侧腹中，适应性喂养两周后，用 CO_2 吸入处死老鼠，并解剖检查肿瘤。发现所有裸鼠甲状腺中有明显的肿瘤细胞浸润，3 种细胞系均有 100% 的致瘤性，其中注射 DRO 细胞系的裸鼠肺转移率很高，当癌细胞接种数量为 2.5×10^4 个/只时，肺转移率最高，为 80%。另测得原位甲状腺肿瘤微血管密度明显高于异位甲状腺肿瘤（$P<0.05$），原位肿瘤中促血管生成因子 VEGF 和 IL-8 的表达水平高于异位甲状腺肿瘤（$P<0.05$）。

异种移植甲状腺癌肿瘤模型造模迅速，移植瘤模型个体差异较小、接种成活率高、重复性良好；其中原位肿瘤模型的建立较为复杂，需要的手术技术较高，但能使癌细胞直接在起源器官中生长，有较高的外显率和再现转移性。

5　小结

甲状腺疾病动物模型的建立是研究甲状腺疾

病发病机制的关键方法,一个成功的动物模型不但要简便可行、重复性高,更需要准确地模拟疾病的发生、发展。在上述模型中,甲亢、甲减模型单纯停留在给药造模,提高或减少甲状腺激素合成,虽然快速高效,但它忽略了疾病复杂的发病过程如亚甲减到甲减这一过程,而 cDNA 免疫造模桥本甲状腺炎使修改 hTg cDNA 的基因序列成为可能,但该种方案技术不够成熟仍需进一步开发,甲状腺癌转基因模型的建立也为研发治疗甲状腺癌靶点药物研究提供了新思路。所以研究出一系列与疾病发展更贴切,操作更为便捷、经济,并且兼顾环境、遗传、肠道微生态、免疫等方面使其更能全面反映人类甲状腺疾病进展的动物模型是今后研究甲状腺疾病的重点之一。

参考文献:

[1] 韩晴, 黄汉林. 甲状腺疾病影响因素研究进展[J]. 中国职业医学, 2015, 42(3): 345-347, 350.

[2] Tsai TY, Tu YK, Munir KM, et al. Association of hypothyroidism and mortality in the elderly population: a systematic review and meta-analysis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(6): 186.

[3] Taylor PN, Albrecht D, Scholz A, et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(5): 301-316.

[4] Carlé A, Andersen SL, Boelaert K, et al. Management of endocrine disease: subclinical thyrotoxicosis: prevalence, causes and choice of therapy [J]. Eur J Endocrinol, 2017, 176(6): R325-R337.

[5] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33(6): 101367.

[6] Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2019, 48(1): 23-35.

[7] Sun J, Hui C, Xia T, et al. Effect of hypothyroidism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive function of pregnant rats [J]. BMC Endocr Disord, 2018, 18(1): 30.

[8] Li J, Liu Z, Zhao H, et al. Alterations in atrial ion channels and tissue structure promote atrial fibrillation in hypothyroid rats [J]. Endocrine, 2019, 65(2): 338-347.

[9] Lee JH, Lee M, Park JA, et al. Effects of hypothyroidism on serotonin 1A receptors in the rat brain [J]. Psychopharmacology (Berl), 2018, 235(3): 729-736.

[10] Alayoubi A, Sullivan RD, Lou H, et al. *In vivo* evaluation of transdermal iodide microemulsion for treating iodine deficiency using sprague dawley rats [J]. AAPS PharmSciTech, 2016, 17(3): 618-630.

[11] Hu Z, Zhuo X, Shi Y, et al. Iodine deficiency up-regulates monocarboxylate transporter 8 expression of mouse thyroid gland [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(23): 4071-4076.

[12] Jeddi S, Gholami H, Gheibi S, et al. Altered gene expression of hydrogen sulfide-producing enzymes in the liver and muscles tissues of hyperthyroid rats [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 17937-17945.

[13] Venediktova NI, Pavlik LL, Belosludtseva NV, et al. Formation of lamellar bodies in rat liver mitochondria in hyperthyroidism [J]. J Bioenerg Biomembr, 2018, 50(4): 289-295.

[14] 刘树民, 崔晓旭, 陈平平, 等. 两种甲状腺功能亢进症动物模型的对比研究[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 19-24, 3.

[15] Braley-Mullen H, Yu S. NOD.H-2h4 mice: an important and underutilized animal model of autoimmune thyroiditis and Sjogren's syndrome [J]. Adv Immunol, 2015, 126: 1-43.

[16] Braley-Mullen H, Sharp GC, Medling B, et al. Spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice [J]. J Autoimmun, 1999, 12(3): 157-165.

[17] He X, Xiong C, Liu A, et al. Phagocytosis deficiency of macrophages in NOD.H-2h4 mice accelerates the severity of iodine-induced autoimmune thyroiditis [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 184(1): 196-205.

[18] Verginis P, Stanford MM, Carayanniotis G. Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis [J]. J Immunol, 2002, 169(9): 5332-5337.

[19] Hatzioannou A, Alevizaki M, Carayanniotis G, et al. Fine epitope mapping within the pathogenic thyroglobulin peptide 2340-2359: minimal epitopes retaining antigenicity across various MHC haplotypes are not necessarily immunogenic [J]. Immunology, 2012, 135(3): 245-253.

[20] Wang X, Liu H, Zhang Y, et al. Effects of isolated positive maternal thyroglobulin antibodies on brain development of offspring in an experimental autoimmune thyroiditis model [J]. Thyroid, 2015, 25(5): 551-558.

[21] 李叙颖, 张兰, 王琳, 等. 软坚消瘿颗粒对肝郁脾虚型桥本甲状腺炎模型大鼠 Treg 和 Th17 细胞因子表达的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(3): 558-565.

[22] Duan J, Deng T, Kang J, et al. DINP aggravates autoimmune thyroid disease through activation of the Akt/mTOR pathway and suppression of autophagy in Wistar rats [J]. Environ Pollut, 2019, 245: 316-324.

[23] Fang Y, Chen K, Jackson DA, et al. Eosinophils infiltrate thyroids, but have no apparent role in induction or resolution of experimental autoimmune thyroiditis in interferon-γ-/-mice [J]. Immunology, 2010, 129(3): 329-337.

[24] Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory [J]. Gene Ther, 2003, 10(2): 131-142.

[25] Faustino LC, Li CW, Stefan-Lifshitz M, et al. A novel mouse model of autoimmune thyroiditis induced by immunization with adenovirus containing full-length thyroglobulin cDNA:

implications to genetic studies of thyroid autoimmunity [J]. Thyroid, 2020, 30(9): 1338-1345.

[26] Jacobson EM, Concepcion E, Ho K, et al. cDNA immunization of mice with human thyroglobulin generates both humoral and T cell responses: a novel model of thyroid autoimmunity [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19200.

[27] Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression [J]. Adv Genet, 2005, 54: 3-20.

[28] Decker RE, Lamantia ZE, Emrick TS, et al. Sonodelivery in skeletal muscle: current approaches and future potential [J]. Bioengineering (Basel), 2020, 7(3): 107.

[29] McIver B, Hay ID, Giuffrida DF, et al. Anaplastic thyroid carcinoma: a 50-year experience at a single institution [J]. Surgery, 2001, 130(6): 1028-1034.

[30] Kirschner LS, Qamri Z, Kari S, et al. Mouse models of thyroid cancer: A 2015 update [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 421: 18-27.

[31] Zheng X, Jia B, Song X, et al. Preventive potential of resveratrol in carcinogen-induced rat thyroid tumorigenesis [J]. Nutrients, 2018, 10(3): 279.

[32] Dalke C, Hölzlwimmer G, Calzada-Wack J, et al. Differences in the susceptibility to iodine131-induced thyroid tumours amongst inbred mouse strains [J]. J Radiat Res, 2012, 53(3): 343-352.

[33] Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, et al. Genetic analysis of 779 advanced differentiated and anaplastic thyroid cancers [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(13): 3059-3068.

[34] Knauf JA, Ma X, Smith EP, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation [J]. Cancer Res, 2005, 65(10): 4238-4245.

[35] McFadden DG, Vernon A, Santiago PM, et al. p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a Braf-mutant mouse model of papillary thyroid cancer [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(16): E1600-E1609.

[36] 张乐乐. 夏枯草提取物对甲状腺肿瘤的抑制作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.

[37] Kim S, Park YW, Schiff BA, et al. An orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma in athymic nude mice [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1713-1721.

〔收稿日期〕2021-04-08

(上接第 65 页)

[8] 梁娟, 刘越, 尹新华, 等. 异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 110-114.

[9] 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 等. 不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥大模型建立影响的比较研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 651-658.

[10] 焦杰, 马星月, 傅强, 等. 延丹胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的作用及机制[J]. 中成药, 2021, 43(4): 908-913.

[11] 王蓓, 童华诚, 张松. cTnT、NT-proBNP 及心肌酶谱联合检测在诊治急性冠脉综合征中的临床意义[J]. 安徽医药, 2014, 18(12): 2287-2289.

[12] 杨铭华, 阚秀梅, 孙喜娟, 等. 肌钙蛋白 I、CK-MB 对癫痫持续状态患儿合并心肌损伤的诊断价值[J]. 实用检验医师杂志, 2014, 6(1): 38-40.

[13] 王勍, 马亚萍, 金春华. 热性惊厥患儿心肌酶学变化与心肌损伤的关系[J]. 山东医药, 2009, 49(5): 99-100.

[14] 周海文, 英锡相, 李海波. 牡荆素-2'-O-鼠李糖苷对大鼠急性心肌缺血的药效研究[J]. 吉林中医药, 2016, 36(1): 71-74.

[15] Li C, Zhang Y, Wang Q, et al. Dragon's Blood exerts cardioprotection against myocardial injury through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in acute myocardial infarction mice model [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 227: 279-289.

[16] 刘炜, 沈春健, 高顺, 等. 探讨中性粒细胞与淋巴细胞比值对急性 ST 段抬高型心肌梗死合并多支血管病变近期临床预后的影响[J]. 心脑血管病防治, 2021, 21(2): 197-199.

[17] Ong SB, Hernández-Reséndiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities [J]. Pharmacol Ther, 2018, 186: 73-87.

[18] Karakas MS, Korucuk N, Tosun V, et al. Red cell distribution width and neutrophil-to-lymphocyte ratio predict left ventricular dysfunction in acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction [J]. J Saudi Heart Assoc, 2016, 28(3): 152-158.

[19] Kurtul A, Murat SN, Yarlioglues M, et al. Association of platelet-to-lymphocyte ratio with severity and complexity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndromes [J]. Am J Cardiol, 2014, 114(7): 972-978.

[20] 杨俊礼, 韩永燕, 王岩, 等. 血小板/淋巴细胞比值与急性一氧化碳中毒患者心肌损伤的关系[J]. 广西医学, 2017, 39(12): 1844-1846.

〔收稿日期〕2021-07-25

黄欣欣,应燕萍. Kruppel 样因子 2 与心血管疾病的研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 94-98,132.
Huang XX, Ying YP. Research progress on Kruppel like factor 2 and cardiovascular disease［J］. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 94-98,132.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 014

Kruppel 样因子 2 与心血管疾病的研究进展

黄欣欣,应燕萍*

(广西医科大学第一附属医院,南宁　530021)

【摘要】　心血管疾病在全球范围内造成了巨大的健康和经济负担。Kruppel 样因子 2 是一种关键的心血管保护性转录因子,参与动脉粥样硬化、脑卒中、心肌梗死以及心力衰竭等心血管疾病的病理生理过程。本文就 Kruppel 样因子 2 的生物学功能,及其参与心血管疾病发生发展的机制和研究进展进行综述。

【关键词】　Kruppel 样因子 2;心血管疾病;调节机制
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2022) 02-0094-05

Research progress on Kruppel like factor 2 and cardiovascular disease

HUANG Xinxin, YING Yanping*
(the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】　Cardiovascular diseases constitute a substantial health and economic burden worldwide. Kruppel like factor 2 is a key cardiovascular-protective transcription factor and is involved in the pathophysiological processes of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, stroke, myocardial infarction and heart failure. This paper reviews the biological functions and mechanisms of Kruppel like factor 2 and research progress in cardiovascular diseases.

【Keywords】　Kruppel like factor 2; cardiovascular diseases; mechanism

心血管疾病(cardiovascular diseases,CVDs)是指主要以心血管病变为病理基础的一系列循环系统疾病,包括动脉粥样硬化、脑卒中、心肌梗死、心力衰竭、高血压、心肌病和周围动脉血管疾病等[1]。来自美国心脏协会(American Heart Association,AHA)的数据显示,2017 年全球因心血管疾病导致的死亡数约为 1780 万(95%置信区间(confidence interval,CI)1750~1880 万)[1],占全球死亡总数的 31. 8%。心血管疾病在全球范围内造成巨大的健康和经济负担,积极找寻心血管疾病预防和治疗的干预靶点,降低心血管疾病发病率、死亡率和提高患者生活质量是当前的紧要任务。

Kruppel 样因子(kruppel-like factors,KLFs)是锌指类 DNA 结合转录因子家族中的亚家族,其作为一个多基因家族共由 18 名成员(KLF1~KLF18)组成。KLFs 亚家族在细胞生长与分化、增殖与凋亡、迁移、代谢等生物过程发挥着重要调控作用,参与了生物体内包括心血管、呼吸、消化、神经等多个系统的病理生理过程[2];其在哺乳动物体内的表达和分布具有组织差异性,如 KLF1 主要表达于红细胞、KLF2

[基金项目]国家自然科学基金(81860032);广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA050081);广西研究生教育创新计划项目(YCSW2021125)。
[作者简介]黄欣欣(1996—),女,硕士研究生,护师,研究方向:血管通路并发症及血栓预防研究。E-mail: 2802963723@ qq.com
[通信作者]应燕萍(1964—),女,硕士,主任护师,教授,研究方向:血管通路并发症及血栓预防研究。E-mail: yanpingying0116@ 126.com

在肺和血管内皮细胞中高表达、KLF4 在胃肠道表达丰富。KLF2 隶属于这个多基因家族，由 Anderson 等[3]于 1995 年首次从小鼠的肺组织中发现并成功克隆，因此，也被命名为肺转录因子（lung kruppel like factor，LKLF）。研究显示，KLF2 在循环系统中表现出抗炎、抗凝、调节血管生成、抗氧化、调控免疫细胞等作用，与心血管疾病密切相关，参与包括动脉粥样硬化、脑卒中、心肌梗死和心力衰竭等心血管疾病的发生、进展与转归。现就 KLF2 的生物学功能，及其参与心血管疾病发生发展的机制和研究进展进行综述。

1　KLF2 的结构特征

*KLF*2 基因定位于人类常染色体 10p13.1 号染色体上，负责 354 个氨基酸的编码。KLFs 家族成员在进化上高度保守，KLF2 作为 KLFs 家族的一员具有其特异性的结构特征，其中，氨基端含 3 个由两个半胱氨酸残基和两个组氨残基酸耦合一个 Zn^{2+} 组成的串联的 Cys_2/His_2 锌指样结构，能与富含 GC 结合位点序列的靶基因 DNA 启动子或增强子结合并起到转录调节作用；而相较于保守的氨基端，羧基端在结构和功能特征上具有多样性和特异性，家族中所有成员羧基端的转录调控区域包括转录激活结构域和转录抑制结构域存在显著差异性且能与不同的共激活因子、共阻遏因子以及共修饰因子结合，通过激活或抑制下游靶基因的表达从而调控不同的表观遗传修饰，发挥不同的生物学功能。

2　KLF2 的生物学功能

2.1　抗炎介质

KLF2 是内皮细胞（endothelial cells，ECs）炎症激活的新型转录调节因子，调控内皮炎症基因的表达。炎症细胞、促炎因子、粘附分子以及趋化因子共同介导了血管内皮的炎症反应。炎症刺激下，内皮细胞合成并释放促炎因子如肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）以及粘附分子包括 E-选择素（E-selectin）、血管细胞间黏附分子 1（vascular cell adhesion molecule 1，VCAM1）、细胞间粘附分子 1（intercellular adhesion molecule 1，ICAM1）等炎症介质诱导血液中单核细胞和白细胞滚动并粘附到内皮上[4-6]，启动炎症瀑布级联。研究表明，KLF2 能下调内皮细胞中 VCAM1、ICAM1、E-选择素等粘附分子的表达，同时，通过抑制炎症趋化因子单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1）的表达显著减少单核细胞和白细胞对内皮细胞的粘附并诱导内皮抗炎表型，减轻内皮炎症反应[7-9]。另有研究显示，过表达 KLF2 还可以阻断核因子-κB 炎症信号通路的传导，抑制核因子-κB 依赖的巨噬细胞炎性激活以及内皮促炎基因的表达[10-11]。免疫细胞向内皮细胞聚集以及单核细胞对内皮细胞的粘附被认为是动脉粥样硬化疾病进展的主要驱动力[12]。内皮炎症可导致血管内皮功能障碍，而内皮功能障碍被认为是心血管疾病的标志，因此，KLF2 可能是包括动脉粥样硬化在内的内皮炎症相关心血管疾病的潜在治疗靶点。

2.2　调控血管生成

KLF2 对于血管的生成与正常发育必不可少。*Klf*2 基因敲除的小鼠胚胎因血管破裂而无法存活[13]。以往研究发现，KLF2 通过抑制 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2，6-二磷酸酶（6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2，6-biphosphatase，PFKFB）的活性阻止 6-磷酸（6-phosphate）向果糖 2，6-二磷酸（fructose 2，6-biphosphate）转化，从而阻断内皮细胞糖酵解过程，致使内皮细胞增殖和迁移能力下降，血管生成受抑[14]。除糖酵解途径，李娜等[15]发现，KLF2 可调控血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）受体 2-血管内皮生长因子 A（VEGFA）信号轴，影响血管生成的关键步骤即内皮细胞的增殖与迁移。研究证实，KLF2 与 VEGFA 启动子结合，从转录水平抑制 VEGFA 表达[16]，从而抑制血管的生发。此外，AMPK-KLF2 信号轴的激活通过诱导内皮克隆形成细胞向内皮细胞分化，参与促红细胞生成素介导的血管生成作用[17]。血管新生是伤口愈合、癌症以及各种缺氧/缺血性疾病病程发展与转归的关键[18]，通过激活或抑制 KLF2 的表达来调控血管的生发与成熟可作为上述疾病的治疗切入点。

2.3　舒张血管

一氧化氮（nitric oxide，NO）是已知的最强效的血管扩张剂[19]，由内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）在分子氧（oxygen，O_2）和辅助因子四氢蝶呤（tetrahydrobiopterin，BH4）的协助下催化 L-[^{3}H]精氨酸（l-arginine）转化为 L-[^{3}H]瓜氨酸（L-citrulline）产生[20-21]。eNOS 作为 KLF2 的下游靶标，KLF2 通过与其启动子特异性结合并调控

L-[^{3}H]精氨酸与 eNOS 氧化酶结构域内血红素基团的偶联状态影响 NO 的合成与释放[19-22]，从而调控血管的收缩与舒张。此外，染色质免疫共沉淀（chromatin immunoprecipitation，CHIP）结果显示，KLF2 能与控制血管舒缩的血红蛋白（hemoglobin，Hb）α 结合并抑制其表达，从而减少内皮细胞中血红蛋白 α 对 NO 的摄取，使得 NO 从内皮细胞向血管平滑肌细胞扩散增加，促使血管舒张[23]。血管舒张受损与内皮促炎、促血栓形成表型有关[24]，由此可见，KLF2 介导的血管舒张对血管健康状态的维持具有重要意义。

2.4 抗血栓形成

生理条件下，血管内皮表现为抗血栓表型以保证血液的正常流动。用小干扰 RNA 沉默 KLF2 的表达后，抑制凝血激活的血栓调节蛋白（thrombomodulin，TM）、阻止血小板聚集的 NO 以及促纤维蛋白降解的组织型纤溶酶原激活物（tissue plasminogen activator，tPA）表达减少[25]，导致血小板聚集、血液凝固性增高及血栓形成；相反，过表达 KLF2 则抑制了促凝血激活的纤溶酶原激活物抑制剂 1（proenzyme activator inhibitor 1，PAI1）和组织因子（tissue factor，TF）的表达[26]。TF 是外源性凝血途径的启动因子，凝血酶原激活和纤维蛋白形成是内源性和外源性凝血途径的共同步骤，提示 KLF2 可通过调节抗/促凝血活性物质的表达或是通过调控内、外源性凝血途径的激活来调控血栓的发生。

2.5 抗氧化

研究表明，氧化应激（oxidative stress，OS）与动脉粥样硬化、心肌梗死、脑卒中以及糖尿病等多种疾病的进展有关。KLF2 通过抑制活性氧（reactive oxygen，ROS）的产生并诱导抗氧化物酶的表达，而发挥抗氧化作用[27]。KLF2 表达受损时，内皮细胞 ROS 产生增多、白细胞粘附增强、内皮细胞凋亡增加[28]，导致内皮功能障碍。研究发现，他汀类药物通过激活 KLF2 诱导抗氧化的过氧化物还原酶 6（peroxiredoxin 6）硫酸化，从而降低内皮细胞 ROS 水平、减少脂质过氧化，减轻内皮氧化应激[29]。

3 KLF2 与心血管疾病

3.1 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化（atherosclerosis）是血管的一种慢性炎症性疾病，其主要特征是大、中动脉内皮表面粥样斑块形成以及单核细胞/巨噬细胞对血管内皮的粘附、浸润，引起动脉壁增厚而造成动脉闭塞[30]。有学者发现，KLF2 表达减少与颈动脉粥样硬化模型大鼠颈动脉内膜断裂、中膜层钙化斑块形成和弹性层失去连续性有关[31]。临床研究也发现，冠状动脉粥样硬化患者血清中 KLF2 含量较健康人低，并且，KLF2 血清含量与斑块稳定性的相关分析结果显示患者血清中 KLF2 的含量与斑块稳定性呈正相关（$r=0.0534$，$P<0.01$）[32]，斑块的不稳定性增加致使斑块易于破溃，导致不良心血管事件发生风险增大。单核细胞粘附于 ECs 随后迁移到内皮间隙分化为巨噬细胞，巨噬细胞摄取循环中的氧化低密度脂蛋白导致泡沫细胞形成，加剧动脉粥样硬化的进展，而 KLF2 能通过抑制多种粘附分子和趋化因子的表达并阻断炎症通路的激活以抑制单核细胞对血管内皮的粘附、中断动脉粥样硬化发病的必要环节，从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

3.2 脑卒中

脑卒中（stroke）俗称中风，是世界范围内获得性致残的主要原因，包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中[33]。Zhang 等[34]认为，缺血性脑卒中发生后局部缺血/缺氧导致脑血管内皮发生氧化应激致使 eNOS 表达减少和 NO 的生物利用度降低，进而导致脑血管收缩增强、脑血流量减少是引发脑损伤的主要原因。及时恢复病变部位的供血/供氧是减少卒中后脑损伤的关键，如前所述，KLF2 可以强烈诱导 eNOS 的表达并促进 NO 合成，促使血管舒张、血流量增加，有利于减轻卒中所致的脑组织缺血/缺氧损伤。但最近研究也发现，卒中急性期恢复脑血流的再灌注可导致血脑屏障（blood-brain barrier，BBB）通透性增加、脑损伤进一步加重[35]。在大鼠缺血性脑卒中模型中，尿酸通过激活 KLF2-VEGFA 信号通路改善 BBB 的通透性，阻止脑循环外免疫活性物质进入脑组织，减少炎症引起的脑损伤发生[36]，机制研究证实，这与 KLF2 下调 VEGFA 表达后紧密连接蛋白表达增多促使内皮细胞间连接紧密有关[37]。目前，缺血性卒中发生后的 3～4.5 h 内静脉使用阿替普酶（alteplase）恢复脑部血供是首选的治疗方案[38]，但阿替普酶的使用受严格的时间窗和禁忌症限制，激活 KLF2 信号通路提供了治疗脑卒中的新思路。

3.3 心肌梗死

心肌梗死（myocardial infarction，MI）是由于冠

状动脉狭窄或闭塞引起心肌长时间缺血/缺氧而导致心肌坏死,是一种高致死率的疾病[39]。大量研究证明,KLF2 对于促进内皮细胞增殖能力和改善心肌功能至关重要。在急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)患者的血清中观察到 KLF2 mRNA 表达降低并伴随心肌和内皮损伤标志物心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I,CTNI)、心肌型脂肪酸结合蛋白(heart-type fatty acid binding protein,HFABP)和血管性血友病因子(von willebrand factor,vWF)表达增加,梗死心肌组织表达炎性标志物如 IL-1β、IL-6 以及 TNF-α 增多[40]。相反,上调 KLF2 表达后,AMI 诱导的内皮损伤得到修复、心肌和内皮损伤标志物浓度降低,血管内皮细胞增殖能力增强,有效地挽救了坏死的心肌[41]。心肌梗死后持续的炎症反应可导致房室重构即间质纤维化和心肌肥厚,最终进展为心力衰竭。心肌重塑和间质纤维化始于内皮功能障碍[42],KLF2 的激活在心肌梗死中表现出强大的内皮损伤修复能力和抗炎能力,但其具体的保护作用机制还有待进一步研究。

3.4　心力衰竭

心力衰竭(heart failure,HF)是一种由多种心血管疾病引起的、病因各异的临床综合征,在全球范围内具有高的发病率和死亡率[43]。研究者发现,*Klf*2 基因敲除小鼠心内膜垫发育过程的关键步骤即上皮-间充质转化过程无法完成,导致心脏瓣膜发育欠成熟,而后小鼠死于心力衰竭[44]。Li 等[45]用含 KLF2 小干扰 RNA 的 RGD-肽磁性纳米颗粒靶向诱导内皮细胞特异性 KLF2 抑制后,辛伐他汀对主动脉缩窄后压力超负荷引起的心功能障碍的保护作用丧失,表现为间质纤维化和心肌肥厚;间质纤维化和心肌肥厚是心室重构的特征表现,心室重构是心力衰竭的主要病理改变。经证实,KLF2 能直接抑制内皮转化生长因子-β1(transforming growth factor-beta-1,TRG-β1)的表达或通过抑制 KLF2-Foxp1-TRGβ1 信号轴的激活来限制心脏成纤维细胞的增殖、迁移和肌成纤维细胞的形成[45-46],从而改善病理性的心肌纤维化和肥大,延缓心室重构,预防心力衰竭的发生。KLF2 还与心力衰竭的预后有关。颈动脉体 KLF2 表达减少导致颈动脉体化学感受器敏感性增加,致使交感神经活动亢进、呼吸紊乱以及心率失常的发生[47],交感神经活动亢进、呼吸紊乱以及心律失常被认为是慢性心力衰竭患者的主要死因。

4　小结与展望

综上所述,KLF2 具有抗炎、抗血栓、抗氧化以及调控血管生成与舒张等强大的心血管保护功能,参与动脉粥样硬化、脑卒中、心肌梗死和心力衰竭等心血管疾病的发生发展过程并影响着疾病的临床结局。KLF2 为心血管疾病的治疗提供了更多的选择,针对 KLF2 上下游分子的研究是未来预防和治疗心血管疾病新的切入点与关键,通过调节 KLF2 的表达或功能可为心血管疾病的治疗提供新的治疗策略。

参考文献:

[1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the american heart association [J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596.

[2] Chang E, Nayak L, Jain MK. Krüppel-like factors in endothelial cell biology [J]. Curr Opin Hematol, 2017, 24(3): 224-229.

[3] Anderson KP, Kern CB, Crable SC, et al. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(11): 5957-5965.

[4] Deng Y, Lei T, Li H, et al. ERK5/KLF2 activation is involved in the reducing effects of puerarin on monocyte adhesion to endothelial cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(8): 2590-2599.

[5] Xu Y, Xu S, Liu P, et al. Suberanilohydroxamic acid as a pharmacological kruppel-like factor 2 activator that represses vascular inflammation and atherosclerosis. [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(12): e007134.

[6] Baker EJ, Yusof MH, Yaqoob P, et al. Omega-3 fatty acids and leukocyte-endothelium adhesion: Novel anti-atherosclerotic actions [J]. Mol Aspects Med, 2018, 64: 169-181.

[7] Xu Y, Liu P, Xu S, et al. Tannic acid as a plant-derived polyphenol exerts vasoprotection via enhancing KLF2 expression in endothelial cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6686.

[8] Li W, Li Y, Zhao Y, et al. The protective effects of aloperine against ox-LDL-induced endothelial dysfunction and inflammation in HUVECs [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 107-115.

[9] Tian R, Li R, Liu Y, et al. Metformin ameliorates endotoxemia-induced endothelial pro-inflammatory responses via AMPK-dependent mediation of HDAC5 and KLF2 [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(6): 1701-1712.

[10] Oishi Y, Manabe I. Krüppel-like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic disease [J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 5:69.

[11] Chung J, Kim KH, An SH, et al. Coxsackievirus and adenovirus

receptor mediates the responses of endothelial cells to fluid shear stress [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(11): 1-15.

[12] Jiang T, Zhang W, Wang Z. Laquinimod protects against TNF-α-induced attachment of monocytes to human aortic endothelial cells (HAECs) by increasing the expression of KLF2 [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14(4): 1683-1691.

[13] Chiplunkar AR, Curtis BC, Eades GL, et al. The Krüppel-like factor 2 and Krüppel-like factor 4 genes interact to maintain endothelial integrity in mouse embryonic vasculogenesis [J]. BMC Dev Biol, 2013, 13: 40.

[14] Doddaballapur A, Michalik KM, Manavski Y, et al. Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(1): 137-145.

[15] 李娜, 刘楚, 潘独伊, 等. Kruppel 样转录因子 2 对人肝窦内皮细胞体外迁移的影响 [J]. 中华医学杂志, 2018, 98(7): 527-532.

[16] Yu S, Hong Q, Wang Y, et al. High concentrations of uric acid inhibit angiogenesis via regulation of the Krüppel-like factor 2-vascular endothelial growth factor-A axis by miR-92a [J]. Circ J, 2015, 79(11): 2487-2498.

[17] Wang D, Song Y, Zhang J, et al. AMPK-KLF2 signaling pathway mediates the proangiogenic effect of erythropoietin in endothelial colony-forming cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 313(6): C674-C685.

[18] Bartoszewski R, Serocki M, Janaszak-Jasiecka A, et al. miR-200b downregulates Kruppel Like Factor 2 (KLF2) during acute hypoxia in human endothelial cells [J]. Eur J Cell Biol, 2017, 96(8): 758-766.

[19] Wu W, Geng P, Zhu J, et al. KLF2 regulates eNOS uncoupling via Nrf2/HO-1 in endothelial cells under hypoxia and reoxygenation [J]. Chem Biol Interact, 2019, 305: 105-111.

[20] Patel R, Varghese JF, Singh RP, et al. Induction of endothelial dysfunction by oxidized low-density lipoproteins via downregulation of Erk-5/Mef2c/KLF2 signaling: Amelioration by fisetin [J]. Biochimie, 2019, 163: 152-162.

[21] 蒋庆娟, 应燕萍. 内皮型一氧化氮合酶与血栓性疾病的研究进展 [J].中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 140-144.

[22] Liu Z, Lai CH, Zhang X, et al. Simvastatin ameliorates total liver ischemia/reperfusion injury via KLF2-mediated mechanism in rats [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2019, 43(2): 171-178.

[23] Sangwung P, Zhou G, Lu Y, et al. Regulation of endothelial hemoglobin alpha expression by Kruppel-like factors [J]. Vasc Med, 2017, 22(5): 363-369.

[24] Caradu C, Couffinhal T, Chapouly C, et al. Restoring endothelial function by targeting desert hedgehog downstream of Klf2 improves critical limb ischemia in adults [J]. Circ Res, 2018, 123(9): 1053-1065.

[25] Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, et al. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function [J]. Circ Res, 2005, 96(5): e48-e57.

[26] Wu H, Wang X, Gao S, et al. Yiqi-huoxue granule (YQHX) downregulates prothrombotic factors by modulating KLF2 and NF-κB in HUVECs following LPS stimulation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9425183.

[27] Gao X, Jiang S, Du Z, et al. KLF2 Protects against Osteoarthritis by repressing oxidative response through activation of Nrf2/ARE signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 8564681.

[28] Saum K, Campos B, Celdran-Bonafonte D, et al. Uremic advanced glycation end products and protein-bound solutes induce endothelial dysfunction through suppression of krüppel-like factor 2 [J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(1): e007566.

[29] Bibli SI, Hu J, Leisegang MS, et al. Shear stress regulates cystathionine γ lyase expression to preserve endothelial redox balance and reduce membrane lipid peroxidation [J]. Redox Biol, 2020, 28: 101379.

[30] Jiang T, Jiang D, You D, et al. Agonism of GPR120 prevents ox-LDL-induced attachment of monocytes to endothelial cells [J]. Chem Biol Interact, 2020, 316(1): 108916.

[31] 盛冲霄, 黎红华, 崔敏, 等. 糖尿病与氧化应激在颈动脉粥样硬化大鼠内皮功能障碍中的作用研究 [J]. 中国全科医学, 2016, 19(9): 1015-1020.

[32] 周晓斌, 刘莉, 李永光, 等. 锌指样转录因子 2 在冠心病患者血清中的含量及意义 [J]. 中国心血管杂志, 2018, 23(5): 402-404.

[33] Diener HC, Hankey GJ. Primary and secondary prevention of ischemic stroke and cerebral hemorrhage: JACC focus seminar [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(15): 1804-1818.

[34] Zhang B, Li J. Phoenixin-14 protects human brain vascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced inflammation and permeability [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 682: 108275.

[35] Geiseler SJ, Morland C. The janus face of VEGF in stroke [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(5): 1362.

[36] Vila E, Solé M, Masip N, et al. Uric acid treatment after stroke modulates the Krüppel-like factor 2-VEGF-A axis to protect brain endothelial cell functions: Impact of hypertension [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 164: 115-128.

[37] Zhang HT, Zhang P, Gao Y, et al. Early VEGF inhibition attenuates blood-brain barrier disruption in ischemic rat brains by regulating the expression of MMPs [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(1): 57-64.

[38] Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, et al. 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the american heart Association/American stroke association [J]. Stroke, 2018, 49(3): e46-e110.

[39] Shafei AS, Ali MA, Ghanem HG, et al. Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction [J]. J Gene Med, 2017, 19(12): 1-39.

(下转第 132 页)

盛瀚萱,张连峰,张丽. 基于 TRIM 家族讨论泛素连接酶 TRIM46 研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 99-104.
Sheng HX, Zhang LF, Zhang L. Research progress on the ubiquitin ligase TRIM46: a review based on the TRIM family [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 99-104.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 015

基于 TRIM 家族讨论泛素连接酶 TRIM46 研究进展

盛瀚萱[1],张连峰[2,3],张 丽[1*]

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021;2.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,北京 100021;3.中国医学科学院神经科学中心,北京 100730)

【摘要】 TRIM46 蛋白是一个新发现的三重基序(tripartite motif,TRIM)家族蛋白,它由两个 RING finger、一个 B-box motif、一个 coiled-coil region、一个 COS、一个 FN3 和一个羧基端的 B30. 2/SPRY 结构域构成。TRIM46 蛋白通过调节平行微管阵列形成参与神经元极化过程,也参与肿瘤的增殖和迁移等,并与固有免疫系统相关。Genecards 数据库提示,TRIM46 在人体各个组织广泛表达,其中脑组织中表达最高。本文从蛋白结构和基因功能的角度概括介绍了 TRIM46 的最新研究进展,并针对 TRIM46 未来的研究进行了初步讨论。

【关键词】 TRIM 家族;三重基序蛋白 46;神经元极性;功能;表达;固有免疫
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0099-06

Research progress on the ubiquitin ligase TRIM46: a review based on the TRIM family

SHENG Hanxuan[1], ZHANG Lianfeng[2,3], ZHANG Li[1*]

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College & Comparative Medical Center, Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College & Comparative Medical Center, Beijing 100021. 3. Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730)

【Abstract】 TRIM46, a relatively novel tripartite motif (TRIM) family protein, consists of two RING fingers, a B-box motif, a coiled-coil region, C-terminal COS, FN3 and B30. 2/SPRY domains. TRIM46 controls neuronal polarity and axon specification by driving the formation of parallel microtubule arrays. TRIM46 plays a role in tumor proliferation and migration and is also involved in innate immune regulation. The data from Genecards suggested that TRIM46 was highly expressed in the brain, although it was broadly expressed in other human organs. This review focuses on recent studies of TRIM46 protein structure and function. Future research directions and method for gene-edited animals regarding TRIM46 are also predicted and discussed.

【Keywords】 TRIM family; TRIM46; neuronal polarity; function; expression; innate immunity

---

[基金项目]国家自然科学基金(31900380,31970508)。
[作者简介]盛瀚萱(1998—),女,硕士研究生,研究方向:比较医学。E-mail: shenghanxuan06@ 163.com
[通信作者]张丽(1981—),女,副研究员,研究方向:比较医学。E-mail: zhangl@ cnilas.org

TRIM46(tripartite motif-containing 46,TRIM46)是一个新基因,功能尚不明确,国内外相关文献很少。但就近期的文献报道来看,TRIM46 十分重要,不仅在早期脑发育中参与神经元极化过程[1],还与肿瘤的增殖、迁移相关[2],并在先天免疫系统中扮演了重要角色[3]。TRIM46 属于 TRIM 家族,而 TRIM 蛋白质家族成员在细胞周期、细胞凋亡、分化、代谢以及病毒的免疫应答等过程中均有重要作用。作者通过将 TRIM46 与其他家族成员乃至亚家族成员之间的比较,总结了 TRIM46 的最新研究进展,并对 TRIM46 蛋白未来的研究方向和手段进行了初步讨论。

1 TRIM 家族及 C-I 亚家族

人类三重基序(tripartite motif,TRIM)蛋白质家族成员众多,迄今已发现近 80 个,涉及细胞周期调控、细胞凋亡、分化或病毒免疫应答等多种生物学过程。TRIM 家族(又名 RBCC 家族)成员含有 RING 指结构域(RING-finger domain),因而可以作为泛素 E3 连接酶发挥功能。除了 RING 指结构域外,TRIM 蛋白还含有一个或者两个锌离子结合结构域(B-boxes domain)和卷曲螺旋结构域(coiled coil domain),以及复杂的 C-端结构域。

TRIM 家族蛋白质根据 C-端结构域的差异可分为 11 个亚家族(C-I~C-XI)。TRIM46 属于 C-I 亚家族,C-I 亚家族包括 6 个成员:MID I(TRIM 18)、MID2(TRIM 1)、TRIM9, TNL(TRIM67)、TRIM36(HAPRIN)和 TRIFIC(TRIM46)。表 1 总结比较了这些基因的功能及相关疾病。C-I 亚家族每个基因不仅含有一个 RBCC 结构域,包括两个 B-boxes,还包括 C 末端的 COS box,Fibronectin Type III motif 和 SPRY/B30.2 样结构域。这些基因又可以分为 3 组:MIDI 和 MID2 同源性高达 76%,但是和其他成员同源性低于 25%;TRIM9 与 TNL 最为相似,同源性高达 65%;而 HAPRIN(TRIM36)与 TRIFIC(TRIM46)最为接近,同源性高达 43%。

2 TRIM46 基因概述

2.1 TRIM46 蛋白结构和功能

TRIM46 基因位于人染色体 1q21,又命名为 GENEY,编码的蛋白含有一个 N 末端的 RING finger 结构域、两个 B-box motif、一个 coiled-coil region、一个 COS box、一个 FN3 和羧基端的一个 B30.2 结构域[14]。TRIM46 蛋白是一个新发现的三重基序(tripartite motif,TRIM)家族蛋白。TRIM46 蛋白含有 759 个氨基酸,分子量约为 83×10^3。TRIM46 含有 RING 指结构域(RING-finger domain),因而可能具备 E3 泛素-蛋白连接酶功能。从四级结构上预测,TRIM46 可以与 TUBB3 蛋白以及 TUBA4A 蛋白发生相互作用。大多数 TRIM 蛋白从 N 端到 C 端的顺序依次是 RING 锌指结构,一个或两个 B-box 结构和一个卷曲螺旋结构域(coiled-coil,CC),又被称为 RBCC 结构域。如图 1 所示,TRIM46 含有 RBCC 结构,在转染的 COS-1 细胞上,可与微管结构共定位。1-166 蛋白区域决定了其在神经元近端轴突的定位,411-429 蛋白区域决定了其与微管结合和共定位。

2.2 TRIM46 的表达

人类蛋白图谱数据库(human protein atls,HPA)中 RNA-seq 数据显示,TRIM46 蛋白在肾上腺、阑尾、脑、十二指肠、胆囊、淋巴结、脾、胃和睾丸等组织中广泛表达,其中脑和男性生殖系统附睾中表达最高。TRIM46 在各个脑区均有表达,其中脑皮层、小脑和基底核中表达丰富,海马和杏仁核中等水平表达,丘脑表达相对较少。TRIM46 在上皮细胞、内分泌细胞、神经细胞、胶质细胞、生殖细胞、血管细胞、肌肉细胞、间质细胞和血液或免疫细胞等多种类型细胞中表达,其中神经细胞、生殖细胞和单核细胞表达最多。在各种细胞系中,人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 中 TRIM46 的表达最高。目前已经有实验验证报道的,是 TRIM46 在神经元的轴突起始段(axon initial segment,AIS)特异表达[1,5]。

3 TRIM46 功能与相关疾病

3.1 TRIM46 与肿瘤

迄今,TRIM46 与肿瘤相关研究较少。从基因位置上看,人和小鼠的 TRIM46 基因均坐落于肿瘤靶点基因 MUC1 的下游,在人类 1 号染色和小鼠 3 号染色体中,两个基因作为同一个基因簇的一部分。2015 年国外的报道发现了在卵巢恶性肿瘤标本和细胞中特征性表达 MUC1-TRIM46-KRTCAP2 的嵌合 RNA[30],而在非肿瘤卵巢组织中检测不到该嵌合 RNA。此外,胃癌的基因组关联分析中显示 MUC1/TRIM46 的 SNP 位点 rs2070803 与患者的生存预后密切相关[31]。功能研究方面,2016 年 Zhang 等[2]报道了 TRIM46 是小鼠 mir-1894-3p 的靶基因,敲低 TRIM46 表达可抑制乳腺癌细胞的增殖和迁

移。随后 2017 年又有国内研究报道[32]，TRIM46 通过抑制 SH2 结构域酪氨酸磷酸酶 1（Src homology 2（SH2）-containing tyrosine phosphatase 1，SHP1）表达，促进 HCT116 结直肠癌细胞的增殖和侵袭。2019 年的研究将 FAM72B、GNE 和 TRIM46 3 基因视为前列腺癌病人的预后基因表达分类器[33]。由于 TRIM46 与 TRIM36 序列高度相似，后者参与了细胞膜间的黏附[34]，提示 TRIM46 也可能通过与细胞外基质互作，促进肿瘤细胞的增殖和迁移。最新的研究揭示了 TRIM46 通过促进 PPARα 的泛素化激活 NF-κB 信号通路参与骨肉瘤细胞存活和凋亡抑制的新机制[35]。

表 1　TRIM C-I 亚家族成员基因功能及相关疾病的比较

Table 1　Gene function and related disorders of TRIM C-I subfamily members

基因 Genes	别名 Aliases	功能 Function	相关疾病 Related disorder	参考文献 References
TRIM46	TRIFIC, GeneY	轴突中的物质运输；轴突特化；神经元极性建立和神经元迁移。Efficient cargo delivery and trafficking in axons, proper axon specification, the establishment of neuronal polarity and proper neuronal migration.	尚无报道 Not yet reported	[1,4-9]
TRIM1	MID2	与微管稳定性相关。May play a role in microtubule stabilization.	精神发育迟滞，X 连锁 101 Mental retardation, X-linked 101（MRX101）	[10-14]
TRIM9	RNF91	E3 泛素蛋白连接酶；可能在神经退行性疾病中与各种异常内涵体的降解和形成相关。通过 SNAP25 参与 SNARE 复合体的形成调节突触小泡的胞外分泌。E3 ubiquitin-protein ligase. May play a role in regulation of neuronal functions and may also participate in the formation or breakdown of abnormal inclusions in neurodegenerative disorders. May act as a regulator of synaptic vesicle exocytosis by controlling the availability of SNAP25 for the SNARE complex formation.	痴呆 Dementia	[15-19]
TRIM18	MID1	靶向 IGBP1 具有 E3 泛素蛋白连接酶活性，促进单泛素化，导致 PP2A 蛋白磷酸酶的催化亚单位去保护和下游的多泛素化降解。转录调节因子，和微管相关影响微管动态。Has E3 ubiquitin ligase activity towards IGBP1, promoting its monoubiquitylation, which results in deprotection of the catalytic subunit of protein phosphatase PP2A, and its subsequent degradation by polyubiquitination. Midline 1, transcriptional regulator, is associated with microtubules and influences microtubule dynamics.	Opitz-GBBB 综合征 Opitz GBBB syndrome	[11,20-23]
TRIM36	RNF98	E3 泛素蛋白连接酶活性介导靶蛋白的泛素化和蛋白降解。参与染色体分离和细胞周期调控。也可能参与顶体反应和受精。E3 ubiquitin-protein ligase TRIM36 mediates ubiquitination and proteasomal degradation of substrate proteins. Involved in chromosome segregation and cell cycle regulation. May play a role in the acrosome reaction and fertilization.	无脑症 Anencephaly（ANPH）	[15,16,24-26]
TRIM67	TNL	无 None	特殊语言障碍，早产胎膜早破。Specific language impairment, premature rupture of the membranes.	[14,19,27-29]

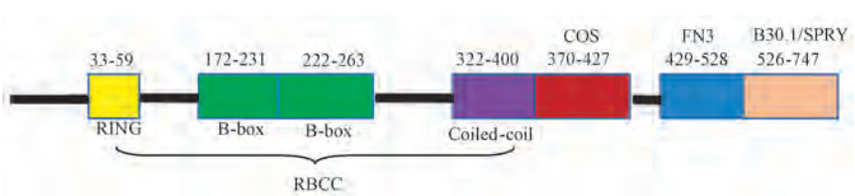


图 1　TRIM46 蛋白结构示意图

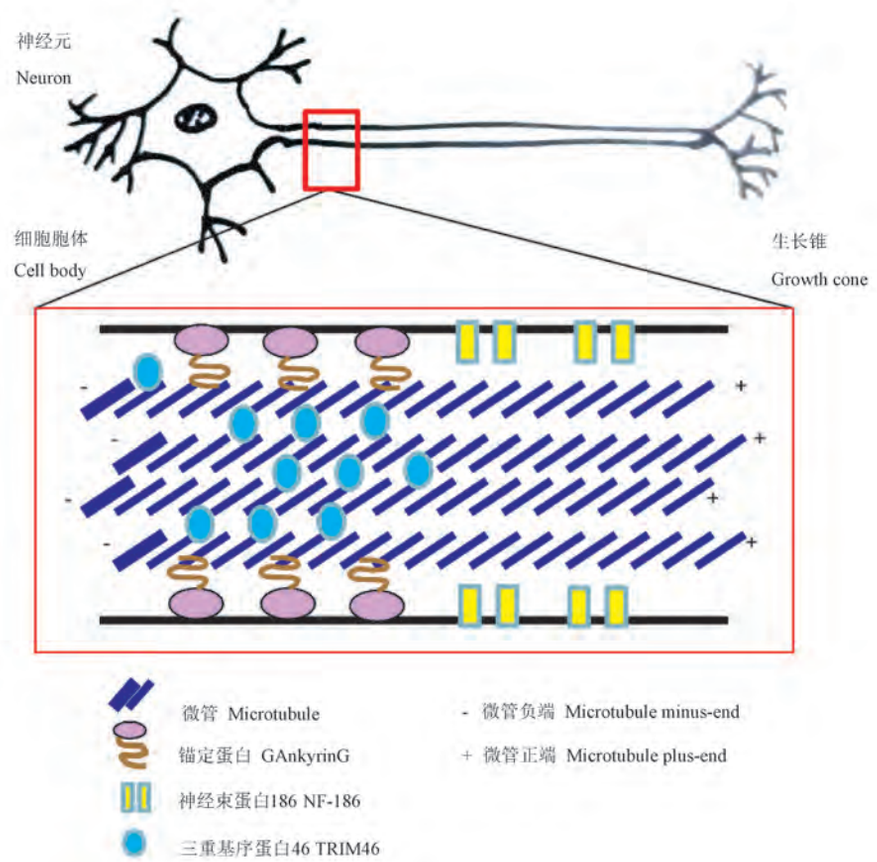
Figure 1　Schematic representation of overall domain architecture of human TRIM46 protein

3.2 TRIM46 与神经元极化

轴突始段(axon initial segment, AIS)在神经元极性形成、动作电位引发、以及脑损伤和脑疾病中起重要作用。研究证实,TRIM46 特异定位于近端轴突,在 AIS 结构维持以及神经元极性的生成/维持中发挥了重要功能[1,4-9]。TRIM46 可诱导平行微管束化[4],平行维管束通过跨桥连接而成,决定了神经元极化的方向[1,4]。同时这些维管束对于神经元轴突内的有效运输也非常重要。TRIM46 部分敲低,导致微管运输增加,微管在远端轴突异常积累[9]。但是,目前关于 TRIM46 蛋白在神经组织中参与神经元极化过程的机制尚不明确,研究很少,目前已知的是 TRIM46 组织轴突起始段的微管束化,决定极化的方向,可能是通过 KIF3/KAP3/TRIM46 转运调节 MARK2 信号对轴突起始段进行时空组织构建[6]。如图 2 所示,TRIM46 与 AIS 其它蛋白成分 480AnkG 和 NF-186 等协同作用,参与轴突形成和神经元极化。

3.3 TRIM46 与痛风、炎症

TRIM 家族与先天免疫相关[36],TRIM46 也同样可能在免疫类疾病的调节方面扮演重要角色。基因组关联分析显示,TRIM46 的单核苷酸多态性(SNP)与血清中尿酸浓度相关[37]。高尿酸血症与一种复杂的关节炎症痛风相关。一项国内的研究显示,TRIM46 的两个 SNP 位点 rs4971101 和 rs2070803 与痛风的敏感性密切相关[38],提示了痛



注:480AnkG 通过 EBs 蛋白招募微管蛋白到质膜上。480AnkG 诱导微管成束,有利于 TRIM46 结合于微管栅栏,二者结合促进微管定向成束化,形成稳定的平行微管。TRIM46 结合微管还可引导 NF-186 运输到近端轴突,480AnkG 则控制 NF-186 在 AIS 的滞留。

图 2 TRIM46 参与近端轴突的微管组织

Note. 480AnkG recruited Tubulin into the plasma membrane via EBs protein. 480AnkG induced microtubule bundle, which was favorable for TRIM46 binding to microtubule lattice, and the binding promoted microtubule fascicles and stable parallel microtubule bundles formation. Microtubule-associated protein TRIM46 also guide Neurofascin-186 trafficking to the proximal axon and 480AnkG controls the retention of NF-186 in AIS.

Figure 2 TRIM46 participates in microtubule organization in the proximal axons

风的遗传因素,未来通过基因修饰动物构建也可解决痛风模型困难问题[39]。艰难梭菌 B(*Clostridium difficile* toxin B)诱发肠道炎症导致腹泻,严重可以致死。最新研究发现,TRIM46 可作为一个新的免疫调节因子,调控艰难梭菌毒素 B(TcdB)诱导的慢性炎症[3]。具体机制是 TRIM46 参与 DUSP1 泛素化,TRIM46 敲低表达抑制 TcdB 诱导的 MAPKs 与 NF-κB 信号激活和炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的产生,反之,TRIM46 过表达则促进炎症。

3.4　TRIM46 与副肿瘤综合症

副肿瘤综合症(paraneoplastic neurological syndromes,PNS),是一种与肿瘤产物相关的异常的免疫反应,可诱发神经、消化、内分泌和造血等多系统病变和相应的临床症状出现。PNS 病人血清或者脑脊液会存在各种抗神经元抗体,而这些抗体的检测是 PNS 诊断和寻找潜在肿瘤的有用工具。最近研究报道发现,TRIM46 抗体可在多种神经综合征中检测到,且与小细胞肺癌(small-cell lung carcinoma, SCLC)相关[40]。TRIM46 特异定位于 AIS,而其他 AIS 成分蛋白抗体在 PNS 及其他神经疾病中已有报道。比如 AIS 另一成分蛋白 NF186 抗体可在外周神经病变中检测到。

4　研究展望

TRIM 家族蛋白具有 3 种类型的结构域:锌指结构(RING finger)、B-box 和卷曲螺旋(coiled coil)。B-box 是引起炎症反应的功能结构域,RBCC 结构域决定了与微管细胞骨架的结合。CC 结构域决定了蛋白自身的相互作用和同源二聚体的形成。TRIM 蛋白还作为 E3 连接酶参与泛素化过程,转移泛素到特定的靶点上。正是由于结构的多样性,决定了其功能的多样性。

TRIM46 与家族其他成员类似,与细胞骨架相关参与微管组装调控,也参与蛋白的泛素化,推测其与神经系统疾病或者精神类疾病有着密不可分的关系。同时,TRIM46 目前的研究大多采用 siRNA 敲低其表达,离体条件下研究其功能缺损导致的表型变化。尚缺乏基因敲除动物或者转基因过表达动物模型,以及利用动物模型开展的功能获得或者功能丢失的条件下的活体表型研究。因此,TRIM46 未来的研究可能会聚焦 3 大方向:神经系统疾病、免疫系统疾病以及肿瘤领域也将涌现出更多关于 TRIM46 作为肿瘤标记物或者预后标记物的研究。从技术手段上讲,利用新的基因编辑技术创建 TRIM46 过表达或者敲除动物模型便于更好开展 TRIM46 新功能研究,以及与疾病相关的分子机制研究。

参考文献:

[1] Van Beuningen SFB, Will L, Harterink M, et al. TRIM46 controls neuronal polarity and axon specification by driving the formation of parallel microtubule arrays [J]. Neuron, 2015, 88(6): 1208-1226.

[2] Zhang L, Li X, Dong W, et al. Mmu-miR-1894-3p inhibits cell proliferation and migration of breast cancer cells by targeting Trim46 [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 609.

[3] Li Y, Xu S, Xu Q, et al. Clostridium difficile toxin B induces colonic inflammation through the TRIM46/DUSP1/MAPKs and NF-kappaB signalling pathway [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2020, 48(1): 452-462.

[4] Harterink M, Vocking K, Pan X, et al. TRIM46 organizes microtubule fasciculation in the axon initial segment [J]. J Neurosci, 2019, 39(25): 4864-4873.

[5] Curcio M, Bradke F. Microtubule organization in the axon: TRIM46 determines the orientation [J]. Neuron, 2015, 88(6): 1072-1074.

[6] Ichinose S, Ogawa T, Jiang X, et al. The spatiotemporal construction of the axon initial segment via KIF3/KAP3/TRIM46 transport under MARK2 signaling [J]. Cell Rep, 2019, 28(9): 2413-2426.

[7] Fréal A, Rai D, Tas RP, et al. Feedback-driven assembly of the axon initial segment [J]. Neuron, 2019, 104(2): 305-321.

[8] Hamdan H, Lim BC, Torii T, et al. Mapping axon initial segment structure and function by multiplexed proximity biotinylation [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 100.

[9] Rao AN, Patil A, Black MM, et al. Cytoplasmic dynein transports axonal microtubules in a polarity-sorting manner [J]. Cell Rep, 2017, 19(11): 2210-2219.

[10] Buchner G, Montini E, Andolfi G, et al. MID2, a homologue of the Opitz syndrome gene MID1: similarities in subcellular localization and differences in expression during development [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(8): 1397-407.

[11] Short KM, Hopwood B, Yi Z, et al. MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders [J]. BMC Cell Biol, 2002, 3: 1.

[12] Perry J, Short KM, Romer JT, et al. FXY2/MID2, a gene related to the X-linked Opitz syndrome gene FXY/MID1, maps to Xq22 and encodes a FNIII domain-containing protein that associates with microtubules [J]. Genomics, 1999, 62(3): 385-394.

[13] Geetha TS, Michealraj KA, Kabra M, et al. Targeted deep resequencing identifies MID2 mutation for X-linked intellectual disability with varied disease severity in a large kindred from

India [J]. Hum Mutat, 2014, 35(1): 41-44.
[14] Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding [J]. J Biol Chem, 2006, 281(13): 8970-8980.
[15] Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. EMBO J, 2001, 20(9): 2140-2151.
[16] Rose JE, Behm FM, Drgon T, et al. Personalized smoking cessation: interactions between nicotine dose, dependence and quit-success genotype score [J]. Mol Med, 2010, 16(7-8): 247-253.
[17] Tanji K, Kamitani T, Mori F, et al. TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies [J]. Neurobiol Dis, 2010, 38(2): 210-218.
[18] Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, et al. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC) [J]. Genome Res, 2004, 14(10B): 2121-2127.
[19] Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs [J]. Nat Genet, 2004, 36(1): 40-45.
[20] Massiah MA, Simmons BN, Short KM, et al. Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING [J]. J Mol Biol, 2006, 358(2): 532-545.
[21] Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, et al. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22 [J]. Nat Genet, 1997, 17(3): 285-291.
[22] Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, et al. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation [J]. Nat Genet, 2001, 29(3): 287-294.
[23] Cainarca S, Messali S, Ballabio A, et al. Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(8): 1387-1396.
[24] Balint I, Müller A, Nagy A, et al. Cloning and characterisation of the RBCC728/TRIM36 zinc-binding protein from the tumor suppressor gene region at chromosome 5q22.3 [J]. Gene, 2004, 332: 45-50.
[25] Singh N, Kumble Bhat V, Tiwari A, et al. A homozygous mutation in TRIM36 causes autosomal recessive anencephaly in an Indian family [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(6): 1104-1114.
[26] Kitamura K, Nishimura H, Nishimune Y, et al. Identification of human HAPRIN potentially involved in the acrosome reaction [J]. J Androl, 2005, 26(4): 511-518.
[27] Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1 [J]. Nature, 2006, 441(7091): 315-321.
[28] Boyer NP, Monkiewicz C, Menon S, et al. Mammalian TRIM67 functions in brain development and behavior [J]. eNeuro, 2018, 5(3): 186.
[29] Comuzzie AG, Cole SA, Laston SL, et al. Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51954.
[30] Kannan K, Kordestani GK, Galagoda A, et al. Aberrant MUC1-TRIM46-KRTCAP2 chimeric RNAs in high-grade serous ovarian carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2015, 7(4): 2083-2093.
[31] Sung H, Hu N, Yang HH, et al. Association of high-evidence gastric cancer susceptibility loci and somatic gene expression levels with survival [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(11): 1119-1128.
[32] 梁倩, 房静远, 洪洁. 泛素连接酶 TRIM46 促进人结直肠癌细胞增殖和侵袭 [J]. 肿瘤, 2017, 37(4): 334-339.
[33] Cheng B, He Q, Cheng Y, et al. A three-gene classifier associated with MicroRNA-mediated regulation predicts prostate cancer recurrence after radical prostatectomy [J]. Front Genet, 2020, 10: 1402.
[34] Yoshigai E, Kawamura S, Kuhara S, et al. Trim36/Haprin plays a critical role in the arrangement of somites during Xenopus embryogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(3): 428-432.
[35] Jiang W, Cai X, Xu T, et al. Tripartite motif-containing 46 promotes viability and inhibits apoptosis of osteosarcoma cells by activating NF-κB signaling through ubiquitination of PPAR [J]. Oncol Res, 2020, 28(4): 409-421.
[36] McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, et al. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation [J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1): 46-56.
[37] Köttgen A, Albrecht E, Teumer A, et al. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations [J]. Nat Genet, 2013, 45(2): 145-154.
[38] Dong Z, Zhou J, Jiang S, et al. Effects of multiple genetic loci on the pathogenesis from serum urate to gout [J]. Sci Rep, 2017, 7: 43614.
[39] 金沈锐, 秦旭华. 痛风及高尿酸血症动物模型的研究现状和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(1): 55-58.
[40] van Coevorden-Hameete MH, van Beuningen SFB, Perrenoud M, et al. Antibodies to TRIM46 are associated with paraneoplastic neurological syndromes [J]. Ann Clin Transl Neurol, 2017, 4(9): 680-686.

〔收稿日期〕2021-03-19

王娟,杨晶晶,周仁鹏,等. 肝纤维化小鼠模型研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 105-110.
Wang J, Yang JJ, Zhou RP, et al. Current status of research on mice models of liver fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 105-110.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 016

肝纤维化小鼠模型研究现状

王 娟[1,2],杨晶晶[1],周仁鹏[1,2],胡 伟[1,2],鲁 超[2,3*]

(1.安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心,合肥 230601;2.安徽医科大学药学院,合肥 230032;
3.安徽理工大学,安徽 淮南 232001)

【摘要】 肝纤维化是肝病领域研究的热点问题,其模型的制备有助于探究发病机理。本论文综述了目前报道的十种常用的肝纤维化小鼠模型,讨论了各自模型的成模原理、造模途径、模型效果、优缺点和用途,比较不同小鼠模型的异同,旨在为模型的选择提供依据,为肝纤维化的研究方向提供参考。

【关键词】 肝纤维化;小鼠;动物模型
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2022) 02-0105-06

Current status of research on mice models of liver fibrosis

WANG Juan[1,2], YANG Jingjing[1], ZHOU Renpeng[1,2], HU Wei[1,2], LU Chao[2,3*]

(1. Department of Clinical Pharmacology, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China.
2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032. 3. Anhui University of Science & Technology, Huainan 232001)

【Abstract】 Liver fibrosis is an important topic in the field of liver disease research, and the establishment of animal models for liver fibrosis is key to exploring the pathogenesis of this disease. This article summarizes the ten commonly used types of mice models of liver fibrosis and discusses their respective mechanisms, Methods of establishment, effects, and advantages and disadvantages of establishing a particular mice model. The differences and similarities between the models are compared to provide a reference for the selection of an appropriate model for liver fibrosis research.

【Keywords】 liver fibrosis; mice; animal models

肝纤维化的概念是上世纪 50 年代由德国科学家提出的,其被认为是癌前状态,与增加原发性肝癌相对死亡率密切相关,占肝癌患者死亡率的一半[1]。因营养代谢和病毒感染等致慢性肝病的各种原因都可引发肝纤维化,先是肝损伤导致细胞外基质(extracellular matrix,ECM)积聚在肝中,随后导致肝纤维化和肝硬化[2-3]。肝纤维化的发生发展机制是由多种细胞、蛋白和各种促纤维化细胞因子等因素共同组成一个复杂的网络,其中肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是其中的主体细胞类型[4]。清除病毒等祛除病因法是目前常规治疗方法,抗炎、针对肝损伤的治疗以及抑制 ECM 产生并促其降解等也是常见治疗方式[1-5]。早期肝纤维化很难被发现,晚期时逆转并不能完全避免进展为肝癌的风险和严重的并发症。因此,在整个肝病发展过程中,对各种致病因素的动物模型进行深入研究,找出缓解甚至逆转早期肝纤维化发展的机制和药物,对治疗肝病具有极高的价值。

[基金项目]国家自然科学基金(81600477)。
[作者简介]王娟(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:临床药理学。E-mail:wangjuan5102020@ 163.com
[通信作者]鲁超(1969—),男,研究员,副教授,研究方向:临床药理学。E-mail:765385306@ qq.com

常用于制备模型的动物主要有大鼠[6]、小鼠[7]、豚鼠[8]、家兔[9]等,也有使用小型猪[10]、斑马鱼[11]、恒河猴[12]、鸭[13]来进行研究。与其他实验动物比较,小鼠因与人类基因组同源度高,繁殖快、成本低、操作易上手而成为制备此种模型的首选,如乙型肝炎纤维化模型就以小鼠为主流[14]。大、小鼠造模方式分类大致相同,但在方法操作难易程度、受试药物用量、纤维化程度、成模率、死亡率等方面有一定区别。如大鼠没有胆囊,胆管阻塞性肝纤维化法会比小鼠更适用。以欧强等[15]采用 SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠成功建立的模型为例:8 周后小鼠模型组的炎症反应和纤维化程度均比大鼠模型组的明显,从这个角度小鼠更适于该病的实验研究。

目前大鼠模型的研究已较成熟,而小鼠模型的相关报道较少,故本文综合国内外关于小鼠肝纤维化模型的研究,基于肝纤维化的不同致病因素,归纳了目前常用模型的成模机制、造模途径、模型效果、优缺点和用途。

1 化学造模法

1.1 四氯化碳(carbon tetrachloride,CCl_4)诱导的肝纤维化模型

反复给予 CCl_4 是一种经典的、最早、最广泛地用于诱导毒素介导肝纤维化的模型之一[16]。其机制是 CCl_4 通过 CYP450 氧化酶激活生成活性自由基再活化贮脂细胞形成脂肪变性,促进纤维化。实验结果可能因试剂的剂量、给药时间和途径或其他因素而有所不同,腹腔注射、皮下注射和灌胃法是目前 CCl_4 造模法常用的给药方式。其中,皮下注射 40%~60% CCl_4 溶于橄榄油最常见,每隔 2 d 注射 1 次,2 个月时即可成功造模[17]。缺点是 CCl_4 毒性较大,大剂量注射易导致实验动物大量死亡而小剂量造模不易成功。

1.2 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine,DMN)诱导的肝纤维化模型

DMN 是一种有肝亲和性毒性的药物,通过甲基化蛋白质、DNA 和生物膜脂质致使肝中毒性改变,导致肝细胞严重坏死和纤维化形成。与 CCl_4 法不同在于损伤是进行性的,在 DMN 暴露中断后 1~2 个月仍可维持稳定疾病状态,因而与人类肝纤维化病理改变更类似。此造模方法已有 40 余年的历史,大都参照 Jenkins 等[18]介绍的方法来制备。王丽娜等[19]将注射频率由连续 3 d 改为每 2 d 1 次,改良方法的模型更稳定,病理可见小叶内纤维化和大面积出血性坏死。DMN 价格昂贵,具有致癌性,应格外留意个人安全。

1.3 硫代乙酰胺(thioacetamide,TAA)诱导的肝纤维化模型

TAA 是一种毒性物质,进入肝后通过延长肝细胞有丝分裂和阻碍 RNA 转移来影响相关酶的代谢过程,最终导致肝细胞坏死,常用于啮齿动物的纤维化诱导。该模型与人类肝疾病的生化和形态学指标特征十分类似,成模率高,通常作为肝纤维化基础研究的合适动物模型[20]。Seo 等[21]采取每周 3 次连续 7 周腹腔注射 TAA 溶液(200 mg/kg)的方法成功造模,结果发现 TAA 可增强小鼠的肝毒性,增加肝功能和纤维化程度,并产生大量胶原纤维,但使小鼠体重减轻。

1.4 其他化学因素诱导的肝纤维化模型

(1)血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)诱导法。此模型是目前提出的一种新型小鼠肝纤维化模型,其过程不出现肝细胞炎症和死亡,已应用于肾、心等其他器官。研究发现 Ang Ⅱ在肝纤维化组织中的含量显著增多,长期输注 Ang Ⅱ可诱导 HSC 活化和促炎作用,可见 Ang Ⅱ具有致炎和纤维化的作用,并以此来诱导该疾病模型[22]。(2)D-氨基半乳糖(D-Galactosamine,D-Gal N)法。因尿嘧啶核苷酸被大量消耗,致使 RNA 和蛋白质合成减少而引起的肝损伤。多用于诱导急性肝损伤,纤维化程度高,多为三到四期,与人类肝纤维化相似度高,重复性好,但不足之处是造模所消耗的时间和成本高。Osawa 等[23]给小鼠反复服用 D-Gal N 持续 8 周,诱导了肝细胞凋亡和肝纤维化。(3)二氧化硅(SiO_2)诱导的肝纤维化。SiO_2 可诱导体内过量氧自由基损伤肝组织以及诱导 TGF-β 等细胞因子激活 HSC,致使 ECM 大量沉积,形成肝纤维化。有研究者混合 SiO_2 和超液化碘油于肝右叶实质内局部注射,12 周后可见部分细胞坏死、巨噬细胞结节和纤维增生[24]。该法可固定肝纤维化病变部位,成功率高,因而可为介入治疗肝癌提供一种实验可行性方向。但操作较为复杂,历时长。

2 免疫造模法

2.1 异种血清法

有研究证实,血清作为异源抗原刺激实验动物产生免疫反应,刺激机体主动释放细胞因子来激活

HSC,使 ECM 过度沉积导致肝纤维化[25]。此机制与临床上慢性肝炎所致肝纤维化非常相似,具有强烈的免疫应答能力,对肝细胞乃至整个动物的伤害很小,对实验结果影响小。猪、牛、马和血吸虫等的血清是实验中常采用的。Zhang 等[26]采用每周给 Balb/c 小鼠注射 0.1 mL/10 g 猪血清,6 周后小鼠表现为明显的纤维化变化。适用于肝纤维化机制的研究和免疫调节剂的筛选。但造模时间长,因过敏反应致实验动物易死亡。

2.2 刀豆素蛋白 A 法(concanavalin A,Con A)

Con A 是一种来自刀豆的植物凝集素,可刺激 T 细胞有丝分裂,促进 TGF-β、TNF-α 等细胞因子的释放,引起炎症反应并进一步发展成肝纤维化,与人类病毒性肝炎的免疫病理机制非常接近[27-28]。这种明显的急性肝损伤可在 Balb/c 小鼠上出现,而在 SCID 小鼠上不会,使用其他免疫抑制剂也不会引起肝损伤,可见其特异性[27]。Yang 等[29]对小鼠反复注射 Con A 建模,采用剂量 15 mg/kg 每周 1 次尾静脉注射的方法,连续注射 6 次后就出现肝纤维化。

3 血吸虫肝纤维化动物模型

日本血吸虫病是我国有害性最大的寄生虫病之一,肝遭受损伤后形成虫卵肉芽肿,再形成纤维化。用血吸虫尾蚴来制作是这类模型的基础造模方式,因而不能应用于其他类型,只应用于血吸虫病性肝病的药物研究治疗。姜苏芩[30]采用皮肤敷贴日本血吸虫尾蚴感染小鼠 12 周来建模,在感染后分期做组织标本检测,发现纤维化程度进行性加重、胶原沉积面积与虫卵肉芽肿位置息息相关。小鼠肝在感染后发生的病理变化与人类有极大的相似性,对研究人类该疾病机制及治疗方面具有重要价值。

4 胆管阻塞性肝纤维化(BCM 法)模型

Beaussier 等[31]通过实验发现因胆管破坏、胆汁淤积导致肝细胞及胆管细胞受损,在肝内产生大量胶原和 ECM 沉积发展成肝纤维化。BCM 法中最常见的是通过人为结扎肝外胆管使其阻塞,其结扎方法包括胆总管结扎法、胆管结扎后切断法和 N-丁基-2-氰基丙烯酸盐逆行性注入法 3 种方式[32]。该模型成模周期短,对动物的要求不高,肝纤维化稳定可靠,且无须与毒性物质接触。但不足之处在于:不仅因不同个体对胆管扩张程度的耐受能力不同而使肝实质有不同反应致使纤维化程度不均一,且因胆汁泄漏引起的腹膜炎以及胆总管的分离结扎技术而致模型死亡率高,一般在 30%以上[33]。该模型不适用于通过利胆而发挥药效的药物。

5 肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury,HIRI)诱导的肝纤维化模型

HIRI 是指肝缺血再灌注后,不仅不会恢复肝功能,反而让肝结构和功能损害更严重的现象。在临床上严重肝外伤、肝移植、休克复苏时均不可避免出现 HIRI,利用 HIRI 这一操作形成的一种新型肝纤维化模型,既符合临床实际,也为这方面的研究提供一种新的方向。肝细胞损伤后释放炎症因子、细胞因子和自由基促使 HSC 被大量激活而启动早期肝纤维化,这些因素在疾病的进程中持续作用并进一步发展。左嘉玮等[34]采用缺血后再灌注 8 周诱导小鼠肝纤维化,采用半肝阻断法,造成小鼠肝左外侧叶、左中叶及中叶缺血 90 min,成功造模。

6 酒精性肝纤维化(alcoholic liver fibrosis,ALF)模型

我国酒文化底蕴深厚,由饮酒引发的健康问题日益严峻,由 ALF 引起死亡的肝硬化患者大约为 50%[35]。肝是酒精代谢的主要场所,代谢物乙醛及其转化物乙酸通过多种途径损伤肝结构与功能导致炎症反应,同时削弱肝内脂肪氧化形成脂肪肝,最终形成 ALF。目前常用的模型制备方法为含酒精饮食诱导法和灌胃法。含酒精饮食诱导法的成本更低,操作更简单,死亡率也更低,常采用 Lieber-DeCarli 模型和 Tsukamoto-French 模型[36-37]。灌胃法可控制每只小鼠的酒精摄入量,造模稳定性高。苏俊[38]应用白酒灌胃法 16 周成功复制模型,观察到如变性坏死、炎症和纤维增生等相关病理表现。此方法非常贴合中国人的饮酒方式。

7 营养诱发模型

营养诱发模型多用来制作脂肪性肝纤维化模型,包括营养物质过剩和营养物质缺乏两种类型。C57 小鼠对代谢综合征敏感性强,易进展为纤维化,常选用来制备该类模型。

7.1 营养物质过剩诱导模型

包括单一营养物质过剩诱导模型(单纯高脂模型)和多种营养物质过剩诱导模型(高脂高糖模型与高胆固醇高胆盐模型)。长期进食高脂饮食后过

多脂肪酸作用于肝细胞产生脂毒性,引起肝损伤和炎症,但单独给予高糖不能诱发纤维化,Asgharpour 等[39]给小鼠联合高果糖-葡萄糖溶液(23.1 g/L 果糖 + 18.9 g/L 葡萄糖)启动致肥饮食后,发现小鼠 16 周后可出现胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR),大大缩短造模时间和增加纤维化程度。Savard 等[40]发现胆固醇增多可能会抑制脂肪酸 β 氧化和减少胆汁酸合成,引起肝脂肪变性,添加胆盐可增强小鼠对胆固醇的吸收并抑制其清除而提高其浓度。该方法比高胆固醇饮食造模周期短且纤维化程度高,但缺点是其未引起 IR。

7.2 营养物质缺乏模型

主要有蛋氨酸和胆碱缺乏(methionine and choline-deficient diet,MCD)模型和 L-氨基酸胆碱缺乏(choline-deficient L-amino acid-defined diet,CDAA)模型。(1)MCD 模型在脂肪性肝纤维化研究中很常见。胆碱、蛋氨酸均缺乏时,谷胱甘肽和卵磷脂合成受阻,导致 VLDL 合成及分泌障碍,造成 TG 在肝细胞沉积,并增加抗氧化屏障机制损伤导致氧化应激加剧,肝细胞发生炎症和坏死[41]。(2)CDAA 模型是把胆碱缺乏饮食中相当量的蛋白质用 L-氨基酸和相应的混合物来替代。Winkler 等[42]用 CDAA 饮食喂养 C57BL/6N 小鼠 10 周后出现周围肝纤维化,伴有肝脂肪变性和中度肝病。与 MCD 饮食比较,CDAA 饮食在胆碱含量控制上更准确,但缺点是小鼠体质量会稍有下降,也不会出现 IR。

8 病毒性肝纤维化动物模型

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)与宿主之间的相互作用复杂,除非病毒被宿主清除,否则宿主将长期携带病毒,肝损害无法愈合最终会导致纤维化、硬化甚至癌症的发生[43]。据统计全球每年因 HBV 感染引起的终末期肝病死亡的超出 100 万人[44]。现已证实啮齿类动物不会感染人类的肝炎病毒,缺乏 HBV 和 HCV 感染的通用小动物模型阻碍我们更深入了解病毒生物学。Bissig 等[45]最近描述了一种可调节系统、用于重新接种免疫缺陷小鼠,特别是缺少富马乙酰水解酶、重组激活基因 2 和 IL-2 受体的 γ 链的小鼠,结果显示出这些具有高水平人类肝嵌合症的小鼠(嵌合率可达 95%)可传播 HBV 和 HCV,感染 HCV 的小鼠对抗病毒治疗有反应。这种模型将为研究 HBV 和 HCV 感染以及其他可能的人类肝病性病原体实验提供实验可能性,并证明可测试抗病毒药物。

9 转基因肝纤维化动物模型

基因遗传因素是肝纤维化中一个重要影响因素,构建小鼠转基因肝纤维化模型包括基因敲除、基因突变和基因转染等方法,通过一条明确的途径来研究肝纤维化的发病机制。近年来,基于流体动力学的基因传递技术引起了人们的广泛关注。基本步骤是将裸质粒 DNA 大量高速注射到动物尾静脉,该方法实现了肝中外源基因的高表达,为实验动物提供了一种高效简单的转染方法。Yang 等[46]运用基于流体动力学的基因传递系统建立了动态小鼠肝纤维化模型,发现小鼠肝中的 TGF-β 可高水平表达,在诱导状态下 Col 1A2 和血清 α-SMA 这两个纤维化和 HSC 活化的指标上调。这种模型代表了一种动态且可逆的肝纤维化,可用来研究肝纤维生成的早期分子机制或筛选用于临床的抗纤维化药物。但缺点是诱导的时间短暂,纤维化水平并未达到大规模(小叶纤维化)。其他基因模型还有 *Ob/ob* 、*Db/db*、*Foz/Foz*、*SREBP*-1*c* 转基因等[47]。

10 复合模型

由于单一因素造模总有弊端,且肝纤维化的形成本身受各方面因素影响,因此部分研究者们可根据自己的模型需要,组合各种因素建立更稳定和更精准机制的理想动物模型。这种将多种因素方法结合起来建立肝纤维化动物模型的方法称之为复合模型。冯劲立等[48]以内毒素脂多糖肝纤维化模型与 DMN 诱导法相结合形成复合型模型,既能提高造模的稳定性,还能更好模拟疾病生理条件。

11 总结

在小鼠动物模型发展史上已有多种模型,从纯化学试剂和酒精引起烈性肝损伤到 Ang Ⅱ“无炎症”诱导、基因诱导等微损伤模型,各种模型各有特点。其中以 CCl_4 诱导法较成熟,但其造模时间、给药方式和剂量无统一的标准。免疫性肝纤维化模型的主动诱导特性与人类肝纤维化形成机制最为接近,临床基础研究的适用性更强,便于推广,但模型中所用蛋白的种类以及攻击阶段蛋白的增加量和时间各有不同。其他模型中的酒精用量、接种病毒用量等均无统一的标准,故而在模型的重复性方面就存在差异。大多数模型与我国肝纤维化的主

要病因仍有较大差距,因其不存在病毒复制且不维持进行性肝实质损伤的过程。现有成模技术均不能符合所有肝纤维化理想要求,仅能根据各个模型的发生机制、建立方法和病理特点,结合研究目的选择不同的成模方法,以尽量满足研究需求。

因此笔者认为,今后的研究应加强机理、病理学方面的研究,建立能客观反映人肝纤维化发病机制的、涉及肝炎病毒的动物模型,可应用组学技术在蛋白、基因和代谢等方面寻求多种病因,以期找到共同致病因素的支点,针对关键基因和目标蛋白药物的研发,使其能预防肝硬化、肝癌等严重并发症,最终改善肝纤维化患者的预后。目前兴起的表观遗传学在肝纤维化机制上的研究或许可为我们打开新的大门。笔者还认为,由于人类的肝纤维化是多种因素共同作用的结果,因此可首选复合造模法,其次是选择成模方法成熟的如 CCl_4 诱导法。希望通过一代又一代研究者的摸索,可以改良造模方法,缩短造模时间,提高成模率,建立在给药剂量、方式和时间以及纤维化程度评判标准上有更统一标准的模型,以期为肝纤维化基础研究做出更大贡献。

参考文献:

[1] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story [J]. Gut, 2015, 64(8): 1337.

[2] Ren Z, Chen X, Hong L, et al. Nanoparticle conjugation of ginsenoside Rg3 inhibits hepatocellular carcinoma development and metastasis [J]. Small, 2020, 16(2): e1905233.

[3] Fan W, Liu T, Chen W, et al. ECM1 Prevents activation of transforming growth factor β, hepatic stellate cells, and fibrogenesis in mice [J]. Gastroenterology, 2019, 157(5): 1352-1367.

[4] Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, et al. Cellular mechanisms of liver fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 671640.

[5] 郑虹, 肖海, 吴雄健. 肝纤维化的发病机制及治疗的最新进展 [J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(3): 298-302, 308.

[6] 何宏星, 陈洁, 黄芳, 等. 高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 648-653.

[7] 刘甦苏, 霍桂桃, 王辰飞, 等. 四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠建立肝纤维化模型 [J]. 实验动物科学, 2019, 36(4): 28-30, 34.

[8] Klaebel J, Rakipovski G, Andersen B, et al. Dietary intervention accelerates NASH resolution depending on inflammatory status with minor additive effects on hepatic injury by vitamin e supplementation [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 808.

[9] 李磊, 李向利, 胡惠敏. 前列环素 E1 对肝动脉碘化油栓塞术后肝纤维化家兔的影响 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(3): 212-217.

[10] Pedersen HD, Galsgaard ED, Christoffersen BØ, et al. NASH-inducing diets in göttingen minipigs [J]. J Clin Exp Hepatol, 2020, 10(3): 211-221.

[11] DeRossi C, Bambino K, Morrison J, et al. Mannose phosphate isomerase and mannose regulate hepatic stellate cell activation and fibrosis in Zebrafish and humans [J]. Hepatology, 2019, 70(6): 2107-2122.

[12] Lai C, Feng T, Wei L, et al. Development and validation of a primate model for liver fibrosis [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2019, 100: 106600.

[13] 常彩芳, 候勇, 丛刚. α-2b 干扰素对乙型肝炎模型鸭肝组织炎症和肝纤维化的治疗作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(1): 11-15, 214.

[14] 黄恺, 孙鑫, 赵志敏, 等. 两种乙肝肝纤维化小鼠复合模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 598-603.

[15] 欧强, 杨华, 赵亚娟, 等. 蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的大、小鼠非酒精性脂肪性肝病模型的特点及差异 [J]. 肝脏, 2017, 22(10): 933-937.

[16] 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.

[17] Chow AM, Tan M, Gao DS, et al. Molecular MRI of liver fibrosis by a peptide-targeted contrast agent in an experimental mouse model [J]. Invest Radiol, 2013, 48(1): 46-54.

[18] Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, et al. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat [J]. J Hepatol, 1985, 1(5): 489-499.

[19] 王丽娜, 刘成海, 陈园, 等. 一种改良的二甲基亚硝胺肝纤维化模型诱导方法及其病理特点 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2): 90-94, 72.

[20] Lebda MA, Sadek KM, Abouzed TK, et al. Melatonin mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via antioxidant activity and modulation of proinflammatory cytokines and fibrogenic genes [J]. Life sciences, 2018, 192: 136-143.

[21] Seo HY, Lee SH, Lee JH, et al. Clusterin attenuates hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and downregulating the smad3 signaling pathway [J]. Cells, 2019, 8(11): 1442.

[22] Zhang Y, Liu H, Jia W, et al. Myeloid differentiation protein 2 mediates angiotensin II-Induced liver inflammation and fibrosis in mice [J]. Molecules, 2019, 25(1): 25.

[23] Osawa Y, Kojika E, Hayashi Y, et al. Tumor necrosis factor-α-mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice [J]. Hepatol Commun, 2018, 2(4): 407-420.

[24] 张文斌, 姜海平, 张海伟, 等. SiO_2 与超液化碘油联合诱导的小鼠肝脏纤维化模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 3: 622-624.

[25] Sun WY, Gu YJ, Li XR, et al. β-arrestin2 deficiency protects against hepatic fibrosis in mice and prevents synthesis of extracellular matrix [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(5): 389.

[26] Zhang YQ, Wan LY, He XM, et al. Gremlin1 accelerates hepatic stellate cell activation through upregulation of TGF-beta expression [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(7): 603-610.

[27] Imose M, Nagaki M, Kimura K, et al. Leflunomide protects from T-cell-mediated liver injury in mice through inhibition of nuclear factor κB [J]. Hepatology, 2004, 40(5): 1160-1169.

[28] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 845-852.

[29] Yang L, Ao Q, Zhong Q, et al. SIRT1/IGFBPrP1/TGF β1 axis involved in cucurbitacin B ameliorating concanavalin A-induced mice liver fibrosis [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2020, 127(5): 371-379.

[30] 姜苏芩. ICOSL/ICOS 通路调控相关长链非编码 RNA 对日本血吸虫感染小鼠肝纤维化的影响 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.

[31] Beaussier M, Wendum D, Schiffer E, et al. Prominent contribution of portal mesenchymal cells to liver fibrosis in ischemic and obstructive cholestatic injuries [J]. Lab Invest, 2007, 87(3): 292-303.

[32] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展 [J]. 广西医学, 2020, 42(7): 875-878.

[33] 刘玲, 谭正怀. 胆总管结扎致肝纤维化动物模型研究现状 [J]. 重庆医学, 2013, 42(23): 2793-2796.

[34] 左嘉玮, 屈豫花, 赵辰怡, 等. MMP13 和 TIMP2 在肝缺血再灌注损伤介导肝纤维化进程中的动态变化及作用 [J]. 动物医学进展, 2020, 41(1): 78-82.

[35] Thiele M, Detlefsen S, Sevelsted Møller L, et al. Transient and 2-dimensional shear-wave elastography provide comparable assessment of alcoholic liver fibrosis and cirrhosis [J]. Gastroenterology, 2016, 150(1): 123-133.

[36] Shao T, Zhao C, Li F, et al. Intestinal HIF-1α deletion exacerbates alcoholic liver disease by inducing intestinal dysbiosis and barrier dysfunction [J]. J Hepatol, 2018, 69(4): 886-895.

[37] Chen P, Torralba M, Tan J, et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice [J]. Gastroenterology, 2015, 148(1): 203-214.

[38] 苏俊. 小鼠酒精性肝纤维化模型的建立及酒精性肝病的临床分析 [D]. 广州: 第一军医大学, 2007.

[39] Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer [J]. J Hepatol, 2016, 65(3): 579-588.

[40] Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis [J]. Hepatology, 2013, 57(1): 81-92.

[41] Du M, Wang X, Yuan L, et al. Targeting NFATc4 attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. J Hepatol, 2020, 73(6): 1333-1346.

[42] Winkler M, Staniczek T, Kürschner SW, et al. Endothelial GATA4 controls liver fibrosis and regeneration by preventing a pathogenic switch in angiocrine signaling [J]. J Hepatol, 2021, 74(2): 380-393.

[43] Wang JH, Lee SB, Lee DS, et al. Total antioxidant capacity in HBV carriers, a promising biomarker for evaluating hepatic fibrosis: a pilot study [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(1): 77.

[44] Zeng DY, Li JM, Lin S, et al. Global burden of acute viral hepatitis and its association with socioeconomic development status, 1990-2019 [J]. J Hepatol, 2021, 75(3): 547-556.

[45] Bissig KD, Wieland SF, Tran P, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment [J]. J Clin Invest, 2010, 120(3): 924-930.

[46] Yang KL, Hung KC, Chang WT, et al. Establishment of an early liver fibrosis model by the hydrodynamics-based transfer of TGF-beta1 gene [J]. Comp Hepatol, 2007, 6: 9.

[47] 蔡江帆, 陈民利. 非酒精性脂肪肝炎动物模型的研究概况 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 128-136.

[48] 冯劲立, 沈海蓉, 李想, 等. 防己黄芪汤对复合造模肝纤维化小鼠肝线粒体过氧化损伤的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(5): 506-508.

〔收稿日期〕2021-06-02

韩晓燕,邱建利. 胆道闭锁实验动物模型的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 111-115.
Han XY, Qiu JL. Comparison of experimental animal models of biliary atresia [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 111-115.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 017

胆道闭锁实验动物模型的比较

韩晓燕[1],邱建利[2*]

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院儿科,郑州 450000)

【摘要】 胆道闭锁(biliary atresia,BA)是新生儿时期导致肝移植的重要病因之一,近年来随着诊断技术的提高,本病的发病率也在不断上升,但本病的具体病因及发病机制尚不明确,动物模型的出现是探索本病的重要途径。但国内对本病的认识及相关动物模型的研究还相对滞后,目前 BA 模型主要分为药物毒物诱导型、胆道机械结扎型、轮状病毒诱导型 3 大类,其中药物毒物诱导的 BA 模型对胆管具有选择性,目前还存在诸多尚未解决的问题;胆道结扎的方法虽然造成胆管闭锁,但和真实世界的 BA 存在发病年龄等不相符的情况;而轮状病毒诱导胆管闭锁模型目前被广泛接受,也是当前主要的研究模型,但是在肝纤维化形成之前,模型动物均已死亡,也不能充分反映 BA 的疾病进展过程;而采用轮状病毒基因重组方法建立的动物模型有存活时间相对较长,并且可以实现肝纤维化的优点,更接近实际的病理发展过程,是具有前景的模型。总的来讲,BA 的研究尚缺乏完全符合临床实际,充分反映临床疾病发展的理想动物模型。

【关键词】 动物模型;胆道闭锁;轮状病毒基因重组
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0111-05

Comparison of experimental animal models of biliary atresia

HAN Xiaoyan[1], QIU Jianli[2*]
(1.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Biliary atresia (BA) is an important indication for liver transplantation during the neonatal period. With the improvement in diagnostic techniques in recent years, the diagnosis rate for BA is increasing continuously. However, the specific etiology and pathogenesis of BA remains unclear. Related knowledge and research models for BA are still relatively limited in China. At present, the BA models are divided mainly into three categories: drug or poison-induced, mechanical biliary tract ligation and rotavirus-induced. Among them, the drug-poison-induced BA model is selective to the bile duct, and there are still many unsolved problems. Although the method of biliary ligation causes bile duct atresia, it is inconsistent with the onset age of BA in the real world. The rotavirus-induced bile duct atresia model is widely accepted and is the main research model at present; however, all of the animals die before the formation of liver fibrosis, and this model does not fully reflect the disease progression process of BA. The rotavirus gene recombination method may result in liver fibrosis and is a promising model because the survival time of the animals is relatively long, and the model more closely relates to the actual pathological process. In general, BA still lacks an ideal animal model that fully conforms to clinical practice and reflects the development of clinical disease.

【Keywords】 animal models; biliary atresia; rotavirus gene recombination

[基金项目]国家自然科学基金(81804142);中国博士后科学基金(2020M670026ZX)。
[作者简介]韩晓燕(1993—),女,硕士研究生,研究方向:小儿消化系统疾病研究。E-mail:945254788@ qq.com
[通信作者]邱建利(1983—),男,博士,研究生导师,研究方向:小儿消化系统疾病研究。E-mail:qiujianli@ 126.com

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是新生儿期一种进行性的、可导致肝内外胆管纤维阻塞性的胆管病变[1]。我国台湾的发病率约为 1.5/10000,高于美国及欧洲国家[2]。本病如不及时治疗,可引起肝硬化及终末期肝衰竭,一般 2 岁之前死亡[3]。依据其梗阻部位可以分为 3 型,其中Ⅲ型病例发病率在 90%以上[4]。BA 的病因可能包括遗传和环境两方面因素,其中全基因组研究显示:GPC1、ADD3 以及 ARF6 基因在本病的发病中起到一定的作用[5-7];环境因素包括围生期病毒感染以及环境毒素暴露相关[8],目前在患儿体内可以分离到的病毒包括巨细胞病毒(CMV)、人疱疹病毒、人乳头瘤病毒、腺病毒、EB 病毒、乙型肝炎病毒、呼肠孤病毒、细小病毒 B19 和轮状病毒(RV)。其中呼肠孤病毒、巨细胞病毒和轮状病毒目前研究较多[9]。本病的发病机制尚未完全阐明,相关研究表明 $CD68^+$巨噬细胞、以及分泌细胞因子 IFN-γ 的 $CD4^+$、$CD8^+$T 淋巴细胞在胆管上皮及汇管区的聚集提示本病的发病机制可能是病毒相关的免疫损伤[10]。Kasai 术的出现在一定程度上改善了患儿的黄疸症状,但不仅给患儿造成较大的伤害,同时也给家庭带来沉重的经济压力及心理负担,影响着家庭的和谐稳定[11]。本病已不仅仅是一个简单的医学问题,更是一个亟待解决的社会问题。因此,提高对本病具体发病机制的认知以及预防本病的发生显得尤为重要。动物模型作为现代医学研究疾病的基础,因其可控性强、来源广泛等优点,为探索疾病病因及发病机制提供条件,BA 模型的成功构建是研究本病的关键。目前,国内外医学界对 BA 及其动物模型的认知在逐步加深,为进一步促进了解,本文对近些年的相关动物模型进行总结,以期对本病的研究提供帮助。

1 胆总管结扎 BA 模型

BA 患儿主要由于各种病因导致的新生儿胆汁流受阻引起胆汁淤积,进而引起肝纤维化、肝硬化甚至终末期肝病的发生。葛军涛等[12-13]采用新生 BALB/c 小鼠胆总管结扎的方法模拟胆道闭锁,其在发病时间上较为相似,该模型术后第 2 天就会出现皮肤变黄随、陶土样大便,并伴随生长发育的迟缓、精神不振以及食欲不振等消化道症状;这在一定程度上和胆道闭锁患儿的临床症状较为相似,该模型的优点在于结扎胆总管的方法操作相对简单、易于重复、建模周期短;并且采用新生鼠与本病临床的发病年龄较为相似;但该动物模型也存在一些缺点:首先,胆总管结扎术后一般 1 周左右动物开始出现死亡,且在第 10 天出现死亡高峰,解剖后并未发现严重肝硬化以及肝衰竭的表现,这与临床上 BA 患儿终末期均会出现门静脉高压、食管静脉曲张以及腹水等肝硬化失代偿以及肝衰竭的表现不符;其次,BA 患儿在生后一般就会出现胆汁淤积的表现,因此我们可以认为在胎儿期已经出现胆管的损伤,其机制可能是多方面的,而胆总管结扎的方法出现的胆汁淤积是以健康小鼠的在体实验,与实际的病因存在较大的差异,发病机制也完全不同,因此不能很好的解释本病的真实病因。

另外,胆总管结扎构建胆道闭锁模型的方法也由来已久,早在 1957 年 Symeonidis 等[14]报道了切除和简单结扎总胆管后观察大鼠肝功能和形态变化,但未能模拟出胆道闭锁出现的临床症状,对现在的模型构建参考意义不大,不再赘述。张守华等[15]通过对 Balb/c 小鼠开腹后游离胆总管, 并进行双重结扎的方法构建梗阻性黄疸模型研究其病因及病理生理机制,结果显示白细胞及中性粒细胞变化和实际胆道闭锁患儿较为相似,但该方法采用的是 5~6 周龄的成年小鼠,和胆道闭锁发生的时间相差甚大,不能很好的模拟该病的发病时间。另外,其结扎胆管后第 7 天可以见到肝细胞片状坏死,广泛性的空泡样变性,但是并未出现肝假小叶、腹水等肝硬化的征象,因此,也不能很好的模拟真实世界的胆道闭锁。

2 毒素诱导 BA 模型

如前所述,BA 的确切病因目前尚不清楚,环境因素可能参与其中。早在 1990 年澳大利亚学者 Harper 等[16]和 Kopp 等[17]发现当地羊和牛的幼崽在出生后大量死亡,且表现为表现为胆汁淤积症状,而他们的母亲及成年动物未出现症状,且死亡的幼崽肝病理结果显示为慢性肝损伤,伴有门静脉周围小管增生、进行性纤维化、偶尔小管断裂、局灶性肝细胞坏死和最终肝硬化。在犊牛中观察到的更严重的损伤可能反映了胆汁淤积或暴露于损伤的更长时间,或者可能反映了物种差异。形态学检查不能确定是原发的肝内胆管的缺乏还是继发于肝外胆道闭锁,或同时影响肝外和肝内胆管的伴随病变。在探索病因中发现,在排除遗传及感染等因素后,这些牛和羊在怀孕期间可能进食了藻类等植

物引起胆道的损伤,而这些植物可能是含有某些毒素[16]。基于此,近年来国外的研究团队采用斑马鱼胆汁分泌实验,从这些植物中提取出一种新型的可以导致胆管损伤的化合物“异黄酮,胆甾烯”[8];这种化合物可对斑马鱼幼体的肝外胆管系统造成选择性破坏,但对肝内胆管系统没有影响。该研究还发现斑马鱼基因组中一个区域的突变可以增强胆甾烯毒性,该区域与已建立的人类 BA 易感性基因座具有保守的同源性。该毒素还导致培养的新生小鼠肝外胆管细胞纤毛丧失,并破坏胆管细胞的细胞极性和上皮细胞的完整性[18-19]。而我国学者也采用化学合成的“胆闭素”在斑马鱼动物模型中得到与上述一致的实验结果[20]。综上所述,这些发现为 BA 的病因提供了直接的证据,表明 BA 可能是由围产期暴露于环境毒素以及可能的基因突变参与其中引起的。

3　轮状病毒诱导型

3.1　轮状病毒诱导 BA 模型

20 世纪 70 年代,人们首次提出围生期病毒感染是新生儿阻塞性胆管疾病的根本原因,其中包括 BA[21]。在随后的几项研究也发现,在 BA 患儿的肝中可见多种病毒的存在,包括轮状病毒[22]、呼肠孤病毒[23]、巨细胞病毒[24]和人乳头瘤病毒[25],然而,在所有的患儿肝标本中并未发现存在单一病毒。最近的研究表明,与 CMV-IgM 阴性病例相比,IgM 阳性的 BA 患者预后较差,并且这些阳性病例具有独特的临床和病理表现,通常对 Kasai 术反应较差。目前一个统一的观点认为各种宫内或围产期感染是引起 BA 临床表现的病因。感染诱导的这些损伤触发宿主的免疫反应,导致胆道进行性的破坏[26]。功能基因组学研究发现,淋巴细胞分化相关基因的协同活化与细胞因子的过度表达使其在细胞免疫的激活中起着重要作用[27]。随后的研究也表明巨噬细胞、树突细胞和自然杀伤细胞在疾病发病机制中的重要性[28-30].

1993 年首次描述的 BA 小鼠模型支持病毒是胆道闭锁发病机制中重要证据,并已成为研究 BA 的重要工具[31]。在该模型中,采用恒河猴轮状病毒(RRV)感染新生 BALB/c 小鼠会导致类似于人类 BA 的胆管炎性和病理表型,特征包括:(1)进行性阻塞性黄疸,表现为胆红素尿、黄疸、陶土样大便、生长发育迟缓,病最终导致死亡;(2)胆管树的形态学和组织学变化与婴儿期 BA 相似[32];(3)新生儿病毒感染的时间和临床表现时间上的相关性[33-34]。Jafri 等[35]之前研究发现胆管上皮细胞感染 RRV 后,胆管细胞内内信号传导在轮状病毒细胞内复制起到关键的作用。胆管细胞在收到 RRV 感染后,会释放趋化因子启动免疫介导的胆管阻塞[36]。最近的研究也发现,RRV 的 VP4 基因在发病机制中起着主要决定因素,VP4 蛋白中的肽序列(SRL)在疾病发病机制中起重要作用[37]。这种特定的肽也存在于已知与人类 BA 相关的其他病毒中,如巨细胞病毒、呼肠孤病毒和 Epstein-Barr。病毒通过这种肽与宿主细胞的结合引发不同的炎症途径,导致疾病的发病[38]。这些数据表明 BA 的发生与病毒感染存在相关性。因此,阻断这些途径可能有助于抑制疾病的发展。因此,轮状病毒诱导的 BA 是研究 BA 发病机制的具有良好特征的重要模型。但是,不幸的是,虽然恒河猴轮状病毒(RRV)感染新生幼鼠可以诱导与人类 BA 相似的胆管病变,并已用于研究该疾病的机制,但几乎所有被 RRV 病毒感染的幼崽在出生后第 14 天都会死亡,这个时期肝纤维化及肝硬化尚未形成,研究该期的机制将不可能实现,因此 RRV 诱导的 BA 模型依然存在缺陷[39]。

3.2　轮状病毒重配株诱导的 BA 模型

随着对 BA 研究的不断深入,以及 RRV 诱导的新生乳鼠胆道闭锁模型的日臻成熟,在一定程度上揭示了胆道闭锁的可能发病机制,但令人遗憾的是该模型乳鼠存活的时间一般不超过 14 d,其肝组织并未形成纤维化或硬化[39],这与临床表型存在较大的差别。为进一步优化该动物模型,使其更能反映 BA 的表型,从而揭示其内在机制,为预防和治疗该病提供基础,Mohanty 等[39]的研究发现 RRV 的 VP4 基因在 BA 的发病机制中起着重要作用,且 VP2 也起着一定的作用[40]。通过单基因重组的方法将 RRV 的 VP4 及 VP2 基因替换到 TUCH 的基因组,然后将重组的 $T^{R(VP2,VP4)}$ 接种到 4 d 龄新生鼠,可以诱导产生 BA 的肝纤维化(Ishak 分级 3~5 级)。众所周知,肝纤维化与胆汁淤积相关,而且在汇管区周围可以看到 Mallory 小体,同样,肝胆管周围的胆管细胞的增殖常常引起肝硬化的出现,有意思的是胆管增殖也是 Kasai 术预后不好的表现。而 $T^{R(VP2,VP4)}$ 诱导的肝纤维化与 BA 患儿的肝组织及肝外胆管有着相似的组织病理学特征,意味着该方法建立的肝纤维化小鼠模型可以用来研究人类疾病。

目前研究肝硬化的动物模型较多,其中主要有以 CCl_4 为代表的药物可以引起肝炎症,活化肝星状细胞,高脂饮食诱导的非酒精性肝病引起的肝硬化,以及胆管结扎引起的胆管机械性梗阻导致的肝纤维化[41]。这些均和 BA 引起的胆汁淤积导致的肝纤维化存在本质差异,并且在组织学上也存在不同的病理特征[42]。例如,胆管结扎的方法虽然可以引起肝纤维的表型,但是没有像 BA 患儿的汇管-汇管以及汇管-中央桥接纤维化以及结节的病理表现,可能由于大鼠不能够存活至肝组织病理表现为 Ishak 分级的 2 级的时间[43],而 $T^{R(VP2,VP4)}$ 诱导的鼠肝纤维化模型其组织学特征与人类 BA 的病理特征极为相似,表现为胆汁淤积引起的胆管增殖,桥接以及结节形成[44]。虽然 $T^{R(VP2,VP4)}$ 病毒不能完全诱导肝外胆管的梗阻,但是可以表现为跳跃病变以及部分阻塞,其余和 BA 患儿的表现相似[45]。另一方面,相关研究表明 MMP-7 的血清水平被用作诊断 BA 的一个生物学标志物,这个发现也被其他的研究证实[46]。而且 BA 患儿肝组织免疫组化提示肝外胆管细胞中 MMP-7 升高,并且其肝以及肝内胆管细胞中 MMP-7 的基因表达也在升高,有意思的是小鼠在 $T^{R(VP2,VP4)}$ 病毒在接种 2 周后也会出现 MMP-7 的升高,虽然 MMP-7 在 BA 的发病机制中的作用尚不明确,但如果是,则可能是治疗的一个靶点[47]。另外,转录组分析证实了这种小鼠模型和人类 BA 的基因表达模式相似。目前也有研究正在采用基因敲除的方法研究纤维化的机制。确定疾病的机制基础有助于治疗的发展[39]。

综上所述,胆道闭锁是新生儿时期一种胆管细胞进行性损伤的,且可以进展为肝纤维化甚至终末期肝衰竭的疾病。其病因复杂,包括围生期病毒感染、免疫紊乱等,目前轮状病毒感染是目前学术界较为认可的病原,因此,基于此的模型是研究者不断探索其发病机制的方向。目前,人们虽然通过临床流行病学以及动物模型研究等多种途径对本病有较多的了解,但对疾病的本质认识还远远不够。充分发挥与临床实际相符的动物模型是研究本病原因及治疗方法的最佳方案。当前诸多的动物模型中采用病毒基因重组的方法与临床较为相似,但不能完全模拟人体,需要我们进一步去探索。

参考文献:

[1] Mo YH, Chen HL, Hsu WM, et al. A noninvasive index to predict liver cirrhosis in biliary atresia [J]. Pediatr Radiol, 2021, 51(2): 257-264.

[2] Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, et al. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study [J]. Pediatrics, 1997, 99(3): 376-382.

[3] Degtyareva A, Razumovskiy A, Kulikova N, et al. Long-term effects of kasai portoe-nterostomy for biliary atresia treatment in russia [J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10(9):686.

[4] Sanchez-Valle A, Kassira N, Varela VC, et al. Biliary atresia: epidemiology, genetics, clinical update, and public health perspective [J]. Adv Pediatr, 2017, 64(1): 285-305.

[5] Garcia-Barceló MM, Yeung MY, Miao XP, et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24.2 [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(14): 2917-2925.

[6] Cheng G, Tang CS, Wong EH, et al. Common genetic variants regulating ADD3 gene expression alter biliary atresia risk [J]. J Hepatol, 2013, 59(6): 1285-1291.

[7] Cheng G, Chung PH, Chan EK, et al. Patient complexity and genotype-phenotype correlations in biliary atresia: a cross-sectional analysis [J]. BMC Med Genomics, 2017, 10(1): 22.

[8] Lorent K, Gong W, Koo KA, et al. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia [J]. Sci Transl Med, 2015, 7(286): 67.

[9] Vij M, Rela M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis [J]. Future Sci OA, 2020, 6(5): FSO466.

[10] Wang J, Xu Y, Chen Z, et al. Liver immune profiling reveals pathogenesis and therapeutics for biliary atresia [J]. Cell, 2020, 183(7): 1867-1883.

[11] Qisthi SA, Saragih DSP, Sutowo DW, et al. Prognostic factors for survival of patients with biliary atresia following kasai surgery [J]. Kobe J Med Sci, 2020, 66(2): E56-E60.

[12] 葛军涛, 李龙, 魏延栋, 等. 哺乳期 BALB/c 小鼠胆道梗阻模型的探索 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(4): 35-37,97-98.

[13] 葛军涛, 李龙, 魏延栋, 等. 胆总管内注射无水乙醇致胆道闭锁动物模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 50-52, 7-8.

[14] Symeonidis A, Trams EG. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct [J]. Am J Pathol, 1957, 33(1): 13-27.

[15] 张守华, 廖彩仙, 张春兴, 等. 小鼠梗阻性黄疸模型的建立及动态观察 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(9): 1579-1581.

[16] Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves [J]. Aust Vet J, 1990, 67(5): 167.

[17] Kopp K, Hernandez-Jover M, Robertson S, et al. A survey of new south wales sheep producer practices and perceptions on lamb mortality and ewe supplementation [J]. Animals (Basel), 2020, 10(9): 1586.

[18] Hurst LD, Pál C, Lercher MJ. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(4): 299-310.

[19] Wang GZ, Chen WH, Lercher MJ. Coexpression of linked gene pairs persists long after their separation [J]. Genome Biol Evol, 2011, 3: 565-570.

[20] 杨一凡, 董瑞, 刘佳, 等. 合成胆道毒素诱导斑马鱼胆道闭锁模型的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(10): 1886-1888.

[21] Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst-the concept of infantile obstructive cholangiopathy [J]. Prog Pediatr Surg, 1974, 6: 113-139.

[22] Qiao H, Zhaori G, Jiang Z, et al. Detection of group C rotavirus antigen in bile duct and liver tissues of an infant with extrahepatic biliary atresia [J]. Chin Med J, 1999, 112(1): 93-95.

[23] Glaser JH, Balistreri WF, Morecki R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis [J]. J Pediatr, 1984, 105(6): 912-915.

[24] Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, et al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia [J]. Pediatr Dev Pathol, 2000, 3(4): 367-373.

[25] Saito T, Terui K, Mitsunaga T, et al. Evidence for viral infection as a causative factor of human biliary atresia [J]. J Pediatr Surg, 2015, 50(8): 1398-1404.

[26] Mack CL. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(3): 233-242.

[27] Bezerra JA, Tiao G, Ryckman FC, et al. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia [J]. Lancet, 2002, 360(9346): 1653-1569.

[28] Mohanty SK, Ivantes CA, Mourya R, et al. Macrophages are targeted by rotavirus in experimental biliary atresia and induce neutrophil chemotaxis by Mip2/Cxcl2 [J]. Pediatr Res, 2010, 67(4): 345-351.

[29] Shivakumar P, Sabla GE, Whitington P, et al. Neonatal NK cells target the mouse duct epithelium via Nkg2d and drive tissue specific injury in experimental biliary atresia [J]. J Clin Invest, 2009, 119(8): 2281-2290.

[30] Walther A, Mohanty SK, Donnelly B, et al. Rhesus rotavirus VP4 sequence-specific activation of mononuclear cells is associated with cholangiopathy in murine biliary atresia [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(6): G466-G474.

[31] Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, et al. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice [J]. Pediatr Res, 1993, 33(4): 394-399.

[32] Petersen C, Grasshoff S, Luciano L. Diverse morphology of biliary atresia in an animal model [J]. J Hepatol, 1998, 28(4): 603-607.

[33] Czech-Schmidt G, Verhagen W, Szavay P, et al. Immunological gap in the infectious animal model for biliary atresia [J]. J Surg Res, 2001, 101(1): 62-67.

[34] Mohanty SK, Donnelly B, Bondoc A, et al. Rotavirus replication in the cholangiocyte mediates the temporal dependence of murine biliary atresia [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69069.

[35] Jafri M, Donnelly B, McNeal M, et al. MAPK signaling contributes to rotaviral-induced cholangiocyte injury and viral replication [J]. Surgery, 2007, 142(2): 192-201.

[36] Jafri M, Donnelly B, Bondoc A, et al. Cholangiocyte secretion of chemokines in experimental biliary atresia [J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(3): 500-507.

[37] Mohanty SK, Donnelly B, Lobeck I, et al. The SRL peptide of rhesus rotavirus VP4 protein governs cholangiocyte infection and the murine model of biliary atresia [J]. Hepatology, 2017, 65(4): 1278-1292.

[38] Mohanty SK, Donnelly B, Temple H, et al. A rotavirus-induced mouse model to study biliary atresia and neonatal cholestasis [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1981: 259-271.

[39] Mohanty SK, Lobeck I, Donnelly B, et al. Rotavirus reassortant-induced murine model of liver fibrosis parallels human biliary atresia [J]. Hepatology, 2020, 71(4): 1316-1330.

[40] Walther A, Mohanty SK, Donnelly B, et al. Rhesus rotavirus VP4 sequence-specific activation of mononuclear cells is associated with cholangiopathy in murine biliary atresia [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 309(6): G466-G474.

[41] Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7312-7324.

[42] Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, et al. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification [J]. Bull World Health Organ, 1977, 55(4): 521-540.

[43] Ferrell L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems [J]. Mod Pathol, 2000, 13(6): 679-704.

[44] Kinugasa Y, Nakashima Y, Matsuo S, et al. Bile ductular proliferation as a prognostic factor in biliary atresia: an immunohistochemical assessment [J]. J Pediatr Surg, 1999, 34(11): 1715-1720.

[45] Moreira RK, Cabral R, Cowles RA, et al. Biliary atresia: a multidisciplinary approach to diagnosis and management [J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(7): 746-760.

[46] Lertudomphonwanit C, Mourya R, Fei L, et al. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(417): 8462.

[47] Yang L, Zhou Y, Xu PP, et al. Diagnostic accuracy of serum matrix metalloproteinase-7 for biliary atresia [J]. Hepatology, 2018, 68(6): 2069-2077.

〔收稿日期〕2021-06-10

姚燕子,胡欢,王倩,等. 免疫衰老影响牙周炎细胞免疫的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 116-125.
Yao YZ, Hu H, Wang Q, et al. Advances in the research on immunosenescence that affects cellular immunity of periodontitis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 116-125.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.02.018

免疫衰老影响牙周炎细胞免疫的研究进展

姚燕子[1],胡 欢[2,3*],王 倩[2],刘建国[2],周学东[1,4*]

(1.遵义医科大学口腔医学院,贵州 遵义 563000;2.贵州省普通高等学校口腔疾病研究特色重点实验室暨遵义市口腔疾病研究重点实验室,贵州 遵义 563000;3.贵州省普通高等学校微生物资源与药物开发特色重点实验室,贵州 遵义 563000;4.口腔疾病研究国家重点实验室,国家口腔疾病临床医学研究中心,四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科,成都 610041)

【摘要】 当今全球已迅速步入老龄化社会,老年人口迅速扩增。伴随年龄增长,机体免疫系统发生着系列变化,即“免疫衰老”,导致各种感染的发生率和老年病的死亡率加剧,增加了各国对卫生医疗的需求。牙周炎是口腔病原菌与免疫系统相互作用引起的牙周组织损伤,在老年人群中表现出发病率增加和组织破坏程度增加,严重影响老年群体的身心健康,增加医疗负担。本文主要综述了衰老与免疫衰老对牙周炎的影响,尤其从免疫细胞方面(包括先天性免疫细胞和适应性免疫细胞)来阐述机体老化对牙周炎疾病的影响。

【关键词】 牙周炎;免疫衰老;免疫细胞
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0116-10

Advances in the research on immunosenescence that affects cellular immunity of periodontitis

YAO Yanzi[1], HU Huan[2,3*], WANG Qian[2], LIU Jianguo[2], ZHOU Xuedong[1,4*]

(1. School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China. 2. Special Key Laboratory of Oral Diseases Research, Higher Education Institution in Guizhou Province, Zunyi Key Laboratory of Oral Diseases Research, Zunyi 563000. 3. Microbial Resources and Drug Development Key Laboratory of Guizhou Tertiary Institution, Zunyi 563000. 4. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Operative Dentistry and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041)

【Abstract】 Currently, many countries have rapidly stepped into the aging society and the elderly population is growing sharply. The aging process is accompanied by a series of changes in the immune system, which is known as “immunosenescence” and leads to an increase in the incidence of various infections and mortality from geriatric diseases, increasing the demand for healthcare in all counties. Periodontitis is chronic inflammation of periodontal tissue caused by an interaction between pathogenic bacteria and host immune system, which has shown a rising trend in vulnerability and periodontal destruction in the elderly population. It seriously affects both physical and mental health of the elderly and

[**基金项目**]国家自然科学基金(31860104);遵义市科技计划课题(遵市科合社字(2018)17 号);黔科合平台人才([2018]5772-010)。
[**作者简介**]姚燕子(1992—),女,硕士研究生,医师,研究方向:口腔微生态与口腔感染性疾病的防治。E-mail: yaoyanzi0398@163.com
[**通信作者**]周学东(1957—),女,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:龋病病因及防治的基础和应用研究。
E-mail: zhouxd@scu.edu.cn
胡欢(1990—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:口腔微生态与口腔感染性疾病的防治。
E-mail: huhuan1990@163.com *共同通信作者

increases the medical burden. This article reviews the effects of senescence and immunosenescence on periodontitis, especially the effects of aging on immune cells, which include innate immune cells and adaptive immune cells, on periodontitis.

【Keywords】 periodontitis; immunosenescence; immune cells

牙周炎(periodontitis)是最常见的口腔感染性疾病,以牙龈炎症、牙周袋形成、牙槽骨吸收和牙齿松动为特征,是加重或诱发全身系统性疾病的主要口腔疾病,严重危害患者的口腔和全身健康[1]。在 2009 至 2012 年的美国健康与营养调查资料中显示,成年人(≥30 岁)的牙周炎患病率为 46%,且患病可能性随年龄增长而稳步增加[2]。最新研究发现牙周炎易感性随衰老而变化,同时牙周组织破坏程度也与年龄相关[3]。“与年龄相关的易感性(age-related susceptibility)”学说认为,随年龄增长免疫系统失调或免疫衰老会引起牙周炎的易感性增加[4]。本文在查阅相关文献的基础上,从免疫细胞如何进行免疫应答来讨论免疫衰老对牙周炎易感性和组织破坏程度的影响。

1　衰老和免疫衰老

衰老(aging or senescence)又称为老化,是生命过程中整个机体的形态、结构和功能逐渐衰退现象的总称,其中胸腺、脾等免疫器官衰退和免疫细胞重塑而造成的先天性免疫和适应性免疫的改变被称为“免疫衰老(immunosenescence)”,表现为胸腺退化,循环单核细胞和树突状细胞数量的改变,吞噬活性降低,外周血幼稚细胞数量减少,而记忆细胞数量相对增加,T、B 细胞库多样性受限,T 细胞亚群失衡,抗体产生减少等特征[5-9]。这些变化最终导致对新抗原反应能力减弱,而自身抗原应答亢进,以及免疫监视失调,表现出个体对许多自身免疫性、感染性和炎症性疾病的易感性增加,导致老年人患感染的敏感性增加,接种疫苗的效力降低等[10-11]。目前多种生理现象已被提出来解释免疫衰老的发生机制,包括长期暴露于抗原、端粒酶活性受损、线粒体功能障碍、自噬缺陷、内质网应激、表观遗传学改变、年龄相关的肠道菌群变化等[12-16]。同时,大量研究表明遗传、营养、生活方式(如体育锻炼、饮食习惯)、慢性病毒感染等多因素也会影响着免疫系统的衰老水平[17-20]。

近年来,免疫衰老促进年龄相关疾病的发展和临床进展的研究备受关注,如肿瘤、阿尔兹海默症、类风湿性关节炎、心血管疾病、代谢疾病等,探讨免疫衰老及其在发病机理中的作用和机制可能是治疗此类疾病和药物开发前景的依据[21-23]。牙周炎作为一种慢性炎症性疾病,流行性调查和临床检查都表现出其患病率和组织损伤随年龄增长而增加。同时对年轻人和老年人进行临床牙龈炎评估与活检样本测定来看,两者之间存在大量的免疫学差异[24]。由此推测牙周炎年龄相关性的变化可能与免疫衰老有关。

2　免疫衰老与牙周炎

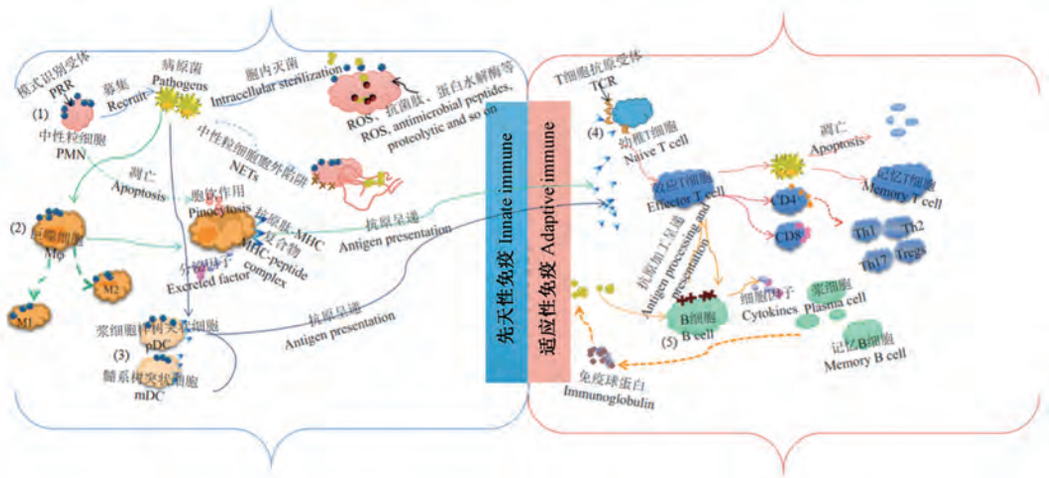
牙周组织长期暴露于口腔微生物中,免疫系统不断地识别、监视入侵者,并与其共存以维护牙周稳定,包括多种免疫细胞参与(见图 1)[25]。当病原菌及其代谢产物逃避免疫防御,引起一系列免疫反应,则会造成牙周组织的直接损伤;另外由病原因子持续性破坏引起的变态反应,亦可导致牙周组织的继发性损伤[26]。牙菌斑生物膜是牙周炎的始动因子,但宿主的免疫反应影响疾病的进展和组织损伤程度。然而随着机体老化,宿主先天性免疫和适应性免疫都经历着变化,其抵御感染的能力受损,先天免疫介导的炎症反应程度和持续时间增强,细胞介导的免疫功能和抗体介导的免疫应答下降[27-28]。这一变化影响牙周炎的易感性和牙周组织的破坏程度。显而易见,老年人先天性免疫和适应性免疫的免疫衰老变化可能影响着牙周炎的发生和发展。

2.1　先天性免疫

先天性免疫又称固有免疫,由不同的细胞和因子组成,是抗感染的第一道防线,机体通过识别病原菌直接抵御微生物对宿主的侵袭。固有免疫细胞,包括中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞等,其效应功能的许多方面都随年龄增长而变化。

2.1.1　中性粒细胞

伴随微生物的入侵,循环中性粒细胞通过白细胞黏附级联反应迁移到血管外,随后迅速募集到牙周感染部位形成屏障,阻止细菌侵入更深的组织。白细胞黏附缺陷综合征-I 型(leukocyte adhesion deficiency-I, LAD-I)相关的牙周炎是由白细胞粘附和迁移障碍引起的侵袭性发展的牙周炎症,对抗生



注：(1)：PMNs 募集到牙周感染部位，通过释放 ROS、抗菌肽、蛋白水解酶和形成 NETs 灭菌。PMN：中性粒细胞；PRR：模式识别受体；(2)：Mφ 通过胞饮作用吞噬凋亡的 PMN；吞噬病原菌、外毒素等进行抗原呈递，并且分泌细胞因子、趋化因子；在病原菌刺激下，Mφ 可极化为 M1 型和 M2 型。Mφ：巨噬细胞；(3)：DCs 根据功能和表型分为 pDCs 和 mDCs，捕获病原菌，并加工呈递给淋巴细胞；(4)：幼稚 T 细胞经 TCR 与抗原相互作用，增殖分化为效应 T 细胞，其多数清除病原菌后凋亡，部分分化为记忆 T 细胞；T 细胞成熟后分为 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞，其中在抗原呈递细胞的引导下，$CD4^+$T 细胞分化为 Th1、Th2、Th17、Tregs 等细胞亚群；(5)：B 细胞通过 BCR 抗原识别并加工呈递给 T 细胞，激活 B 细胞产生细胞因子；B 细胞经抗原刺激后分化为浆细胞和记忆性 B 细胞。

图 1　免疫细胞对病原菌的防御作用

Notes. (1), PMNs are recruited to the sites of periodontal infection to against bacterial by releasing ROS, antimicrobial peptides, proteolytic and forming NETs. PMN, Polymorphonuclear leukocyte. PRR, Pattern recognition receptor. (2), Mφ phagocytize the apoptotic PMN through pinocytosis and present antigen by phagocytizing pathogens, exotoxins, etc. Meanwhile, secrete cytokines and chemokines. Mφ can be activated into M1 and M2 macrophages under the stimulation of pathogens. Mφ, Macrophages. (3), DCs can be divided into pDCs and mDCs according to different function and phenotype, which capture, process and present pathogenic bacteria to lymphocytes. (4), Naive T cells are proliferated and differentiated into effector T cells through TCR-antigen interaction. Most of them are eliminated by apoptosis after clearing pathogenic bacteria, while some of them differentiate into memory T cells. T cells are divided into $CD4^+$T cells and $CD8^+$T cells after maturation. Then, $CD4^+$T cells are further differentiated into Th1, Th2, Th3, Th17, Tregs and other cell subsets by activated with antigen-presenting cells. TCR, T cell receptor. (5), B cells are activated and promoted to secrete cytokines with the help of BCRs, which capture, process and present antigens to T cells. After the stimulation of antigens, B cells differentiate into plasma cells and memory B cells.

Figure 1　Mechanisms of immune cells defense against pathogens

素和/或机械刮除牙菌斑治疗均无效，这证明牙周组织中性粒细胞的成功募集对于牙周组织防御病原菌入侵有重要作用[29-31]。中性粒细胞的迁移取决于协调良好的黏附级联反应，包括 β2 整合素如淋巴细胞功能相关抗原 1（lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1）与内皮拮抗受体如细胞间粘附因子（intercellular adhesion molecule, ICAM）的相互作用[32]。内皮发育调节基因 1（developmental endothelial locus-1, Del-1）是由内皮细胞分泌的胞外基质，通过与整合素 LFA-1 的结合，阻止依赖于 LFA-1 的白细胞与内皮细胞表面的相互作用，从而负性调节中性粒细胞外渗到炎症部位[33]。Eskan 等[34]对老龄小鼠（≥18 个月）牙周组织分析发现 Del-1 mRNA 及其蛋白质表达量较年轻小鼠低，这会引起中性粒细胞过多募集和炎性骨吸收。中性粒细胞通过细胞粘附分子与内皮细胞接触和黏附，而后向内皮细胞中迁移的过程称为趋化性，可导致大量中性粒细胞从外周血液主动转移到被攻击部位。有学者提出老年人群血液中中性粒细胞的趋化性明显减弱，可能是年龄相关的膜流动性改变影响脂筏，进而可能导致信号转导和趋化性改变[35]；Sapey 等[36]的研究发现老年宿主的磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphoinositide 3-kinase, PI3K）活性过度或失调，导致中性粒细胞迁移的准确性显著降低。衰老影响中性粒细胞的募集，使牙周组织中性粒细胞稳态失衡，继而造成牙周组织损伤[33]。

当中性粒细胞成功募集到病原菌感染部位后，通过有效地识别、吞入并杀伤和降解病原菌。吞噬作用是一个由中性粒细胞表面模式识别受体如 toll 样受体（toll-like receptors, TLRs），和/或 IgG Fc 受体（即 FcγR，如 FcγR Ⅱ 和 FcγR Ⅲ）介导，诱导微生物主动进入吞噬小体的过程[37]。吞噬小体的形成涉及肌动蛋白细胞骨架的调节。在衰老过程中肌动蛋白聚合反应改变和关键吞噬作用受体 FCγ 受体（CD16）显著减少，都是可能造成中性粒细胞吞噬能力及效率降低的重要原因[38]。细菌一旦被吞噬至胞内，中性粒细胞将迅速释放蛋白水解酶、抗菌肽和活性氧杀菌[39]。而老年人较年轻人具有更高的活性氧（reactive oxygen species, ROS），过多的 ROS 释放会产生氧化应激，氧化应激伴随着牙槽骨附近细胞因子水平的升高可以激活叉头框蛋白 O3（forkhead box protein O3, FOXO3）和 Wnt 信号通路，进而触发 RANKL 介导的骨吸收[37,40-41]。

除了胞内灭菌，中性粒细胞还通过脱颗粒，在胞外形成中性粒细胞胞外陷阱（neutrophil extracellular traps, NETs），这是一个由含组蛋白的 DNA 骨架、髓过氧化酶、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶和乳铁蛋白等颗粒衍生的肽和酶组成的胞外纤维网[42]。NETs 捕获胞外病原体并固定，通过局部高浓度抗菌物质清除龈沟内病原菌及其代谢产物来保护牙龈；也可作为阻止细菌继续扩散的物理屏障[42-43]。牙周病原菌通过胞外核酸酶降解 NETs，导致致病性增加；慢性肉芽肿疾病不依赖 NADPH 途径产生 NETs 使这些患者不易患牙周炎；*ELANE* 基因突变的患者可能因为不能形成 NETs，而多数患有侵袭性牙周炎，这些均提示我们 NETs 对于维持牙周健康必不可少[44-45]。Xu 等[46]研究发现老年小鼠的中性粒细胞发生自噬相关蛋白 ATG5 缺陷相关的自噬水平降低，导致释放 NETs 能力受损。Hazeldine 等[47]通过白细胞介素-8（interleukin-8, IL-8）或脂多糖（LPS）体外刺激中性粒细胞，可见健康老人 NETs 的形成明显减少，并且将老年和年轻两组牙周炎患者的中性粒细胞暴露于次氯酸，同样发现老年组的中性粒细胞释放的 NETs 显著减少，可见老年人中性粒细胞的 NETs 形成受损。

中性粒细胞是牙周炎免疫反应的主要细胞，是清除病原菌及其代谢产物的基础。衰老可能导致中性粒细胞功能失调，造成清除细菌障碍，使宿主反应与菌群失衡，增加炎症的易感性，使牙周炎发生易感、病程发展易加重。

2.1.2　巨噬细胞

巨噬细胞是单核细胞移行到组织后分化成熟的吞噬细胞，通过胞饮作用、吞噬作用和受体介导的胞吞作用摄取抗原呈递给淋巴细胞。巨噬细胞的胞饮作用可吞噬凋亡中性粒细胞，维持机体内中性粒细胞稳态。Aprahamian 等[48]发现老年小鼠的巨噬细胞对于凋亡细胞的胞饮作用受损，造成凋亡细胞的积累，可影响宿主的自身免疫反应，这一现象与随年龄增长而积累的免疫复合物、细胞因子和氧化低密度脂蛋白有关。巨噬细胞强大的吞噬作用是通过表面特异受体如 TLRs 识别病原体，引起局部肌动蛋白细胞骨架聚合形成伪足来包裹颗粒。多项研究表明增龄造成巨噬细胞 TLRs 功能改变，内毒素耐受能力降低，可能引起老年人不可控制的牙周炎症[49-50]。Liang 等[51]在高龄小鼠的巨噬细胞表面发现放大炎症的受体（C5aR 和 TREM-1）的表达增加，这可能是衰老相关的高炎症状态的原因之一。在病原体诱导下，巨噬细胞分泌一系列细胞因子和趋化因子参与免疫反应。Shaik-Dasthagirisaheb 等[52]的研究发现衰老造成巨噬细胞产生中性粒细胞趋化蛋白 KC、巨噬细胞炎性蛋白-1α（macrophage inflammatory protein-1α, MIP-1α）等趋化因子和 NO 等细胞因子的能力显著降低，以及白介素-6（interleukin-6, IL-6）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor-α, TNF-α）等先天免疫介质的表达也呈减弱趋势，而前列腺素 E2（prostaglandin E2, PGE2）等细胞因子则无变化，表明衰老可减弱骨髓巨噬细胞对牙龈卟啉单胞菌的免疫反应。

巨噬细胞摄入病原体、外毒素或胞内蛋白分子等抗原，通过去折叠和蛋白酶水解等过程将其降解为多肽片段，合成抗原肽-MHC 复合物。该复合物表达于细胞表面，然后被递呈给淋巴细胞，诱导免疫反应和调节免疫应答。Gonzalez 等[53]通过对不同年龄牙龈组织中发生抗原处理和提呈的基因进行转录组测序分析，发现老化的健康牙龈组织中 MHC-Ⅱ途径（外源性抗原途径）的基因表达显著增加，包括 *IFI30*、*CD74*、*CTSS* 等；相反，MHC-Ⅰ途径（内源性抗原途径）基因表达下调；此外，胞浆抗原的蛋白质加工相关的热休克蛋白 HSP90 表达量也减少，这些变化提示我们老化的健康牙龈组织主要通过 MHC-Ⅱ途径进行抗原呈递。

在微生物和微环境的刺激下，诱导巨噬细胞表

型极化为 M1 型和 M2 型,M1 型为经典活化巨噬细胞参与促炎反应,在防御病原体感染中发挥核心作用;M2 型巨噬细胞即替代性活化的巨噬细胞,主要促进 Th2 型免疫应答,参与组织重构、促进机体的抗炎反应[54]。巨噬细胞表型极化可能是监测牙周炎活动性、调节高危患者对龈下生物膜的免疫反应和减少牙槽骨丢失的关键指标[55]。Yang 等[56]发现巨噬细胞亚群的相对失衡可能会影响并加剧牙周炎症,而 M2 亚群的倾斜将有利于炎症的缓解,并认为 M1/M2 比值可帮助我们了解牙周组织健康状况。Gonzalez 等[50]发现在健康老年牙周组织中,巨噬细胞浸润/分化/成熟的模式倾向于增加炎症和组织破坏性巨噬细胞 M1,当受到微生物刺激时,可能会增强牙槽骨吸收的易感性和破坏程度。

2.1.3 树突状细胞

树突状细胞(dendritic cells, DC)是一组异质细胞群,根据功能和表型外周血树突状细胞分为浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid DC, pDC)和髓系树突状细胞(myeloid dendritic cell, mDC)。mDC 在外周捕获抗原,然后迁移到淋巴器官以启动免疫应答;pDC 在胸腺髓质和淋巴结 T 细胞区域协助抗病毒反应[57]。Pérez-Cabezas 等[58]通过检测 18~65 岁健康人群的血液样本,发现外周血中树突状细胞的绝对数量伴随衰老发生变化,pDC 功能受损和数量减少,这可能是老年人感染易感性增加的原因之一。

树突状细胞是口腔黏膜的哨兵,外周未成熟树突状细胞通过表达各种模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)捕获、加工牙周组织微生物、凋亡细胞等刺激淋巴细胞活化增殖。其中 TLRs 是关键受体家族,通过识别不同的病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)产生细胞因子调节 T 细胞亚群的分化[59]。有效的抗原捕获是树突状细胞免疫反应的关键,Agrawal 等[60]研究发现 PI3k 激酶信号通路中 AKT 激酶的激活减少可能削弱树突状细胞的吞噬能力。衰老削弱了 TLRs 的功能和表达,影响细胞因子的分泌,使活化 T 细胞能力受损,影响 T 细胞亚群的分化[61-62]。DC 功能的改变共同导致了老年人的免疫功能障碍和慢性炎症的发展。

朗格汉斯细胞(Langerhans cell, LC)是口腔黏膜上皮中树突状细胞家族的一员,在牙周病的发生和维持中可能起重要作用。Zavala 等[63]在健康牙龈中发现上皮内 LC 的密度随年龄增长而下降,树突状结构的数量和长度均减少,这些形态学改变可能导致树突状细胞功能的丧失和/或反映了免疫功能的异常,这提示我们口腔组织的免疫防御可能在老年时受到损害。Bodineau 等[64]研究发现慢性牙周炎老年患者上皮 LC 数量减少,树突状结构也更短(即表面积减少),在抵御病原菌时,表现出较早的成熟以平衡其较低的上皮内密度和改变的形态。这一变化是否会影响牙周健康需要进一步探索。

树突状细胞是先天性免疫和适应性免疫的桥梁。衰老可能在功能上损害了树突状细胞对抗原的摄取,对凋亡细胞的吞噬,以及 T 细胞介导的适应性免疫的激活,增加了宿主疾病的易感性和组织破坏程度。

2.2 适应性免疫

当固有免疫应答无法消灭牙周病原菌及其毒力因子时,在抗原呈递和细胞因子作用下机体启动适应性免疫应答。适应性免疫又称获得性免疫或特异性免疫,包括 T 细胞介导的细胞免疫和 B 细胞介导的体液免疫。

2.2.1 T 淋巴细胞

牙周炎病变早期,牙周结缔组织出现大量 T 淋巴细胞浸润,提示 T 细胞介导的细胞免疫在牙周病发病机制中的重要作用。T 淋巴细胞来源于骨髓祖细胞,迁移到胸腺成熟后,输出到外周[65]。外周幼稚 T 细胞表面 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)与抗原相互作用,增殖分化为介导清除感染的效应性 T 细胞,效应细胞迁移到感染部位清除病原菌。大多数效应 T 细胞清除病原菌后凋亡,一部分作为长期记忆 T 细胞持续存在,免受后续感染。随年龄增长,胸腺退化导致 TCR 多样性降低,幼稚 T 细胞输出减少,并且经历的抗原刺激增加和已发生的感染有助于幼稚 T 细胞分化为记忆 T 细胞,记忆 T 细胞的比例增加,这直接导致对新抗原反应差的发生率增加,细胞介导的免疫力降低,增加牙周炎复发的风险[65-67]。

T 细胞成熟后根据 CD 分子分为 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞。其中在抗原呈递细胞的引导下,$CD4^+$ T 细胞分化为 Th1、Th2、Th17、调节性 T 细胞(Tregs)等细胞亚群,这些细胞亚群通过形成复杂的细胞因子网络作用于靶细胞,随后介导牙周免疫[68]。有学者提出 $CD4^+$T 细胞亚群功能分化及相关炎症因子动态平衡在牙周炎的发生及发展过程中发挥重要作用,其平衡和极化状态影响着牙周炎的进展和预

后[69]。随年龄增长,以 Th1 细胞主导的破坏性应答和以 Th2 细胞主导的保护性应答平衡受到破坏,Th1/Th2 平衡向 Th1 倾斜,可能导致机体疾病的发生和疾病进程的改变[69-71]。Schmitt 等[72]发现在衰老过程中健康人群外周血中 TH17/Treg 比例失衡和细胞因子表达改变都可能导致促炎和抗炎免疫反应之间的失衡,即患炎症性疾病的易感性增加。Su 等[73]研究发现在慢性牙周炎的发病过程中,年轻患者的 Th17/Treg 比值不同于老年患者,这一现象与 DC 中 CD40 的差异表达水平相符。Th17/Treg 比例失衡会引起 RANKL 过度表达,导致牙槽骨吸收,并且通过调节 Th17/Treg 失衡可抑制实验性牙周炎的牙槽骨吸收[74-75]。

$CD8^+$T 细胞即细胞毒性 T 淋巴细胞,在稳态条件下可下调炎症,并在组织损伤情况下启动修复机制维持牙龈组织的完整性,抑制骨破坏细胞因子和修复牙槽骨[76]。Han 等[77]发现调节 $CD8^+$T 细胞通过抑制破骨细胞生成和促进成骨细胞生成可保护牙槽骨免受炎症损伤。Kayar 等[78]发现与牙周健康的产妇相比,患有牙周炎的产妇 $CD8^+$T 细胞增加,并提出 $CD4^+/CD8^+$ 比率是宿主防御系统改变的重要指标。Demir 等[79]通过比较不同年龄组的健康小鼠,发现较成年小鼠而言,衰老小鼠牙龈组织 $CD4^+$T 细胞数量随年龄增加没有变化,但 $CD8^+$T 细胞相对数量增加,$CD4^+/CD8^+$ 比例降低;同时外周血中 $CD8^+$T 淋巴细胞伴随着年龄的增加而减少,$CD4^+$T 淋巴细胞的相对数量增加,$CD4^+/CD8^+$ 比率增加。衰老伴随的这一变化对牙周免疫防御的影响需要进一步的研究。

2.2.2　B 淋巴细胞

作为体液免疫的一部分,B 淋巴细胞在免疫反应的早期阶段发挥抗原呈递功效。Clark 等[80]发现与年轻人相比,老年人 B 细胞表现出较差的抗原呈递功能。Crawford 等[81]提出 B 细胞抗原呈递功能的缺乏损害效应 T 细胞分泌细胞因子功能。此外,B 淋巴细胞通过产生抗体和细胞因子使宿主对牙周病原菌进行防御[82-83]。

表 1　衰老对牙周组织免疫细胞功能的影响

Table 1　Effects of aging on cellular functions in periodontal tissue

分类 Subtypes	主要免疫细胞 Major immune cells	衰老对免疫细胞功能的影响 Effects of aging on immune cellular functions
先天性免疫 Innate immune system	中性粒细胞 PMNs	(1)过多募集;(2)迁移的趋化性和准确性降低;(3)吞噬能力及效率降低;(4) ROS 过多,NETs 受损。 (1) Excessive collection. (2) Reduced chemotaxis and accuracy of migration. (3) Decreased phagocytic capacity and efficiency. (4) Excessive ROS, damaged NETs.
	巨噬细胞 Macrophages	(1)胞饮作用受损;(2)模式识别受体如 TLRs 功能改变;(3)影响趋化因子、细胞因子分泌;(4)抗原呈递途径改变;(5)浸润/分化/成熟的模式偏移。 (1) Impaired pinocytosis. (2) Changes in function of pattern recognition receptors, such as TLRs. (3) Influences in secretion of cytokine and chemokines. (4) Changes in antigen presentation pathway. (5) Shifted pattern of infiltration/differentiation/maturation.
	树突状细胞 Dendritic cells	(1) pDCs 功能受损和数量减少;(2) TLRs 功能和表达受损;(3)吞噬能力减弱;(4) LC 的密度下降,树突状结构的数量和长度减少。 (1) Impaired function and reduced number of pDCs. (2) Impaired function and expression of TLRs. (3) Diminished phagocytosis. (4) Decreased the density of LC and reduced number and length of dendritic structures.
适应性免疫 Adaptive immune system	T 细胞 T cells	(1)幼稚/记忆 T 细胞比例改变;(2)TCR 多样性降低;(3) $CD4^+/CD8^+$T 细胞比例改变;(4) $CD4^+$T 细胞亚群分化失衡和细胞因子表达改变。 (1) Changes in ratio of naive/memory T cells. (2) Reduced in diversity of TCRs. (3) Changes in ratio of $CD4^+/CD8^+$ T cells. (4) Imbalanced differentiation of $CD4^+$ T cell subsets and changes in cytokine expression.
	B 细胞 B cells	(1)抗原呈递功能受损;(2)幼稚/成熟 B 细胞数量、分化、成熟等功能改变;(3)抗体多样性、质量受损。 (1) Impaired antigen presentation. (2) Changes in number, differentiation and maturation of naive/memory B cells. (3) Impaired antibody diversity and quality.

随年龄增长,骨髓中微环境改变,幼稚 B 细胞生成减少,并且外周成熟 B 细胞的关键存活因子如 B 细胞活化因子(B cell activating factor, BAFF)和增殖诱导配体(A proliferation-inducing ligand, APRIL)在血浆中表达水平降低,引起 B 细胞祖细胞和不成熟 B 细胞的增殖能力下降,而外周 B 细胞寿命延长,使 B 细胞数量几乎没有变化,但 B 细胞多样性急剧减少,对外来抗原的反应减弱,多样性的丧失直接影响老年人的免疫健康,破坏免疫平衡[84-87]。记忆 B 细胞具有高度特异性的抗原记忆能力,当同种抗原再次入侵牙周组织时,记忆 B 细胞迅速转化为效应 B 细胞并产生更强烈的二次免疫应答。随年龄增长,记忆 B 细胞尤其是 IgD^+IgM^+ $CD27^+IgM$ 记忆 B 细胞明显减少,并伴有浆细胞分化能力和 Ig 合成能力的降低[88]。Ebersole 等[89]发现在健康老年牙龈组织和老年牙周炎组织中,B 细胞和浆细胞的基因模式发生了改变,大多数变化与细胞的分化/成熟功能有关,特别是与免疫球蛋白多样性有关。

B 细胞通过产生抗体分子(也称为免疫球蛋白)来启动体液免疫保护,在生发中心(germinal centers, GC)通过体细胞高频突变(somatic hypermutation, SHM)和类别转换重组(class switch recombination, CSR)机制促进抗体多样化。体细胞高频突变在免疫球蛋白(Ig)重链基因的可变区(variable, V)、变异区(diversity, D)和连接区(joining, J)内引入点突变,编码免疫球蛋白的抗原结合可变区,为抗原筛选高亲和力抗体突变体;同时类别转换重组通过将编码 IgM 和 IgD 的 $C\mu$ 和 $C\delta$ 基因分别替换为编码 IgG、IgA 和 IgE 的 $C\gamma$、$C\alpha$ 和 $C\varepsilon$ 基因,在不改变抗原特异性的情况下产生具有新效应功能的抗体[90]。受转录因子 E47(由 *E2A* 基因编码的碱性螺旋环螺旋蛋白)调控的胞苷脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)在这两个免疫球蛋白基因多样化机制过程必不可少,老年人表现出 B 细胞 E47 mRNA 的表达量降低,这可能影响了抗体的多样性,使 B 细胞体液免疫的特异性受损[28]。Ebersole 等[91]认为牙周炎患者口腔病原菌的抗体反应的强度与年龄无关,但口腔病原体抗体水平与临床疾病程度之间的关系随年龄而变化,提出老年人群口腔疾病发病率和病情严重程度增加的主要原因可能是抗体质量的改变。这一现象是否与衰老影响抗体多样性有关,需要我们进一步研究。

3 小结及展望

牙周炎是牙菌斑与宿主免疫防御系统间相互作用的结果。免疫衰老引起免疫细胞的一系列复杂的变化(见表 1),可能导致免疫细胞无法有效地防御病原菌,从而导致牙周病原菌长期存在,并增加牙周组织中防御细胞的积累,进而造成老年群体牙周炎症易感性和组织损伤程度增加。随着全球老龄化和口腔存留牙数增加,针对老年群体牙周疾病治疗和保健的需求将不断增长。已有大量研究表明牙周炎与冠心病、类风湿关节炎等年龄相关的系统性疾病有关,其可能机制是牙周病原菌及其毒力因子躲过宿主的防御机制进入体循环发生远处传播,同时细菌及其代谢产物引起机体系统性炎性反应的慢性升高,从而影响疾病的发生发展,在这些病程发展中免疫衰老的作用仍需要更多进一步的研究[92-93]。加强对免疫衰老及其在牙周炎中作用的进一步研究有利于我们更全面的认识牙周炎,可能为防治老年人牙周疾病提供潜在的新策略,并为研究年龄相关性系统性疾病提供新思路。

参考文献:

[1] Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990 - 2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors [J]. J Dent Res, 2017, 96(4): 380-387.

[2] Eke PI, Wei L, Thornton-evans GO, et al. Risk indicators for periodontitis in us adults: nhanes 2009 to 2012 [J]. J Periodontol, 2016, 87(10): 1174-1185.

[3] López R, Smith PC, Göstemeyer G, et al. Ageing, dental caries and periodontal diseases [J]. J Clin Periodontol, 2017, 44(18): S145-S152.

[4] Hajishengallis G. Too old to fight? aging and its toll on innate immunity [J]. Mol Oral Microbiol, 2010, 25(1): 25-37.

[5] Pawelec G. Age and immunity: What is "immunosenescence"? [J]. Exp Gerontol, 2018, 105: 4-9.

[6] Thomas R, Wang W, Su DM. Contributions of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging [J]. Immun Ageing, 2020, 17: 2.

[7] Aiello A, Farzaneh F, Candore G, et al. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? a review of potential options for therapeutic intervention [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2247.

[8] 朱华, 于品, 徐艳峰, 等. 自然衰老过程中 SD 大鼠免疫系统结构功能的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 95

-100.

[9] 管博文, 卢延华, 苏路路, 等. 老年和青年 C57BL/6J 小鼠外周血及免疫细胞分型测定分析[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 24-28.

[10] Allen JC, Toapanta FR, Chen W, et al. Understanding immunosenescence and its impact on vaccination of older adults [J]. Vaccine, 2020, 38(52): 8264-8272.

[11] Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: an overview [J]. J Immunol Methods, 2018, 463: 21-26.

[12] Macian F. Autophagy in T cell function and aging [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 213.

[13] Callender LA, Carroll EC, Bober EA, et al. Mitochondrial mass governs the extent of human T cell senescence [J]. Aging Cell, 2020, 19(2): e13067.

[14] de Punder K, Heim C, Wadhwa PD, et al. Stress and immunosenescence: the role of telomerase [J]. Psychoneuroendocrinology, 2019, 101: 87-100.

[15] Amsterdam D, Ostrov BE. The impact of the microbiome on immunosenescence [J]. Immunol Invest, 2018, 47(8): 801-811.

[16] Johnson ND, Conneely KN. The role of DNA methylation and hydroxymethylation in immunosenescence [J]. Ageing Res Rev, 2019, 51: 11-23.

[17] Weyh C, Krüger K, Strasser B. Physical activity and diet shape the immune system during aging [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 622.

[18] 王宇虹, 曲光瑾, 肖冲, 等. 灵长类巨细胞病毒慢性潜伏再激活诱导免疫衰老的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 124-128.

[19] Xu W, Wong G, Hwang YY, et al. The untwining of immunosenescence and aging [J]. Semin Immunopathol, 2020, 42(5): 559-572.

[20] Bauer ME, Fuente MDL. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence [J]. Mech Ageing Dev, 2016, 158: 27-37.

[21] Lian J, Yue Y, Yu W, et al. Immunosenescence: a key player in cancer development [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 151.

[22] Laderoute M. The paradigm of immunosenescence in atherosclerosis-cardiovascular disease (ASCVD) [J]. Discov Med, 2020, 29(156): 41-51.

[23] Zhao Y, Zhan JK, Liu Y. A perspective on roles played by immunosenescence in the pathobiology of Alzheimer's disease [J]. Aging Dis, 2020, 11(6): 1594-1607.

[24] Persson GR. Dental geriatrics and periodontitis [J]. Periodontol 2000, 2017, 74(1): 102-115.

[25] Ebersole JL, Dawson D, Emecen-huja P, et al. The periodontal war: microbes and immunity [J]. Periodontol 2000, 2017, 75(1): 52-115.

[26] Harvey JD. Periodontal microbiology [J]. Dent Clin North Am, 2017, 61(2): 253-269.

[27] Hazeldine J, Lord JM. Innate immunesenescence: underlying mechanisms and clinical relevance [J]. Biogerontology, 2015, 16(2): 187-201.

[28] Pinti M, Appay V, Campisi J, et al. Aging of the immune system: focus on inflammation and vaccination [J]. Eur J Immunol, 2016, 46(10): 2286-2301.

[29] 李阳, 李厚轩, 闫福华. 与牙周相关的白细胞黏附缺陷综合征-Ⅰ型研究进展[J]. 中国实用口腔科杂志, 2019, 12(5): 257-260.

[30] Hajishengallis G, Moutsopoulos NM. Role of bacteria in leukocyte adhesion deficiency-associated periodontitis [J]. Microb Pathog, 2016, 94: 21-26.

[31] Hajishengallis G. New developments in neutrophil biology and periodontitis [J]. Periodontol 2000, 2020, 82(1): 78-92.

[32] Vestweber D. How leukocytes cross the vascular endothelium [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(11): 692-704.

[33] Hajishengallis G, Moutsopoulos NM, Hajishengallis E, et al. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss [J]. Semin Immunol, 2016, 28(2): 146-158.

[34] Eskan MA, Jotwani R, Abe T, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss [J]. Nat Immunol, 2012, 13(5): 465-473.

[35] Fulop T, Larbi A, Douziech N, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging [J]. Aging Cell, 2004, 3(4): 217-226.

[36] Sapey E, Greenwood H, Walton G, et al. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence [J]. Blood, 2014, 123(2): 239-248.

[37] Cooper PR, Palmer LJ, Chapple ILC. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? [J]. Periodontol 2000, 2013, 63(1): 165-197.

[38] Wessels I, Jansen J, Rink L, et al. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils [J]. ScientificWorldJournal, 2010, 10: 145-160.

[39] Hirschfeld J, White PC, Milward MR, et al. Modulation of neutrophil extracellular trap and reactive oxygen species release by periodontal bacteria [J]. Infect Immun, 2017, 85(12): e00297-e00317.

[40] Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Foxos, wnts and oxidative stress-induced bone loss: new players in the periodontitis arena? [J]. J Periodontal Res, 2011, 46(4): 397-406.

[41] Nogueira-neto J, Cardoso ASC, Monteiro HP, et al. Basal neutrophil function in human aging: implications in endothelial cell adhesion [J]. Cell Biol Int, 2016, 40(7): 796-802.

[42] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria [J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535.

[43] Hirschfeld J, Dommisch H, Skora P, et al. Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms [J]. Int J Med Microbiol, 2015, 305(4-5): 453-463.

[44] White PC, Chicca IJ, Cooper PR, et al. Neutrophil extracellular traps in periodontitis: a web of intrigue [J]. J Dent Res, 2016, 95(1): 26-34.

[45] Vitkov L, Hartl D, Minnich B, et al. Janus-faced neutrophil extracellular traps in periodontitis [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1404.

[46] Xu F, Zhang C, Zou Z, et al. Aging-related atg5 defect impairs neutrophil extracellular traps formation [J]. Immunology, 2017, 151(4): 417-432.

[47] Hazeldine J, Harris P, Chapple IL, et al. Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals [J]. Aging Cell, 2014, 13(4): 690-698.

[48] Aprahamian T, Takemura Y, Goukassian D, et al. Ageing is associated with diminished apoptotic cell clearance *in vivo* [J]. Clin Exp Immunol, 2008, 152(3): 448-455.

[49] Sun Y, Li H, Yang MF, et al. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39224.

[50] Gonzalez OA, Novak MJ, Kirakodu S, et al. Differential gene expression profiles reflecting macrophage polarization in aging and periodontitis gingival tissues [J]. Immunol Invest, 2015, 44(7): 643-664.

[51] Liang S, Domon H, Hosur KB, et al. Age-related alterations in innate immune receptor expression and ability of macrophages to respond to pathogen challenge *in vitro* [J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(8): 538-546.

[52] Shaik-Dasthagirisaheb YB, Kantarci A, Gibson Ⅲ FC. Immune response of macrophages from young and aged mice to the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* [J]. Immun Ageing, 2010, 7: 15.

[53] Gonzalez OA, Novak MJ, Kirakodu S, et al. Comparative analysis of gingival tissue antigen presentation pathways in ageing and periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2014, 41(4): 327-339.

[54] 牛卓娅, 张亚玲, 姚智燕, 等. 巨噬细胞极化与炎性疾病的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(6): 742-744.

[55] Sima C, Glogauer M. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone [J]. Periodontol 2000, 2013, 63(1): 80-101.

[56] Yang J, Zhu Y, Duan D, et al. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis [J]. Arch Oral Biol, 2018, 96: 234-242.

[57] Vora R, Bernardo D, Durant L, et al. Age-related alterations in blood and colonic dendritic cell properties [J]. Oncotarget, 2016, 7(11): 11913-11922.

[58] Pérez-Cabezas B, Naranjo-Gómez M, Fernández MA, et al. Reduced numbers of plasmacytoid dendritic cells in aged blood donors [J]. Exp Gerontol, 2007, 42(10): 1033-1038.

[59] Song L, Dong G, Guo L, et al. The function of dendritic cells in modulating the host response [J]. Mol Oral Microbiol, 2018, 33(1): 13-21.

[60] Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, et al. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway [J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6912-6922.

[61] Agrawal A, Gupta S. Impact of aging on dendritic cell functions in humans [J]. Ageing Res Rev, 2011, 10(3): 336-345.

[62] You J, Dong H, Mann ER, et al. Ageing impairs the T cell response to dendritic cells [J]. Immunobiology, 2013, 218(8): 1077-1084.

[63] Zavala WD, Cavicchia JC. Deterioration of the langerhans cell network of the human gingival epithelium with aging [J]. Arch Oral Biol, 2006, 51(12): 1150-1155.

[64] Bodineau A, Coulomb B, Folliguet M, et al. Do langerhans cells behave similarly in elderly and younger patients with chronic periodontitis? [J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(2): 189-194.

[65] Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function [J]. Nat Immunol, 2004, 5(2): 133-139.

[66] Ciabattini A, Nardini C, Santoro F, et al. Vaccination in the elderly: the challenge of immune changes with aging [J]. Semin Immunol, 2018, 40: 83-94.

[67] Deli F, Romano F, Gualini G, et al. Resident memory T cells: possible players in periodontal disease recurrence [J]. J Periodontal Res, 2020, 55(2): 324-330.

[68] Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, et al. Age-related changes of $CD4^+$ T cell migration and cytokine expression in germ-free and SPF mice periodontium [J]. Arch Oral Biol, 2018, 87: 72-78.

[69] 李昆蔓, 代静, 任静, 等. CD4 阳性 T 淋巴细胞亚群与牙周炎的关系[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2017, 11(3): 178-183.

[70] Campbell L, Millhouse E, Malcolm J, et al. T cells, teeth and tissue destruction - what do T cells do in periodontal disease? [J]. Mol Oral Microbiol, 2016, 31(6): 445-456.

[71] Xia Y, Yang J, Wang G, et al. Age-related changes in DNA methylation associated with shifting Th1/Th2 balance [J]. Inflammation, 2016, 39(6): 1892-1903.

[72] Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging [J]. Exp Gerontol, 2013, 48(12): 1379-1386.

[73] Su X, Zhang J, Qin X. CD40 up-regulation on dendritic cells correlates with Th17/Treg imbalance in chronic periodontitis in young population [J]. Innate Immun, 2020, 26(6): 482-489.

[74] Cafferata EA, Castro-Saavedra S, Fuentes-Barros G, et al. Boldine inhibits the alveolar bone resorption during ligature-induced periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance [J]. J Periodontol, 2021, 92(1): 123-136.

[75] Cafferata EA, Terraza-aguirre C, Barrera R, et al. Interleukin-35 inhibits alveolar bone resorption by modulating the Th17/Treg imbalance during periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(6): 676-688.

[76] Cardoso EM, Arosa FA. $CD8^+$ T cells in chronic periodontitis: roles and rules [J]. Front Immunol, 2017, 8: 145.

[77] Han YK, Jin Y, Miao YB, et al. $CD8^+$ $Foxp3^+$ T cells affect

alveolar bone homeostasis via modulating Tregs/Th17 during induced periodontitis: an adoptive transfer experiment [J]. Inflammation, 2018, 41(5): 1791-1803.

[78] Kayar NA, Çelikİ, Alptekin NÖ. Immune responses in women with periodontitis and preterm low birth weight: levels of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in gingival granulation tissue [J]. Arch Oral Biol, 2020, 109: 104551.

[79] Demir T, Canakci V, Erdem F, et al. The effects of age and gender on gingival tissue and peripheral blood T-lymphocyte subsets: a study in mice [J]. Immunol Invest, 2008, 37(2): 171-182.

[80] Clark HL, Banks R, Jones L, et al. Characterization of MHC-II antigen presentation by B cells and monocytes from older individuals [J]. Clin Immunol, 2012, 144(2): 172-177.

[81] Crawford A, Macleod M, Schumacher T, et al. Primary T cell expansion and differentiation *in vivo* requires antigen presentation by B cells [J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3498-3506.

[82] Shelburne CE, Shelburne PS, Dhople VM, et al. Serum antibodies to *Porphyromonas gingivalis* chaperone HtpG predict health in periodontitis susceptible patients [J]. PLoS One, 2008, 3(4): e1984.

[83] Yu P, Hu Y, Liu Z, et al. Local induction of B cell interleukin-10 competency alleviates inflammation and bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice [J]. Infect Immun, 2017, 85(1): e00645-e00716.

[84] Gibson KL, Wu YC, Barnett Y, et al. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status [J]. Aging Cell, 2009, 8(1): 18-25.

[85] Dunn-walters DK. The ageing human B cell repertoire: a failure of selection? [J]. Clin Exp Immunol, 2016, 183(1): 50-56.

[86] Tabibian-keissar H, Hazanov L, Schiby G, et al. Aging affects B-cell antigen receptor repertoire diversity in primary and secondary lymphoid tissues [J]. Eur J Immunol, 2016, 46(2): 480-492.

[87] Moura J, Madureira P, Leal EC, et al. Immune aging in diabetes and its implications in wound healing [J]. Clin Immunol, 2019, 200: 43-54.

[88] Shi Y, Yamazaki T, Okubo Y, et al. Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell [J]. J Immunol, 2005, 175(5): 3262-3267.

[89] Ebersole JL, Kirakodu SS, Novak MJ, et al. Transcriptome analysis of B cell immune functions in periodontitis: mucosal tissue responses to the oral microbiome in aging [J]. Front Immunol, 2016, 7: 272.

[90] Cerutti A, Cols M, Puga I. Activation of B cells by non-canonical helper signals [J]. EMBO Rep, 2012, 13(9): 798-810.

[91] Ebersole JL, Al-sabbagh M, Gonzalez OA, et al. Ageing effects on humoral immune responses in chronic periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2018, 45(6): 680-692.

[92] Carter CJ, France J, Crean S, et al. The *Porphyromonas gingivalis*/host interactome shows enrichment in GWASdb genes related to Alzheimer's disease, diabetes and cardiovascular diseases [J]. Front Aging Neurosci, 2017, 9: 408.

[93] Persson GR. Periodontal complications with age [J]. Periodontol 2000, 2018, 78(1): 185-194.

〔收稿日期〕2020-12-02

刘丽,李琦,杜欣珂,等. M2 型小胶质细胞极化促进少突胶质祖细胞的分化——促进多发性硬化症髓鞘再生的有效途径[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 126-132.
Liu L, Li Q, Du XK, et al. M2 microglia promote oligodendrocyte precursor cell differentiation: an effective therapy for stimulating remyelination in multiple sclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 126-132.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 019

M2 型小胶质细胞极化促进少突胶质祖细胞的分化——促进多发性硬化症髓鞘再生的有效途径

刘 丽,李 琦,杜欣珂,冉庆森,孙立东,杨 庆,李玉洁,陈 颖,王娅杰,翁小刚,蔡维艳,朱晓新*

(中国中医科学院 中药研究所,北京 100700)

【摘要】 中枢神经系统(central nervous system, CNS)持续性的自身免疫性炎症和髓鞘脱失是多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)的典型病理特征,尤其以神经系统持续衰退导致慢性脱髓鞘轴突病变引起的继发-进展型 MS(secondary progressive multiple sclerosis, SPMS)最为难治。有多种免疫细胞和神经细胞参与 MS 的疾病进程,但在 CNS 中主要负责炎症反应调节和髓鞘再生的分别为小胶质细胞(microglia, MG)和少突胶质祖细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)。在 MS 患者病灶部位发现具有 MG M1/M2 极化失衡和 OPCs 分化受阻导致的髓鞘再生障碍的现象,以往研究通常把 MG 的极化失衡和 OPCs 分化受阻当成两个独立的现象。但近期研究表明,两者之间存在交互式作用,MG 极化失衡是导致 OPCs 分化受阻的核心机制之一,而 OPCs 也可反作用于 MG,两者共同影响髓鞘的再生过程。在 MS 的治疗上,目前临床上治疗 MS 的药物只能对症治疗,无法根治 MS。探索新的药物研发方向是目前 MS 临床治疗中亟待解决的关键科学问题。本研究就"从极化到分化"这一领域进行综述,聚焦于通过靶向 MG 极化失衡从而促进 OPCs 的分化和髓鞘再生的新策略,以期为 MS 及其他以 CNS 组织修复障碍为共同病理特征的神经退行性疾病的治疗提供新的药物研发方向。

【关键词】 多发性硬化症治疗;髓鞘再生;小胶质细胞极化;少突胶质祖细胞分化
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0126-07

M2 microglia promote oligodendrocyte precursor cell differentiation: an effective therapy for stimulating remyelination in multiple sclerosis

LIU Li, LI Qi, DU Xinke, RAN Qingsen, SUN Lidong, YANG Qing, LI Yujie, CHEN Ying, WANG Yajie, WENG Xiaogang, CAI Weiyan, ZHU Xiaoxin*

(China Academy of Chinese Medical Sciences Institute of Chinese Materia Medica, Beijng 100700, China)

【Abstract】 Demyelination and autoimmune chronic inflammation in the central nervous system are the typical pathological features of multiple sclerosis (MS). A range of immune and nerve cells participate in the disease process of MS. The regulation of inflammation and remyelination is mainly performed by microglia (MG) and oligodendrocyte precursor cells (OPCs), respectively. In non-repairing lesions of MS patients, an imbalance of MG polarization and a

[**基金项目**]"重大新药创制"科技重大专项(2017ZX09101002-002-002,2017ZX09101002-002-008);中国中医科学院优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ13-YQ-044)。
[**作者简介**]刘丽(1992—),女,博士,研究方向:青蒿素类药物治疗自身免疫病的共同药理学研究。E-mail: kimliu0520@163.com
[**通信作者**]朱晓新(1959—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学研究。E-mail: zhuxx@icmm.ac.cn

failure of OPC differentiation are likely to contribute to inefficient remyelination. Previous researchers have emphasized that these are independent functions. However, it has recently been reported that MG polarization is closely connected with OPC differentiation, an imbalance of MG polarization can inhibit OPC differentiation. Conversely, OPCs can also interfere with the inflammatory response of MG. Taken together, interactions between MG and OPCs form a holistic entity and function as a crucial mechanism of remyelination. Currently approved treatments for MS mainly target the aberrant immune response, and are able to improve the disease-related symptoms but do not cure MS, particularly intractable secondary progressive multiple sclerosis (SPMS). Therapeutic strategies or agents that promote remyelination remain under extensive investigation. This review summarizes the interactions between MG polarization and OPC differentiation, and provides strategies to overcome the failure of OPC differentiation by attempting to rebalance MG polarization, which will be beneficial for the development of demyelinating diseases including SPMS.

【Keywords】 multiple sclerosis therapy; remyelination; microglia polarization; oligodendrocyte precursor cell differentiation

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是以中枢神经系统(central nervous system, CNS)炎性脱髓鞘病变为主要特点的自身免疫性疾病,全世界共有 200 多万患者[1-3]。目前临床使用药物只能对症治疗,不能从根本上完全阻止或逆转这种神经系统的退行性病变,长期的炎性损伤和髓鞘脱失,导致神经元的变性和死亡,表现为运动、认知和感觉功能的障碍。

MS 在病理上表现为 CNS 病灶内大量炎性细胞浸润及少突胶质细胞(oligodendrocyte, OLs)死亡导致的髓鞘脱失[4]。更值得注意的是,这两大病理特征并不是孤立的,而是相互诱导可以形成统一的功能单元。炎症浸润具体表现为小胶质细胞(microglia, MG)介导的炎症反应失衡导致的病理损伤,而髓鞘再生障碍主要表现为少突胶质祖细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)分化受阻。

在药物的研发和应用中,通过药物干预调控 MG 向 M2 的方向极化,重塑其极化的平衡,来促进 OPCs 的分化,本质上实现对炎性细胞浸润和髓鞘脱失的双重影响,有望实现神经系统损伤组织的再修复。损伤修复障碍不仅是中枢神经系统 MS 的病理表现,在帕金森、阿尔兹海默症等其他神经退行性疾病患者和动物模型中也发现损伤组织的修复障碍[5-6]。基于这一共同病理表现,促进损伤组织的新生对神经退行性疾病治疗也具有极大的启发意义。

1　MS 中炎性损伤导致髓鞘修复障碍

根据临床表现的不同,MS 可分为复发-缓解型 MS(RRMS),继发-进展型 MS(SPMS),原发-进展型 MS(PPMS)和进展-复发型 MS(PRMS)4 种类型。大部分患者为复发-缓解型 MS[3],但随着病情反复发作,多数患者在 10~20 年内最终转化为 SPMS,SPMS 患者由于髓鞘再生障碍导致病情无法逆转,而留下终身残疾[2],促进髓鞘的再生成为治疗 MS 的有效策略之一。

髓鞘是由成熟的 OLs 形成致密绝缘的髓磷脂蛋白膜包裹着轴突形成,起到加快神经冲动传导和营养支持神经轴等作用。OLs 在 CNS 中主要由 OPCs 分化而来,从 OPCs 到成熟的 OLs 的发育过程主要涉及 4 个阶段,表达不同的标志物:前 O2A 祖细胞,主要表达标志物 A2B5、NG2;O2A 祖细胞,主要表达 A2B5、NG2 和 O4;未成熟 OLs,主要表达 O4 和 O1,成熟 OLs,高表达 MBP(myelin basic protein, MBP)和 CC1[7]。当髓鞘损伤时,OPCs 感受到组织稳态的失衡而被激活,开始大量增殖、迁移、分化,形成成熟的 OLs[8-9]。尽管具有这种再生能力,但 MS 患者仍然存在髓鞘再生的修复障碍。在 MS 患者脱髓鞘病灶处发现大量未成熟的 OLs 和 OPCs,提示 OLs 的存活不是髓鞘再生的限制性因素,而多数 OPCs 停留在从未成熟到成熟的阶段,OPCs 的分化受阻才是髓鞘再生失败的关键因素[10]。

MS 的另一个病理特征是大量炎性细胞浸润,在新形成的脱髓鞘病灶内,发现大量 MG 的激活和浸润,而少见淋巴细胞的浸润[11]。病理学研究表明炎症在 MS 的各个阶段都会导致组织损伤。局灶性炎症浸润在脑膜和血管周围间隙,产生可溶性因子,直接或间接的通过 MG 激活诱发脱髓鞘和神经退行性病变。如何基于 MG 的炎症调控来促进 OPCs 分化成为解决 MS 患者髓鞘修复障碍问题的关键。

2　小胶质细胞极化对 MS 髓鞘再生的作用及机制研究

2.1　小胶质细胞极化对髓鞘再生的作用

MG 属于 CNS 中固有巨噬细胞,也是 CNS 炎症

反应的主要执行细胞,维持 CNS 微环境稳定,在 MS 的发生、发展中扮演着重要角色[12],其表型和功能随微环境的改变而动态变化,见图 1。

2.1.1 小胶质细胞极化平衡促进 MS 髓鞘再生

MG 根据其活化状态,可分为经典活化态(M1 型)和可替代活化态(M2 型),M2 型 MG 又可分为 M2a,M2b 和 M2c 亚型。M1 和 M2 细胞比例的失衡可能是造成 MS 疾病进展髓鞘再生障碍的关键因素[13]。在 MS 患者的病灶中可以观察到 M1 和 M2 型 MG 的比例严重失衡,且 M2 型 MG 分布的部位髓鞘再生程度明显增强[14]。在 MS 的典型动物模型-实验性变态反应性脑脊髓炎(EAE)中,M1/M2 比例升高会抑制脊髓损伤后的轴突再生,当加入外源性的 M2 型 MG 后,M1 和 M2 的比例达到平衡状态,可明显促进 OPCs 的分化和髓鞘的新生,改善 EAE 的疾病症状[15]。并且有研究表明,M2b 亚型可以转化为 M1 和 M2a/b 的过渡态[16],提示 M1 型 MG 和 M2 型 MG 之间可以相互转化,在 M1/M2 型 MG 失衡的 MS 等 CNS 退行性疾病中,促进 M1 型 MG 向 M2 型的转化,维持 M1 和 M2 的相对平衡,是一个潜在的药物作用干预靶点。

2.1.2 M2 型小胶质细胞促进 OPCs 分化

MG 不同的极化状态对 OPCs 的影响不同。MS 单细胞测序结果表明,在 EAE 动物模型 CNS 内,MG 多数呈现出 M1 炎症表型[17]。在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的 M1 型 MG 与 OPCs 或神经前体细胞的共培养模型中,神经前体细胞和 OPCs 的分化明显受到抑制。而在白介素-4(interleukin-4, IL-4)诱导的 M2 型 MG 与 OPCs 或神经前体细胞的共培养模型中,神经前体细胞和 OPCs 的分化能力也明显增强[18]。同样的情况,把 M1 型 MG 培养液作为 OPCs 的条件培养基时,OPCs 的分化明显减缓,而把 M2 型 MG 的培养液作为 OPCs 的条件培养基时,OPCs 的分化增加。在体内模型中,M2 型 MG 功能受损后,其 OPCs 的分化受阻,并且髓鞘再生过程受到抑制[19],提示 M2 型 MG 具有促进 OPCs 分化和髓鞘再生的作用。靶向 MG 极化失衡,促进 MG 向 M2 型转化,可促进髓鞘再生,并且对以髓鞘再生障碍为共同病理特征的其他神经退行性疾病的治疗具有提示性意义。

2.1.3 M2 型小胶质细胞促进 MS 髓鞘再生的机制

M1 型 MG 可通过活性氧(氮)、炎症因子、趋化因子的释放,与 T 细胞相互作用形成炎症级联反应等方式,导致 OLs 的凋亡,形成大面积的髓鞘脱失。与 M1 型 MG 功能相反的是,M2 型 MG 一方面是通过分泌抗炎因子,抑制炎症反应,调节炎症反应平衡,为髓鞘的再生提供稳定的内环境,从而促进 OPCs 的募集、增殖和分化。另一方面,M2 型 MG 可通过分泌神经营养因子,促进 OPCs 的分化,实现髓鞘的再生[20]。

研究表明,在 EAE 脱髓鞘期间,M1 型胶质细胞占主导,在 EAE 的高峰期及缓解期,血液结合素(Hpx)可启动 M1 型 MG 向 M2 型 MG 的转化[21],病灶中的 M2 型 MG 逐渐增多,髓鞘再生明显增多。M2 型 MG 分泌 IL-4、IL-10、IL-13、TGF-β 等,通过 STAT-6 通路,分别与其 MG 表面受体结合,释放抗炎型细胞因子[22],抑制 CNS 内炎症应答,减少炎症对髓鞘的攻击。除了对 CNS 内环境的调节外,M2 型 MG 通过释放 IL-4、激活素 A 等促进 OPCs 的增殖和分化。如在 IL-4 诱导的 M2 型胶质细胞的上清液中,可检测到炎症因子 TNF-α 的减少,并且 OPCs 数量明显增多[17];M2 分泌的激活素 A 与 OPCs 上该因子的受体结合、IL-4 可通过 IL-4R/PPARγ 通路促进 OPCs 的分化和髓鞘再生[19,23-24]。药理学研究表明,具有炎症调节功能的丙酮酸乙酯能够增多 M2 型小胶质细胞,促进 OPCs 的分化来促进髓鞘再生过程[25]。

除上述机制外,M2 型 MG 还可通过其他机制促进髓鞘再生,如通过神经营养因子的释放和髓鞘碎片的及时清除。Zhang 等[26]报道,M1 和 M2 型 MG,尤其是 Arg1+ M2 型 MG 产生的神经营养因子 3(neurotrophin 3, NT3)可促进 OPCs 的分化。

2.2 OPCs 对小胶质细胞的作用

当髓鞘损伤时,病灶部位的 OPCs 会改变其形态,并且其基因表达谱会迅速变成“激活”状态,启动髓鞘再生过程。研究发现,在 CNS 中,不仅 MG 对 OPCs 有抑制或促进其增殖、迁移、分化的作用,“激活”的 OPCs 自身也会通过产生细胞因子对 MG 产生作用。如单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),在 MS 脱髓鞘病区,激活的 OPCs 的 MCP-1 表达明显上升[8]。在 MS 髓鞘损伤时,OPCs 释放的 MCP-1 在可促进 MG 的激活和迁移[27]。形成一个整合单元共同促进 MS 的髓鞘再生。

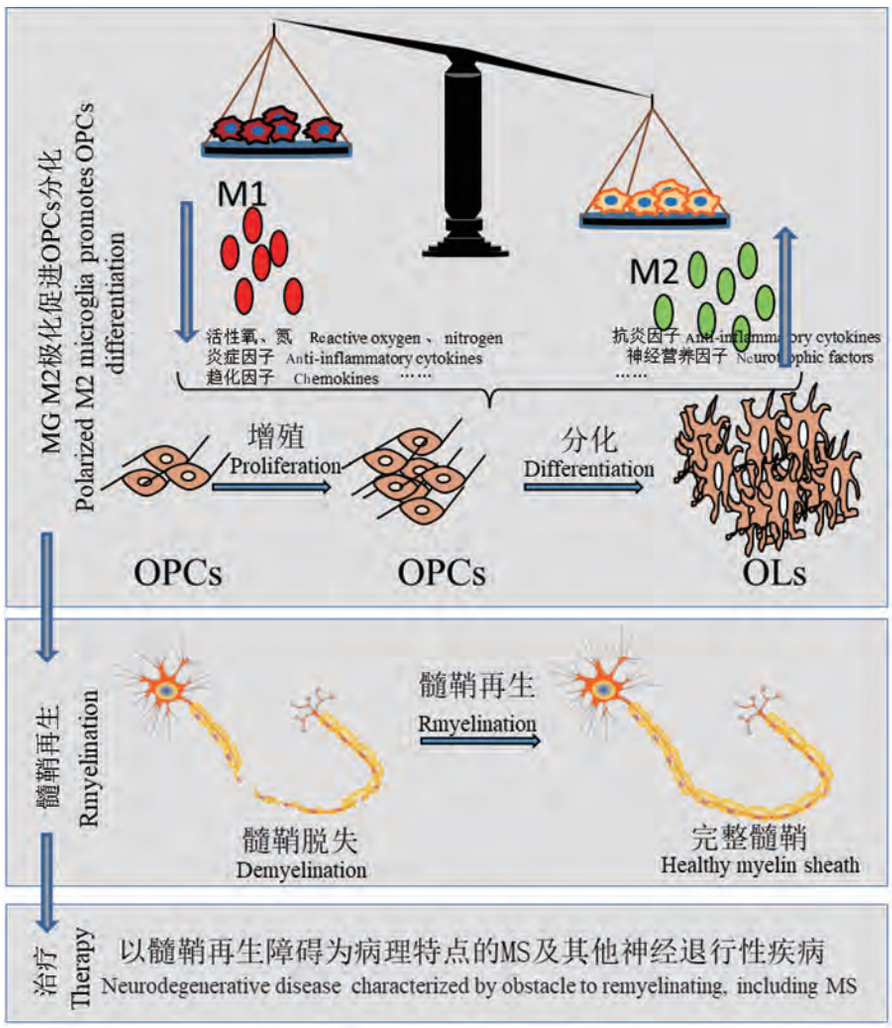


图 1　小胶质细胞 M2 极化促进 OPCs 分化和髓鞘再生

Figure 1　Polarized M2 microglia promotes OPCs differentiation and remyelination

3　MS 的治疗及药物研发现状

3.1　MS 临床治疗现状

目前在 MS 的治疗上，对于 MS 急性期的药物治疗主要采用糖皮质激素，以减轻急性期症状、缩短病程、改善残疾程度和防治并发症，其虽对部分患者的病情有较好的控制作用，但由于个体差异，仍有一部分患者对糖皮质激素不敏感，疗效不理想，并且长期使用糖皮质激素不利于恢复神经功能，且存在一系列的不良反应的风险，如电解质紊乱、糖尿病、消化道出血，无菌性股骨头坏死等[28]。在 MS 患者缓解期的治疗上，主要使用疾病修饰疗法（DMT），目前，截至 2017 年 12 月，经美国食品药品监督局（FDA）批准 15 种 DMT 药物[29]，都存在不同程度的脏器毒性及免疫反应，且能够同时对 RRMS 和 SPMS 具有缓解作用的药物只有少数，如阿仑单抗、奥瑞珠单抗、米托蒽醌、特力氟胺，其他药物只对 RRMS 的临床症状有缓解作用，而对 SPMS 患者的疗效甚微，甚至没有任何疗效[4]。所以对于 MS 的治疗，尤其是针对 SPMS，国内外仍缺乏安全有效经济的药物。

3.2　基于“小胶质细胞和 OPCs”的药物研发现状

基于 MG 和 OPCs 在 MS 的重要作用及可塑性，促进 M1 型 MG 向 M2 型转化，促进 OPCs 的分化，是一个潜在的药物作用干预靶点。目前通过影响 MG 和 OPCs 的功能来治疗 MS 的多种中西药物/天然产物正在进行临床前研究[30]。

3.2.1　西药研发现状

目前治疗 MS 的 DMT 药物大多是免疫调节剂，但经研究发现，特立氟胺不仅具有免疫调节作用，也能促进 OPCs 的分化从而促进 EAE 模型小鼠的髓鞘再生。特立氟胺是 FDA 批准的治疗 RRMS 的

临床一线药物,主要通过抑制新生嘧啶的合成发挥作用,对增殖的 B 细胞和 T 细胞具有抑制作用。近年来的基础研究表明特立氟胺可能对髓鞘再生障碍的 SPMS 也具有一定的治疗价值。其可能通过 Mssh1/Ascl1 通路、髓鞘调节因子 Myrf、转录因子 Nkx2.2 和 Tap7 等的参与促进原代大鼠 OPCs 的分化[31],这对髓鞘再生具有很强的提示性意义。另外,有多种能够调节 M1 型 MG 向 M2 型极化的药物在 MS 的治疗上也取得了良好的效果。如新型免疫调节剂来那度胺[32]可促进 M2 型巨噬细胞标记基因(Arg-1、Ym-1、Mrc1、Ccl17、Ccl22)的表达,并且在 EAE 模型小鼠中验证了来那度胺药效,通过 IL-10/P38/STAT3 信号通路促进巨噬细胞向 M2 方向极化,抑制了 EAE 小鼠 CNS 中的炎症反应,髓鞘的完整程度明显上升。除此之外,还有多种靶向 MG 极化的西药正在进行临床前研究,如丙酮酸乙酯[33]、亚精胺[34]、毛喉素[35];生物疫苗 PADRE-Kv1.3[36]等。以期能够寻找到高效的治疗 MS 的临床药物。上述候选药物主要以抑制 MG 的激活或者促进促炎型 M1 型 MG 向抗炎型 M2 型 MG 的转化,抑制炎症或通过与 T 细胞的相互作用发挥免疫调节,来改善 EAE 小鼠的临床症状。

3.2.2 中药研发现状

(1)靶向 MG 极化和 OPCs 分化来缓解 EAE 症状

在中药治疗 EAE 的研究中,有多种中药取得了很好的治疗效果,如补肾中药淫羊藿有效成分淫羊藿黄酮、山茱萸提取物山茱萸环烯醚萜、巴戟天甲素等都能明显降低 EAE 的神经功能评分,改善其行为学障碍[37]。基于 MG 和 OPCs 的分化促进髓鞘再生的研究中,研究表明植物提取物薯蓣皂苷元对 EAE 小鼠具有明显的治疗作用,薯蓣皂苷元一方面通过抑制 MG 的激活,减少炎症细胞浸润;减少 $CD4^+$T 细胞的增殖,抑制 Th1/Th17 细胞的分化,发挥着抑制炎症,保护髓鞘免受损伤的作用[38-39]。另一方面,其对髓鞘再生也同样具有明显的作用,在研究髓鞘再生公认的酮腙模型中发现,薯蓣皂苷元干预后,模型小鼠的成熟的 OLs 数量和髓鞘再生程度明显增加,但 OPCs 的数量没有明显变化。同时,在体外原代提取的大鼠 OPCs 中证明,薯蓣皂苷元对 OPCs 的增殖和迁移没有明显的作用,但对 OPCs 的分化具有明显的作用,说明薯蓣皂苷元促进髓鞘再生依赖于 OPCs 的分化作用[40]。薯蓣皂苷元治疗 MS 兼顾保护髓鞘免受损伤和促进髓质再生的作用,相对于西药的单一靶点治疗,其发挥了天然药物靶点多样,综合治疗的特点。

(2)其他

有多种中成药及天然产物如片仔癀[41]、苦参素[42]等直接调节 MG 的极化平衡,降低 EAE 动物模型中过高的 M1 型 MG,增加偏低的 M2 型 MG 的数量,使 M1 和 M2 的极化水平恢复平衡,来控制 EAE 病灶部位过高的炎症反应,降低其对髓鞘的损伤作用。另外研究显示,多种治疗自身免疫病药物可有效改善 EAE 的疾病症状[43-44],如双氢青蒿素,在自身免疫病系统性红斑狼疮、光敏性皮炎、炎症性肠病等中都具有很好的疗效,在 MS 的治疗中,研究显示,双氢青蒿素可通过增强共抑制信号[45]、调节 mTOR 信号通路调节 Th 和 Treg 细胞之间的比例等方式来缓解 EAE 的临床症状[46],但双氢青蒿素是否可以促进 OPCs 的分化和髓鞘再生仍需进一步的研究。

4 结语

目前对于 MS 的治疗多数用单纯的抗炎或免疫调节来抑制疾病的进展,无法从根本上阻止或治疗 MS。如何促进 OPCs 的分化,解决 MS 的髓鞘再生障碍是未来药物研发的瓶颈。在此方面,中药及其有效成分发挥了靶点多样,综合疗效显著的特点,是未来治疗 MS 的一个宝贵的资源库。另外,在阿尔茨海默症、帕金森等其他神经退行性疾病模型中也发现存在组织修复障碍的问题,基于这一共同病理环节,靶向修复障碍是神经退行性疾病的共同环节和枢纽,起到了核心的治疗价值。

参考文献:

[1] Severa M, Zhang J, Giacomini E, et al. Thymosins in multiple sclerosis and its experimental models: moving from basic to clinical application [J]. Mult Scler Relat Disord, 2019, 27: 52-60.

[2] Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(9): 545-558.

[3] Marzullo A, Kocevar G, Stamile C, et al. Classification of multiple sclerosis clinical profiles via graph convolutional neural networks [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 594.

[4] Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment [J]. Curr Neuropharmacol, 2011, 9(3): 409-416.

[5] 赵雪纯, 李建毅, 周晓芳, 等. 蛋白酶体活性对小鼠神经干细胞活性氧水平的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(5): 605-610.

[6] Sun J, Zhou H, Bai F, et al. Remyelination: a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease? [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 58(3): 597-612.

[7] Guardiola-Diaz HM, Ishii A, Bansal R. Erk1/2 MAPK and mTOR signaling sequentially regulates progression through distinct stages of oligodendrocyte differentiation [J]. Glia, 2012, 60(3): 476-486.

[8] Moyon S, Dubessy AL, Aigrot MS, et al. Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration [J]. J Neurosci, 2015, 35(1): 4-20.

[9] Franklin RJ, Ffrench-Constant C, Edgar JM, et al. Neuroprotection and repair in multiple sclerosis [J]. Nat Rev Neurol, 2012, 8(11): 624-634.

[10] Luessi F, Kuhlmann T, Zipp F. Remyelinating strategies in multiple sclerosis [J]. Expert Rev Neurother, 2014, 14(11): 1315-1334.

[11] Alvarez JI, Saint-Laurent O, Godschalk A, et al. Focal disturbances in the blood-brain barrier are associated with formation of neuroinflammatory lesions [J]. Neurobiol Dis, 2015, 74: 14-24.

[12] 王小蕊, 孙豪, 蔡其燕, 等. 小胶质细胞极化在中枢神经系统髓鞘再生中的作用研究进展 [J]. 生理科学进展, 2016, 47(5): 386-390.

[13] Cao L, He C. Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination [J]. Neurosci Bull, 2013, 29(2): 189-198.

[14] Shechter R, Miller O, Yovel G, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus [J]. Immunity, 2013, 38(3): 555-569.

[15] Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, et al. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration [J]. Mult Scler, 2011, 17(1): 2-15.

[16] Lisi L, Stigliano E, Lauriola L, et al. Proinflammatory-activated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells [J]. ASN Neuro, 2014, 6(3): 171-183.

[17] Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, et al. High-dimensional single-cell mapping of central nervous system immune cells reveals distinct myeloid subsets in health, aging, and disease [J]. Immunity, 2018, 48(2): 380-395.

[18] Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 31(1): 149-160.

[19] Miron VE, Boyd A, Zhao JW, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(9): 1211-1218.

[20] Miron VE, Franklin RJ. Macrophages and CNS remyelination [J]. J Neurochem, 2014, 130(2): 165-171.

[21] Han D, Yu Z, Liu W, et al. Plasma Hemopexin ameliorates murine spinal cord injury by switching microglia from the M1 state to the M2 state [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 181.

[22] Yin L, Chen Y, Qu Z, et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the effect of cornel iridoid glycoside on experimental autoimmune encephalomyelitis amelioration in rats [J]. J Neuroimmunol, 2014, 274(1-2): 28-37.

[23] Zhang Q, Zhu W, Xu F, et al. The interleukin-4/PPARγ signaling axis promotes oligodendrocyte differentiation and remyelination after brain injury [J]. PLoS Biology, 2019, 17(6): e3000330.

[24] de Kretser DM, O'Hehir RE, Hardy CL, et al. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 359(1-2): 101-106.

[25] He Y, An J, Yin J, et al. Ethyl pyruvate enhances spontaneous remyelination by targeting microglia phagocytosis [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 77: 105929.

[26] Zhang ML, Zhang XJ, Kang J, et al. Matrine promotes NT3 expression in CNS cells in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Neurosci Lett, 2017, 649: 100-106.

[27] Iqbal AJ, Regan-Komito D, Christou I. A real time chemotaxis assay unveils unique migratory profiles amongst different primary murine macrophages [J]. PLoS One, 2013, 8 (3): e58744.

[28] 中国免疫学会神经免疫分会, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 多发性硬化诊断和治疗中国专家共识(2018 版) [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2018, 25(6): 387-394.

[29] Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis [J]. New Engl J Med, 2018, 378: 169-180.

[30] Wang J, Wang J, Wang J, et al. Targeting microglia and macrophages: a potential treatment strategy for multiple sclerosis [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 286.

[31] Göttle P, Manousi A, Kremer D, et al. Teriflunomide promotes oligodendroglial differentiation and myelination [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 76.

[32] Weng Q, Wang J, Wang J, et al. Lenalidomide regulates CNS autoimmunity by promoting M2 macrophages polarization [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 251.

[33] 何燕. 丙酮酸乙酯靶向胶质细胞介导髓鞘再生的探索 [D]. 晋中: 山西中医药大学, 2020.

[34] Yang Q, Zheng C, Cao J, et al. Spermidine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through inducing inhibitory macrophages [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(11): 1850-1861.

[35] Veremeyko T, Yung AWY, Dukhinova M, et al. Cyclic AMP pathway suppress autoimmune neuroinflammation by inhibiting functions of encephalitogenic CD4 T cells and enhancing M2 macrophage polarization at the site of inflammation [J]. Front Immunol, 2018, 9: 50.

[36] Fan C, Long R, You Y, et al. A novel PADRE-Kv1.3 vaccine

effectively induces therapeutic antibodies and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in rats [J]. Clin Immunol, 2018,193: 98-109.
[37] 郑娜. 补肾中药有效成分对小胶质细胞极化的调节及机制研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
[38] 柳威力. 薯蓣皂苷元在实验性自身免疫性脑脊髓炎模型中的治疗作用 [D]. 合肥: 安徽大学, 2018.
[39] Liu W, Zhu M, Yu Z, et al. Therapeutic effects of diosgenin in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroimmunol, 2017, 313: 152-160.
[40] Xiao L, Guo D, Hu C, et al. Diosgenin promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation through estrogen receptor-mediated ERK1/2 activation to accelerate remyelination [J]. Glia, 2012, 60(7): 1037-1052.
[41] 罗会. 基于调控小胶质细胞极化探讨片仔癀对进展型 EAE 的治疗作用 [D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
[42] Liu SQ, Zhang ML, Zhang HJ, et al. Matrine promotes oligodendrocyte development in CNS autoimmunity through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Life Sci, 2017,180: 36-41.
[43] 李世举, 王艳旭, 邱建敏, 等. 雷公藤内酯醇对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠小胶质/巨噬细胞极化的影响 [J]. 福建中医药, 2021, 52(4): 23-25.
[44] 陈颖婷, 何柯新, 王云秀, 等. 雷公藤内酯醇对类风湿关节炎大鼠 TLR4/NF-κB 信号通路的调控作用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(17): 2053-2057.
[45] Ran QS, Li Q, Liu L, et al. Dihydroartemisinin ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis through enhancing co-inhibitory signals [J]. Mater Express, 2020,10: 1824-1830.
[46] Zhao YG, Wang Y, Guo Z, et al. Dihydroartemisinin ameliorates inflammatory disease by its reciprocal effects on Th and regulatory T cell function via modulating the mammalian target of rapamycin pathway [J]. J Immunol, 2012, 189(9): 4417-4425.

〔收稿日期〕2020-11-09

(上接第 98 页)

[40] Dai Y, Yan T, Gao Y. Silence of miR-32-5p promotes endothelial cell viability by targeting KLF2 and serves as a diagnostic biomarker of acute myocardial infarction [J]. Diagn Pathol, 2020, 15(1): 19.
[41] Gao C, Qian H, Shi Q, et al. MicroRNA-363-3p serves as a diagnostic biomarker of acute myocardial infarction and regulates vascular endothelial injury by targeting KLF2 [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2020, 10(3): 421-430.
[42] Pezel T, Viallon M, Croisille P, et al. Imaging interstitial fibrosis, left ventricular remodeling, and function in stage A and B heart failure [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2021, 14(5): 1038-1052.
[43] El-Mahdy RI, Saleem TH, Essam OM, et al. Functional variants in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor rs755622 gene (MIF G173C) among patients with heart failure: Association with echocardiographic indices and disease severity [J]. Heart Lung, 2021, 50(1): 92-100.
[44] Goddard LM, Duchemin AL, Ramalingan H, et al. Hemodynamic forces sculpt developing heart valves through a KLF2-WNT9B paracrine signaling axis [J]. Dev Cell, 2017, 43(3): 274-289.
[45] Li H, Wang Y, Liu J, et al. Endothelial Klf2-Foxp1-TGFβ signal mediates the inhibitory effects of simvastatin on maladaptive cardiac remodeling [J]. Theranostics, 2021, 11(4): 1609-1625.
[46] Liu J, Zhuang T, Pi J, et al. Endothelial forkhead box transcription factor P1 regulates pathological cardiac remodeling through transforming growth factor-β1-endothelin-1 signal pathway [J]. Circulation, 2019, 140(8): 665-680.
[47] Marcus NJ, Del Rio R, Ding Y, et al. KLF2 mediates enhanced chemoreflex sensitivity, disordered breathing and autonomic dysregulation in heart failure [J]. J Physiol, 2018, 596(15): 3171-3185.

〔收稿日期〕2021-01-19

赵高远,苗玉芳,侯润苏,等. 线粒体损伤与慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍及中医药治疗进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 133-137,144.
Zhao GY, Miao YF, Hou RS, et al. Progress on mitochondrial injury in skeletal muscle induced by chronic obstructive pulmonary disease and treatment with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 133-137,144.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 020

线粒体损伤与慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍及中医药治疗进展

赵高远[1,2],苗玉芳[1,2],侯润苏[1,2],李康沉[1,2],田燕歌[1,2,3*]

(1.河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,郑州 450046;2.河南省中医药防治呼吸病重点实验室,郑州 450046;3.河南中医药大学中医药科学院,郑州 450046)

【摘要】 骨骼肌功能障碍(skeletal muscle dysfunction, SMD)是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)的常见并发症,导致患者活动能力降低,严重影响其生活质量。线粒体损伤是 COPD 合并 SMD 的主要机制之一,线粒体的氧化应激、能量代谢障碍、自噬异常等是引起线粒体损伤的重要原因;线粒体 ROS 的生成增多导致氧化应激,引起线粒体生物合成减少、体密度降低和线粒体呼吸功能(RCR 评估)下降;线粒体膜电位降低、ATP 合成酶活性降低、线粒体膜通透性转换孔的过度开放导致线粒体能量代谢障碍;严重氧化应激和全身炎症均能触发线粒体自噬异常,加快其降解和清除。中医药在改善 COPD 患者运动能力,提高患者生活质量等方面具有明显优势。随着近年来中医药相关研究的深入,中医药对改善线粒体损伤治疗 COPD 合并 SMD 取得了一定进展。该文结合国内外相关文献,就线粒体损伤与 COPD 合并 SMD 关系及其中医药治疗进行总结,为进一步研究提供依据。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;骨骼肌功能障碍;线粒体损伤;中医药
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0133-05

Progress on mitochondrial injury in skeletal muscle induced by chronic obstructive pulmonary disease and treatment with traditional Chinese medicine

ZHAO Gaoyuan[1,2], MIAO Yufang[1,2], HOU Runsu[1,2], LI Kangchen[1,2], TIAN Yange[1,2,3*]

(1. Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Disease Co-constructed by Henan Province & Education Ministry of P.R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046. 3. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Skeletal muscle dysfunction (SMD) is a common complication of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which usually causes a decline in exercise activity and quality of life. Mitochondrial injury is one of the main mechanisms by which SMD coexists with COPD, and injury is mainly caused by oxidative stress, energy metabolism disorders, and abnormal autophagy. An increase in mitochondrial reactive oxygen species production leads to oxidative stress and decreased mitochondrial biosynthesis, volume density, and mitochondrial respiratory function (respiratory control

[基金项目]河南省科技厅科技攻关课题(192102310427);国家自然科学基金(82074406)。
[作者简介]赵高远(1990—),男,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E-mail:71871885@qq.com
[通信作者]田燕歌(1984—),女,博士,副教授,研究方向:中医药防治呼吸病。E-mail:yange0910@126.com

ratio evaluation). Decreased mitochondrial membrane potential and ATP synthase activity and excessive opening of the mitochondrial membrane permeability transition pore may result in mitochondrial-mediated metabolic disorders. Severe oxidative stress and systemic inflammation can trigger abnormal mitochondrial autophagy and accelerate degradation and clearance of mitochondria. Traditional Chinese medicine (TCM) has obvious benefits in improving exercise ability and quality of life in patients with COPD. With the in-depth study of TCM in recent years, TCM has been shown to improve mitochondrial injury after treatment of COPD-induced SMD. In this study, we reviewed the relevant literature and summarized the relationship between mitochondrial injury and COPD combined with SMD and treatment with TCM. This review may provide a basis for further research.

【**Keywords**】 chronic obstructive pulmonary disease; skeletal muscle dysfunction; mitochondrial injury; traditional Chinese medicine

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种不可逆性老年呼吸系统疾病,以持续进行性加重的气流受限为特征,发病率和致死率均高[1]。我国有近 1 亿 COPD 患者,其中 40 岁以上人群患病率为 13.7%[2]。COPD 居我国疾病负担第二位,随着我国人口老龄化的加重,COPD 患病率呈上升态势,已成为严重危害公众健康的重大疾病之一[3]。

骨骼肌功能障碍(skeletal muscle dysfunction,SMD)是 COPD 患者活动受限的主要原因及常见的肺外并发症,也是促进疾病发展的关键因素。在 COPD 早期有 30%~40%患者已经存在骨骼肌萎缩和体重下降,COPD 患者股四头肌最大自主等长收缩(maximal isometric voluntary contraction,MVC)比健康人降低 20%~30%,股四头肌肌力较健康人平均降低 25%,故 COPD 患者的下肢肌肉更加容易发生萎缩[4-5]。目前认为,COPD 合并 SMD 的潜在机制可能与营养不良、氧化应激、炎症反应、蛋白合成/分解失衡、线粒体损伤等有关[6-7]。在 COPD 进展过程中,患者骨骼肌中线粒体破裂信号呈递增趋势,严重影响骨骼肌能量的生成[8]。此外,活性氧(reactive oxygen species,ROS)的异常升高是线粒体氧化应激的直接诱因,较高浓度的 ROS 又可触发线粒体自噬,进而导致线粒体活性降低甚至凋亡[9-10]。因此,防止线粒体损伤是改善 COPD 合并 SMD 的关键。现就线粒体损伤与 COPD 合并 SMD 及中医药治疗进展做一综述,为进一步科学研究提供依据。

1 线粒体损伤导致 COPD 患者 SMD 的发生机制

线粒体损伤是导致 COPD 患者 SMD 的重要原因之一,骨骼肌线粒体氧化应激、能量代谢障碍、自噬异常等均为其损伤的重要机制。

1.1 氧化应激

氧化应激是机体抗氧化系统无法清除过量的 ROS 时,体内氧化与抗氧化作用失衡所表现出的应激反应[11]。ROS 分为外源性 ROS 和内源性 ROS。外源性 ROS 主要来源于吸入的有毒气体或环境污染物,内源性 ROS 的来源包括线粒体呼吸、过氧化物酶体、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶系统和炎症细胞,而线粒体的氧化磷酸化过程是内源性 ROS 的主要来源之一[12]。线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)结构开放,缺乏修复途径,而异常升高的线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species,mtROS)所引发的氧化应激易损伤 mtDNA,并且会引起电子传输链和氧化磷酸化异常,导致线粒体内蛋白质、DNA 受损和炎症加重,从而导致线粒体生物合成减少和线粒体呼吸功能(RCR 评估)下降[13-15]。Konokhova 等[16]观察到 COPD 患者骨骼肌中 mtDNA 缺失的发生率很高(74% vs 15%),且 mtDNA 缺失患者的核 DNA 氧化水平是无 mtDNA 缺失患者的 2 倍,极易导致 SMD 的发生。Gifford 等[17]研究发现,氧化应激易导致 COPD 患者骨骼肌线粒体密度降低。总之,mtROS 的过量生成是 COPD 患者 SMD 的主要原因之一。

mtROS 的生成增多和氧化应激的增强是促进肌丝蛋白降解进而发展成肌肉萎缩的重要因素,在萎缩的四肢肌肉固定模型中,给予线粒体靶向抗氧化肽 SS-31 可显著减轻肌肉氧化应激和蛋白质降解,并防止肌纤维萎缩[18]。患有肌肉萎缩和 II 型肌纤维萎缩的 COPD 患者股外侧肌活检组织中线粒体超氧阴离子产生相对较高[19]。此外,对于 ROS 敏感的核因子 κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)转录因子也参与了 COPD 患者肌肉蛋白质的分解代谢,促进患者肌肉萎缩[20]。过氧化物酶增殖物激活受体 α(peroxisome proliferators-activated receptor,PPAR-α)可直接抑制 ROS 的生成,PPAR-α 激动剂可阻抑氧化应激,并可通过调节解偶联蛋白 3

(uncoupling protein3, UCP3)基因改变 ROS 的生成和脂肪酸的氧化[21-22]。PPAR mRNA 表达水平的降低可能是线粒体呼吸功能和体密度降低的原因之一,在 COPD 患者外周骨骼肌中 PPAR 的 mRNA 表达水平与线粒体体积密度呈正相关[23]。因此,PPAR 通路可能代表了一类新的潜在药物靶点,有助于 COPD 合并 SMD 中线粒体损伤的治疗。

1.2　线粒体能量代谢障碍

线粒体由于具有吸收和释放 Ca^{2+}的能力,通过氧化磷酸化和细胞钙离子动力学在 ATP 的产生中起着核心作用,而 ATP 作为骨骼肌运动的能量来源,在维系能量的平衡中起重要作用。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的稳定是维持细胞正常生理功能的重要条件,而在 COPD 中线粒体 MMP 呈降低趋势[24]。MMP 为线粒体能量产生的重要条件,膜电位的降低可导致 ATP 合成障碍,引起细胞质内的 ATP 快速水解,从而致使 ATP 损耗严重,钙离子内流,触发细胞凋亡[25]。当线粒体积累高浓度的 Ca^{2+}时,特别是在氧化应激情况下,会刺激线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的开放,导致线粒体肿胀,以及 MMP 的减少和 ATP 合成酶中断[26]。骨骼肌线粒体 ATP 酶的活性在 COPD 合并 SMD 患者中下降,导致线粒体钠泵功能及氧化磷酸化功能障碍,影响三磷酸循环,ATP 合成不足,进而阻碍能量供应,不能维系骨骼肌运动的正常能量消耗,进一步加剧 COPD 患者骨骼肌肌力及耐力的减退[27]。与正常人相比,COPD 患者骨骼肌线粒体产生一定量的 ATP 需要消耗更多的氧气,而在 COPD 患者的线粒体中又存在氧气供应不足的问题,由此形成恶性循环,加剧 SMD 的进展[28]。因此,线粒体能量代谢障碍对 COPD 患者骨骼肌运动具有显著影响。

1.3　线粒体自噬异常

自噬是一种进化高度保守的蛋白质降解过程,由双层膜组成的自噬泡将细胞中损坏的蛋白或细胞器等物质包裹后运送到溶酶体进行降解,受损或功能障碍的线粒体通过线粒体自噬从细胞中被清除[29]。正常的骨骼肌细胞存在一定的线粒体自噬,可去除蛋白质聚合物和功能失调的线粒体,在维持肌肉的动态平衡方面起着积极的作用[30]。线粒体自噬可以维持健康的线粒体群体,在疾病发病机制中发挥细胞保护作用[31]。研究表明,生理水平的 mtROS 促进骨骼肌细胞正常范围内的自噬,而 mtROS 的异常增高会导致氧化应激,触发过度自噬,这反过来又会加重肌纤维萎缩[32-33]。COPD 患者骨骼肌自噬的程度与肌肉萎缩和肺功能损害的严重程度有关[34]。而肺部炎症诱导的全身炎症会引起骨骼肌线粒体过度自噬,导致线粒体生物生成减少[35]。通过对 COPD 患者股外侧肌线粒体研究发现,在氧化应激状态下,骨骼肌自噬水平的增加,会促进股外侧肌线粒体的降解[36]。临床研究表明,COPD 患者自噬增加与肌肉萎缩及肺功能下降程度呈正相关,表现为大腿横截面积减少,FEV_1/FVC 比值下降[35]。

COPD 中的线粒体自噬可能受 PTEN 诱导激酶 1(PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金蛋白(PARKIN)通路介导。一旦线粒体电位急剧下降,PINK1 就从线粒体内膜移位到线粒体外膜,然后将 PARKIN 从胞浆引导到去极化的线粒体,触发自噬。简而言之,PINK1 和 PARKIN 协同作用检测线粒体去极化,标记受损的线粒体,并触发线粒体自噬[37]。电压依赖型阴离子孔道蛋白(voltage-dependent anion channel1, VDAC1)的磷酸化在 PARKIN 介导的线粒体自噬起重要作用,在此过程中,自噬接头蛋白 P62/SQSTM1 在清除受损的线粒体中发挥关键作用,因为 PARKIN 依赖的线粒体自噬需要 P62 重新聚集到线粒体中进行清除[38]。因此,COPD 患者骨骼肌线粒体的异常自噬,直接导致线粒体生物合成减少,引起骨骼肌功能障碍。

2　中医药治疗 COPD 患者骨骼肌线粒体损伤现状

中医药在患者的运动能力及生活质量等方面的改善优势明显。COPD 在中医学中属于“喘病”、“肺胀”等范畴[39],COPD 由肺虚渐及脾肾,脾肾之虚又累及于肺,虚损积久而成诸脏俱虚,故正虚积损是 COPD 的主要病机[40]。肺病日久,必盗母气,肺病及脾,脾失健运,因脾主肌肉四肢,则可致肌肉瘦消、软弱无力,甚至萎弱不用,故肺脾气虚证是 COPD 合并 SMD 的主要病机之一。前期临床研究表明,补肺健脾方(ZL.201110205234.6)具有健脾补肺、化痰止咳、降气平喘等功效,其通过补肺益气、健脾生肌的作用,能显著改善患者肺功能、减少急性加重次数和持续时间、延长 6 min 步行距离和生活质量,长期随访仍具有较好疗效[41]。实验研究表明,补肺健脾方可改善 COPD 稳定期大鼠肺功能,明显提高股四头肌的线粒体体密度,改善线粒体数

量、形态和功能,其作用与抑制线粒体氧化和凋亡有关,可提高 Na^+-K^+ ATP 酶活性,降低线粒体琥珀酸脱氢酶(succinate dehydro genase,SDH)活性,降低 BCL2 相互作用蛋白 3(BCL2 interacting protein 3,BNIP3)、细胞色素-C(cytochrome C,CYTO-C)等凋亡因子,抑制骨骼肌线粒体损伤,改善骨骼肌功能[42-45]。

其他学者也发现中医药对骨骼肌线粒体损伤具有修复作用。琚星萌等[46]研究发现,四君子汤(人参,白术,茯苓,甘草)具有益气健脾作用可以提高大鼠骨骼肌琥珀酸脱氢酶(SDH)活性,改善骨骼肌线粒体呼吸功能,提高线粒体能量代谢,修复线粒体损伤。健脾益气中药(人参,白术等)通过增强骨骼肌线粒体能量的合成和代谢,对骨骼肌线粒体损伤有明显的修复作用[47]。川芎嗪在改善骨骼肌活性、维持骨骼肌细胞线粒体完整性及抗氧化作用等方面具有显著效果,能减少骨骼肌细胞凋亡,延缓失神经骨骼肌细胞的萎缩[48]。Zhang 等[49]研究指出,姜黄素通过上调线粒体过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1α,PGC-1α)/沉默信息调节因子 3(sirtuin3,SIRT3)信号通路,显著降低氧化应激和炎症反应,可明显改善 COPD 大鼠骨骼肌肌纤维萎缩、肌原纤维结构紊乱、间质纤维化和线粒体结构损伤。

3 结语

线粒体损伤是 COPD 合并 SMD 的主要机制之一,而氧化应激、线粒体能量代谢障碍、线粒体自噬是已知的引起线粒体损伤的重要原因。以线粒体生物发生为靶点的疗法可能会使 COPD 骨骼肌功能得到改善,因骨骼肌具有极强的可塑性,所以针对它的治疗对提高 COPD 患者的运动功能和生命健康具有重要的临床意义。并且伴随近年来中医药的长足发展,中医药能从一定程度上修复线粒体损伤,改善 COPD 患者 SMD,并取得了良好效果。中医药的有效参与,从一定程度上弥补了西医治疗的疗效欠缺,为中西医结合的良性发展勾勒理想蓝图。但目前该方面的研究存在一些不足:(1)线粒体损伤致 SMD 机制尚不十分清楚,导致其作用靶点不明,缺乏靶向性治疗药物;(2)中医药治疗 COPD 合并骨骼肌线粒体损伤的研究较少,导致确切疗效机制不明;(3)因“脾主肌肉四肢”,目前中医药治疗 COPD 合并 SMD 的研究多集中于肺脾气虚证,偏重于健脾,虽然肺脾气虚证是稳定期的主要证型之一,但也是疾病发展的一个过程,随着疾病进展可能发展成肺肾气虚、肺肾气阴两虚证,但因为患者活动能力的持续降低,必定有 SMD 的存在并伴随始终,故今后的治疗和研究也要注重益肾、滋阴等。因此,进一步研究应深入探讨线粒体损伤机制,探索有效作用靶点,加强中医药相关研究,为临床应用提供依据。

参考文献:

[1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obsructive Pulmonary Disease, 2020 report [EB/OL]. [2019-11-05]. https://goldcopd. org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1. 2-03Dec19_WMV.pdf.

[2] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1706-1717.

[3] Yin P, Wang H, Vos T, et al. A subnational analysis of mortality and prevalence of COPD in China from 1990 to 2013: findings from the global burden of disease study 2013 [J]. Chest, 2016, 150(6): 1269-1280.

[4] Maltais F, Decramer M, Casaburi R, et al. ATS/ERS Ad Hoc committee on limb muscle dysfunction in COPD. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 189(9): e15-e62.

[5] Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, et al. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity [J]. Eur Respir J, 2010, 36(1): 81-88.

[6] Marklund S, Bui KL, Nyberg A. Measuring and monitoring skeletal muscle function in COPD: current perspectives [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2019, 14: 1825-1838.

[7] Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chron Respir Dis, 2016, 13(3): 297-311.

[8] Leermakers PA, Schols AMWJ, Kneppers AEM, et al. Molecular signalling towards mitochondrial breakdown is enhanced in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15007.

[9] Taivassalo T, Hussain SN. Contribution of the mitochondria to locomotor muscle dysfunction in patients with COPD [J]. Chest, 2016, 149(5): 1302-1312.

[10] Marchi S, Giorgi C, Suski JM, et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging [J]. J Signal Transduct,

2012, 2012: 329635.

[11] 户元元, 李亚, 李素云. 氧化应激在 COPD 骨骼肌功能障碍中的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(5): 1244-1247.

[12] Jiang Y, Wang X, Hu D, et al. Mitochondrial alterations during oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 1153-1162.

[13] Puente-Maestu L, Lázaro A, Tejedor A, et al. Effects of exercise on mitochondrial DNA content in skeletal muscle of patients with COPD [J]. Thorax, 2011, 66(2): 121-127.

[14] Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136(3): 769-780.

[15] 蒋雪莲, 钟萍, 黄成亮, 等. 稳定期慢性阻塞性肺疾病患者营养状况和氧化应激能力与肺功能的关系 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(1): 40-45.

[16] Konokhova Y, Spendiff S, Jagoe RT, et al. Failed upregulation of TFAM protein and mitochondrial DNA in oxidatively deficient fibers of chronic obstructive pulmonary disease locomotor muscle [J]. Skelet Muscle, 2016, 6: 10.

[17] Gifford JR, Trinity JD, Kwon OS, et al. Altered skeletal muscle mitochondrial phenotype in COPD: disease vs. disuse [J]. J Appl Physiol (1985), 2018, 124(4): 1045-1053.

[18] Min K, Smuder AJ, Kwon OS, et al. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy [J]. J Appl Physiol (1985), 2011, 111(5): 1459-1466.

[19] Fermoselle C, Rabinovich R, Ausin P, et al. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? [J] Eur Respir J, 2012, 40(4): 851-862.

[20] Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 91-108.

[21] Busiello RA, Savarese S, Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism [J]. Front Physiol, 2015, 6: 36.

[22] Ramsden DB, Ho PW, Ho JW, et al. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. Brain Behav, 2012, 2(4): 468-478.

[23] Zhang JQ, Long XY, Xie Y, et al. Relationship between PPARα mRNA expression and mitochondrial respiratory function and ultrastructure of the skeletal muscle of patients with COPD [J]. Bioengineered, 2017, 8(6): 723-731.

[24] Navratilova Z, Kolek V, Petrek M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2016, 64(3): 177-193.

[25] 刘少博, 令狐婷, 高耀, 等. 线粒体能量代谢障碍在抑郁症发病机制中的关键作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 865.

[26] Sinha K, Das J, Pal PB, et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(7): 1157-1180.

[27] 王丽丽, 李素云, 李亚. 慢性阻塞性肺疾病骨骼肌能量代谢研究现状 [J]. 中医临床研究, 2015, 7(28): 143-145.

[28] Gifford JR, Trinity JD, Layec G, et al. Quadriceps exercise intolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the potential role of altered skeletal muscle mitochondrial respiration [J]. J Appl Physiol (1985), 2015, 119(8): 882-888.

[29] Ahmad T, Sundar IK, Lerner CA, et al. Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease [J]. FASEB J, 2015, 29(7): 2912-2929.

[30] Masiero E, Agatea L, Mammucari C, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass [J]. Cell Metab, 2009, 10(6): 507-515.

[31] Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, et al. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD [J]. J Clin Invest, 2014, 124(9): 3987-4003.

[32] Rahman M, Mofarrahi M, Kristof AS, et al. Reactive oxygen species regulation of autophagy in skeletal muscles [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3): 443-459.

[33] Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, et al. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity [J]. Cell Metab, 2008, 8(5): 425-436.

[34] Guo Y, Gosker HR, Schols AM, et al. Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(11): 1313-1320.

[35] Leermakers PA, Remels AHV, Langen RCJ, et al. Pulmonary inflammation-induced alterations in key regulators of mitophagy and mitochondrial biogenesis in murine skeletal muscle [J]. BMC Pulm Med, 2020, 20(1): 20.

[36] Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 91-108.

[37] Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/Parkin mitophagy [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(10): 733-744.

[38] Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, et al. Mitofusin 2 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy [J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(24): 4861-4870.

(下转第 144 页)

蒋超,王超,任晓楠,等. 浅述干细胞治疗慢性肾疾病的潜力 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 138-144.
Jiang C, Wang C, Ren XN, et al. A brief review on the development of stem cells as therapeutics for chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 138-144.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 021

浅述干细胞治疗慢性肾疾病的潜力

蒋　超,王　超,任晓楠,周晓辉*

(复旦大学附属公共卫生临床中心,上海　201508)

【摘要】 慢性肾疾病具有高发病率、高致死率的特点并且在全球范围内流行,但除了血液透析和肾移植外,迄今尚无其他有效方法治愈,因此是当前严重危害人类生命健康的重大疾病之一。干细胞是一类具有自我更新和分化为多种谱系能力的细胞,近年来研究提示,干细胞具有作为慢性肾疾病潜在治疗方法的可能。本文对间充质干细胞、胚胎干细胞和诱导多潜能干细胞三种干细胞在治疗慢性肾疾病方面的潜力进行了一个简要综述。

【关键词】 慢性肾疾病;间充质干细胞;胚胎干细胞;诱导多潜能干细胞
【中图分类号】 R-33　**【文献标识码】** A　**【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0138-07

A brief review on the development of stem cells as therapeutics for chronic kidney disease

JIANG Chao, WANG Chao, REN Xiaonan, ZHOU Xiaohui*
(Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Chronic kidney disease (CKD) is prevalent worldwide and represents a serious threat to human life and health with a high morbidity and mortality. Currently, there are no effective curative therapeutics for CKD except hemodialysis and renal transplantation. Stem cells, which are able to self-renew and differentiate into multiple lineages, have been explored as a potentially viable treatment for CKD in recent years. In this review, the potential applications of three types of stem cells for treatment of CKD are briefly summarized, including embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, and mesenchymal stem cells.

【Keywords】 chronic kidney disease; mesenchymal stem cell; embryonic stem cell; induced pluripotent stem cell

慢性肾疾病(chronic kidney disease,CKD)是当前一个全球性的疾病,严重危害人类的生命健康,成为了卫生健康和经济领域的巨大负担。根据国际肾病预后组织(kidney disease improving global outcomes,KDIGO)的定义,肾功能减退,肾小球滤过率不到 60 mL/(min · 1.73 m^2)或者具有肾损伤的标志物,如蛋白尿、电解质紊乱、尿沉渣异常、组织学异常和影像学检测结构异常等,并且症状至少持续 3 个月即可被认为是 CKD[1]。CKD 可由多种疾病及相关因素引起,造成肾功能和结构进行性丧失和不可逆的损伤,其中高血压和糖尿病等疾病占据主要原因,除此之外还包括单基因、多基因遗传因

[基金项目]上海市科学技术委员会实验动物专项(19140905301);上海市卫生健康委员会项目(20204Y0335);上海市公共卫生临床中心院级科研课题(KY-GW-2021-05,KY-GW-2021-38);上海实验动物安全控制管理信息平台研究及应用示范(21140900200);生物安全实验室实验动物信息可追溯系统应用评价研究(21140900202)。
[作者简介]蒋超(1997—),男,硕士研究生,研究方向:肾脏病动物模型。E-mail: 20211300004@ fudan.edu.cn
[通信作者]周晓辉(1973—),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:感染免疫学与实验动物模型。E-mail: zhouxiaohui@ shphc.org.cn

素、表观遗传因素和不良环境因素影响等[1]。对于 CKD 的患病率及危险因素的调查分析也表明年龄、高血压和糖尿病等与 CKD 有着密切的关系[2]。目前分布在全球各个地区和国家 CKD 患者的患病率约在 3.0%~18.0%,患者分布各个年龄层,其中老年人居多。造成患病率的差异因素包括年龄、收入、地理位置、环境、饮食和气候影响等[3]。

早期阶段的 CKD 症状不容易发现,因此一旦发现症状一般都在 CKD 较严重阶段。常规治疗不能阻止大多数 CKD 病情进展到终末期肾疾病(end stage kidney disease,ESKD)阶段,最后通常需要肾透析或者肾移植。肾透析虽然能够提高患者的生存率,但这与透析前后细心护理有很大关系,而且还需要考虑昂贵的医疗费用和病人的生活质量。肾移植是治疗 ESKD 的有效方法,但是由于缺少供体来源的器官而受到限制,而且移植肾的病人需要长期使用免疫抑制药物,这容易导致病人感染其它疾病[4]。因此仍需要探索更有效的 CKD 治疗方案。

干细胞(stem cells,SCs)是一种具有自我更新和多向分化能力的细胞,根据其来源可以分为 3 类:胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)、诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)和成体干细胞(somatic stem cell,SSC)。其中 SSC 包括间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)、造血干细胞(hematopoietic stem cell,HSC)和神经干细胞(neural stem cell,NSC)等[5-6]。近年来,对 SCs 深入和突破性的研究给临床上多种疾病的治疗带来了希望,包括 CKD[7]。SCs 治疗 CKD 的机制如旁分泌作用、促进细胞自噬、抗炎症、抗凋亡和介导免疫调节等已经被逐渐阐明,同时 SCs 自身也具有多向分化潜能。正因为 SCs 的自身优势,故可通过体外培养形成肾类器官,然后移植入体内,修复替代损伤肾;或者直接将 SCs 移植入宿主体内发挥多向分化潜能、旁分泌作用、抗炎症和介导免疫调节等方面的功能,促进肾功能改善和结构修复[7-8]。本文将从 MSC、ESC 和 iPSC 在治疗 CKD 方面的应用潜力进行阐述。

1 SCs 治疗 CKD 的潜力

1.1 MSC 治疗 CKD 的潜力

MSC 属于多能成体干细胞,具有强大的自我更新和多谱系分化潜能,能够从骨髓、脂肪组织、外周血和脐带血等部位分离出来[9]。近年来一些研究已经逐渐发现了 MSC 的一些功能特点,如 MSC 定位于受损组织器官部位,定向分化为器官特异性细胞,修复受损组织或者通过旁分泌和内分泌作用产生生物活性因子,如细胞因子、趋化因子、生长因子和胞外泡(extracellular vesicles,EV)发挥促细胞增殖、抗纤维化、抗炎、抗凋亡和调节免疫反应等作用[10-11]。这些功能特点使 MSC 在治疗 CKD 方面显示出强大的潜力。

目前不少研究已经成功的将 MSC 培养成为肾小球系膜细胞、足细胞和肾小管上皮细胞等[12-13]。Machiguchi 等[13]将人类 MSC 诱导培养成肾小管上皮细胞,然后将其移植入免疫缺陷大鼠的肾皮质,可检测到新生的肾小球和肾小管结构。也有研究表明 MSC 能够延缓 CKD 进一步发展,保护肾功能、减轻组织损伤和肾纤维化等[14-15]。现在大多数研究认为 MSC 主要是通过旁分泌生物活性因子发挥对肾的保护作用。日本研究小组利用细胞片工程技术(cell sheet engineering technology),把能够分泌人肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)的间皮细胞片移植到单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction,UUO)大鼠的肾包膜表面,发现移植的细胞片能够较长时间存活于体内,且能够不断分泌 HGF 抑制肾小管和肾盂的扩张,维持肾小管周围毛细血管密度和肾血流量,从而控制大鼠肾纤维化进展[16]。然后又将骨髓间充质干细胞片(bone marrow mesenchymal stem cell sheets, BM-MSC sheets)移植到大鼠缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)模型肾表面,发现 BM-MSC sheets 也能够存活在肾表面且能够分泌 HGF 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),从而保护肾小管、减轻内皮损伤、维持微血管密度和控制肾纤维化进展。该研究第 1 个将 BM-MSC sheets 应用于肾疾病治疗,证明了细胞片疗法具有治疗肾疾病包括 CKD 的潜力[17]。

近年来,MSC 分泌的 EV 在一些疾病治疗中也具有重要的作用。EV 中包含蛋白质、MicroRNA 和脂质分子等,MSC 可旁分泌 EV 作用于其它细胞传递细胞信号,从而在损伤组织中发挥一定的作用[18]。Nassar 等[19]临床研究实验证明脐血 MSC 来源的 EV 能够改善整体肾功能,包括肾小球滤过率、血肌酐和血尿素氮水平都有所改善,同时还能减轻

炎症免疫反应,而且通过一年的临床评估表明该治疗方法是安全的。血管钙化是 CKD 的常见并发症,实验表明来源于 BM-MSC 的外泌体(exosomes,EV 的一种类型)具有改善人主动脉血管平滑肌细胞钙化的功能,因此研究推测外泌体也可能改善 CKD 引起的血管钙化[20]。Wang 等[21]也发现来源于 MSC 的 EV 包含了相关 MicroRNA 分子,这些小分子可能通过影响 TGF-β 分子介导下游信号传递,从而在肾纤维化进展中起到关键作用。

但是 CKD 引起的病理生理状况和体内不良环境会影响 MSC 的植入和存活,从而影响 MSC 的治疗效果。近年来已经有研究策略来解决这些问题,如低氧预处理 MSC 可以提高其对体内不良环境的抵抗力、促进其存活增殖和增强促血管生成的能力[22]。一些生物活性因子如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor,IGF)等预处理 MSC 也可提高其存活增殖率、迁移能力和旁分泌活性[23]。此外,用激素如褪黑素(melatonin)预处理 MSC 对其抵抗体内恶劣微环境有着重要作用[24]。一项研究证明褪黑素预先处理 BM-MSC 可以增强其归巢和存活能力,并增强对肾的保护作用[25]。另一项研究也认为褪黑素刺激细胞产生的外泌体可增强 CKD 病人 MSC 的功能,包括提高其线粒体功能、抑制其衰老、促进其增殖和增强产生血管生成细胞因子的能力。通过小鼠体内实验也验证该方法能够提高移植的 MSC 存活率,并保护小鼠的肾血管[26]。因此基于这些预处理策略可进一步提高 MSC 的治疗效果。

可见 MSC 在保护肾结构、改善肾功能和控制肾纤维化等方面显示出强大的潜能。虽然 MSC 具有多向分化潜能,但是以上研究表明 MSC 主要是通过旁分泌多种生物活性因子发挥保护和修复肾的作用。

1.2 ESC 治疗 CKD 的潜力

ESC 是来源于囊胚时期内细胞团的一种多潜能干细胞,具有自我更新和分化为所有细胞类型的细胞,被广泛研究并用于再生医学方面[27]。

ESC 可分化为肾各种类型的细胞,具有再生肾能力[28]。许多研究学者也证实了 ESC 的强大再生能力。Narayanan 等[29]将人类 ESC 体外培养分化成具有肾近端小管功能特征的细胞,然后移植到严重联合免疫缺陷小鼠皮下,可以形成简单的肾上皮。来自日本研究小组两项研究分别将鼠和人的 ESC 体外诱导形成肾小管细胞,经过培养也产生了肾小管结构[30-31]。Takasato 等[32]通过在特定培养条件下分阶段添加骨形态发生蛋白 4(bone morphogenetic protein 4,BMP4)、激活素 A(activin A)、成纤维细胞生长因子 9((fibroblast growth factor 9,FGF9)、维甲酸(retinoic acid,RA)和骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein 7,BMP7)等体外诱导人类 ESC 形成后原始条纹(posterior primitive streak)和中间中胚层(intermediate mesoderm,IM),然后发现了肾祖细胞(nephron progenitor cells,NPCs)和相关肾结构的形成。而且用另外 2 种因子 CHIR99021(Wnt 信号通路激动剂)和 FGF9,诱导效果更好,并且认为在形成肾结构过程中细胞间能够相互影响,自组织形成早期肾单位。这与其它的两项研究结果相似[33-34],其中 Morizane 等[34]以更加有效的方案将人类 ESC 诱导为 NPCs,有效率达到 90.0%,并通过 2 D 或者 3 D 培养 NPCs 形成了具有足细胞、近端小管、Henle 环和远端小管的肾类器官。由于体外研究证明了 ESC 的分化潜能,因此也有体内实验研究将人 ESC 经过 2 D 培养形成 NPCs,皮下移植到免疫缺陷鼠中,形成的结构基本上包含了肾单位各组分,包括毛细血管网、足细胞、基底膜和系膜细胞等,并且形成的肾小球也具有滤过功能。相比于体外 2 D 和 3D 培养,体内的环境可以更好的促进 NPCs 形成较为成熟和完整的肾单位结构[35]。但是要产生完全成熟的肾还需要更多的研究。最近一项新的研究将 ESC 培养产生未完全成熟的肾类器官,该研究描述了肾类器官每个发育阶段的基因转录表达变化,概括了肾发育的过程,并表明基因调控对肾发育至关重要,对未来研究肾发育和体外产生成熟的肾提供了重要的参考策略[36]。

除了以上将 ESC 通过分化培养为具有肾单位结构的肾类器官的研究,也有研究将载有 ESC 的细胞明胶(gelatin microcryogels,GMs)植入 5/6 肾切除 CKD 的大鼠肾中,发现可以减缓大鼠 CKD 的进展,其中血浆尿素氮水平、肾小管损伤和肾小球硬化指数都有不同程度的改善[37]。此外,Tan 等[38]将小鼠来源的 ESC 分化为输尿管芽(ureteric bud,UB)祖细胞,然后与后肾间充质(metanephric mesenchyme,

MM)细胞培养产生肾类器官,并将该肾类器官用于药物和化学物质的毒性检测。

虽然 ESC 为 CKD 以及其它多种疾病的治疗带来了希望,但是 ESC 需要从胚胎中分离,从而限制了其获取来源;另外移植的 ESC 也会形成畸胎瘤和产生机体免疫排斥的问题,因此限制了其临床应用[39]。

综上所述,这些实验研究说明 ESC 能够被诱导分化为肾谱系细胞,通过培养可产生肾类器官,并用于移植和肾药物毒性检测等。这为 ESC 治疗 CKD 提供了坚实的数据和理论基础。

1.3　iPSC 治疗 CKD 的潜力

日本科学家用 4 种因子 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 成功的诱导出 iPSC。该 iPSC 能够表现出 ESC 的形态和生长特性,并且能够产生三胚层各种组织,因此与 ESC 一样具有多系分化能力[40]。

目前已经有一些方案将 iPSC 分化为肾谱系细胞,进行肾发育和肾重建的研究[41]。Takasato 等[42]用 CHIR9902 和 FGF9 两种因子诱导出 UB 和 MM,经过 3 D 培养形成了具有肾皮质、肾髓质、肾小球、肾近端小管、远端小管和集合管等结构,表明 iPSC 可形成较成熟的肾成分。Morizane 等[43]用更加有效、特异和简化的诱导方案体外将 iPSC 诱导成为 NPCs,通过培养也产生了包含近端小管、远端小管和 Henle 环等多节段类似于体内的肾单位结构。Tsujimoto 等[44]用人类 iPSC(hiPSC)来源的 NPCs 与 UB 体外培养产生了肾类器官,形成的肾小球、肾小管和集合管能够自组织相互连接。移植到免疫缺陷小鼠肾包膜下产生的血管化网络可与宿主肾相互连接。此外,也有研究用 hiPSC 建立肾类器官疾病模型,如先天性肾病综合征(congenital nephrotic syndrome)和常染色体隐性遗传性多囊肾(ARPKD)等。这些模型可用于肾疾病药物的开发及治疗效果的评估检测[41,45]。

目前大多数研究是将 iPSC 诱导成 NPCs 进而形成肾类器官,从而修复和重建肾。而将 iPSC 细胞直接用于治疗 CKD 的动物模型研究报道较少。研究发现促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)对治疗 CKD 引起的肾贫血具有一定的疗效[46]。Hitomi 等[46]将肝来源的 hiPSC 细胞诱导为能够产生 EPO 的细胞(hiPSC-EPO),该类细胞在体内和体外都具有产生 EPO 的能力,并且能够改善小鼠的肾贫血。因此,hiPSC-EPO 可以作为治疗肾贫血一个方法策略。也有研究表明直接移植 hiPSC 能够保护 CKD 大鼠肾、减轻肾间质纤维化、肾小管萎缩和肾小球硬化等,从而抑制 CKD 进展[47]。另外 iPSC 来源的 MSC(iPSC-MSC)也可以保护 CKD 大鼠肾功能,经过 iPSC-MSC 治疗的大鼠尿肌酐水平和尿蛋白都有所降低,残余肾部分和肾小管损伤也得到了保护和改善[48]。

综上,用 iPSC 进行肾再生是一个很好的策略方法。这些再生的肾类器官可用于移植、构建疾病模型进行药物开发检测等方面。但是当前存在的不足之处是体外形成肾类器官在大小、组分和功能等方面都不够成熟,而且体内不能有效的连接到血管,从而无法发挥与宿主肾相同的作用。因此我们仍然需要探索有效的肾重建方案来解决当前的问题,如种间囊胚互补、将细胞种植到肾支架上和 3D 生物打印技术等。这些方案也可能为重建结构功能成熟的肾提供了技术路线[49]。

2　总结和展望

CKD 严重危害人类的生命健康,成为全球卫生健康和经济邻域一个巨大的负担,目前还没有有效的治疗手段来应对 CKD。近年来研究发现细胞疗法在治疗 CKD 方面有一个很好的应用前景。本文总结了 MSC、ESC 和 iPSC 3 种 SCs 治疗 CKD 的应用潜力。MSC 主要是通过旁分泌各种细胞因子和 EV 促进肾修复、肾功能改善、抑制肾纤维化和钙化等,但因 MSC 易受到体内环境影响而降低了其治疗效果。ESC 和 iPSC 更多用于体外和体内形成肾类器官修复损伤肾,研究肾发育机制,建立疾病模型用于开发和评估治疗药物等。3 种 SCs 优缺点及应用潜力详见表 1。虽然现在大多数研究还不能够产生完全和体内大小、功能相同的肾用于移植,但是这些方法策略为以后的研究打下了坚实的基础。因此,随着未来对干细胞治疗研究的更加深入,干细胞技术有很大希望能够治疗 CKD 以及其它肾相关类型的疾病。

表 1 三种 SCs 优缺点的比较

Table 1 Comparison of the advantages and disadvantages of three kinds of stem cells

细胞类型 Cell type	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	应用潜力 Application potential	参考文献 References
间充质干细胞 Mesenchymal stem cell (MSC)	来源方便、易于分离培养;免疫原性低;促细胞增殖、修复损伤组织、抗氧化压力、抗纤维化、抗炎、抗凋亡和调节免疫反应等。Convenient source, easy to separate and cultivate. Low immunogenicity. Promoting cell proliferation, repairing damaged tissues, anti-oxidative stress, anti-fibrosis, anti-inflammation, anti-apoptosis, regulating immune response, etc.	难以有效定位到特定组织器官部位且容易受到环境影响从而限制了其治疗效果。It is difficult to effectively locate specific tissues and organs, and it is easily affected by the environment, which limits its therapeutic effect.	细胞治疗;保护肾,促进器官组织修复和再生。Cell therapy: protect kidney, promote the repair and regeneration of organs and tissues.	[7,11-17,22]
胚胎干细胞 Embryonic stem cell (ESC)	具有全能性, 无限增殖能力,保持高度未分化状态和稳定的二倍体核型。Totipotent, infinite proliferation capacity, maintain a highly undifferentiated state and a stable diploid karyotype.	来源受限、是否规范化研究、伦理问题;易形成畸胎瘤;移植免疫排斥。Restricted sources, whether to standardize research, ethical issues. Form teratomas. Transplantation immune rejection.	形成肾谱系的细胞和肾类器官,用于移植。Form the cells and kidney organoids of the kidney lineage, which is used for transplantation.	[32-35,38-39]
诱导多潜能干细胞 Induced pluripotent stem cell (iPSC)	自我增殖与分化能力与 ESC 特性相近;能够无限增殖、来源广泛、避免了胚胎分离等伦理问题。Ability of self-proliferation and differentiation is similar to the characteristics of ESC. It can proliferate indefinitely, have a wide range of sources, and avoid ethical issues such as embryo separation.	重编程 iPSC 效率不高;致瘤性。Reprogramming iPSC is not efficient. There is a risk of tumor formation.	形成肾类器官,用于移植;构建肾疾病模型,用于肾药物开发和评估。Formation of kidney organoids for the study of kidney transplantation. Construction of kidney disease models for the development and evaluation of kidney drugs.	[40-45]

参考文献:

[1] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, et al. Chronic kidney disease [J]. The Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252.

[2] 卓琳, 蔡卿卿, 刘丁阳, 等. 慢性肾脏病的患病率及危险因素荟萃分析 [J]. 中国老年医杂志, 2015, 38(9): 2125-2138.

[3] Glassock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(2): 104-114.

[4] Drawz P, Rahman M. Chronic kidney disease [J]. Ann Intern Med, 2015, 162(11): ITC1-ITC16.

[5] Yuan BZ, Wang J. The regulatory sciences for stem cell-based medicinal products [J]. Front Med, 2014, 8(2): 190-200.

[6] Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function [J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1):125.

[7] 高舒平, 曲春辉, 周瑞, 等. 干细胞与转化医学研究进展浅析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(4): 439-442.

[8] Liu D, Cheng F, Pan S, et al. Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 249.

[9] Jin HJ, Bae YK, Kim M, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(9): 17986-18001.

[10] Peired AJ, Sisti A, Romagnani P. Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease: a review of clinical evidence [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 4798639.

[11] Kim HK, Lee SG, Lee SW, et al. A Subset of paracrine factors as efficient biomarkers for predicting vascular regenerative efficacy of mesenchymal stromal/stem cells [J]. Stem Cells, 2019, 37(1): 77-88.

[12] Zhang L, Li K, Yan X, et al. MicroRNA-498 inhibition enhances the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into podocyte-like cells [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(24): 2841-2852.

[13] Machiguchi T, Nakamura T. Nephron generation in kidney cortices through injection of pretreated mesenchymal stem cell-differentiated tubular epithelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(1): 141-147.

[14] Villanueva S, Ewertz E, Carrión F, et al. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model [J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(11): 489-499.

[15] Villanueva S, Carreno JE, Salazar L, et al. Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue reduce functional and tissue damage in a rat model of chronic renal failure [J]. Clin Sci (Lond), 2013, 125(4): 199-210.

[16] Oka M, Sekiya S, Sakiyama R, et al. Hepatocyte growth factor-secreting mesothelial cell sheets suppress progressive fibrosis in a rat model of CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(2): 261-276.

[17] Imafuku A, Oka M, Miyabe Y, et al. Rat mesenchymal stromal cell sheets suppress renal fibrosis via microvascular protection [J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(12): 1330-1341.

[18] Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy [J]. Front Physiol, 2012, 3: 359.

[19] Nassar W, El-ansary M, Sabry D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases [J]. Biomater Res, 2016, 21: 3.

[20] Guo Y, Bao S, Guo W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate high phosphorus-induced vascular smooth muscle cells calcification by modifying microRNA profiles [J]. Funct Integr Genomics, 2019, 19(4): 633-643.

[21] Wang Y, Guo YF, Fu GP, et al. Protective effect of miRNA-containing extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells of old rats on renal function in chronic kidney disease [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 274.

[22] Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention *in vivo* [J]. Stem Cells, 2015, 33(6): 1818-1828.

[23] Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, et al. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion [J]. Cell Transplant, 2013, 22(3): 423-436.

[24] Zhao L, Hu C, Zhang P, et al. Melatonin preconditioning is an effective strategy for mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 25-33.

[25] Saberi K, Pasbakhsh P, Omidi A, et al. Melatonin preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes their engraftment and improves renal regeneration in a rat model of chronic kidney disease [J]. J Mol Histol, 2019, 50(2): 129-140.

[26] Yoon YM, Lee JH, Song KH, et al. Melatonin-stimulated exosomes enhance the regenerative potential of chronic kidney disease-derived mesenchymal stem/stromal cells via cellular prion proteins [J]. J Pineal Res, 2020, 68(3): e12632.

[27] Young RA. Control of the embryonic stem cell state [J]. Cell, 2011, 144(6): 940-954.

[28] Becherucci F, Mazzinghi B, Allinovi M, et al. Regenerating the kidney using human pluripotent stem cells and renal progenitors [J]. Expert Opin Biol Ther, 2018, 18(7): 795-806.

[29] Narayanan K, Schumacher KM, Tasnim F, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells [J]. Kidney Int, 2013, 83(4): 593-603.

[30] Morizane R, Monkawa T, Fujii S, et al. Kidney specific protein-positive cells derived from embryonic stem cells reproduce tubular structures *in vitro* and differentiate into renal tubular cells [J]. PLoS One, 2014, 8(6): e64843.

[31] Yamaguchi S, Morizane R, Homma K, et al. Generation of kidney tubular organoids from human pluripotent stem cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 38353.

[32] Takasato M, Er PX, Becroft M, et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(1): 118-126.

[33] Lam AQ, Freedman BS, Morizane R, et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(6): 1211-1225.

[34] Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury [J]. Nat Biotechnol, 2015, 33(11): 1193-1200.

[35] Bantounas I, Ranjzad P, Tengku F, et al. Generation of functioning nephrons by implanting human pluripotent stem cell-derived kidney progenitors [J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 766-779.

[36] Chow T, Wong FTM, Monetti C, et al. Recapitulating kidney development *in vitro* by priming and differentiating mouse embryonic stem cells in monolayers [J]. NPJ Regen Med, 2020, 5: 7.

[37] Geng XD, Zheng W, Wu CM, et al. Embryonic stem cells? loaded gelatin microcryogels slow progression of chronic kidney diseases [J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129(4): 392-398.

[38] Tan Z, Rak-raszewska A, Skovorodkin I, et al. Mouse embryonic stem cell-derived ureteric bud progenitors induce nephrogenesis [J]. Cells, 2020, 9(2): 329.

[39] Hentze H, Graichen R, Colman A. Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts [J]. Trends Biotechnol, 2007, 25(1): 24-32.

[40] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.

[41] Osafune K. iPSC technology-based regenerative medicine for kidney diseases [J]. Clin Exp Nephrol, 2021, 25(6): 574-584.

[42] Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis [J]. Nature, 2015, 526(7574): 564-568.

[43] Morizane R, Bonventre JV. Generation of nephron progenitor cells and kidney organoids from human pluripotent stem cells [J]. Nat Protoc, 2017, 12(1): 195-207.

[44] Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, et al. A modular

differentiation system maps multiple human kidney lineages from pluripotent stem cells [J]. Cell Rep, 2020, 12(1): 195-207.
[45] Orbes TA, Howden SE, Lawlor K, et al. Patient-iPSC-derived kidney organoids show functional validation of a ciliopathic renal phenotype and reveal underlying pathogenetic mechanisms [J]. Am J Hum Genet, 2018, 102(5): 816-831.
[46] Hitomi H, Kasahara T, Katagriri N, et al. Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin producing cells ameliorate renal amemia in mice [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(409): 2300.
[47] Rota C, Morigi M, Cerullo D, et al. Therapeutic potential of stromal cells of non-renal or renal origin in experimental chronic kidney disease [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 220.
[48] Sheu JJ, Sung PH, Wallace CG, et al. Intravenous administration of iPS-MSC (SPIONs) mobilized into CKD parenchyma and effectively preserved residual renal function in CKD rat [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(6): 3593-3610.
[49] Osafune K. Regenerative treatments for kidney diseases: the closest and fastest strategies to solving related medical and economic problems [J]. Artif Organs, 2021, 45(5): 447-453.

〔收稿日期〕2021-07-21

(上接第 137 页)

[39] 李建生, 李素云, 余学庆. 慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011 版) [J]. 中医杂志, 2012, 53(1): 80-84.
[40] 李建生. 正虚积损为慢性阻塞性肺疾病的主要病机 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 710-713.
[41] Li SY, Li JS, Wang MH, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a fourcenter, open-label, randomized, controlled study [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12: 197.
[42] 李素云, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法治疗慢性阻塞性肺疾病大鼠疗效及远后效应 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(12): 3116-3121.
[43] Dong Y, Li Y, Sun Y, et al. Bufei Jianpi granules improve skeletal muscle and mitochondrial dysfunction in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 51.
[44] Mao J, Li Y, Li S, et al. Bufei Jianpi granules reduce quadriceps muscular cell apoptosis by improving mitochondrial function in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1216305.
[45] 李素云, 李亚, 李建生, 等. 补肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠膈神经放电和膈肌功能的影响 [J].中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 812-816.
[46] 琚星萌, 宋雅芳, 雷孝文, 等. 四君子汤对脾虚大鼠骨骼肌 SDH 活性及 PGC-1α 基因和蛋白表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4): 802-804.
[47] 琚星萌. 基于 SDH 和 PGC-1α 探讨健脾益气法对脾虚证线粒体能量代谢的调控机制 [D]. 广州:广州中医药大学, 2015.
[48] 李中华, 梁炳生. 川芎嗪对大鼠失神经骨骼肌细胞凋亡及 bcl-2、bax 表达的影响 [J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(8): 18-20.
[49] Zhang M, Tang J, Li Y, et al. Curcumin attenuates skeletal muscle mitochondrial impairment in COPD rats: PGC-1α/SIRT3 pathway involved [J]. Chem Biol Interact, 2017, 277: 168-175.

〔收稿日期〕2021-01-14