

史添立, 罗贞, 焦石. YAP 在特发性膜性肾病中的表达及其对 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 1-8.

Shi TL, Luo Z, Jiao S. Expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy and its role in C5b-9-induced podocyte injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.001

# YAP 在特发性膜性肾病中的表达及其对 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用

史添立<sup>1</sup>, 罗贞<sup>1\*</sup>, 焦石<sup>2</sup>

(1.海口市人民医院肾内科,海口 570208; 2.中山市博爱医院肾病风湿科,广东 中山 510603)

**【摘要】** 目的 在特发性膜性肾病(IMN)中探究转录共激活因子 Yes 相关蛋白(YAP)的表达及其在膜攻击复合物 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用。方法 免疫组织化学染色检测 YAP 蛋白在 IMN 患者肾组织及正常对照肾组织中的表达;选用亚溶解剂量的膜攻击复合物 C5b-9(以下简称 C5b-9)在体外建立人足细胞系 MPC5 的损伤模型,Western blot 检测随 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中 YAP 蛋白的表达变化;使用 siRNA 瞬时转染技术,靶向沉默足细胞中 YAP 基因表达,qRT-PCR 及 Western blot 检测转染效率;按足细胞处理的不同将其分为 4 组,正常培养的 Control 组,经 C5b-9 处理的 C5b-9 组,C5b-9 处理转染 si-NC 或 si-YAP 的 C5b-9+si-NC 组与 C5b-9+si-YAP 组;应用 CCK-8 实验检测上述各组细胞的增殖活力,Annexin V-FITC 双染色联合流式细胞数检测各组细胞的凋亡发生率,DCFH-DA 法检测细胞中活性氧(ROS)含量,Western blot 检测各组细胞中足细胞标志性蛋白 Nephrin、WT1 与紧密连接蛋白 ZO-1、表型转换蛋白 Snail 及纤连蛋白 Fibronectin 的蛋白表达水平。结果 与正常对照肾组织相比,YAP 在 IMN 中的表达显著增加( $P<0.05$ );随 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中 YAP 蛋白的表达水平逐渐升高;转染 si-YAP 后,足细胞中 YAP mRNA 及蛋白水平均显著降低( $P<0.05$ );与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞的增殖活力均显著降低( $P<0.05$ ),而凋亡率及 ROS 含量均显著增加( $P<0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞增殖活力显著增加( $P<0.05$ ),凋亡率及 ROS 含量显著减少( $P<0.05$ );Western blot 检测各组细胞中相关蛋白的表达结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达均显著降低( $P<0.05$ ),Snail 与 Fibronectin 蛋白表达均显著增加( $P<0.05$ );而与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著增加( $P<0.05$ ),而 Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著减少( $P<0.05$ )。结论 本研究结果表明 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球中的表达显著增加,而沉默足细胞中 YAP 基因表达能够明显改善 C5b-9 诱导的细胞功能损伤,并抑制其凋亡的发生。

**【关键词】** 特发性膜性肾病;转录共激活因子 Yes 相关蛋白;膜攻击复合物 C5b-9;足细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0001-08

## Expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy and its role in C5b-9-induced podocyte injury

SHI Tianli<sup>1</sup>, LUO Zhen<sup>1\*</sup>, JIAO Shi<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China.

2. Department of Nephrology and Rheumatology, Bo'ai Hospital, Zhongshan 510603)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81473618);海南省卫生计生行业科研项目(19A200057)。

**【作者简介】** 史添立(1978—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肾内科疾病的诊治及相关研究。E-mail:historical990@163.com

**【通信作者】** 罗贞(1982—),女,研究方向:肾内科疾病的诊治及相关研究。E-mail:8363568@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods** Expression of YAP protein in IMN patients and normal renal tissues was detected by immunohistochemistry. An injury model of the human podocyte line MPC5 was established *in vitro* with C5b-9. Expression of YAP protein in podocytes was detected by Western blot. siRNA transient transfection was used to silence YAP gene expression in podocytes. The transfection efficiency was assessed by qRT-PCR and Western blot. Podocytes were divided into four groups: control, C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups. A CCK-8 assay was used to assess the proliferation activity, annexin V-FITC double staining combined with flow cytometry was used to assess apoptosis, DCFH-DA staining was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS). Western blot was used to measure the apoptosis rate. The expression of podocyte marker protein nephrin, WT1, tight junction protein ZO-1, phenotype transition protein snail and fibronectin was detected by Western blot. **Results** Compared with normal renal tissue, the expression of YAP in IMN was increased significantly ( $P < 0.05$ ). With prolongation of the C5b-9 stimulation time, the expression level of YAP protein was increased in podocytes ( $P < 0.05$ ). After si-YAP transfection, the mRNA and protein levels of YAP in podocytes were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, cell proliferation in C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups was decreased significantly, while the apoptosis rate and ROS content were increased significantly ( $P < 0.05$ ). However, compared with C5b-9 and C5b-9+si-NC groups, cell proliferation in the C5b-9+si-YAP group was increased significantly and the ROS content in cells was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Expression of nephrin, WT1 and ZO-1 in C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). Compared with C5b-9 and C5b-9+si-NC groups, the protein expression of nephrin, WT1 and ZO-1 in the C5b-9+si-YAP group was increased significantly, while the protein expression of Snail and fibronectin was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** This study showed that YAP protein expression in glomeruli of IMN patients is significantly increased and silencing YAP gene expression in podocytes significantly improves C5b-9-damaged induced functions and inhibits apoptosis

**【Keywords】** idiopathic membranous nephropathy; YAP; C5b-9; podocytes

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是导致原发性肾病综合征的重要病因,严重威胁患者的生命健康<sup>[1]</sup>。其中约 25%~30%的 MN 患者与潜在的疾病相关,如系统性红斑狼疮、恶性肿瘤及各种病毒或细菌引起的感染性疾病等,而当继发性原因不明显时则归为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN),后者约占 70%<sup>[2-3]</sup>。尽管近年来针对 IMN 的特异性分子标记物的研究取得了一定的进展,但其具体病因及发病机制仍未阐明,极大影响了 IMN 的治疗及预后。

既往研究证实 IMN 是一种原位免疫复合物或循环免疫复合物沉积于肾小球上皮细胞下,并引起补体的异常激活,形成补体膜攻击复合物 C5b-9,进而损伤足细胞的正常结构及功能的相关疾病<sup>[4-5]</sup>。其中亚溶解剂量的 C5b-9 介导的足细胞损伤在 IMN 中得到广泛认可,该假说认为亚溶解剂量的 C5b-9 对足细胞所产生的损伤并非完全溶解效应,但能够激活足细胞中多种信号通路,进而产生大量炎症因子、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及蛋白质,导致细胞发生间质细胞转变(即表型转化),细胞骨架紊乱乃至凋亡等,最终损伤肾小球的滤过屏障,产生大量蛋白尿等肾损伤现象<sup>[6]</sup>。转录共激活

因子 Yes 相关蛋白(yes-associated protein, YAP)是经典的 Hippo 信号通路的重要效应因子之一,其在调控细胞增殖、生长、分化和死亡等多个环节均具有重要地位<sup>[7-8]</sup>。近年来,随着对 YAP/Hippo 通路在肾发育过程中作用的认识,人们发现 YAP 信号的异常表达也参与调控了多种肾疾病的发生进展<sup>[8]</sup>。然而在 IMN 中, YAP 在肾组织中的表达及相关作用尚鲜有报道。本研究欲通过探究 YAP 的 IMN 患者中的表达,并建立 C5b-9 损伤肾小球足细胞的体外模型,进而阐明其相关作用,以期进一步揭示 IMN 的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

人肾小球足细胞 MPC5 细胞系购自中国科学院上海细胞库。

#### 1.1.2 临床标本来源

选取 2018 年 2 月至 2020 年 2 月于海口市人民医院肾内科确诊的 IMN 患者 121 例(IMN 组),所有患者肾活检均证实为 IMN,其中男性 62 例,女性 59 例,平均年龄(47.1±3.9)岁。另取年龄、性别相匹

配的同时期于我院泌尿科行肾肿瘤切除术的癌旁正常对照肾组织 91 例 (Normal 组)。纳入标准: (1) 所有受试者年龄  $\geq 18$  岁; (2) IMN 符合 Ehrenreich-Churg 诊断标准<sup>[9]</sup>, 且排除经临床资料核查及实验室检查发现的继发性 IMN 患者; (3) 受试者入院前 3 个月未使用任何免疫抑制剂、细胞毒性药物或糖皮质激素等; (4) 临床资料完整, 且患者或家属签署知情同意书。本研究符合伦理学相关要求, 且经海口市人民医院伦理委员会批准 (2018AKB206-01)。

## 1.2 主要试剂与仪器

DMEM/HG 培养基, 0.25% 胰酶 (美国 Hyclone 公司, 批号: AD13203319、AD15802247); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 11416-791); TRIzol、反转录试剂盒、转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司, 批号: 4339218、426019、711035); SYBR Premix Ex Taq (日本 TaKaRa 公司, 批号: T108241R73661); CCK-8 试剂盒, Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂 (江苏碧云天生物科技公司, 批号: C191029、C200914、C190518、ST170514、ST190211); DCFH-DA 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 批号: EZ1911D0032); 沉默 YAP 的 siRNA (si-YAP) 及阴性对照序列 si-NC (广州锐博生物技术有限公司, 批号: 201029BZ); 补体来自 8 名健康体检者新鲜血清 (normal human serum, NHS); 人补体 C5b-6 复合物 (美国 Merck 公司, 批号: M1129); 大鼠抗 YAP、p-YAP、 $\beta$ -actin 抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 批号: 191128、200711、20120706); 大鼠抗 Nephlin、WT1、ZO-1 (美国 Cayman 公司, 批号: C1908A04、C2004A16、C1811A26); 兔抗 Snail、Fibronectin (美国 Abcam 公司, 批号: ab924417、ab101732); 兔抗大鼠或山羊抗兔二抗 (上海爱必信生物技术有限公司, 批号: A190211、A191122); qRT-PCR 引物由上海生工合成。凝胶成像系统, 凝胶电泳仪, PCR 及 qRT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: 005、X10-7、T10-9、IQ5); 流式细胞仪 FACS-Calibur (美国 BD 公司, 型号: FACSC- II); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: 荧光 CKX-19)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC)

将固定于 4% 甲醛溶液的肾组织样本进行常规石蜡包埋, 切片机进行连续切片后, 二甲苯脱蜡, 梯

度乙醇脱水, 3% 的过氧化氢消除内源性过氧化物酶, 高压柠檬酸钠进行抗原恢复, 5% 的牛血清白蛋白封闭抗体后, 加入稀释后的 YAP 抗体 (1: 800), 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 (1: 1000) 室温孵育 1 h, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片后, 显微镜下观察拍照。

### 1.3.2 细胞的培养, 转染和分组处理

MPC5 在含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 DMEM/HG 培养基中, 并置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。取处于对数生长期的足细胞, 0.25% 的胰酶常规消化后, 按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板中, 当细胞生长融合至 70% 时, 参考 Lipofectamin 2000 转染试剂说明书方法将 Opti-MEN 稀释后的转染试剂及 si-YAP 或 si-NC 按 1: 1 比例加入足细胞中进行转染, 6 h 后更换为新鲜培养, 继续培养 48 h 后应用 qRT-PCR 及 Western blot 实验检测转染效率。参考文献<sup>[10]</sup>方法, 使用亚溶解剂量的 C5b-9 与 NHS 进行处理 MPC5 细胞, 并将细胞分为 4 组, 正常培养的 MPC5 细胞 (control 组), 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 MPC5 细胞 (C5b-9 组) 和 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 si-NC 细胞 (C5b-9+si-NC 组) 和 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 si-YAP 细胞 (C5b-9+si-YAP 组)。各组细胞均置于上述条件的培养箱中培养 48 h 后进行后续相关实验。

### 1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

取各组待测足细胞, TRIzol 法提取细胞中总 RNA, 应用反转录试剂盒反转录为 cDNA。参考 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书确定 qRT-PCR 反应体系及条件, qRT-PCR 的引物序列为: YAP-F: 5'-CAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGG-3', YAP-R: 5'-GTAGTCGGATCCTAACCACGTGAGAAAG-3';  $\beta$ -actin-F: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3',  $\beta$ -actin-R: 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'。以  $\beta$ -actin 作为内参, 按照 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算待测细胞中目的基因的表达。

### 1.3.4 CCK-8 检测足细胞增殖活力

取对数生长期各组细胞, 按  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中, 于培养箱中培养 0、12、24、48 h 后加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 继续孵育 1 h 后, 在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔光密度值。每组每个时间点设置 3 个复孔。统计软件计算并分析各组细胞的增殖活力。

### 1.3.5 Annexin V-FITC 双染法联合流式细胞术检测足细胞凋亡

取培养 48 h 后上述各组细胞, 常规消化细胞

后,2000 r/min 离心细胞 5 min 后,取细胞沉淀加入 195  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 结合液进行重悬细胞,随后再依次加入 5  $\mu$ L 与 10  $\mu$ L 的 V-FITC 与 PI 染液,充分混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,过滤细胞团块后,上机进行分析。

### 1.3.6 细胞内活性氧(ROS)检测

取对数生长期各组细胞,按  $5 \times 10^4$  个/孔接种至 6 孔板中,待细胞生长融合至 80% 时,弃去原培养液,每孔加入 1 mL 终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 DCFH-DA,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后,PBS 洗涤细胞后,收集细胞,应用流式细胞仪进行检测。实验单独重复 3 次。

### 1.3.7 Western blot 实验

取各组待测细胞,将 RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂按 100 : 1 的比例进行混合后,提取细胞中总蛋白,4 $^{\circ}$ C 下 24000 r/min 离心 15 min,收集上清液,BCA 法进行蛋白定量,加入蛋白上样缓冲液后将蛋白样品经沸水中加热变性 5 min。10% SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉室温下进行抗体封闭 2 h 后,加入 YAP(1 : 500)、Nephrin(1 : 1000)、WT1(1 : 1000)、ZO-1(1 : 1000)和 Snail(1 : 800)、Fibronectin(1 : 800)及  $\beta$ -actin(1 : 2000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,随后加入相应二抗(1 : 10000),TBST 溶液洗膜后,加入 ECL 发光液于 Bio-Rad 图像分析仪进行蛋白条带灰度扫描,以  $\beta$ -actin 为内参,分析目的蛋白表达水平。实验单独重复 3 次。

### 1.4 统计学方法

GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,数据结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间样本使用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 Turkey 检验。以  $P < 0.05$

表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 YAP 在 IMN 肾组织中的表达

IHC 染色结果显示,Normal 组肾小球中有少量 YAP 蛋白表达,且主要表达于细胞胞质中,而在 IMN 患者中,YAP 蛋白在肾小球中表达明显增加( $P < 0.05$ ),且多数表达于细胞核中(图 1)。

### 2.2 C5b-9 激活足细胞中 YAP 信号表达

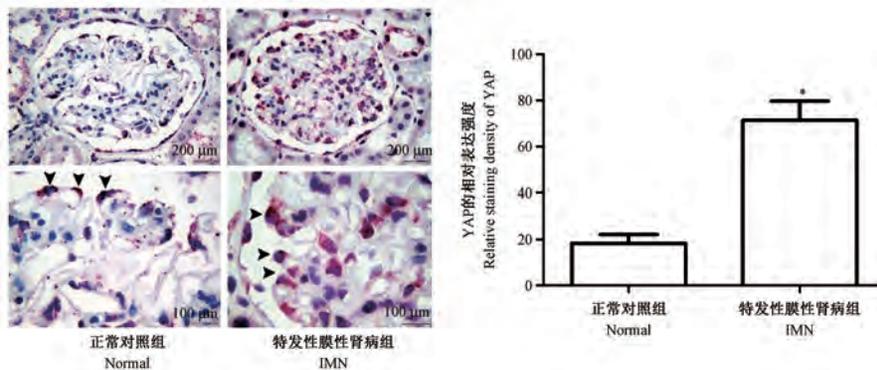
Western blot 实验结果显示,随 C5b-9 刺激时间的延长,p-YAP 蛋白表达无明显变化,而非磷酸化 YAP 蛋白表达逐渐增加,且以 24 h 增加趋势最为明显,故足细胞中 p-YAP/YAP 比值随 C5b-9 刺激时间而不断降低( $P < 0.05$ )。而在细胞中 p-YAP 蛋白不能进入细胞核以激活下游靶基因的转录,但 YAP 蛋白则能够完成上述作用,提示 C5b-9 能够激活 YAP 信号表达(图 2)。

### 2.3 转染 si-YAP 后足细胞中 YAP mRNA 及蛋白的表达水平

qRT-PCR 及 Western blot 实验结果显示,转染沉默 YAP 表达的 si-YAP 后足细胞中 YAP mRNA 及蛋白的表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ),而转染 si-NC 后足细胞无明显变化( $P > 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后的足细胞活性的影响

CCK-8 检测结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞活力均显著降低( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞活力显著增加( $P < 0.05$ ),前两组无明显差异( $P > 0.05$ ,图 4)。

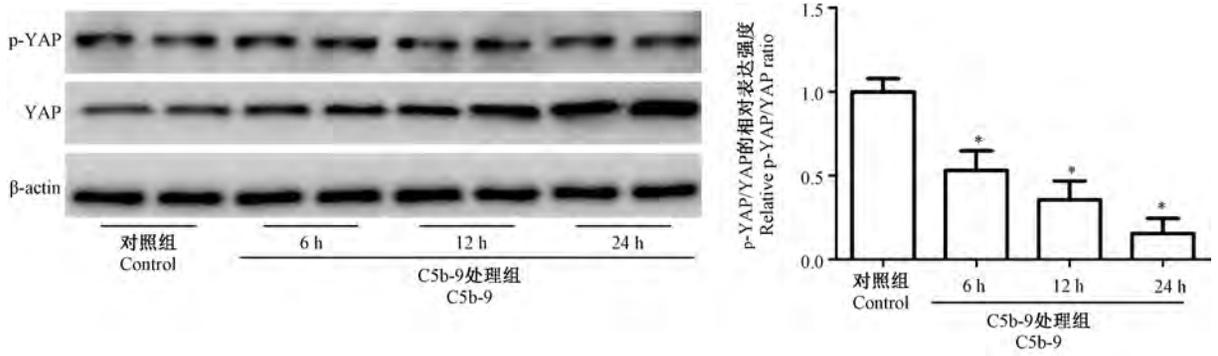


注:与 Normal 组相比,\* $P < 0.05$ 。

图 1 YAP 在 IMN 肾组织中的表达显著增加

Note. Compared with Normal group, \* $P < 0.05$ .

Figure 1 Expression of YAP significantly increased in IMN renal tissue

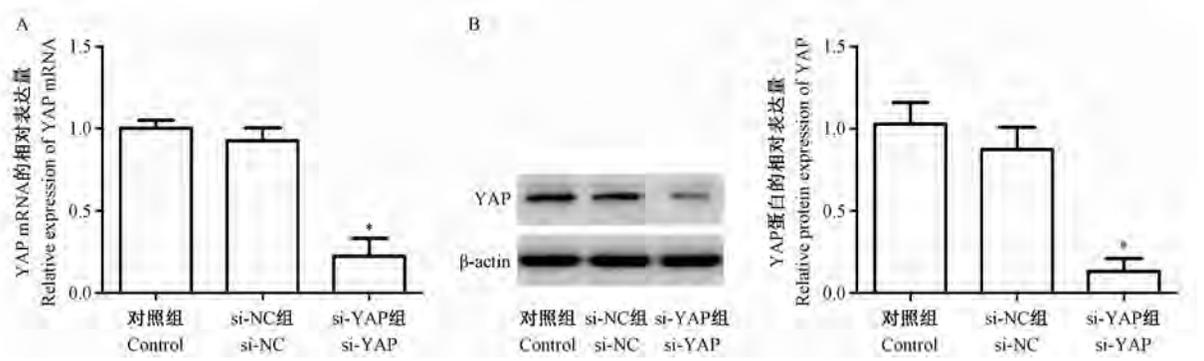


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 2 C5b-9 激活足细胞中 YAP 信号表达

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 2 YAP signal expression in podocytes activated by C5b-9

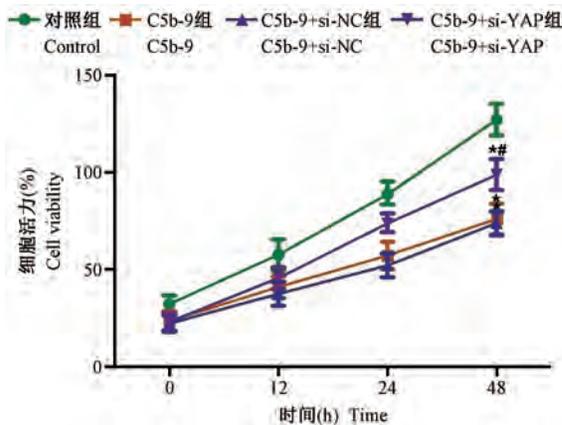


注:A:qRT-PCR 检测足细胞中 YAP mRNA 表达;B:Western blot 检测足细胞中 YAP 蛋白表达。与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 3 转染 si-YAP 后显著抑制足细胞中 YAP mRNA 及蛋白表达

Note. A, Expression of YAP mRNA in podocytes was detected by qRT-PCR. B, Expression of YAP protein in podocytes was detected by Western blot. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 Expression of YAP mRNA and protein in podocytes was significantly inhibited after transfection of si-YAP



注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后的足细胞活性的影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 4 Effect of YAP gene silencing on podocyte activity after C5b-9 stimulation

## 2.5 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞凋亡影响

Annexin V-FITC 结合流式细胞术检测各组足细胞凋亡结果表明,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞凋亡比例均显著增加( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞凋亡比例显著减少( $P < 0.05$ ),前两组无明显差异( $P > 0.05$ ,图 5)。

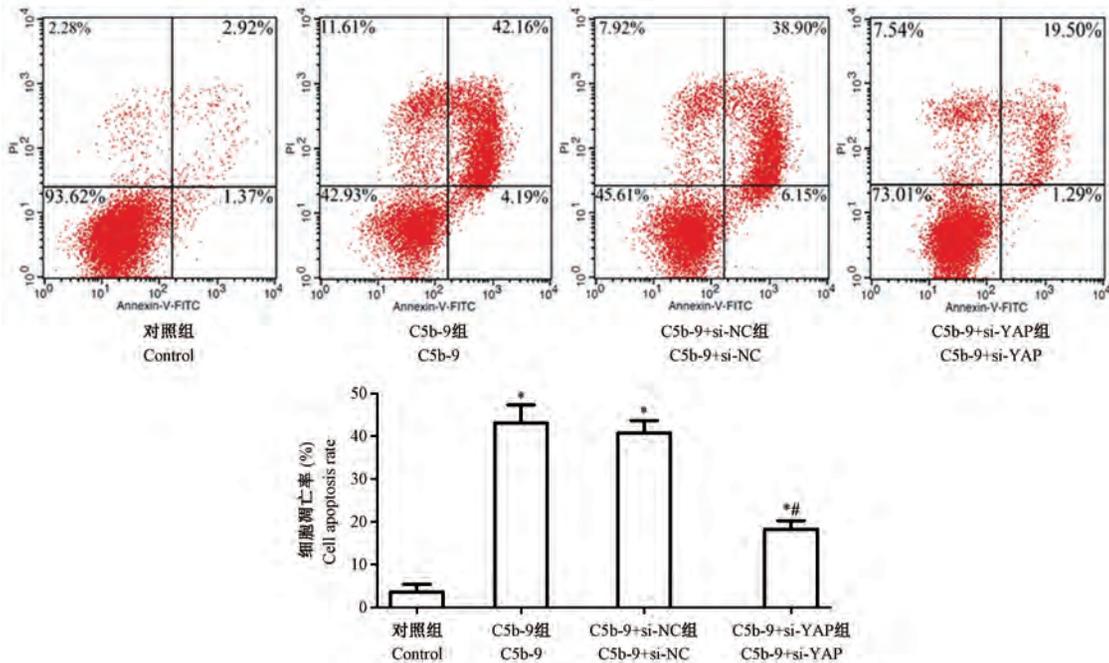
## 2.6 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中 ROS 产生的影响

流式细胞仪检测各组足细胞中 ROS 表达的结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞中 ROS 含量显著增加( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 ROS 显著减少( $P < 0.05$ ),前两组无显著差异( $P > 0.05$ ,图 6)。

## 2.7 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞标志性蛋白、紧密连接蛋白和表型转换蛋白表达的影响

Western blot 检测各组细胞中足细胞标志性蛋白 Nephrin、WT1 及紧密连接蛋白 ZO-1 和表型转换蛋白 Snail、纤连蛋白 Fibronectin 的表达结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-

9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.05$ , 图 7)。

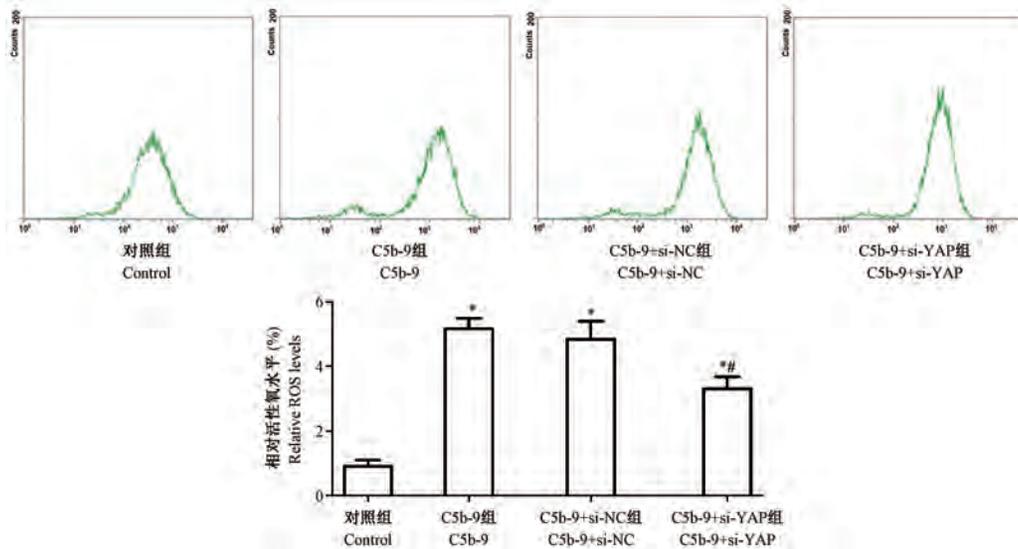


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞凋亡影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 5 Effect of YAP gene silencing on podocytes apoptosis after C5b-9 stimulation

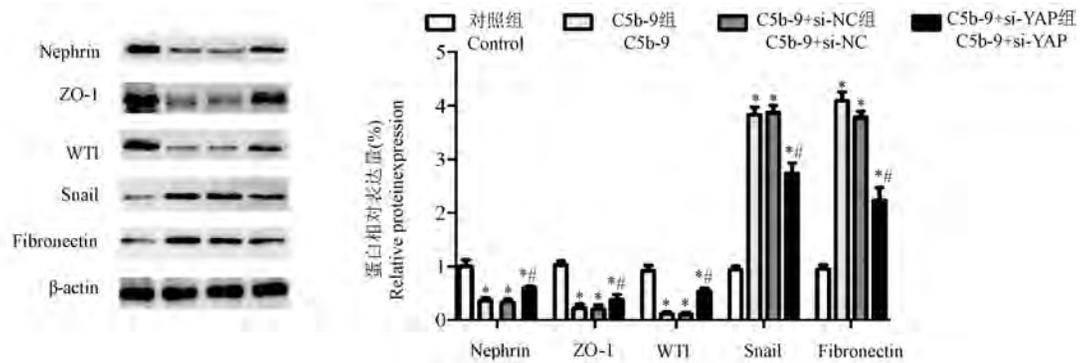


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中 ROS 产生的影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 6 Effect of YAP gene silencing on ROS production in podocytes stimulated by C5b-9



注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中足细胞标志性蛋白 Nephrin、WT1 及紧密连接蛋白 ZO-1 和表型转换蛋白 Snail 及纤连蛋白 Fibronectin 表达的影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 7 Effects of YAP gene silencing on the expression of podocellular marker proteins Nephrin, WT1, tight binding protein ZO-1, phenotypic transition protein Snail and Fibronectin in podocellular cells stimulated by C5b-9

### 3 讨论

足细胞是位于肾组织毛细血管球外侧的终末分化细胞,其不仅是构成肾小球过滤屏障的重要组成部分,同时也是免疫介导和非免疫损伤的重要作用靶点<sup>[11]</sup>。而持续的足细胞损伤则会导致细胞数量的减少,进而引起肾功能不全,乃至终末期肾病的发生。既往研究证实补体系统的异常活化在 IMN 足细胞损伤中具有重要地位,而 C5b-9 作为补体活化的终产物,更能直接破坏足细胞的正常结构与功能<sup>[5]</sup>。因此积极探究 C5b-9 损伤足细胞的相关机制对阐明 IMN 的发生发展具有重要意义。本研究结果显示,通过 siRNA 转染技术沉默在 IMN 肾组织中过表达的 YAP 基因能够显著改善 C5b-9 诱导的足细胞损伤,这提示 YAP 信号可能在 IMN 的致病机制中具有重要作用。

YAP/Hippo 信号通路是近年来受到广大学者关注的一条调控细胞增殖、分化和凋亡相关基因转录和表达的重要信号通路<sup>[7]</sup>。研究发现 Hippo 途径在动物体内具有高度保守性,其主要由 Mst1/2 激酶, Lats1/2 激酶和共转录激活因子 YAP 或 TAZ 构成<sup>[12]</sup>。在细胞中,上游的相关调控元件如 NF2、KIBRA 等,磷酸化 Mst1/2 激酶,并使其转为激活状态,从而进一步同样磷酸化并活化 Lats1/2 激酶,而活化 Lats1/2 激酶可以直接使下游的 YAP 蛋白发生磷酸化。分子机制相关研究发现,骨架蛋白 14-3-3 等能够与磷酸化的 YAP 相结合,使其滞留在胞浆中,并经泛素化途径被降解。而未发生磷酸化的

YAP 蛋白能够顺利进入细胞核,并与 TEAD 结合,启动下游相关靶基因的转录及表达,参与调控细胞的增殖与凋亡过程<sup>[13-15]</sup>。提示未发生磷酸化的核内 YAP 才具有发挥相关生物学活性的作用。在本研究中,我们通过免疫组织化学染色发现 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球足细胞中的表达异常增加,且其定位多位于细胞核内。这提示在 IMN 中 YAP 可能通过调控下游相关靶基因的转录导致参与 IMN 的发生进展。

随着对 YAP/Hippo 信号通路认识的加深,人们发现主要定位于肾小球足细胞内的 YAP 蛋白与细胞的损伤,凋亡,细胞骨架的异常及间质性表型转换等密切相关,然而其具体作用仍存在争议。如 Campbell 等<sup>[16]</sup>研究发现, YAP 蛋白能通过分子结构中的 WW 结构域与树突蛋白 dendrin 的相关序列进行结合,从而抑制细胞核内促凋亡信号的转录,避免阿霉素或星形孢菌素所诱导的足细胞凋亡。同样在局灶节段性肾小球硬化中,足细胞核内 YAP 蛋白的含量减少,加速了基质中胶原纤维的产生及足细胞的丢失<sup>[17]</sup>。这些研究提示 YAP 在保护足细胞功能及维持肾小球过滤屏障中具有关键作用。然而,其他研究也表明,细胞核内 YAP 信号的过度表达则会造成足细胞的损伤及凋亡。如在糖尿病肾病(DN)中,足细胞核中异常聚集的 YAP 蛋白与患者收缩压、血尿素氮,肌酐的升高及 DN 的病理分级呈正相关,提示抑制 YAP 活性可能具有延缓 DN 进展的作用<sup>[18]</sup>。国内学者谢可炜<sup>[19]</sup>在阿霉素肾病的体内外研究中发现,过表达足细胞中 YAP 蛋

白可能通过促进周期相关蛋白 CDK4 和 CyclinD1 的表达,从而诱导静止期的足细胞重新进入细胞周期,并发生间充质细胞分化,严重影响足细胞的正常功能,并使其发生“有丝分裂灾难”,加速足细胞的丢失。本研究通过体外建立 C5b-9 损伤足细胞模型发现,随着 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中非磷酸化 YAP 蛋白的表达逐渐增加,而沉默 YAP 基因表达能显著缓解 C5b-9 诱导的足细胞增殖活性降低,凋亡增加、ROS 产生及足细胞损伤与间质细胞表型转化现象,同样提示 YAP 在足细胞的异常表达及定位可能通过损伤足细胞的功能,促进 IMN 的发生发展。

综上,本研究结果表明 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球中的表达显著增加,沉默足细胞中 YAP 基因表达能够明显改善 C5b-9 诱导的细胞功能损伤,抑制其凋亡的发生。虽然 YAP 在足细胞损伤中的具体作用机制仍需进一步研究,但本研究有望为 YAP 在 IMN 治疗的潜在作用靶点提供实验室及理论基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ronco P, Plaisier E, Debiec H. Advances in membranous nephropathy [J]. J Clin Med, 2021, 10(4): 607-621.
- [ 2 ] Hoxha E, von Haxthausen F, Wiech T, et al. Membranous nephropathy-one morphologic pattern with different diseases [J]. Pflügers Arch, 2017, 469(7-8): 989-996.
- [ 3 ] Stahl RA, Reinhard L, Hoxha E. Characterization of autoantibodies in primary membranous nephropathy and their clinical significance [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2019, 15(2): 165-175.
- [ 4 ] Ronco P, Debiec H. Membranous nephropathy: current understanding of various causes in light of new target antigens [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2021, 10(81): e1097.
- [ 5 ] 钟珍,李俊佳,胡海滢,等.补体攻膜复合物 C5b-9 在特发性膜性肾病发病中作用研究进展 [J].中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(7): 631-633.
- [ 6 ] Koopman JJE, van Essen MF, Rennke HG, et al. Deposition of the membrane attack complex in healthy and diseased human kidneys [J]. Front Immunol, 2021, 11(22): e599974.
- [ 7 ] Wong JS, Meliambro K, Ray J, et al. Hippo signaling in the kidney: the good and the bad [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(2): F241-F248.
- [ 8 ] Bonse J, Wennmann DO, Kremerskothen J, et al. Nuclear YAP localization as a key regulator of podocyte function [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): e850.
- [ 9 ] Mirza MK, Kim L, Kadambi PV, et al. Membranous nephropathy transplanted in the donor kidney: observations of resolving glomerulopathy in serial allograft biopsies [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(12): 2343-2347.
- [ 10 ] Sha W, Shen L, Zhou L, et al. Silencing of CXCL12 performs a protective effect on C5b-9-induced injury in podocytes [J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(8): 1535-1544.
- [ 11 ] Liu W, Gao C, Liu Z, et al. Idiopathic membranous nephropathy: glomerular pathological pattern caused by extrarenal immunity activity [J]. Front Immunol, 2020, 11(79): e1846.
- [ 12 ] 郑志煌,张志刚,吴慧娟,等. Hippo 信号通路与肾病 [J].临床与病理杂志, 2017, 37(7): 1518-1523.
- [ 13 ] Xu C, Wang L, Zhang Y, et al. Tubule-Specific Mst1/2 deficiency induces CKD via YAP and non-YAP mechanisms [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(5): 946-961.
- [ 14 ] Vargas RE, Duong VT, Han H, et al. Elucidation of WW domain ligand binding specificities in the Hippo pathway reveals STXBP4 as YAP inhibitor [J]. EMBO J, 2020, 39(1): e102406.
- [ 15 ] Meliambro K, Wong JS, Ray J, et al. The Hippo pathway regulator KIBRA promotes podocyte injury by inhibiting YAP signaling and disrupting actin cytoskeletal dynamics [J]. J Biol Chem, 2017, 292(51): 21137-21148.
- [ 16 ] Campbell KN, Wong JS, Gupta R, et al. Yes-associated protein (YAP) promotes cell survival by inhibiting proapoptotic dendrin signaling [J]. J Biol Chem, 2013, 288(24): 17057-17062.
- [ 17 ] Bonse J, Wennmann DO, Kremerskothen J, et al. Nuclear YAP localization as a key regulator of podocyte function [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 850-912.
- [ 18 ] Ma R, Ren JM, Li P, et al. Activated YAP causes renal damage of type 2 diabetic nephropathy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 755-763.
- [ 19 ] 谢可炜. YAP 信号调节阿霉素肾病足细胞进入细胞周期及分化 [D]. 上海:上海交通大学, 2018.

[收稿日期]2021-08-19

李藤藤, 徐东升, 李琪, 等. 淫羊藿苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡及炎症的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 9-15.

Li TT, Xu DS, Li Q, et al. Effect of icariin the apoptosis and inflammation of RAW264.7 cells induced by ox-LDL [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.002

## 淫羊藿苷对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡及炎症的影响

李藤藤<sup>1</sup>, 徐东升<sup>2</sup>, 李琪<sup>1</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 张洋<sup>1</sup>, 任立群<sup>1\*</sup>, 李相军<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学药学院实验药理与毒理学教研室, 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院肿瘤科, 长春 130000)

**【摘要】** 目的 研究淫羊藿苷(ICA)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)凋亡及炎症的影响,进一步阐明 ICA 抗动脉粥样硬化(AS)的作用。方法 体外培养 RAW264.7 细胞,ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞构建泡沫细胞模型,观察 ICA 低、中、高剂量对 RAW264.7 细胞活力、细胞凋亡、泡沫化、炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌的影响,同时采用 Western blot 检测 ICA 对 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I $\kappa$ B $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响。结果 ICA 可以提高细胞活力,降低细胞的凋亡率;减少泡沫巨噬细胞的形成;降低炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌;下调 Bcl-2、Caspase-3、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达,上调 Bax、I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达。结论 ICA 能够减轻泡沫巨噬细胞的凋亡,抑制炎症因子的表达,从而可能延缓动脉粥样硬化的发展进程。

**【关键词】** 淫羊藿苷;动脉粥样硬化;巨噬细胞;凋亡;炎症

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0009-07

## Effect of icariin the apoptosis and inflammation of RAW264.7 cells induced by ox-LDL

LI Tengteng<sup>1</sup>, XU Dongsheng<sup>2</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, WU Di<sup>1</sup>, ZHANG Yang<sup>1</sup>, REN Liqun<sup>1\*</sup>, LI Xiangjun<sup>1\*</sup>

(1. Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China.

2. Department of Oncology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130000)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of icariin (ICA) on apoptosis and inflammation of leukemic mouse macrophages (RAW264.7) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL), and to clarify the anti-arterial effect of ICA and the role of atherosclerosis (AS). **Methods** RAW264.7 cells were treated with ox-LDL to induce foam cell models. The effects of low, medium, and high doses of ICA on RAW264.7 cell viability, apoptosis, foaming and secretion of inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were investigated. Western blot was used to assess the effect of ICA on protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65. **Results** ICA improved cell viability and reduced apoptosis, the formation of foamy macrophages, secretion of inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Bcl-2, Caspase-3 and NF- $\kappa$ B p65 protein expression, and up-regulated protein expression of Bax and I $\kappa$ B $\alpha$ . **Conclusions** ICA reduces apoptosis of foamy macrophages and inhibits the expression of inflammatory factors, thereby delaying the development of atherosclerosis.

**【Keywords】** icariin; macrophages; atherosclerosis; apoptosis; inflammation

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81773934)。

[作者简介] 李藤藤(1995—),女,硕士研究生,研究方向:心血管药理学方向。E-mail: 17865650090@163.com

[通信作者] 任立群(1963—),女,教授,研究方向:心血管与肿瘤药理学。E-mail: renlq@jlu.edu.cn

李相军(1974—),男,副教授,研究方向:心血管药理学。E-mail: lxj@jlu.edu.cn

\* 共同通信作者

随着生活条件的改善和饮食结构的变化,我国心血管疾病的发生率和死亡率迅速增长,据推算,我国现患心血管疾病人数 2.9 亿,其死亡高于肿瘤和其他疾病,占居民疾病死亡的 40% 以上,居于首位<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种心血管疾病,是由内源性促炎和抗炎失衡所引起的炎症反应<sup>[2-3]</sup>,涉及脂质沉积、内皮损伤、泡沫细胞堆积和不稳定斑块的破裂等病理过程<sup>[4]</sup>,不稳定斑块容易发生破裂并促进血栓形成。巨噬细胞是斑块中最重要的免疫细胞,其数量和功能对斑块的大小和稳定性有直接的影响,并通过分泌多种炎症因子,进一步介导免疫细胞浸润不稳定斑块,引发斑块内细胞的凋亡和坏死,进而加速不稳定斑块的破裂<sup>[5-7]</sup>。因此,抑制巨噬细胞凋亡及减少促炎因子的分泌对延缓 AS 进展有重要意义。

淫羊藿苷(icariin, ICA)是从传统补益中药淫羊藿中提取的一种黄酮类化合物,是淫羊藿最为代表性的成分<sup>[8]</sup>,具有抗骨质疏松、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等药理作用<sup>[9]</sup>。目前,本课题组已发现,ICA 通过阻断 p38 MAPK 和 ERK1/2 信号通路抑制 VSMC 增殖<sup>[10]</sup>。本研究旨在通过体外构建泡沫巨噬细胞模型,探讨 ICA 对泡沫巨噬细胞凋亡以及炎症因子分泌的影响,为抗 AS 治疗提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

RAW264.7 细胞株(吉林大学生命科学学院实验室赠送,由吉林大学药学院实验药理与毒理学教研室冻存)。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养液(Hyclone 公司,美国);胎牛血清(四季青,浙江天杭生物科技股份有限公司);青霉素-链霉素双抗溶液(美国 Gibco 公司);淫羊藿苷(四川维克奇生物技术有限公司,纯度 98.0%);氧化低密度脂蛋白(ox-LDL,广州奕源生物技术有限公司);CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Hoechst33258 染色试剂盒(南京凯基科技有限公司);油红 O(北京索莱宝科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(上海酶联)。TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长沙湘智离心机有限公司);Nikon ECLIPSE 80i 正置显微镜(尼康仪器(上海)有限公司);美国伯乐 Bio-Rad 垂直电泳转印系

统(上海巴玖实业有限公司);MD 全波长光吸收酶标仪 SpectraMax 190(美谷分子仪器(上海)有限公司);4200 全自动化学发光成像分析系统(上海天能);倒置荧光显微镜和生物显微镜(Nikon 仪器(上海)有限公司);CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 BD 公司);JJ260 型精密电子天平。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养和实验分组

RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,第 2 天换液继续培养。当细胞生长密度至 70%~80% 时进行传代培养,2~4 代细胞用于实验。将培养的 RAW264.7 细胞分为空白组(CON 组)、模型组(MOD 组,50  $\mu$ g/mL ox-LDL)、ICA 低、中、高剂量组(ICA 10、20、40  $\mu$ mol/L 组 + 50  $\mu$ g/mL ox-LDL)。低、中、高浓度的 ICA 预处理 RAW264.7 细胞 30 min 后,模型组和 ICA 低、中、高剂量组中加入 50  $\mu$ g/mL 的 ox-LDL 培养 24 h,空白组不作处理,加入等量的培养液代替。

#### 1.3.2 CCK-8 法检测细胞活力

使用无血清的 DMEM 培养液制备浓度分别为 10、20、40  $\mu$ mol/L 的 ICA 工作液。按照每孔每毫升  $1.5 \times 10^4$  个细胞数将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种到 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理,每组设置 6 个复孔。培养 24 h 后,向各孔中加入 10  $\mu$ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,吸去各孔中的培养液,37 $^{\circ}$ C 摇床 5 min,酶标仪 490 nm 波长处检测各孔的吸光度,细胞活力 = 实验组 A 值/对照组 A 值  $\times 100\%$

#### 1.3.3 Hoechst 33258 检测细胞凋亡率

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升  $2.0 \times 10^5$  个细胞数接种于放有盖玻片 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃培养液,用预冷的 PBS 洗 1 遍,加入 500  $\mu$ L 4% 的多聚甲醛固定液进行固定,时间 10~15 min,弃掉固定液并用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 500  $\mu$ L Hoechst33258 染色液,摇床摇动 5 min 后,弃掉染色液,PBS 洗 2 遍,调整显微镜的荧光波长,于镜下仔细观察并拍照,圆形是正常细胞核的着色形态,呈现淡蓝色;凋亡细胞则是致密浓染,呈现亮蓝色。

#### 1.3.4 油红 O 染色

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升  $2.0 \times 10^5$  个细胞数接种于放有盖玻片的 6

孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃掉培养液,PBS 洗 2 遍,加 4%多聚甲醛,固定 30 min,弃掉多聚甲醛,PBS 洗两遍,加入 2 mL 油红 O 染液,37℃ 孵育 30 min,镜下观察,弃掉油红 O 染液,苏木素复染 2~3 min,水洗,甘油明胶封片,镜下观察拍照。

### 1.3.5 酶联免疫吸附实验(ELISA)

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升  $2.0 \times 10^5$  个细胞数接种于 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,收集各孔中的培养液并于  $-80^\circ\text{C}$  保存,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,测定 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  释放的影响。

### 1.3.6 免疫印迹实验(Western blot)

将处于对数生长期的 RAW264.7 细胞按照每孔每毫升  $2.0 \times 10^5$  个细胞数接种于 6 孔板中,按照 1.3.1 培养条件及实验分组处理 24 h 后,弃掉培养皿中的培养液,PBS 洗 2 遍,然后收集细胞。提取各组细胞总蛋白时按照提取试剂盒的说明书,采用 BCA 定量法,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,通过湿法转膜到 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 2 h,加入相应的一抗抗体,4℃ 冰箱中孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗膜 4 次,每次 5 min 加入稀释后的二抗,室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 4 次,每次 5 min,按照高灵敏度化学发光检测试剂盒说明书滴加发光工作液显色后,内参以 GAPDH 作为参照,采用 Image proplus 6.0 软件进行灰度分析。Western blot 实验过程中涉及的抗体及稀释浓度见表 1。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / GAPDH 条带灰度值。

## 1.4 统计学方法

统计学采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。计量资料经正态分布和方差齐性检验,实验结果以平

均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示,多组平均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响

给药处理 24 h 后,经 CCK-8 法检测,与 CON 组比较,MOD 组细胞活力明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 MOD 组比较,ICA 20、40  $\mu\text{mol/L}$  可以显著提高细胞活力,具有统计学意义( $P < 0.05$ ),ICA 10  $\mu\text{mol/L}$  组细胞活力增加,但差异无统计学意义(表 2)。

### 2.2 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡的影响

给药处理 24 h 后,经 Hoechst33258 染色观察,未经药物处理的 CON 组细胞生长状态良好,细胞核形态均一,整体细胞呈现均匀的蓝色荧光;与 CON 组比较,MOD 组细胞核变形皱缩且发出明显的蓝色荧光,即细胞染色质密集皱缩,出现高亮的凋亡小体,典型凋亡细胞核数目明显增多,具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 MOD 组比较,ICA 低、中、高剂量组亮蓝色荧光渐弱,高亮的凋亡小体数目逐渐减少,凋亡细胞核数逐渐减少,具有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 3,图 1)。

### 2.3 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞油红 O 染色观察

药物处理 24 h 后,经油红 O 染色观察,与 CON 组比较,MOD 组细胞体积增大且均有油红 O 染色阳性细胞遍布,细胞内脂滴形成,具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 MOD 组比较,ICA 中、高剂量组油红 O 染色阳性细胞逐渐减少,细胞内脂滴变小且减少,具有统计学意义( $P < 0.05$ ),ICA 低剂量组油红 O 染色阳性细胞减少,但差异无统计学意义(图 2)。

表 1 Western blot 法检测中使用的抗体和稀释浓度比例  
Table 1 Antibodies used in Western blot method detection and dilutions

抗体 Antibody	稀释 Dilutions	种属 Source	公司 Company
一抗 Primary antibodies	Bcl-2	1:800	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	Bax	1:800	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	Caspase-3	1:800	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	I $\kappa$ B $\alpha$	1:1000	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	NF- $\kappa$ B p65	1:800	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
	GAPDH	1:2000	兔 Rabbit ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)
二抗 Secondary antibody	HRPGoat Anti-Rabbit IgG	1:5000	山羊 Goat ABclonal, 中国武汉(Wuhan, China)

**表 2** ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞活力的影响  
**Table 2** Effect of ICA on the viability of RAW264.7 cells induced by ox-LDL

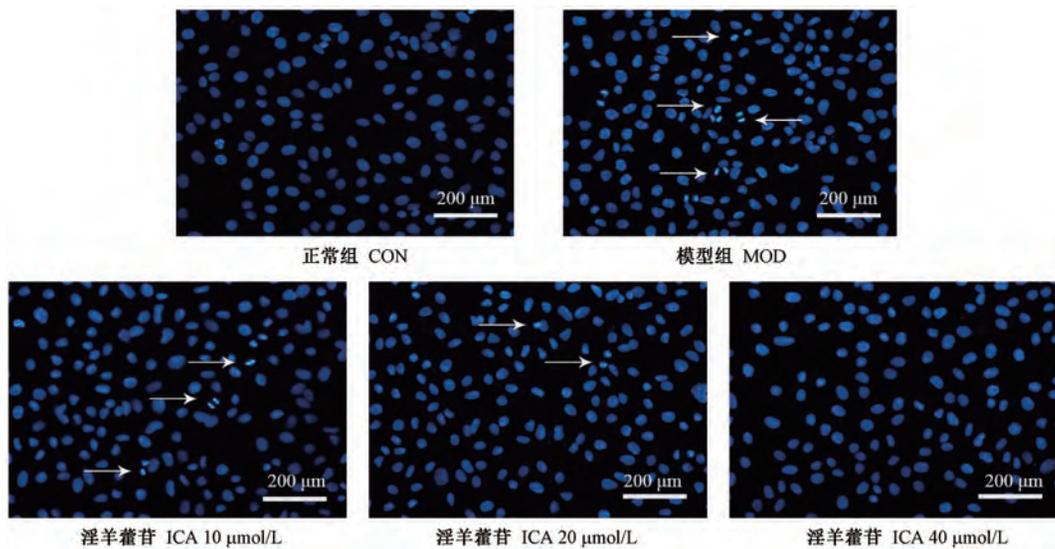
组别 Groups	细胞相对活力 (%) Relative cell viability
正常组 CON	100.00±0.00
模型组 MOD	60.00±0.69*
淫羊藿苷 ICA	
10 μmol/L	62.10±0.39
20 μmol/L	67.88±1.49#
40 μmol/L	80.63±1.00#

注:与 CON 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。  
Note. Compared with the CON group, \* $P < 0.05$ . Compared with the MOD group, # $P < 0.05$ .

**表 3** ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡的影响  
**Table 3** Effect of ICA on RAW264.7 cell apoptosis induced by ox-LDL

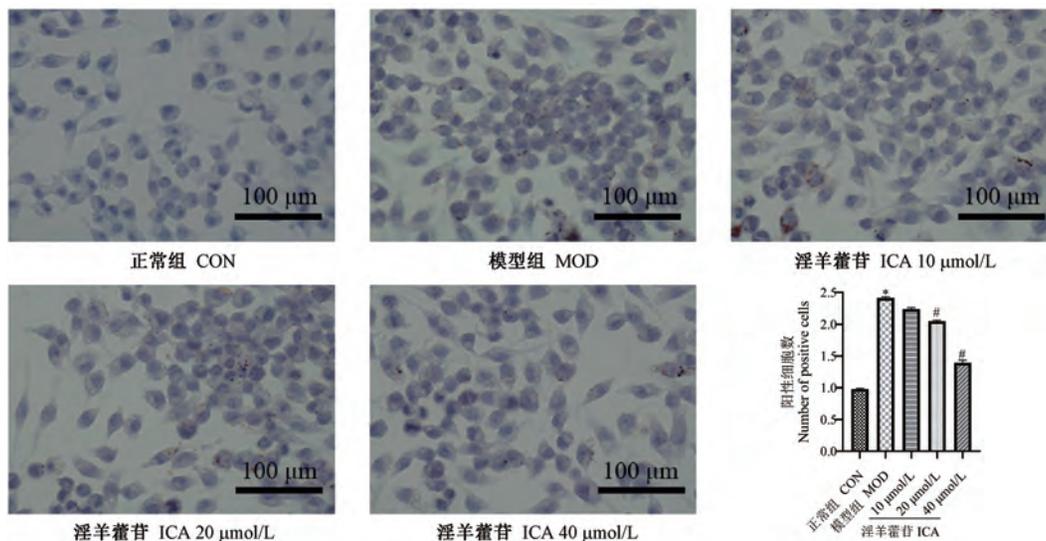
组别 Groups	细胞凋亡数 Apoptosis number
正常组 CON	6±0.82
模型组 MOD	17±0.82*
淫羊藿苷 ICA	
10 μmol/L	11±1.62#
20 μmol/L	9±0.82#
40 μmol/L	6±0.82#

注:与 CON 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。  
Note. Compared with the CON group, \* $P < 0.05$ . Compared with the MOD group, # $P < 0.05$ .



**图 1** ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞凋亡的影响

**Figure 1** Effect of ICA on RAW264.7 cell apoptosis induced by ox-LDL



注:与 CON 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

**图 2** ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞泡沫化影响

Note. Compared with the CON group, \* $P < 0.05$ . Compared with the MOD group, # $P < 0.05$ .

**Figure 2** Effect of ICA on the foaming of RAW264.7 cells induced by ox-LDL

**2.4 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响**

药物处理 24 h 后,收集细胞培养上清,经 ELISA 测定,与 CON 组比较,MOD 组细胞分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  因子均显著增加,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 MOD 组比较,ICA 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  处理时可以降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  因子的分泌,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(表 4)。

**2.5 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响**

ICA 浓度为 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  预处理 30 min,

ox-LDL 诱导 24 h 后,提取细胞蛋白,经 Western blot 检测,与 CON 组比较,MOD 组细胞 Bax、Caspase-3 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达均显著增加,Bcl-2 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达显著下降,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与 MOD 组比较,ICA 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  处理时可以降低 Bax、Caspase-3 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达,提高 Bcl-2 和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达,具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(图 3)。

**3 讨论**

AS 是一种累及动脉血管壁的慢性炎症疾病,随着生活水平和生活方式的改变,AS 呈现逐年上升趋势

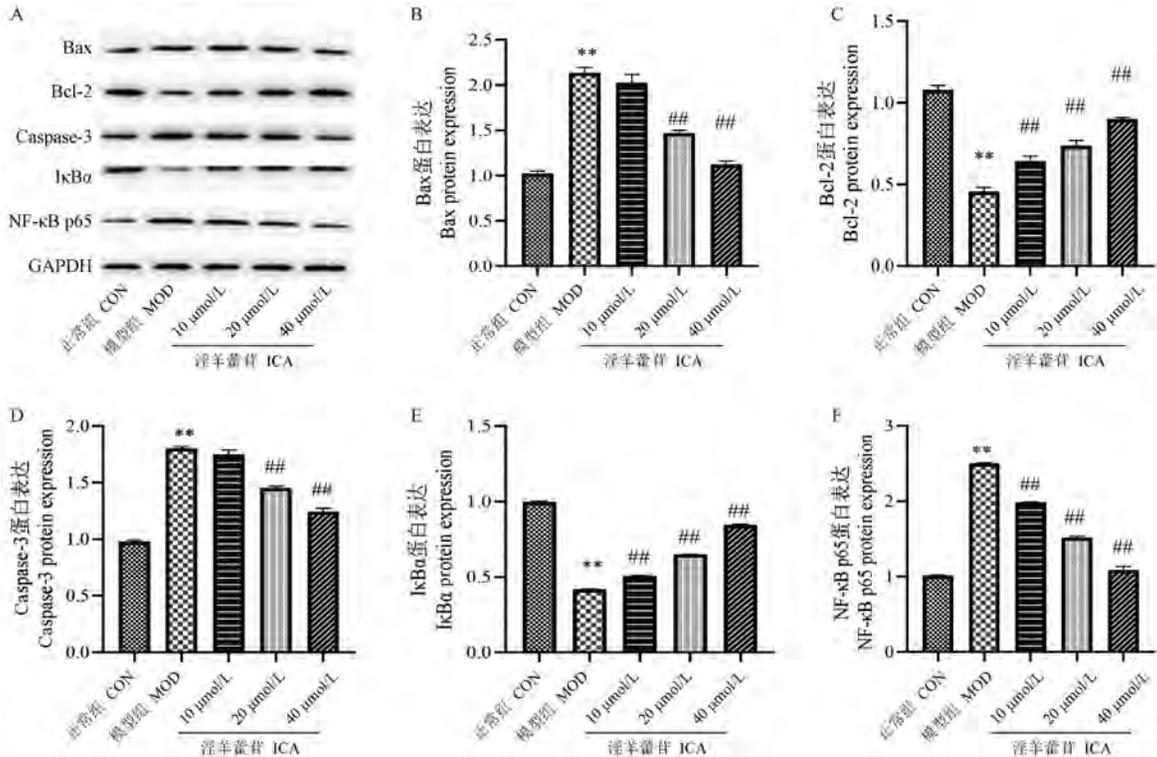
表 4 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞炎症因子释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of ICA on the secretion of inflammatory factors in RAW264.7 cells induced by ox-LDL

组别 Groups	白介素 1 $\beta$ (pg/mL) IL-1 $\beta$	白介素 6 (pg/mL) IL-6	肿瘤坏死因子 $\alpha$ (pg/mL) TNF- $\alpha$
正常组 CON	127.30 $\pm$ 0.82	92.42 $\pm$ 1.14	430.04 $\pm$ 1.67
模型组 MOD	202.19 $\pm$ 1.20*	149.65 $\pm$ 1.17*	821.31 $\pm$ 2.33*
淫羊藿苷 ICA	10 $\mu\text{mol/L}$	127.36 $\pm$ 1.60#	680.07 $\pm$ 1.64#
	20 $\mu\text{mol/L}$	164.20 $\pm$ 0.90#	627.75 $\pm$ 1.93#
	40 $\mu\text{mol/L}$	133.27 $\pm$ 1.40#	95.74 $\pm$ 0.74#

注:与 CON 组相比,\* $P < 0.05$ ;与 MOD 组相比,# $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the CON group,\* $P < 0.05$ . Compared with the MOD group,# $P < 0.05$ .



注:与 CON 组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与 MOD 组相比,## $P < 0.01$ 。

图 3 ICA 对 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

Note. Compared with the CON group,\*\* $P < 0.01$ . Compared with the MOD group,## $P < 0.01$ .

Figure 3 Effect of ICA on the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 protein in RAW264.7 cells induced by ox-LDL

势,其发生发展与很多疾病紧密相关,比如肥胖病、高血压、糖尿病及高胆固醇血症等<sup>[11]</sup>。目前他汀类药物是预防和治疗动脉粥样硬化的常用药物,但是他汀类药物可能会出现肌痛、肌炎和横纹肌溶解等肌肉病症,严重情况下还可能引起急性肾衰竭和肝功能受损<sup>[12]</sup>。

淫羊藿来源于小檗科多年生草本植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿或朝鲜淫羊藿的干燥叶,其性温而味辛、甘,归肝、肾经,中医临床多用于肾阳虚衰,阳痿遗精,筋骨痿软,风湿痹痛,麻木拘挛等症。淫羊藿具有悠久的药用历史,开始记载在《神农本草经》中。现代的实验研究发现,淫羊藿中含有多种化学成分,其中以黄酮类为主要化学成分,还包括酚苷类、多糖类、生物碱类等其他多种化学成分,淫羊藿具有多种药理作用,比如抗炎、抗肿瘤、抗衰老和抗骨质疏松等<sup>[13]</sup>。淫羊藿苷(ICA)是淫羊藿的主要活性成分之一,分子式为  $C_{33}H_{40}O_{15}$ ,分子量为 676.65<sup>[14]</sup>,是一种黄酮类的化合物。既往研究多集中于淫羊藿苷抗骨质疏松、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等药理作用方面,最近几年来,越来越多的研究者们开始将研究目标转移到 ICA 对心血管系统的作用上,在 ICA 抗 AS、抗高血压、抗心肌缺血等很多方面均取得了一些崭新的科研成果。本课题组对 ICA 具有较为系统和深刻的药理学研究,目前成果主要集中在药物安全性评价;对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的抗 AS 作用及治疗价值研究<sup>[15]</sup>;对体外培养的平滑肌细胞药理作用及机制研究<sup>[16]</sup>。基于此,本研究以巨噬细胞为切入点,明确 ICA 对巨噬细胞凋亡及炎症因子的影响,从而揭示 ICA 抗动脉粥样硬化的作用。

巨噬细胞在 AS 的形成、发生以及发展中发挥至关重要的作用,参与着全过程<sup>[17]</sup>。巨噬细胞凋亡在 AS 病变早期可以抑制 AS 的发生进程,但是在病变晚期,巨噬细胞降解细胞内脂质的能力下降,巨噬细胞凋亡则导致不稳定斑块的破裂,从而加速 AS 的发生进程<sup>[18]</sup>。单核细胞迁移至内皮下分化形成巨噬细胞,巨噬细胞吞噬 ox-LDL 形成泡沫细胞,泡沫细胞的形成是 AS 发展过程中的一个典型事件<sup>[19]</sup>。用 ox-LDL 刺激巨噬细胞分化成泡沫细胞是研究 AS 的经典模型,本研究在此模型上研究 ICA 的体外抗动脉粥样硬化作用及其机制。结果表明,加入不同浓度的 ICA 处理 24 h 后,经 ox-LDL 诱导的巨噬细胞细胞活力增加,凋亡细胞数减少;细胞

泡沫化减少;IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  炎症因子分泌减少,表明 ICA 具有减少巨噬细胞凋亡并抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  炎症因子分泌的作用,提示 ICA 具有抗 AS 的药理作用。

在病理状态下,细胞内源性凋亡通路会在巨噬细胞吞噬 ox-LDL 的过程中被激活<sup>[20]</sup>。Bcl-2 是定位在线粒体膜上的一种蛋白,与 Bax 蛋白共同形成异源二聚体,从而来控制线粒体膜的通透性,防止细胞色素 C 的流出而激活下游 Caspase-3 凋亡蛋白引发内源性凋亡<sup>[21-22]</sup>。当泡沫细胞出现生存障碍时,泡沫细胞会发生破裂,从而释放出大量的炎症因子和脂质吞噬物<sup>[23-24]</sup>,进一步导致不稳定斑块的形成和破裂。刘学谦等<sup>[25]</sup>发现清心通脉饮可降低巨噬细胞的凋亡,其机制与降低促凋亡蛋白 Bax 的表达,增加 Bcl-2 蛋白表达有关;赵正等<sup>[26]</sup>研究发现 TM 可引起 Caspase-3 活性增加,诱导泡沫细胞凋亡,与 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化和凋亡结果相符;林徐泽等<sup>[27]</sup>研究表明脂肪因子 Omentin-1 可显著抑制巨噬细胞的凋亡,其机制与 Omentin-1 促进巨噬细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 及 Caspase-3 的蛋白表达有关。本研究结果表明,与 CON 组相比,MOD 组 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达减少;与 MOD 组相比,ICA 将不同程度降低 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达,并提高 Bcl-2 蛋白表达,并且呈剂量依赖性,与上述研究结果一致,表明 ICA 可激活细胞内源性凋亡途径引起细胞凋亡。

Park 等<sup>[28]</sup>研究发现, NF- $\kappa$ B 的激活能够抑制巨噬细胞的凋亡,这一现象的发现提示可能与级联放大炎症反应相关。NF- $\kappa$ B 的抑制因子是 I $\kappa$ B,I $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 结合后,能够阻止 NF- $\kappa$ B 转移到细胞核内。当细胞处于静息状态时,NF- $\kappa$ B 和 I $\kappa$ B 结合形成没有活性的复合体,存在于胞浆中,当外界信号的刺激细胞后,I $\kappa$ B 激酶复合体则将 I $\kappa$ B 磷酸化,使 NF- $\kappa$ B 暴露出核定位的相关位点。游离的 NF- $\kappa$ B 迅速进入到细胞核中,与特异性  $\kappa$ B 序列结合,诱导基因转录,进而抑制巨噬细胞凋亡。本研究中,MOD 组 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达增加,I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达减少。ICA 处理后发现:ICA 将不同程度地提高 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达,降低 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达,并且呈剂量依赖性,与以往人们研究结果一致,表明 ICA 能够激活 NF- $\kappa$ B 活性抑制巨噬细胞凋亡。综上所述,本研究在细胞水平证实了 ICA 可以提高巨噬细

胞活性并减少细胞凋亡,抑制相关炎症因子的释放,激活细胞内源性凋亡途径和 NF- $\kappa$ B 活性抑制凋亡蛋白的表达,为 ICA 抗 AS 的研究提供了实验证据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [ 2 ] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis-A matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193.
- [ 3 ] Libby P, Bornfeldt KE, Tall AR. Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 531-534.
- [ 4 ] Perrotta P, Emini VB, Bieke VDV, et al. Pharmacological strategies to inhibit intra-plaque angiogenesis in atherosclerosis [J]. Vascul Pharmacol, 2018, 112: 72-78.
- [ 5 ] Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, et al. Inflammation and atherosclerosis-revisited [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2014, 19(2): 170-178.
- [ 6 ] Williams JW, Giannarelli C, Rahma A, et al. Macrophage biology, classification, and phenotype in cardiovascular disease: JACC macrophage in CVD series (Part 1) [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(18): 2166-2180.
- [ 7 ] Rafeian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, et al. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes [J]. Int J Prev Med, 2014, 5(8): 927-946.
- [ 8 ] Li C, Li Q, Mei Q, et al. Pharmacology effects and pharmacokinetics properties of icariin, the major bioactive component in herba epimedii [J]. Life Sci, 2015, 126: 57-68.
- [ 9 ] 李聪聪,赵鹏,秦燕勤,等.淫羊藿苷的药理活性研究进展 [J]. 中医学报, 2020, 35(4): 781-786.
- [ 10 ] 胡彦武,李海涛,刘凯,等.淫羊藿苷通过影响 MAPK 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管平滑肌细胞增殖作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3655-3660.
- [ 11 ] Phrommintikul A, Krittayaphong R, Wongcharoen W, et al. Management of atherosclerosis risk factors for patients at high cardiovascular risk in real-world practice: a multicentre study [J]. Singapore Med J, 2017, 58(9): 535-542.
- [ 12 ] 刘梅林,冯雪茹.老年人应用他汀类药物的安全性 [J]. 临床荟萃, 2008, 23(10): 691-694.
- [ 13 ] 袁航,曹树萍,陈抒云,等.淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3630-3640.
- [ 14 ] Chen YJ, Zheng HY, Huang XX, et al. Neuroprotective effects of icariin on brain metabolism, mitochondrial functions, and cognition in triple-transgenic Alzheimer's disease mice [J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(1): 63-73.
- [ 15 ] 张洋,冷晓薇,李亚娟,等.罗布麻叶总黄酮对大鼠动脉粥样硬化干预作用 [J]. 中国公共卫生, 2016, 32(12): 1696-1699.
- [ 16 ] 徐瑞,黄鹏,张祎冰,等. miR-205-5p/PRKCA/p38 信号通路在淫羊藿苷抑制动脉粥样硬化中的介导作用 [J]. 老年学杂志, 2020, 40(10): 2169-2176.
- [ 17 ] Koelwyn GJ, Corr EM, Erbay E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. Nat Immunol, 2018, 19(6): 526-537.
- [ 18 ] Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage apoptosis and necrotic core development in atherosclerosis: a rapidly advancing field with clinical relevance to imaging and therapy [J]. Can J Cardiol, 2017, 33(3): 303-312.
- [ 19 ] 尹建国,张社兵,彭道泉.载脂蛋白 AI 通过诱导自噬抑制泡沫细胞脂质沉积和凋亡 [J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(1): 17-21.
- [ 20 ] Dominic EA, Ramezani A, Anker SD, et al. Mitochondrial cytopathies and cardiovascular disease [J]. Heart, 2014, 100(8): 611-618.
- [ 21 ] 冯健愉,朱玉山,陈佺,等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(8): 1477-1489.
- [ 22 ] Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 65-80.
- [ 23 ] Yurdagul A Jr, Doran AC, Cai B, et al. Mechanisms and consequences of defective efferocytosis in atherosclerosis [J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 4: 86.
- [ 24 ] Cai B, Thorp EB, Doran AC, et al. MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127(2): 564-568.
- [ 25 ] 刘学谦,王静,曹守沛,等.凉血散淤法通过抑制巨噬细胞凋亡抗动脉粥样硬化的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 59-65.
- [ 26 ] 赵正,李琦,尹婕,等.参莲提取物对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞泡沫化和凋亡的药效学研究及提取部位活性比较 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(5): 590-597.
- [ 27 ] 林徐泽,王志坚,周玉杰.脂肪因子 Omentin-1 通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 通路抑制泡沫巨噬细胞炎症因子释放及凋亡的研究 [J]. 心脑血管病杂志, 2019, 38(9): 975-981.
- [ 28 ] Park JM, Greten FR, Wong A, et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis-CREB and NF- $\kappa$ B as key regulators [J]. Immunity, 2005, 23(3): 319-329.

[收稿日期]2021-01-22

沈钦海, 张盟辉, 秦召敏, 等. 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 16-22.

Shen QH, Zhang MH, Qin ZM, et al. Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.003

## 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤

沈钦海<sup>1</sup>, 张盟辉<sup>2</sup>, 秦召敏<sup>1\*</sup>, 刘军<sup>3</sup>

(1. 山东医学高等专科学校医学系, 济南 250002; 2. 山东省济南市第四人民医院普通外科, 山东大学附属省立医院, 济南 250000; 3. 山东大学齐鲁医院, 济南 250021)

**【摘要】** 目的 探讨槲皮素预处理通过 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬对肝缺血再灌注损伤的保护作用。方法 大鼠使用随机数字表法分为对照组、模型组、槲皮素组、氯喹(自噬抑制剂)组和槲皮素+氯喹组。手术前 3 d, 槲皮素组大鼠灌胃给予 0.1 g/kg 槲皮素, 氯喹组大鼠腹腔注射 0.02 g/kg 氯喹, 槲皮素+氯喹组灌胃给予槲皮素同时腹腔注射氯喹, 对照组和模型组给予等体积溶剂, 每天 1 次。构建肝缺血再灌注大鼠模型并于再灌注 6 h 后处死大鼠。全自动生化分析仪检测大鼠肝功能指标, 包括谷氨酸-丙酮酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸酰基转移酶(AST); 苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肝组织病理学变化; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清中炎症因子含量, 包括白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ); 单磺尸胺染色法(MDC)观察并计算各组大鼠肝组织细胞自噬率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK、mTOR 蛋白磷酸化水平。结果 对照组大鼠肝组织结构完整, 肝细胞排列整齐, 无显著坏死现象。与对照组相比, 模型组大鼠肝组织结构紊乱, 肝细胞排列疏松, 出现坏死, ALT、AST 水平、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ ), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 槲皮素组大鼠肝组织上述病理损伤显著缓解, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ ), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ ); 氯喹组大鼠肝组织上述病理损伤显著加重, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ ), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ )。与槲皮素组相比, 槲皮素+氯喹组大鼠肝组织病理损伤显著加重, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ ), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ ); 与氯喹组相比, 槲皮素+氯喹组大鼠肝组织病理损伤显著减轻, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ ), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高( $P < 0.05$ )。结论 槲皮素预处理可能通过激活肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬, 从而减少炎症反应, 缓解肝损伤。

**【关键词】** 槲皮素; 肝缺血再灌注损伤; 自噬; AMPK/mTOR 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) 03-0016-07

### Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81770646)。

**【作者简介】** 沈钦海(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 肝病发病机制及治疗。E-mail: sdyzsqh@126.com

**【通信作者】** 秦召敏(1969—), 女, 副教授, 研究方向: 传染病研究及教学。E-mail: sdyzqzm@126.com

SHEN Qin Hai<sup>1</sup>, ZHANG Menghui<sup>2</sup>, QIN Zhaomin<sup>1\*</sup>, LIU Jun<sup>3</sup>

- (1. Department of medicine, Shandong Medical College, Jinan 250002, China. 2. Department of general surgery, the Fourth People's Hospital of Jinan, Shandong Province, Provincial hospital affiliated to Shandong University, Jinan 250000.  
3. Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250021)

**[ Abstract ] Objective** To investigate the protective effect of quercetin pretreatment on hepatic ischemia-reperfusion injury by autophagy mediated via the AMPK/mTOR signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, quercetin, chloroquine (autophagy inhibitor) and quercetin+chloroquine groups. Three days before the operation, the quercetin group was administered 0.1 g/kg quercetin, the chloroquine group was intraperitoneally injected with 0.02 g/kg chloroquine, the quercetin+chloroquine group was administered quercetin by gavage and chloroquine was injected intraperitoneally at 3 days, and the control and model groups were administered an equal volume of solvent once a day. The rat model of hepatic ischemia-reperfusion was established and rats were sacrificed at 6 hours after reperfusion. Liver function indexes, which included glutamic pyruvate transaminase (ALT) and aspartate acyltransferase (AST), were measured by an automatic biochemical analyzer. Pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The serum levels of inflammatory factors, which included interleukin (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The autophagy rate was calculated by monosulfonamide (MDC) staining. Expression of Beclin1 protein and the phosphorylation of AMPK and mTOR proteins in liver tissue were detected by Western blot. **Results** In the control group, the liver tissue structure was complete, hepatocytes were arranged in order, and there was no significant necrosis. Compared with the control group, the liver tissue structure of the model group was disordered, the arrangement of hepatocytes was loose, and necrosis had appeared, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ( $P < 0.05$ ), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the above pathological damage of liver tissue in the quercetin group was alleviated significantly, the levels of ALT and AST, the contents of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and the phosphorylation level of mTOR protein were significantly lower ( $P < 0.05$ ), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly higher ( $P < 0.05$ ). In the chloroquine group, the above pathological damage of liver tissue was aggravated significantly, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ( $P < 0.05$ ), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ( $P < 0.05$ ). Compared with the quercetin group, the pathological damage of liver tissue in the quercetin + chloroquine group was more serious, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . and phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ( $P < 0.05$ ) and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ( $P < 0.05$ ). Compared with the chloroquine group, the pathological damage of liver tissue in the quercetin+chloroquine group was significantly reduced, the levels of ALT and AST, the contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and phosphorylation level of mTOR protein were significantly lower ( $P < 0.05$ ), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Quercetin pretreatment may activate autophagy mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury, thereby reducing the inflammatory response and alleviating liver injury.

**[ Keywords ]** quercetin; hepatic ischemia-reperfusion injury; autophagy; AMPK/mTOR pathway; inflammatory response

肝缺血再灌注损伤常见于出血性休克、肝手术、肝移植术等过程中,可引起肝损伤、肝衰竭等,也是肝手术移植失败的重要原因<sup>[1]</sup>。自噬是一个将自身细胞器或细胞质中的蛋白包被形成囊泡,通

过自噬溶酶体,使囊泡内容物降解的过程,在机体生理和病理过程中常见<sup>[2]</sup>,其发挥的作用在不同组织和细胞中各不相同。前人研究发现,在肝缺血再灌注损伤过程中,上调细胞自噬具有保护肝功能的

作用<sup>[3]</sup>。另外,通过提高腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路调节的自噬,可缓解缺血再灌注诱导的肝损伤<sup>[4]</sup>。槲皮素是一种天然的膳食黄酮,具有显著的抗氧化作用,可通过降低炎症反应,对心脏等器官起保护作用<sup>[5]</sup>。而且槲皮素能有效改善大鼠肝缺血再灌注损伤<sup>[6]</sup>,但是槲皮素预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的缓解作用及对 AMPK/mTOR 信号通路介导自噬途径的影响,未见报道。本研究使用槲皮素及自噬抑制剂氯喹预处理肝缺血再灌注损伤的大鼠模型,旨在从 AMPK/mTOR 信号通路探讨槲皮素对缺血再灌注损伤大鼠自噬的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠(50 只,雄性,5 周龄,体重 170~180 g)购自山东大学医学院实验中心[SCXK(鲁)2018-0003],于山东大学实验室饲养[SYXK(鲁)2019-0043],符合山东大学实验室动物伦理保护标准及相关法律法规(2020-S-09),按照 3R 原则关照实验动物。

### 1.2 主要试剂与仪器

槲皮素(原料药,纯度 $\geq 98\%$ )购自南京泽朗医药科技有限公司;自噬抑制剂-氯喹(规格:50 mg,纯度:97%),购自麦克林生化科技有限公司。

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司;单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)购自上海基尔顿生物科技有限公司; $\beta$ -actin 鼠抗购自 Sigma 公司;Beclin1、磷酸化(phosphorylation, p)-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 一抗和辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗均购自 Abcam 公司。

全自动生化分析仪(BK-200 型)购自山东博科;酶标仪(Fax-20100 型)购自美国 INStat;光学显微镜(SMZ745 型)购自日本尼康;ChemiDoc-MP 全能型凝胶成像分析系统购自山东三瑞科技有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 肝缺血再灌注大鼠模型的建立及分组

将 SPF 级 SD 大鼠使用随机数字表法分为对照组,模型组、槲皮素组、氯喹组和槲皮素+氯喹组。

手术前 3 天,槲皮素组大鼠灌胃给予槲皮素(0.5% 羧甲基纤维素钠溶解),给药剂量 0.1 g/kg<sup>[7]</sup>,氯喹组大鼠腹腔注射 0.02 g/kg 氯喹<sup>[8]</sup>(自噬抑制剂,蒸馏水溶解),槲皮素+氯喹组灌胃给予槲皮素同时腹腔注射氯喹,对照组和模型组给予等体积蒸馏水和 0.5% 羧甲基纤维素钠溶剂,每天 1 次。参考马志勇等<sup>[9]</sup>方法构建肝缺血再灌注大鼠模型:大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,固定于手术板上,切开腹壁,游离肝蒂,使用血管夹钳夹肝蒂进行肝缺血,60 min 后松开血管夹使血液灌注 6 h,其中对照组仅游离肝蒂不进行嵌夹,所有大鼠血液再灌注 6 h 后处死,收集各组大鼠血液、肝组织进行检测。

#### 1.3.2 全自动生化分析仪检测大鼠肝功能指标

分离上述 1.3.1 中收集的各组大鼠部分新鲜血液中血清(剩余血清置于 4℃ 冰箱中,用于后续检测),置于全自动生化分析仪上检测血清中谷氨酸-丙酮酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。两者用于反映肝功能的指标,水平越高表明肝损伤越严重。

#### 1.3.3 HE 染色观察各组大鼠肝组织病理学变化

取上述 1.3.1 中收集的各组大鼠部分新鲜肝组织,经过固定(4%多聚甲醛,24 h)、包埋(石蜡)、切片(5  $\mu$ m),然后脱蜡(二甲苯)、脱水(梯度乙醇)、染色(苏木精-伊红)等过程,具体操作步骤严格按照 HE 染色试剂盒进行,最后在石蜡切片中滴 1 滴中性树胶进行封片,光学显微镜观察。

#### 1.3.4 ELISA 法检测血清中炎症因子含量

取上述 1.3.1 中置于 4℃ 冰箱中的各组大鼠剩余血清,严格按照 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒说明书进行操作。

#### 1.3.5 MDC 观察并计算各组肝组织细胞中自噬率

取上述 1.3.1 中收集的各组大鼠新鲜肝组织各 0.05 g 剪碎、胰蛋白酶制成单细胞悬液(剩余肝组织置于-80℃冰箱中保存),接种至 6 孔板(2 mL/孔),将 6 孔板离心、PBS 缓冲液洗涤、1 mL 4%多聚甲醛固定、50  $\mu$ mol/L MDC 染色、37℃温育,30 min 后,观察并计数 MDC 阳性细胞,MDC 阳性细胞率即为细胞自噬率。

#### 1.3.6 Western blot 法检测各组大鼠肝组织中 Beclin1、AMPK、mTOR 蛋白表达水平

取上述 1.3.5 中置于-80℃冰箱中的大鼠肝组织,提取总蛋白并对蛋白进行定量,然后进行十二

烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,与 Beclin1、AMPK、p-AMPK、p-mTOR、mTOR、 $\beta$ -actin 鼠抗(稀释比均为 1:2000)4℃ 孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗(1:5000)室温孵育 2 h 后、显色、凝胶成像分析系统分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

使用软件 SPSS 24.0 进行统计分析,平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示计量数据,多组间比较和进一步两两间比较分别行单因素方差分析和 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝功能指标的影响

模型组 ALT 和 AST 水平显著高于对照组( $P < 0.05$ );槲皮素组 ALT 和 AST 水平显著低于模型组( $P < 0.05$ ),氯喹组 ALT 和 AST 水平显著高于模型组( $P < 0.05$ )。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组 ALT 和 AST 水平显著升高( $P < 0.05$ );与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组 ALT 和 AST 水平显著降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.2 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织病理学变化的影响

对照组大鼠肝组织结构完整,肝细胞排列整齐,无显著坏死现象;模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞排列疏松,出现坏死,槲皮素组较模型组大鼠肝组织病理损伤有所缓解,氯喹组较模型组大鼠肝组织病理损伤加重;槲皮素+氯喹组较槲皮素组大鼠肝组织病理损伤加重,较氯喹组大鼠肝组织病理损伤减轻。见图 1。

2.3 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠血清中炎症因子含量的影响

模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著高于对照组( $P < 0.05$ );与模型组相比,槲皮素组

大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著降低( $P < 0.05$ ),氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著升高( $P < 0.05$ )。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著升高( $P < 0.05$ );与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著降低( $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织细胞自噬率的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低( $P < 0.05$ );与模型组相比,槲皮素组大鼠肝组织细胞自噬率显著升高( $P < 0.05$ ),氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低( $P < 0.05$ )。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低( $P < 0.05$ );与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著升高( $P < 0.05$ )。见表 3、图 2。

2.5 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织 Beclin1、AMPK、mTOR 蛋白表达水平的影响

模型组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著低于对照组( $P < 0.05$ ),

表 1 各组大鼠肝功能指标比较( $\bar{x}\pm s, n = 10$ )

组别 Groups	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
对照组 Control group	32.09 $\pm$ 3.31	72.34 $\pm$ 7.53
模型组 Model group	1024.55 $\pm$ 118.37 <sup>a</sup>	1326.67 $\pm$ 133.29 <sup>a</sup>
槲皮素组 Quercetin group	458.33 $\pm$ 76.51 <sup>b</sup>	725.39 $\pm$ 73.69 <sup>b</sup>
氯喹组 Chloroquine group	1935.56 $\pm$ 20.28 <sup>b</sup>	2107.52 $\pm$ 216.89 <sup>b</sup>
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	985.42 $\pm$ 99.25 <sup>cd</sup>	1279.34 $\pm$ 128.59 <sup>cd</sup>

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与槲皮素组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与氯喹组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with quercetin group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with chloroquine group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

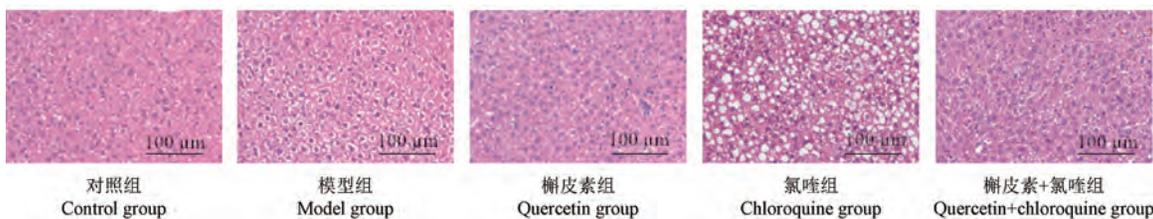


图 1 各组大鼠肝组织病理学 HE 染色图

Figure 1 Hepatic histopathological HE staining of rats in each group

mTOR 蛋白磷酸化水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。槲皮素组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著高于模型组 ( $P < 0.05$ )，mTOR 蛋白磷酸化水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )；氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )，mTOR 蛋白磷酸化水平显著高于模型组。与槲皮素

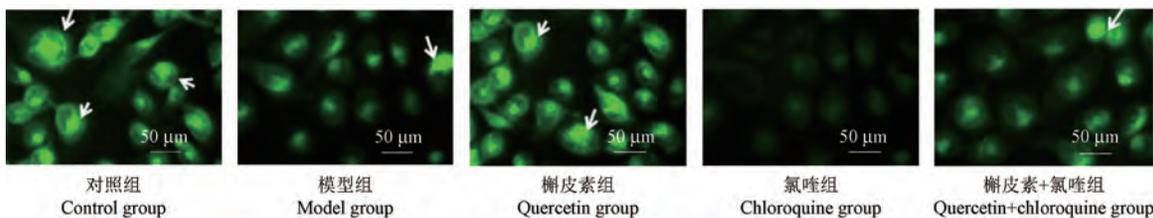
组比，槲皮素+氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高 ( $P < 0.05$ )；与氯喹组比，槲皮素+氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 4、图 3。

**表 2** 各组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
**Table 2** Contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in serum of rats in each group

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
对照组 Control group	34.23 $\pm$ 3.56	28.34 $\pm$ 2.95	22.76 $\pm$ 2.39
模型组 Model group	1067.24 $\pm$ 128.53 <sup>a</sup>	976.83 $\pm$ 978.54 <sup>a</sup>	679.24 $\pm$ 68.29 <sup>a</sup>
槲皮素组 Quercetin group	543.17 $\pm$ 57.31 <sup>b</sup>	213.56 $\pm$ 22.47 <sup>b</sup>	154.85 $\pm$ 17.23 <sup>b</sup>
氯喹组 Chloroquine group	1328.57 $\pm$ 133.09 <sup>b</sup>	1242.29 $\pm$ 126.27 <sup>b</sup>	916.13 $\pm$ 92.34 <sup>b</sup>
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	943.86 $\pm$ 95.56 <sup>cd</sup>	909.88 $\pm$ 97.29 <sup>cd</sup>	554.35 $\pm$ 57.18 <sup>cd</sup>

注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与槲皮素组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与氯喹组相比，<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with quercetin group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with chloroquine group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .



注：箭头所示为 MDC 染色阳性细胞。

**图 2** 各组细胞自噬小体荧光图

Note. Arrow is MDC positive cells.

**Figure 2** Fluorescence of autophagosomes in each group

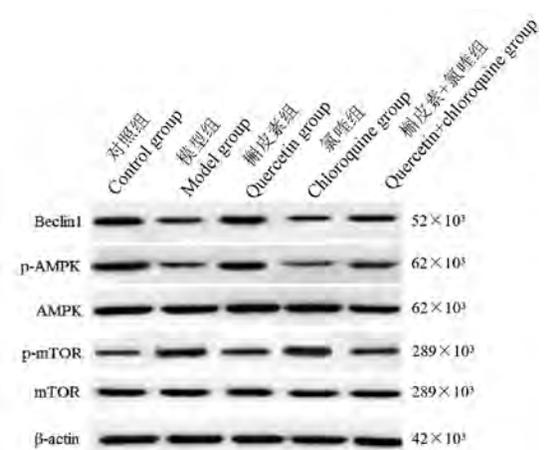
**表 3** 各组大鼠肝组织细胞自噬率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 3** Autophagy rates in liver tissue cells of rats in each group

组别 Groups	MDC 阳性细胞率 (%) MDC positive cell rate
对照组 Control group	36.17 $\pm$ 3.72
模型组 Model group	11.26 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>
槲皮素组 Quercetin group	29.48 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>
氯喹组 Chloroquine group	4.33 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	13.36 $\pm$ 1.48 <sup>cd</sup>

注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与模型组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与槲皮素组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与氯喹组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with quercetin group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with chloroquine group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .



**图 3** 各组大鼠肝组织中 Beclin1、p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 蛋白表达条带图

**Figure 3** Expression of Beclin1, p-AMPK, AMPK,

p-mTOR and mTOR proteins in liver tissue of rats in each group

表 4 各组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达及 AMPK 和 mTOR 蛋白磷酸化水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Comparison of Beclin1 protein and AMPK, mTOR phosphorylation proteins expression levels in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	Beclin1/ $\beta$ -actin	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
对照组 Control group	0.94 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.02
模型组 Model group	0.35 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.84 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
槲皮素组 Quercetin group	0.73 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.84 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
氯喹组 Chloroquine group	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.92 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>

注:与对照组相比, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与模型组相比, <sup>b</sup> $P<0.05$ ;与槲皮素组相比, <sup>c</sup> $P<0.05$ ;与氯喹组比较, <sup>d</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ . Compared with model group, <sup>b</sup> $P<0.05$ . Compared with quercetin group, <sup>c</sup> $P<0.05$ . Compared with chloroquine group, <sup>d</sup> $P<0.05$ .

### 3 讨论

肝缺血再灌注是肝手术或肝移植的必要组成部分,缺血过程中不可避免会造成肝细胞损伤,再灌注后肝功能也不太可能迅速恢复正常<sup>[10]</sup>。在大多数情况下,术后会出现肝炎症、损伤甚至严重的肝功能障碍,严重者甚至可导致多器官功能衰竭甚至死亡<sup>[11]</sup>。因此,预防和减轻肝缺血再灌注损伤对改善患者预后、降低死亡率具有重要影响。何莹等<sup>[12]</sup>研究发现老年大鼠肝缺血再灌注损伤伴随自噬作用降低及自噬相关蛋白水平显著下降。本研究通过构建大鼠肝缺血再灌注损伤,发现模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞排列疏松,出现坏死,ALT 和 AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量显著升高,肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平显著降低,提示肝缺血再灌注大鼠肝组织出现病理损伤及炎症反应,且细胞自噬减少。

槲皮素可以降低血压、血脂,抗癌、抗炎和抗氧化应激,对多种心血管疾病具有良好的治疗效果,广泛存在于双子植物中,是一种黄酮类化合物<sup>[13]</sup>。其中,槲皮素不但能显著抑制乳腺癌细胞的生长<sup>[14]</sup>,还能诱发原发积液性淋巴瘤细胞的自噬<sup>[15]</sup>。另外, Uylas 等<sup>[16]</sup>研究发现,槲皮素在正确剂量下可有效预防肝缺血再灌注损伤, He 等<sup>[17]</sup>研究发现槲皮素可以通过 mTOR 途径增强缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞自噬,治疗缺氧相关性肺动脉高压疾病。本研究发现,槲皮素可显著缓解肝缺血再灌注大鼠肝组织病理损伤,降低肝功能指标 ALT 和 AST 水平以及炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量,提高肝组织细胞自噬率和 Beclin1 蛋白表达水平,提示槲皮素能够激活细胞自噬,缓解肝损伤。但其中的机制尚需进一步研究。

Wang 等<sup>[18]</sup>研究发现高血糖通过抑制 AMPK/mTOR 介导的自噬,促进肝内巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活,加重急性肝损伤。本研究发现,肝缺

血再灌注模型大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平、AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低, mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高,提示 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬在模型大鼠中处于抑制状态,而经槲皮素预处理后, AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬得到激活。另外,肾上腺髓质素可能通过 AMPK/mTOR 轴激活自噬,从而保护间质细胞的甾体生成功能,防止细胞焦亡<sup>[19]</sup>;阻碍 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬能够促进小鼠非酒精性脂肪肝<sup>[20]</sup>。为进一步探究槲皮素是通过 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬发挥肝缺血再灌注损伤的保护作用,本研究通过采用自噬抑制剂氯喹单独及槲皮素和氯喹联合预处理肝缺血再灌注大鼠,发现大鼠肝组织病理损伤程度介于槲皮素和氯喹单独干预之间; ALT 和 AST 水平、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平比槲皮素单独干预升高,比氯喹单独干预降低,肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平比槲皮素单独干预降低,比氯喹单独干预升高,提示槲皮素改善肝缺血再灌注大鼠肝损伤的作用可被氯喹逆转,进一步说明槲皮素减轻肝缺血再灌注大鼠肝损伤的作用机制与激活 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬有关。

综上所述,槲皮素预处理可能通过激活肝缺血再灌注大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬,缓解肝损伤。但是自噬涉及的信号通路较多且肝缺血再灌注的作用机制较为复杂,槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠的保护作用,是否还涉及自噬相关的其他信号通路,尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 张北平, 翟淑萍, 苑伟, 等. 茵陈蒿汤联合加味大柴胡汤对肝缺血再灌注损伤大鼠的影响 [J]. 中国医学导报, 2018, 15(30): 15-18.
- [2] 宋斯佳, 罗森. 自噬在呼吸系统疾病中的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(78): 44-45.
- [3] 杨龙灿, 张旭阳, 潘宁波, 等. 雷帕霉素在肝脏缺血再灌注

- 损伤中对自噬相关蛋白 ULK1, LC3 表达的影响 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2261-2265.
- [ 4 ] Liu H, Dong J, Song S, et al. Spermidine ameliorates liver ischaemia-reperfusion injury through the regulation of autophagy by the AMPK-mTOR-ULK1 signalling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 227-233.
- [ 5 ] Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, et al. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of quercetin in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(1): 1-8.
- [ 6 ] 王甲甲, 钟佳伶, 张娟, 等. 槲皮素对缺血再灌注大鼠肝脏损伤的保护作用 [J]. 山东医药, 2015, 5(22): 22-24.
- [ 7 ] 叶苗, 刘丽仙, 梁晓美. 槲皮素对大鼠肾缺血再灌注损伤模型的保护作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 1(12): 1041-1043.
- [ 8 ] 陈铭欣, 杜洪印, 喻文立, 等. 自噬在氢抑制原位肝移植术大鼠海马神经元凋亡中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(2): 184-187.
- [ 9 ] 马志勇, 李雪平, 侯振宇, 等. 七氟烷通过 JAK2-sTAT3 通路对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响 [J]. 局解手术学杂志, 2020, 29(9): 693-697.
- [ 10 ] Donadon M, Molinari AF, Corazzi F, et al. Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during pringle maneuver in hepatic surgery a prospective randomized pilot study [J]. *World J Surg*, 2016, 40(9): 2202-2212.
- [ 11 ] Olthof PB, van Golen RF, Meijer B, et al. Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2): 375-385.
- [ 12 ] 何莹, 张季, 赵圆圆, 等. 老年大鼠肝脏缺血再灌注损伤抑制自噬的作用机理 [J]. 中华器官移植杂志, 2016, 37(11): 677-681.
- [ 13 ] 陈振华, 胡晓艳, 赵滕, 等. 槲皮素对心血管系统疾病的影响及其新剂型研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 440-443.
- [ 14 ] Li X, Zhou N, Wang J, et al. Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 196(1): 56-62.
- [ 15 ] Granato M, Rizzello C, Montani MSG, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41(1): 124-136.
- [ 16 ] Uylas MU, Şahin A, Şahintürk V, et al. Quercetin dose affects the fate of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats: An experimental research [J]. *Int J Surg*, 2018, 5(53): 117-121.
- [ 17 ] He Y, Cao X, Guo P, et al. Quercetin induces autophagy via FOXO1-dependent pathways and autophagy suppression enhances quercetin-induced apoptosis in PASMCs in hypoxia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 2(103): 165-176.
- [ 18 ] Wang Q, Wei S, Zhou S, et al. Hyperglycemia aggravates acute liver injury by promot liver-resident macrophage NLRP3 inflammasome activation via the inhibition of AMPK/mTOR-mediated autophagy induction [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98(1): 54-66.
- [ 19 ] Li MY, Zhu XL, Zhao BX, et al. Adrenomedullin alleviates the pyroptosis of Leydig cells by promoting autophagy via the ROS-AMPK-mTOR axis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 489-509.
- [ 20 ] Lu W, Mei J, Yang J, et al. ApoE deficiency promotes non-alcoholic fatty liver disease in mice via impeding AMPK/mTOR mediated autophagy [J]. *Life Sci*, 2020, 252(1): 1-10.

[ 收稿日期 ] 2021-01-18

卢迎宏, 王丹, 井海云, 等. 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和纤维化 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 23-30.

Lu YH, Wang D, Jing HY, et al. Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 23-30.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.004

## 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠 氧化应激和纤维化

卢迎宏, 王丹, 井海云\*, 王梦超, 李智慧

(郑州大学附属郑州中心医院心血管内科, 郑州 450007)

**【摘要】** 目的 文章探讨胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化的影响。方法 SD 雄性大鼠分为假手术组、模型组、模型加药组。检测并记录各组大鼠心率(HR)、左室收缩压(LVSP)和短轴缩短率(FS)。HE染色观察心肌病理损伤程度。ELISA检测肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌红蛋白(Mb)和心肌肌钙蛋白I(cTnI)含量。试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量。Western blot检测线粒体途径凋亡相关蛋白和纤维化标记蛋白表达水平。Masson染色观察心肌组织纤维化。RT-PCR检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和纤维结合蛋白(FN)表达水平。结果 与模型组比, 3、6 U/kg PKase组大鼠HR、LVSP和FS显著升高( $P < 0.05$ ), 心肌组织病理损伤明显改善, CK-MB、Mb、cTnI和MDA含量显著降低( $P < 0.05$ ), SOD和GSH含量升高( $P < 0.05$ ), 心肌纤维化程度明显得到改善, Bax/Bcl-2、cas-9、cas-3、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、FN表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。结论 胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化。

**【关键词】** 胰激肽原酶; 心肌缺血再灌注; 氧化应激; 纤维化

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0023-08

## Pancreatic kininogenase relieves oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury

LU Yinghong, WANG Dan, JING Haiyun\*, WANG Mengchao, LI Zhihui

(Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of pancreatic kininogenase on myocardial injury, oxidative stress, and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** SD rats were divided into sham, model and drug-treated groups. The heart rate (HR), left ventricular systolic pressure (LVSP), and short-axis contraction rate (FS) of rats were measured in each group. HE staining was used to detect myocardial pathological lesions. ELISA were used to detect the contents of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), myoglobin (Mb) and cardiac troponin I (cTnI). Assay kits were used to detect the contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH). Western blot was used to assay the expression levels of mitochondrial pathway apoptosis-related and fibrosis marker proteins. Masson staining was used to observe myocardial tissue fibrosis. RT-PCR was used to assay the expression levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and fibronectin (FN). **Results** Compared with the model group, HR, LVSP and FS in 3 and 6 U/kg PKase groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), pathological damage of myocardial tissue was significantly improved, the contents of CK-MB, Mb, MDA and cTnI were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), SOD and GSH contents were increased ( $P < 0.05$ ), the degree of myocardial fibrosis was significantly improved, Bax/Bcl-2, cas-

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(2017T02093)。

[作者简介] 卢迎宏(1980—), 女, 本科, 副主任医生, 研究方向: 心血管内科, 心力衰竭。E-mail: luyinghong2020@163.com

[通信作者] 井海云(1966—), 女, 本科, 主任医生, 研究方向: 心内科。E-mail: zjf-lyh@163.com

9, cas-3,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 and FN levels were reduced significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Pancreatic kininogenase relieves myocardial injury, oxidative stress and fibrosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury.

**【Keywords】** pancreatic kininogenase; myocardial ischemia reperfusion; oxidative stress; fibrosis

心肌缺血再灌注损伤是指心肌缺血一定时间后得到正常灌注,心肌组织损伤却呈进行性加重的病理过程,严重时可导致猝死<sup>[1-2]</sup>。研究表明,心肌缺血再灌注损伤是由心肌组织细胞中大量产生氧自由基、钙离子超负荷及白细胞的炎症作用等所引起的,具体的发病机制有待进一步研究<sup>[3]</sup>。目前,临床上治疗心肌缺血再灌注损伤的方法主要有基因治疗、缺血后适应治疗和药物靶向治疗等<sup>[4-6]</sup>。药物靶向治疗在心肌缺血再灌注损伤中的应用已见成效,例如他汀类药物、降糖药、促红细胞生成素等<sup>[7]</sup>。胰激肽原酶(PKase)又称胰激肽释放酶,是哺乳动物胰腺等器官中提取的一种蛋白水解酶,具有血管舒张、改善血液循环和微循环、防止血栓形成等作用。已有研究报道,胰激肽原酶在糖尿病肾病中发挥抗氧化应激、抗炎反应及抗组织纤维化等重要调控作用<sup>[8-9]</sup>,但胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤中的作用尚不知晓。因此,本研究通过建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型,探究胰激肽原酶在大鼠心肌损伤、心肌氧化应激和纤维化中的作用,为心肌缺血再灌注损伤的临床诊断与治疗提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

50 只无特定病原体(SPF)级 SD 大鼠,雄性,6~7 周龄,体重 220~250 g。由河南省实验动物中心提供[SCXK(豫)2017-0001],本研究所有动物实验操作完全遵守实验动物伦理保护法及 3R 原则,并经郑州中心医院相关动物实验伦理委员会批准通过(ZXYY20200703)。实验动物饲养于郑州大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0008],动物饲养条件:每只大鼠给予 12 h 光照/黑暗循环,自由获取水和标准饮食,(20±2)℃和(60±5)%湿度环境下饲养。

### 1.2 主要试剂与仪器

胰激肽原酶(高纯,50 U/mg)购自上海源叶生物科技有限公司(货号 S10219);HE 试剂盒(C0105S)购自碧云天生物科技有限公司;大鼠肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)(ml059533)、肌红蛋白(Mb)(ml003054)、心肌肌钙蛋白 I(cTn-I)(ml003145)ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技

有限公司;SOD(A001-3-2)、MDA(A003-1-2)和 GSH(A005-1-2)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司;Masson 染色试剂盒(G1340)、BCA 蛋白定量试剂盒(PC0020)、PT-PCR 试剂盒(RP1100)均购自北京索莱宝科技有限公司;Bax(ab32503)、Bcl-2(ab182858)、cas-9(ab184786)、cas-3(ab184786)、 $\alpha$ -SMA(ab124964)、TGF- $\beta$ 1(ab215715)和 FN(ab268020)兔单克隆抗体和 HRP 标记的对应二抗均购自英国 Abcam 公司。

心脏超声诊断仪(Vivid7)购自美国 GE 公司;ABI7500 Real-time PCR 系统(Applied Biosystems);酶标仪(RT6100)购自深圳雷杜生命科学股份有限公司;台式高速离心机(D3024R)购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;成像系统(Tanon-1600R)购自上海天能科技有限公司,光学显微镜(Nikon Eclipse E100)购自日本尼康公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 动物实验

50 只大鼠随机分为假手术组、模型组、模型加药组共 5 组( $n = 10$ )。建模:模型组和模型加药组大鼠采用左冠状动脉前降支结扎法建立心肌缺血再灌注大鼠模型。动物实验前禁食 12 h,腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,随后将大鼠仰卧位固定于实验板上,用 4 根电极银针支住大鼠四肢,用 MS4000U-1C 型生物信号定量记录分析系统检测大鼠心电图,气管插管后用呼吸机辅助大鼠呼吸。在大鼠胸骨第 3、4 肋骨间做开胸切口手术,暴露大鼠心脏,于冠状动脉左前降支根部用带线缝合针穿深度约 1 mm,宽度 1.8 mm 备用结扎,缺血 30 min 后再灌注 60 min 建立心肌缺血再灌注大鼠模型,以左室前壁紫绀及 ST 段抬高,QRS 幅度升高即为手术成功,ST 段逐渐降低,左室前壁缺血区紫绀消失标志再灌注成功,假手术组只穿线不结扎。模型加药组建模前参考文献<sup>[10]</sup>分别腹腔注射 1.5、3、6 U/kg 胰激肽原酶,持续给药 5 周(每天 1 次)。记录各组大鼠心率(HR)、左室收缩压(LVSP)和短轴缩短率(FS),每组 20 只。术后 12 h 收集各组大鼠尾静脉血,然后实施安乐死,收集心脏组织用于后续实验。

1.3.2 HE 染色观察心肌病理损伤

取 4% 多聚甲醛固定的心肌组织,经石蜡包埋切片、脱蜡、水化后,行 HE 染色;光镜下拍照并观察记录组织形态学变化。

1.3.3 ELISA 检测心损标记物含量水平

取 100  $\mu$ L 尾静脉血,于 3000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清,按 ELISA 试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 CK-MB、Mb、cTnI 含量。

1.3.4 试剂盒检测氧化应激指标

严格按照 SOD、MDA 和 GSH 检测试剂盒测定各组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量。

1.3.5 Western blot 检测线粒体损伤标记蛋白表达水平

从液氮中取出大鼠心肌组织,于室温下解冻后用手术剪将组织剪切成小块并置于匀浆研磨仪中研磨均匀。用 RIPA 蛋白裂解液于冰上提取总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白总浓度,每孔上样 20  $\mu$ g,经 SDS-PAGE 电泳分离、转膜、脱脂奶粉封闭后,加入一抗(1:1000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,第 2 天回收一抗并加入 HRP 标记的对应二抗(1:5000),室温孵育 2 h。用 ECL 化学发光试剂于暗室下曝光显影,将胶片扫描存档整理去色后,分析并计算各组大鼠蛋白相对表达量,蛋白相对表达量为目标条带和内参条带(ACTIN)比值表示。独立重复实验 3 次取平均值。

1.3.6 Masson 染色观察心肌组织纤维化程度

取 4% 多聚甲醛固定的心肌组织,按照 Masson 试剂盒说明书进行大鼠心肌组织 Masson 染色。蓝色代表胶原纤维,红色代表肌纤维。

1.3.7 RT-PCR 检测  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN mRNA 表达水平

取液氮中保存的大鼠心肌组织约 80 mg,温室下解冻组织,超声研磨均匀后在 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 条件下离心 15 min,用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA 并测定 RNA 浓度和纯度。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA,按 RT-PCR 试剂盒操作说明配制反应体系。在 PCR 扩增仪上进行扩增(扩增条件:保持步骤 96 $^{\circ}$ C 15 s,40 个周期,95 $^{\circ}$ C 10 s 和 60 $^{\circ}$ C 30

s),以目的基因和内参比值表示 mRNA 表达水平,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析结果。重复实验 3 次,结果取平均值。引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件分析,数据表示为平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )。采用单因素方差进行组间比较,若方差齐则两两比较采用 LSD 法,若方差不齐则两两比较采用 Dunnett-*t* 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠 HR、LVSP 和 FS 的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 HR、LVSP 和 FS 均显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠 HR、LVSP 和 FS 均无明显差异( $P > 0.05$ ),3、6 U/kg PKase 组大鼠 HR、LVSP 和 FS 升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。结果提示,胰激肽原酶缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏功能。

2.2 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌病理损伤的影响

HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理损伤程度,如图 2 所示,假手术组大鼠心肌组织结构正常,排列规则,未见炎性细胞浸润。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织结构紊乱,心肌细胞肿大,可见大量肌纤维断裂和炎性细胞浸润。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组仍然可见大量断裂的心肌纤维和炎性细胞浸润,3 U/kg PKase 组大鼠心肌细胞中可见少量炎性细胞浸润,未见断裂的心肌纤维和水肿变性的肌细胞。6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织排列规则,仅见极少的炎性细胞浸润,未见断裂的心肌纤维和肿胀变性的肌细胞。结果提示,胰激肽原酶改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织病理损伤。

2.3 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心损标记物含量的影响

ELISA 检测各组大鼠心损标记物 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量(见表 2),与假手术组比较,模型组大

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer	下游引物(5'-3') Reverse primer
$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 $\alpha$ -SMA	GAAGAGTTACGATTGCCTGATG	ATGATGCTGTTGTAGGTGTTTC
转化生长因子- $\beta$ 1 TGF- $\beta$ 1	TGCCCTCTACAACCAACACAACCCG	AACTGTCCACCTTGGCGTTGCCA
纤维结合蛋白 FN	CACCCAGTATTCTCAGAGATTAC	CTGTCAGCCTGTACATCTAAAG
肌动蛋白 Actin	AGCGGGAATTCTGCGTGC	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量无明显变化( $P>0.05$ ),3、6 U/kg PKase 组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量显著降低( $P<0.05$ )。结果提示,胰激肽原酶能够改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌功能。

#### 2.4 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 SOD 和 GSH 含量明显降低,MDA 含量升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量无明显差异( $P>0.05$ ),3、6 U/kg PKase 组大鼠血清中 SOD 和 GSH 含量升高,MDA 含量降低,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠氧化应激水平。

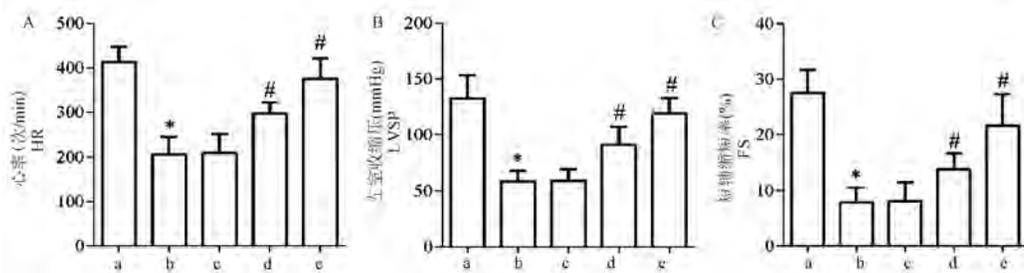
#### 2.5 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cleaved cas9/cas9 和 cleaved cas3/cas3 蛋白水

平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中蛋白水平无明显差异( $P>0.05$ ),3、6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cleaved cas9/cas9 和 cleaved cas3/cas3 蛋白水平显著降低( $P<0.05$ ),见图 4。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能损伤。

#### 2.6 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌纤维和炎症因子的影响

如图 5 所示,假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,染色均匀,未见炎症细胞浸润且间质内无增生纤维。与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞排列紊乱,间质内充满大量、均匀的蓝色纤维网,部分纤维断裂,可见炎症细胞浸润。与模型组大鼠比较,1.5 U/kg PKase 组大鼠仍可见大量炎症细胞浸润,间质内蓝色纤维网稍有减轻。3 U/kg PKase 组增生的蓝色纤维网明显减少,可见少量炎症细胞浸润,6 U/kg PKase 组大鼠间质内增生的蓝色纤维网显著减少或消失,仅可见极少的纤维条,心肌细胞中未见炎症细胞浸润。结果提示,胰激肽原酶能够改善心肌缺血再灌注大鼠心肌纤维化。

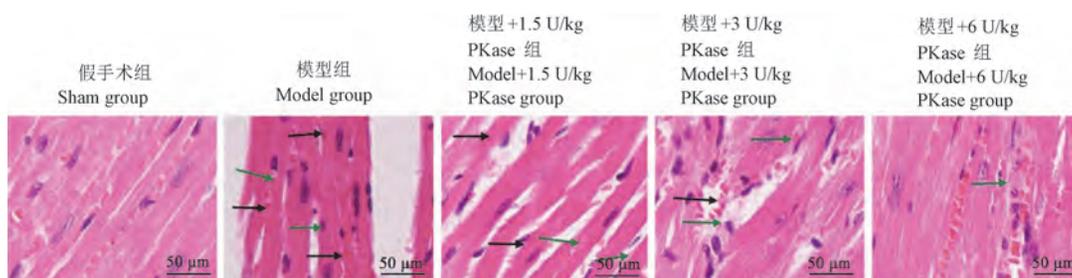


注:a:假手术组;b:模型组;c:模型+1.5 U/kg PKase 组;d:模型+3 U/kg PKase 组;e:模型+6 U/kg PKase 组。与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠 HR、LVSP 和 FS( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Note. a, Sham group. b, Model group. c, Model+1.5 U/kg PKase group. d, Model+3 U/kg PKase group. e, Model+6 U/kg PKase group. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ .

Figure 1 HR, LVSP and FS of rats in each group



注:心肌纤维被染成淡红色,细胞核呈蓝紫色,黑色箭头表示炎症浸润细胞,绿色箭头表示断裂纤维。

图 2 各组大鼠心肌组织 HE 染色

Note. Myocardial fibers are stained red, the nucleus is blue-purple, the black arrows indicate inflammatory infiltrating cells, and the green arrows indicate broken fibers.

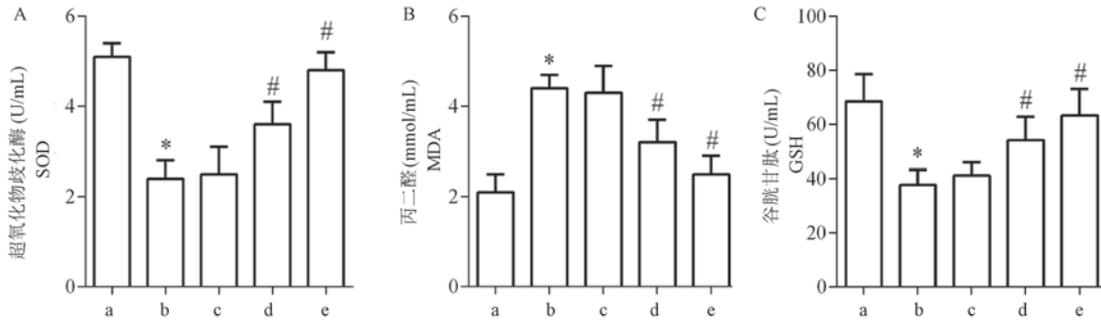
Figure 2 HE staining of myocardial tissue of rats in each group

**表 2** 各组大鼠 CK-MB、Mb 和 cTnI 含量( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )  
**Table 2** Contents of CK-MB, Mb and cTnI in each group of rats

组别 Groups	肌酸激酶同工酶 (U/L) CK-MB	肌红蛋白 (ng/mL) Mb	心肌肌钙蛋白 I (ng/mL) cTnI
假手术组 Sham group	20.42 ± 4.13	26.17 ± 5.06	0.11 ± 0.03
模型组 Model group	119.66 ± 21.24*	138.16 ± 18.45*	0.68 ± 0.09*
模型+1.5 U/kg PKase 组 Model+1.5 U/kg PKase group	117.78 ± 19.32	136.43 ± 19.54	0.67 ± 0.07
模型+3 U/kg PKase 组 Model+3 U/kg PKase group	79.64 ± 14.58#	91.06 ± 20.42#	0.43 ± 0.08#
模型+6 U/kg PKase 组 Model+6 U/kg PKase group	31.43 ± 6.21#	48.22 ± 7.34#	0.17 ± 0.06#

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

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

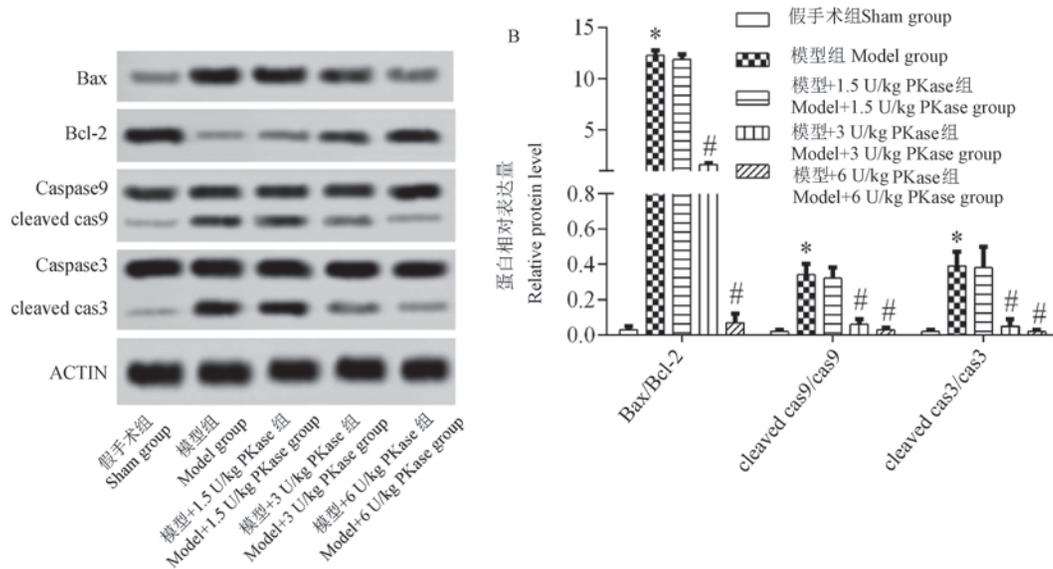


注:a:假手术组;b:模型组;c:模型+1.5 U/kg PKase 组;d:模型+3 U/kg PKase 组;e:模型+6 U/kg PKase 组。与假手术组相比, \* $P<0.05$ ;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

**图 3** 各组大鼠血清中 SOD、MDA 和 GSH 含量( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Note. a, Sham group. b, Model group. c, Model+1.5 U/kg PKase group. d, Model+3 U/kg PKase group. e, Model+6 U/kg PKase group. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ .

**Figure 3** Contents of SOD, MDA and GSH in serum of rats in each group



注:A:Western blot 检测线粒体损伤标记物蛋白表达;B:蛋白相对表达量。与假手术组相比, \* $P<0.05$ ;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

**图 4** 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体功能的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

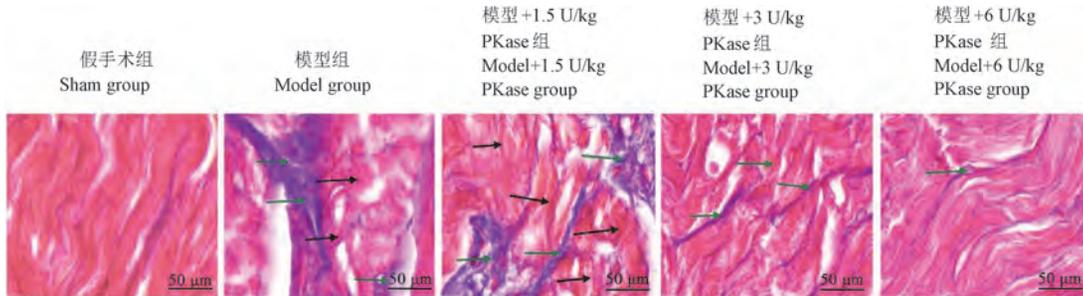
Note. A, Detection of mitochondrial damage marker protein expression by Western blot. B, Relative protein expression level. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ .

**Figure 4** Effect of pancreatic kininogenase on mitochondrial function in rats with myocardial ischemia reperfusion injury

2.7 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠纤维化标记蛋白水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN mRNA 和蛋白水平均显著上调( $P<0.05$ )。与模型组比较,1.5 U/kg PKase 组大

鼠  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN 在 mRNA 和蛋白水平均无明显差异( $P>0.05$ ),3、6 U/kg PKase 组大鼠心肌组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN mRNA 和蛋白水平均显著下调( $P<0.05$ ),见图 6。结果提示,胰激肽原酶能够缓解心肌缺血再灌注大鼠心肌组织纤维化。

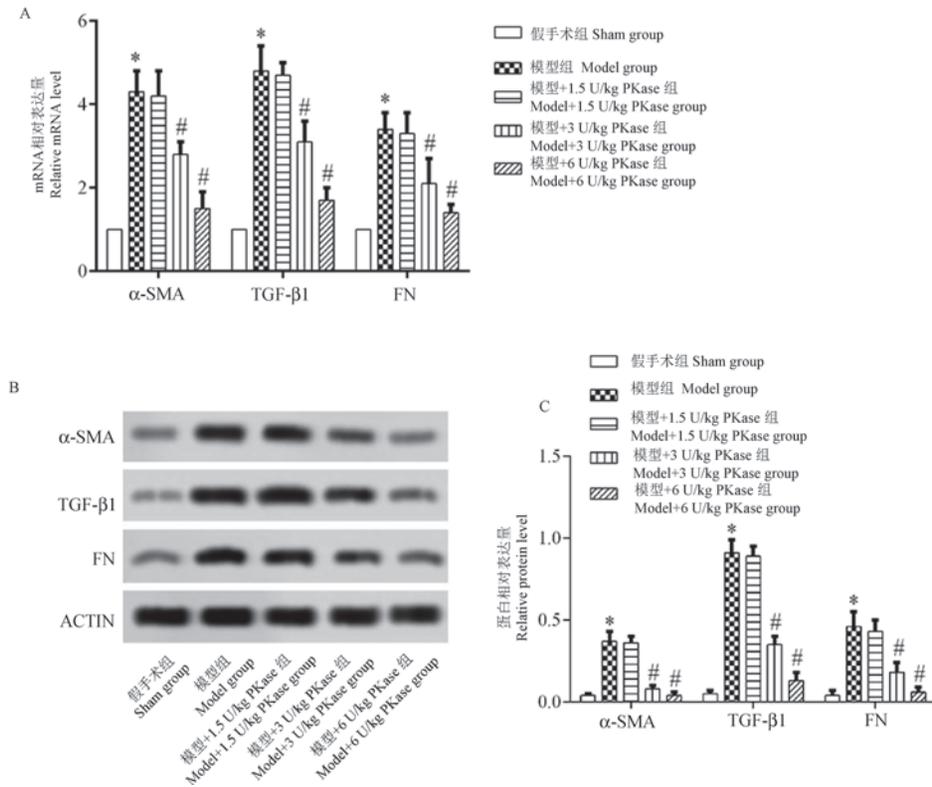


注:心肌纤维被染成红色,胶原纤维被染成蓝色,黑色箭头表示炎性浸润,绿色箭头表示胶原纤维。

图 5 心肌组织 Masson 染色

Note. Myocardial fibers are dyed red, collagen fibers are dyed blue, black arrows indicate inflammatory infiltration, and green arrows indicate collagen fibers.

Figure 5 Masson staining of myocardial tissue



注:A:RT-PCR 检测  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN mRNA 水平;B:Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN 蛋白水平;C:蛋白相对表达量。与假手术组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图 6 胰激肽原酶对心肌缺血再灌注损伤大鼠纤维化标记蛋白水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. A, mRNA levels of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 and FN were detected by RT-PCR. B, Protein levels of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 1 and FN were detected by Western blot. C, Relative protein expression level. Compared with sham group, \* $P<0.05$ . Compared with the model group, # $P<0.05$ .

Figure 6 Effect of pancreatic kallikrein on the level of fibrosis marker protein in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury

### 3 讨论

心肌缺血再灌注发生前会产生大量的氧自由基,从而引起心肌纤维化和心肌损伤,心脏功能障碍等<sup>[11]</sup>。因此,及时清除氧自由基和降低心肌纤维水平能够有效缓解心肌损伤和心脏功能。Xie 等<sup>[12]</sup>发现,心肌缺血再灌注大鼠血清 CK-MB、Mb 和 cTnI 水平明显升高, $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN 含量极高,SOD 和 GSH 含量降低,MDA 含量升高,经给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤明显好转,氧化应激和炎症水平降低,纤维化程度得到改善。本研究结果发现,经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心脏功能明显好转,心肌病理损伤得到改善,心肌氧化应激、纤维化水平降低。因此,胰激肽原酶通过降低心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌氧化应激和纤维化水平缓解大鼠心肌损伤。

本研究前期检测了各组大鼠心脏功能、心肌病理损伤程度和心肌损伤标记物含量水平,结果显示,模型组大鼠 HR、LVSP、FS 明显低下,心肌病理损伤严重,CK-MB、Mb 和 cTnI 含量极高。经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心脏功能显著得到改善,心肌病理损伤及损伤标记物含量减少。结果提示,胰激肽原酶对心肌缺血再灌注大鼠心脏功能、心肌损伤具有调控作用。为明确胰激肽原酶调控模型大鼠心肌功能的作用机制,本实验还检测了各组大鼠心肌组织中氧化应激和纤维化水平。

氧化应激发生积累的大量氧自由基促使心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞膜通透性增加,从而使得胞内的 SOD 释放到细胞外。同时,MDA 含量增加诱发机体发生脂质过氧化反应,最终破坏机体正常的氧化与抗氧化平衡状态,进一步加重心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤<sup>[13-17]</sup>。本实验显示,在模型组大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 含量明显降低,MDA 含量升高,经胰激肽原酶治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中 SOD 和 GSH 含量显著升高,MDA 含量降低。由于线粒体功能与氧化应激密切相关,若氧化应激水平极高,则会导致线粒体膜通透性增加及氧自由基的大量产生,使得线粒体肿胀、功能受损、细胞内钙离子超载,最终引起细胞死亡<sup>[18-20]</sup>。因此,线粒体损伤程度能够从侧面反应机体氧化应激水平及正常组织功能。本研究通过检测各组大鼠线粒体损伤标记物蛋白表达水平,结果

发现,经胰激肽原酶给药治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中 Bax/Bcl-2、cas-9、cas-3 水平显著降低,结合前期实验结果可知,胰激肽原酶可能通过调控模型大鼠心肌氧化应激水平改善大鼠心脏和线粒体功能,缓解心肌病理损伤。

$\alpha$ -SMA 是血管平滑肌细胞中的一种细胞骨架蛋白,与心肌细胞纤维化的发生发展有关,是肌成纤维细胞的特异性标志物<sup>[21]</sup>。TGF- $\beta$ 1 是新发现的调节细胞生长和分化的 TGF- $\beta$  超家族,具有抑制心肌细胞分化的作用<sup>[22]</sup>。FN 是心肌细胞外基质的主要结构蛋白之一,在心肌细胞粘附性和运动能力中发挥着重要作用<sup>[23]</sup>。本实验结果显示,经胰激肽原酶治疗后,心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 和 FN 表达水平显著降低,结果提示,胰激肽原酶通过降低心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织纤维化水平缓解大鼠心肌损伤。

综上所述,胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤、氧化应激和纤维化中具有调控作用。本实验从动物水平上初步说明胰激肽原酶在心肌缺血再灌注损伤中的调节作用,后续实验我们计划进一步探究胰激肽原酶的具体调节作用机制,为胰激肽原酶的临床应用及药物研发提供更加充分的理论依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Houang EM, Bartos J, Hackel BJ, et al. Cardiac muscle membrane stabilization in myocardial reperfusion injury [J]. JACC Basic Transl Sci, 2019, 4(2): 275-287.
- [ 2 ] Zhou H, He L, Xu G, et al. Mitophagy in cardiovascular disease [J]. Clin Chim Acta, 2020, 507: 210-218.
- [ 3 ] Manechote C, Palee S, Kerdphoo S, et al. Pharmacological inhibition of mitochondrial fission attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury in pre-diabetic rats [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 182: 114295.
- [ 4 ] 高亚松, 苏岩岩, 丁超. 急性 ST 段抬高型心肌梗死术前抗栓预处理对自发再灌注及短期预后的影响 [J]. 临床误诊误治, 2018, 31(1): 78-82.
- [ 5 ] 张世平, 王臻, 金梅梅, 等. 右美托咪定对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制 [J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(7): 7-11.
- [ 6 ] 黎仕焕, 李繁, 黄奕弟. 右美托咪定联合咪达唑仑对心肌缺血再灌注损伤大鼠的心肌保护作用研究 [J]. 临床误诊误治, 2019, 32(10): 103-108.
- [ 7 ] Naito H, Nojima T, Fujisaki N, et al. Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine [J]. Acute Med Surg, 2020, 7(1): e501.
- [ 8 ] Cheng Y, Yu X, Zhang J, et al. Pancreatic kallikrein protects

- against diabetic retinopathy in KK Cg-Ay/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(6): 1074–1086.
- [ 9 ] Pantano E, Marchi S, Biagini M, et al. NHBA is processed by kallikrein from human saliva [J]. *PLoS One*, 2020, 14(8): e0203234.
- [ 10 ] Jin JZ, Li HY, Jin J, et al. Exogenous pancreatic kininogenase protects against renal fibrosis in rat model of unilateral ureteral obstruction [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(12): 1597–1608.
- [ 11 ] 刘根, 张博方, 柳小佩, 等. 川皮苷对心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制研究 [J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(9): 1–6.
- [ 12 ] Xie D, Li M, Yu K, et al. Etomidate alleviates cardiac dysfunction, fibrosis and oxidative stress in rats with myocardial ischemic reperfusion injury [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1181.
- [ 13 ] Mokhtavi B, Azizi Y, Rostami Abookheili A, et al. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells-conditioned medium attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by targeting oxidative stress [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(11): 1453–1461.
- [ 14 ] Gong HJ, Lin JJ, Li H, et al. A study on protective effect of morphine against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via CAMP/PKA signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(5): 1669–1677.
- [ 15 ] 曾菲, 李强, 曾昇, 等. 氢溴酸加兰他敏介导 AMPK $\alpha$ 1/Nrf2/HO-1 通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(3): 337–343.
- [ 16 ] Ding M, Li M, Zhang EM, et al. Fullerol alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and oxidative stress in cardiomyocytes via activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9665–9674.
- [ 17 ] Dookun E, Walaszczyk A, Redgrave R, et al. Clearance of senescent cells during cardiac ischemia-reperfusion injury improves recovery [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(10): e13249.
- [ 18 ] Wang J, Zhou H. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1866–1879.
- [ 19 ] 何力, 秦超毅, 石峻, 等. 急性心肌梗死大鼠心肌细胞内质网应激和线粒体损伤的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(3): 350–354.
- [ 20 ] Greco V, Longone P, Spalloni A, et al. Crosstalk between oxidative stress and mitochondrial damage: focus on amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1158: 71–82.
- [ 21 ] 许陕陕, 李沙, 张夏霞, 等. 非诺贝特治疗单侧输尿管结扎小鼠肾纤维化的机制研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2020, 51(5): 670–674.
- [ 22 ] Su HH, Liao JM, Wang YH, et al. Exogenous GDF11 attenuates non-canonical TGF- $\beta$  signaling to protect the heart from acute myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3): 20.
- [ 23 ] Lu L, Ma J, Tang J, et al. Irisin attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction by regulating ER-mitochondria interaction through a mitochondrial ubiquitin ligase-dependent mechanism [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(5): e166.

[收稿日期]2021-01-14

黄虹, 黄蝶, 王瑞杰, 等. 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 31-37.

Huang H, Huang D, Wang RJ, et al. Capsaicin inhibits invasion and migration of colon cancer cells by upregulating MTSS1 expression [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 31-37.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.005

## 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的实验研究

黄虹<sup>1</sup>, 黄蝶<sup>2</sup>, 王瑞杰<sup>3</sup>, 余壮明<sup>4\*</sup>

(1.海南医学院第一附属医院介入血管外科,海口 570102;2.海南医学院第一附属医院血液透析科,海口 570102;  
3.海南医学院第一附属医院眼科,海口 570102;4.海南医学院第一附属医院普通外科,海口 570102)

**【摘要】** 目的 探究辣椒素通过上调肿瘤转移抑制因子 1 (MTSS1) 抑制结肠癌细胞侵袭、迁移的机制。方法 实验 1: 10、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组分别加入终浓度为 10、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素, 对照组不添加辣椒素, 恒温箱中培养 24 h; 实验 2: 对照组正常培养, 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组添加终浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素, 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组在 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组的基础上分别添加终浓度为 50 nmol/L 对照 siRNA、MTSS1 siRNA, 转染 4 h 更换为终浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素培养液。CCK8 检测细胞增殖情况; Transwell 检测细胞侵袭情况; 划痕实验检测细胞迁移情况; 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测细胞中辣椒素受体 (TRPV1)、MTSS1、基质金属蛋白酶 (MMP)-2、MMP-9 蛋白水平。结果 不同浓度辣椒素处理细胞发现, 与对照组相比, 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组细胞增殖抑制率升高, 10、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组细胞中 TRPV1、MTSS1 蛋白水平升高, 细胞侵袭数量、迁移百分比、细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ )。干扰 MTSS1 并添加 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素发现, 与对照组相比, 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞侵袭数量、迁移百分比、细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低, 细胞中 MTSS1 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ); 分别与 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组相比, 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞侵袭数量、迁移百分比、细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白水平升高, 细胞中 MTSS1 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ )。结论 辣椒素通过上调 MTSS1 表达抑制结肠癌细胞侵袭、迁移, 从而起到对结肠癌的保护作用。

**【关键词】** 辣椒素; 肿瘤转移抑制因子 1; 结肠癌细胞; 侵袭; 迁移

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0031-07

### Capsaicin inhibits invasion and migration of colon cancer cells by upregulating MTSS1 expression

HUANG Hong<sup>1</sup>, HUANG Die<sup>2</sup>, WANG Ruijie<sup>3</sup>, YU Zhuangming<sup>4\*</sup>

(1. Department of Interventional Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China. 2. Department of Hemodialysis, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102. 3. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102. 4. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102)

**【基金项目】** 海南省自然科学基金项目 (812201)。

**【作者简介】** 黄虹 (1987—), 女, 本科, 医师, 研究方向: 介入。E-mail: hhnmail@163.com

**【通信作者】** 余壮明 (1969—), 男, 本科, 主任医师, 研究方向: 普通外科。E-mail: yuzhuangm@sina.com

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of capsaicin in inhibiting the invasion and migration of colon cancer cells by upregulating tumor metastasis suppressor 1 (MTSS1). **Methods** Experiment 1: 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin groups were treated with capsaicin, whereas the control group was untreated and cultured at a constant temperature for 24 hours. Experiment 2: the control group was cultured normally, the 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin group was treated with 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin, 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+control siRNA and 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+MTSS1 siRNA groups were treated with 50 nmol/L control siRNA and MTSS1 siRNA, respectively, based on the 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin group. After transfection for 4 h, 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin-containing culture medium was added. Cell proliferation was assessed by CCK8 assays. Cell invasion was assessed by Transwell assays. Cell migration was assessed by a scratch test. The protein levels of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), MTSS1, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 were measured by Western blot. **Results** After treatment with capsaicin at various concentrations, compared with the control group, cell proliferation in 25, 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin groups was higher, the protein levels of TRPV1 and MTSS1 in 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin groups were higher, and cell invasion, the percentage of migrated cells and the protein levels of MMP-2 and MMP-9 were lower ( $P<0.05$ ). After RNA interference of MTSS1 and addition of 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin, compared with the control group, cell invasion, the percentage of migrated cells, and the protein levels of MMP-2 and MMP-9 were lower in 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin, 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+control siRNA, 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+MTSS1 siRNA groups ( $P<0.05$ ), and the protein level of MTSS1 was higher ( $P<0.05$ ). Compared with 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin and 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+control siRNA groups, cell invasion, the percentage of migrated cells, the protein levels of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in the 100  $\mu\text{mol/L}$  capsaicin+MTSS1 siRNA group and the level of MTSS1 protein was lower ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Capsaicin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by upregulating the expression of MTSS1, thereby exerting a protective effect against colon cancer.

**【Keywords】** capsaicin; tumor metastasis suppressor 1; colon cancer cells; invasion; migration

结肠癌作为消化道常见肿瘤,在中国其发病率仅次于肺癌和胃癌,位于第3,早期症状不明显,与肠炎等良性疾病易混淆,发现时已至晚期,且发病趋于年轻化,危害严重<sup>[1]</sup>。目前治疗结肠癌常见药物为奥沙利铂,但该药物对血液、神经系统会产生毒性,不能长期使用<sup>[2]</sup>,因此,寻找安全有效且毒性副作用均低的药物对于治疗尤为重要。辣椒素在临床上应用有数十年,是辣椒中具有辛辣刺激性的复合物,具有镇痛、抗炎、抗肿瘤、抗肥胖、保护心脏等多项作用,且对肿瘤的作用越来越受到重视<sup>[3]</sup>。辣椒素作为潜在的新型治疗药物在人类癌症中有一定应用,具有抗增殖、诱导细胞凋亡和自噬、抗血管生成和抗转移等作用<sup>[4]</sup>。肿瘤转移抑制因子1 (metastasis suppressor1, MTSS1)作为细胞间连接,参与肌动蛋白介导的细胞核形成与细胞间微丝分支稳定性,可降低肿瘤的迁移、浸润能力<sup>[5]</sup>。在乳腺癌中研究发现,辣椒素可以上调 MTSS1、下调基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMP)-2、MMP-9,实现对肿瘤的抑制<sup>[6]</sup>,但在结肠癌中尚无发现相关研究。因此,本文以人结肠癌细胞 HCT116 作为研究对象,探讨辣椒素对细胞侵袭、迁移的影响,并初步探讨其机制,为临床上辣椒素对结肠癌的治疗提供一定参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

人结肠癌细胞 HCT116 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,目录号:TCHu99。

### 1.2 主要试剂与仪器

辣椒素购自美国 Sigma 公司,货号:M1022-50M;引物由上海吉凯基因技术有限公司合成;Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 购自美国 invitrogen 公司,货号:11668019;CCK8 试剂盒购自广州佳研生物科技有限公司,货号:MA0218-15;结晶紫染色液购自上海碧云天公司,货号:C0121;一抗辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)、MTSS1、MMP-2、MMP-9 购自英国 abcam 公司,货号分别为:ab6166、ab204127、ab92536、ab228402。Transwell 小室购自 Costar 公司,型号:3460;全自动酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,型号:Model 680;蛋白凝胶成像仪购自上海 Tanon 公司,型号:Tanon2500。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

HCT116 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温箱中培养,2~3 d 更换 1 次培养液,细胞密度长至 90% 时传代,细胞生长至对数期实验。

### 1.3.2 siRNA 引物设计

Whitehead siRNA Selection Web Server 在线设计, MTSS1 siRNA: 5'-GGTCTGATTACAGCTGGT-3'、对照 siRNA: 5'-UACAGACCCUCGAUCGGUTT-3'。

### 1.3.3 细胞分组

HCT116 细胞参考文献<sup>[7]</sup>处理并进行预实验。实验 1: 10、25、50、100 μmol/L 辣椒素组(10、25、50、100 μmol/L capsaicin group)分别加入终浓度为 10、25、50、100 μmol/L 辣椒素, 对照组(control group)不添加辣椒素, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养 24 h; 实验 2: 对照组(control group)、100 μmol/L 辣椒素组(100 μmol/L capsaicin group)、100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组(100 μmol/L capsaicin+control siRNA group)、100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组(100 μmol/L capsaicin+MTSS1 siRNA group)、100 μmol/L 辣椒素组添加终浓度为 100 μmol/L 辣椒素; 100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组、100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组在 100 μmol/L 辣椒素组的基础上分别添加终浓度为 50 nmol/L 对照 siRNA、MTSS1 siRNA(参照 Lipofectamine™ 2000 说明书转染), 转染 4 h 更换为终浓度为 100 μmol/L 辣椒素培养液, 对照组正常培养 24 h。CCK8 检测细胞增殖情况; Transwell 检测细胞侵袭情况; 划痕实验检测细胞迁移情况; 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测细胞中 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平。

### 1.3.4 CCK8 检测细胞增殖情况

各组细胞在 96 孔板中处理 24 h, 加入 CCK8 继续培养 2 h, 全自动酶标仪测定 450 nm 波长下各孔吸光度(optical density, OD), 增殖抑制率=(对照孔 OD<sub>450</sub>-实验孔 OD<sub>450</sub>)/对照孔 OD<sub>450</sub>×100%, 6 个重复孔。

### 1.3.5 Transwell 检测细胞侵袭情况

各组细胞在 24 孔板中处理 24 h, 收集细胞, 无胎牛血清培养液稀释成每毫升 1×10<sup>4</sup> 个的单细胞悬

液, Transwell 小室经基质胶上下包被后放入 24 孔板中, 小室下层加 500 μL 完全培养液, 上层加 500 μL 单细胞悬液, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 结晶紫染色后显微镜拍照并计数。

### 1.3.6 划痕实验检测细胞迁移情况

各组细胞在 6 孔板中处理 24 h, 去培养液, PBS 清洗细胞, 划痕后立即拍照, 添加 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 培养 48 h 拍照, Image J 检测细胞迁移情况。迁移百分比=(0 h 划痕面积-48 h 划痕面积)/0 h 划痕面积×100%。

### 1.3.7 Western blot 检测细胞中 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达情况

各组细胞在 6 孔板中处理 24 h, 添加蛋白裂解液冰上裂解细胞 10 min, 10000 r/min 4℃ 离心 20 min, 上清为总蛋白, BCA 蛋白试剂盒测定总蛋白浓度。每孔上样 20 μg, 聚丙烯酰胺凝胶电泳浓缩胶、分离胶分离蛋白, NC 膜转膜后, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加对应一抗 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9, 4℃ 孵育过夜, 洗涤后添加对应二抗常温下孵育 2 h。DAB 显色试剂盒显色, 蛋白凝胶成像仪拍照和定量分析。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK-*q* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 辣椒素对细胞增殖的影响

与对照组相比, 25、50、100 μmol/L 辣椒素组细胞增殖抑制率升高(*P*<0.05)。见表 1。

### 2.2 辣椒素对细胞侵袭的影响

与对照组相比, 10、25、50、100 μmol/L 辣椒素组细胞侵袭数量降低(*P*<0.05)。见表 1、图 1。

表 1 不同浓度辣椒素处理细胞增殖抑制率、侵袭数量、迁移百分比的比较(*n*=6)

Table 1 Comparison of cell proliferation inhibition rate, invasion number, and migration percentage at different concentrations of capsaicin

组别 Groups	增殖抑制率(%) Proliferation inhibition rate	细胞侵袭数量(个) Cell invasion number	迁移百分比(%) Migration percentage
对照组 Control group	0.00±0.00	34.16±4.16	84.16±6.15
10 μmol/L 辣椒素组 10 μmol/L capsaicin group	1.53±0.25	24.76±3.69*	56.86±5.48*
25 μmol/L 辣椒素组 25 μmol/L capsaicin group	16.49±1.16*	21.38±3.86*	46.85±4.88*
50 μmol/L 辣椒素组 50 μmol/L capsaicin group	34.46±4.56*	13.49±2.96*	36.48±5.49*
100 μmol/L 辣椒素组 100 μmol/L capsaicin group	39.46±5.18*	6.48±1.17*	24.46±4.44*

注: 与对照组相比, \**P*<0.05。

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

### 2.3 辣椒素对细胞迁移的影响

与对照组相比,10、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组细胞迁移百分比降低( $P<0.05$ )。见表 1、图 2。

### 2.4 辣椒素对细胞中 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平的影响

与对照组相比,10、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组细胞中 TRPV1、MTSS1 蛋白水平升高, MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低( $P<0.05$ )。见表 2、图 3。

### 2.5 干扰 MTSS1 对辣椒素处理细胞侵袭的影响

与对照组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素

+MTSS1 siRNA 组细胞侵袭数量降低( $P<0.05$ );分别与 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞侵袭数量升高( $P<0.05$ )。见图 4、表 3。

### 2.6 干扰 MTSS1 对辣椒素处理细胞迁移的影响

与对照组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞迁移百分比降低( $P<0.05$ );分别与 100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素组、100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+对照 siRNA 组相比,100  $\mu\text{mol/L}$  辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞迁移百分比升高( $P<0.05$ )。见图 5、表 3。

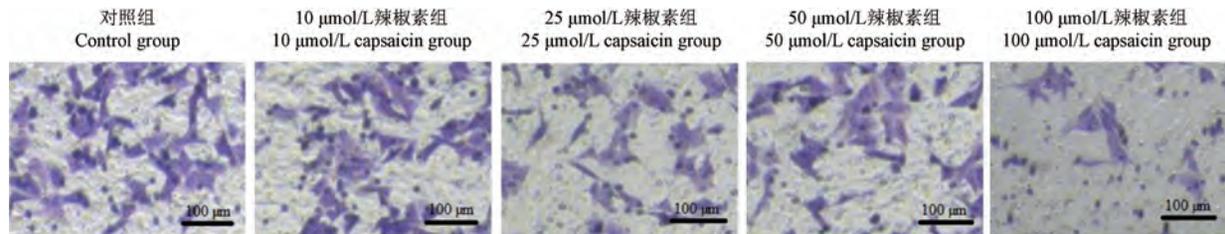


图 1 不同浓度辣椒素处理细胞侵袭情况

Figure 1 Invasion of cells at different concentrations of capsaicin

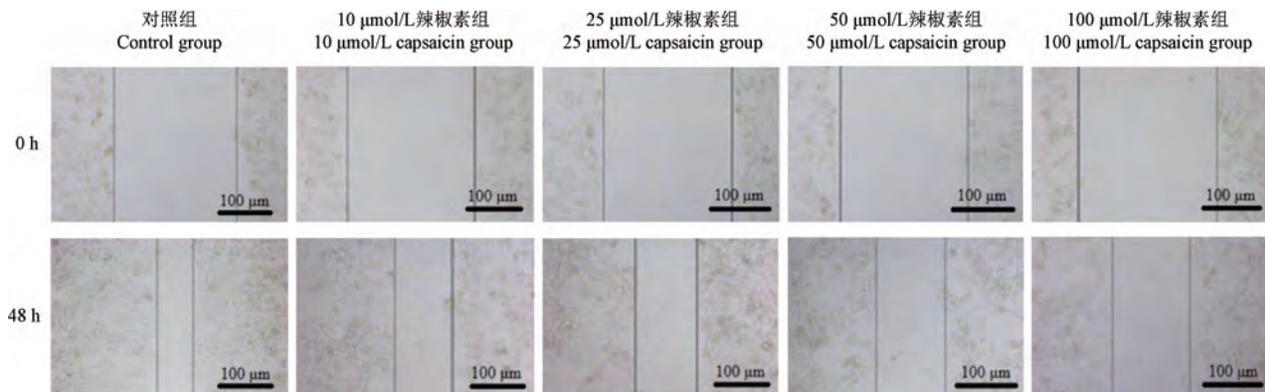


图 2 不同浓度辣椒素处理细胞迁移情况

Figure 2 Migration of cells at different concentrations of capsaicin

表 2 不同浓度辣椒素处理细胞中 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平比较( $n=6$ )

Table 2 Comparison of TRPV1, MTSS1, MMP-2 and MMP-9 protein levels in cells with different concentrations of capsaicin

组别 Groups	TRPV1	MTSS1	MMP-2	MMP-9
对照组 Control group	0.21±0.04	0.16±0.04	1.08±0.17	0.96±0.08
10 $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素组 10 $\mu\text{mol/L}$ capsaicin group	1.16±0.18*	0.47±0.04*	0.67±0.07*	0.36±0.04*
25 $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素组 25 $\mu\text{mol/L}$ capsaicin group	1.23±0.33*	0.51±0.05*	0.71±0.08*	0.31±0.04*
50 $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素组 50 $\mu\text{mol/L}$ capsaicin group	1.28±0.41*	0.57±0.06*	0.73±0.05*	0.13±0.04*
100 $\mu\text{mol/L}$ 辣椒素组 100 $\mu\text{mol/L}$ capsaicin group	2.14±0.45*	1.03±0.12*	0.22±0.04*	0.09±0.02*

注:与对照组相比, \* $P<0.05$ 。

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

**2.7 干扰 MTSS1 对辣椒素处理细胞中 MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平的影响**

与对照组相比, 100 μmol/L 辣椒素组、100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组、100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞中 MTSS1 蛋白水平升高,

MMP-2、MMP-9 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ); 分别与 100 μmol/L 辣椒素组、100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组相比, 100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组细胞中 MTSS1 蛋白水平降低, MMP-2、MMP-9 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4、图 6。

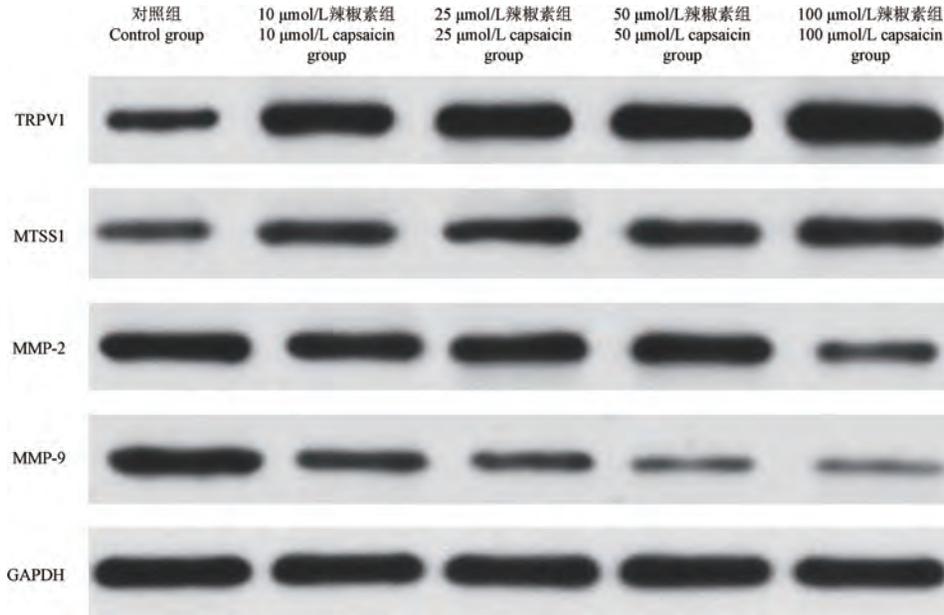


图 3 不同浓度辣椒素处理细胞中 TRPV1、MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平情况

Figure 3 Protein levels of TRPV1, MTSS1, MMP-2 and MMP-9 in cells with different concentrations of capsaicin

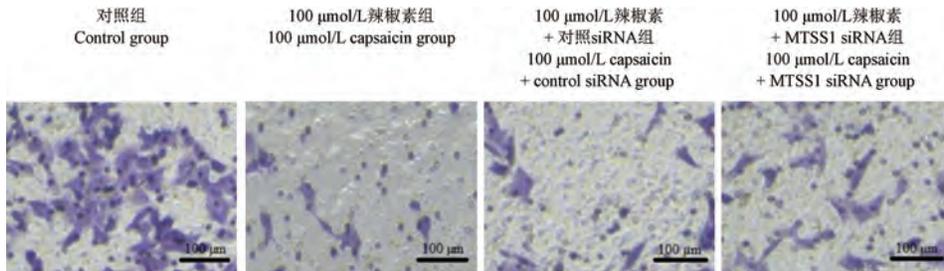


图 4 干扰 MTSS1 后辣椒素处理细胞侵袭的情况

Figure 4 Invasion of capsaicin-treated cells by interference with MTSS1

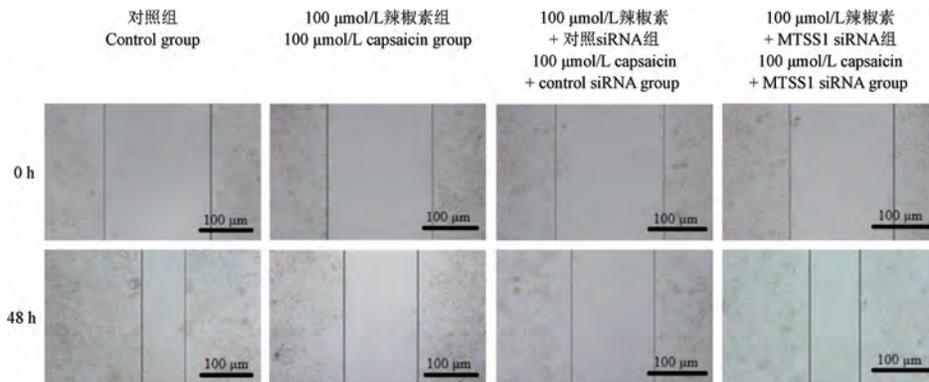


图 5 干扰 MTSS1 后辣椒素处理细胞迁移情况

Figure 5 Migration of capsaicin-treated cells by interference with MTSS1

表 3 干扰 MTSS1 后辣椒素处理细胞侵袭数量、迁移百分比的比较( $n=6$ )

Table 3 Comparison of the invasion and migration of capsaicin-treated cells by interference with MTSS1

组别 Groups	细胞侵袭数量(个) Cell invasion number	迁移百分比(%) Migration percentage
对照组 Control group	33.56±3.46	76.89±8.46
100 μmol/L 辣椒素组 100 μmol/L capsaicin group	6.58±1.16*	26.49±3.48*
100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组 100 μmol/L capsaicin+ control siRNA group	7.06±1.25*	21.46±4.59*
100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组 100 μmol/L capsaicin+MTSS1 siRNA group	18.46±6.48** <sup>△</sup>	61.16±7.48** <sup>△</sup>

注:与对照组相比, \* $P<0.05$ ;与 100 μmol/L 辣椒素组相比, # $P<0.05$ ;与 100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组相比, <sup>△</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, \* $P<0.05$ . Compared with the 100 μmol/L capsaicin group, # $P<0.05$ . Compared with the 100 μmol/L capsaicin+control siRNA group, <sup>△</sup> $P<0.05$ .

表 4 干扰 MTSS1 后辣椒素处理细胞中 MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平比较( $n=6$ )

Table 4 Comparison of MTSS1, MMP-2 and MMP-9 protein levels in capsaicin-treated cells by interference with MTSS1

组别 Groups	MTSS1	MMP-2	MMP-9
对照组 Control group	0.18±0.03	0.87±0.12	1.03±0.12
100 μmol/L 辣椒素组 100 μmol/L capsaicin group	0.86±0.08*	0.26±0.06*	0.12±0.02*
100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组 100 μmol/L capsaicin+ control siRNA group	0.87±0.09*	0.28±0.05*	0.13±0.03*
100 μmol/L 辣椒素+MTSS1 siRNA 组 100 μmol/L capsaicin+MTSS1 siRNA group	0.43±0.06** <sup>△</sup>	0.68±0.07** <sup>△</sup>	0.48±0.05** <sup>△</sup>

注:与对照组相比, \* $P<0.05$ ;与 100 μmol/L 辣椒素组相比, # $P<0.05$ ;与 100 μmol/L 辣椒素+对照 siRNA 组相比, <sup>△</sup> $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, \* $P<0.05$ . Compared with the 100 μmol/L capsaicin group, # $P<0.05$ . Compared with the 100 μmol/L capsaicin+control siRNA group, <sup>△</sup> $P<0.05$ .

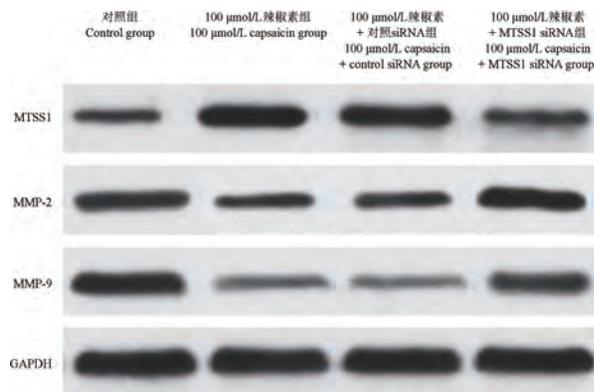


图 6 干扰 MTSS1 后辣椒素处理细胞中 MTSS1、MMP-2、MMP-9 蛋白水平情况

Figure 6 Protein levels of MTSS1, MMP-2 and

MMP-9 in capsaicin-treated cells by interference with MTSS1

### 3 讨论

结肠癌细胞侵袭、迁移会造成远处肺、骨、肝转移,侵袭、转移是肿瘤患者死亡的最主要原因<sup>[8]</sup>,因此,发现一种可以有效抑制结肠癌侵袭、转移且副作用小物质对于结肠癌的治疗意义重大。辣椒素作为辣椒皮中生物碱,通过 TRPV1 或其他途径参与抗肿瘤作用,是抗肿瘤潜在药物,具有广阔应用前景<sup>[9-10]</sup>,但作用机制复杂,目前具体机制尚不清楚,尚需进一步研究。研究发现,辣椒素可以抑制结肠癌细胞增殖、侵袭、迁移,提示辣椒素对结肠癌具有抑制侵袭、迁移作用,实现对结肠癌的保护,但尚需研究机制。

辣椒素是唯一一种 TRPV1 的天然激活剂,在结肠的黏膜层、黏膜下层、肌肉层、肌肉神经丛中均发现 TRPV1 的表达,可调节肠道运动、分泌、循环等功能<sup>[11-12]</sup>;在结肠癌中表达水平低于远处正常组织,可能参与结肠癌的发生发展<sup>[13]</sup>。研究发现,结肠癌细胞中添加辣椒素可以增加 TRPV1 的蛋白水平,提示辣椒素激活 TRPV1,实现对结肠癌的影响。MTSS1 作为细胞骨架肌动蛋白衔接蛋白,作为支架蛋白参与板状伪足形成过程,发挥肿瘤抑制作用<sup>[14]</sup>,在正常组织中均有表达,但在结肠癌、结肠癌中低表达甚至不表达,被认为是一种肿瘤转移抑制型基因<sup>[15-16]</sup>。MMPs 几乎可以降解细胞外基质中各种蛋白成分,可破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,从而促进肿瘤转移<sup>[17]</sup>;在众多 MMPs 中, MMP-2、MMP-9 参与血管基底膜降解过程,与肿瘤侵袭、迁移关系密切<sup>[18-19]</sup>。进一步研究发现,过表达 MTSS1 可以降低 MMP-2、MMP-9 的表达,在胶质瘤中 MTSS1 调控 MMP-2、MMP-9 发挥作用<sup>[20]</sup>。本研究发现,添加辣椒素后可以促进 MTSS1 的表达,从而降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,抑制结肠癌侵袭、迁移过程。而添加 MTSS1 抑制剂后,细胞侵袭、迁移过程增强,细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达升高;MTSS1 抑制剂可以减弱辣椒素对细胞侵袭、迁移的抑制过程。提示辣椒素通过促进 MTSS1 表达,抑制 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,实现对侵袭、迁移的抑制。

综上所述,辣椒素通过上调 MTSS1 表达从而抑制结肠癌细胞侵袭、迁移过程,实现对结肠癌的保护,为临床上结肠癌的治疗提供一定参考依据。但辣椒素不同浓度对肿瘤的影响差异极大,研究辣椒素治疗结肠癌的最佳浓度是后续探究重点。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Kim YJ, Park SJ, Lim CS, et al. Ratiometric detection of  $\gamma$ -glutamyltransferase in human colon cancer tissues using a two-photon probe [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(14): 9246-9250.
- [ 2 ] 王颜天池, 鹿艳, 韩军, 等. 黑根霉胞外多糖联合奥沙利铂对二甲胂诱导的大鼠结肠癌的抑制作用及对 Survivin/caspase-3/caspase-7 的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(5): 690-694.
- [ 3 ] Lu M, Chen C, Lan Y, et al. Capsaicin-the major bioactive ingredient of chili peppers: bio-efficacy and delivery systems [J]. *Food Funct*, 2020, 11(4): 2848-2860.
- [ 4 ] Zhang S, Wang D, Huang J, et al. Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2020, 45(1): 16-28.
- [ 5 ] Guo Y, Qiao X, Zhu L, et al. MicroRNA-182-5p modulates oral squamous cell carcinoma migration and invasion via targeting MTSS1 gene [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 1007-1013.
- [ 6 ] 王国伟. 辣椒素对人乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响以及机制的研究 [D]. 济南: 山东司法大学, 2016.
- [ 7 ] Hou N, He X, Yang Y, et al. TRPV1 induced apoptosis of colorectal cancer cells by activating calcineurin-NFAT2-p53 signaling pathway [J]. *Bio Med Res Int*, 2019, 2019: 6712536-6712544.
- [ 8 ] 李华驰, 熊治国, 谢敏, 等. 结肠癌肝转移裸鼠模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 63-68.
- [ 9 ] 左明, 胡丽贞. 辣椒素预防及抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2017, 30(6): 465-469.
- [ 10 ] Agosti F, Altier C. pFluorin-tagged TRPV1 shines light on capsaicin tachyphylaxis [J]. *Channels (Austin)*, 2019, 13(1): 308-310.
- [ 11 ] Hatta A, Kurose M, Sullivan C, et al. Dry eye sensitizes cool cells to capsaicin-induced changes in activity via TRPV1 [J]. *J Neurophysiol*, 2019, 121(6): 2191-2201.
- [ 12 ] Inagaki H, Kurganov E, Park Y, et al. Oral gavage of capsaicin causes TRPV1-dependent acute hypothermia and TRPV1-independent long-lasting increase of locomotor activity in the mouse [J]. *Physiol Behav*, 2019, 206(1): 213-224.
- [ 13 ] Bektur E, Şahin E, Ceyhan E, et al. Beneficial effect of mirtazapine on diabetes-induced hyperalgesia: involvement of TRPV1 and ASIC1 channels in the spinal cord and dorsal root ganglion [J]. *Neurol Res*, 2019, 41(6): 544-553.
- [ 14 ] Petrov P, Sarapulov AV, Eöry L, et al. Computational analysis of the evolutionarily conserved missing in metastasis/metastasis suppressor 1 gene predicts novel interactions, regulatory regions and transcriptional control [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 4155-4172.
- [ 15 ] 刘庆滨, 陈艳昕, 肖芳, 等. MTSS1 与 SOX2 在结肠癌中的表达及其对术后患者预后的影响 [J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(5): 482-485.
- [ 16 ] Tang X, Yang M, Wang Z, et al. MicroRNA-23a promotes colorectal cancer cell migration and proliferation by targeting at MARK1 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2019, 51(7): 661-668.
- [ 17 ] Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Ríos-Arrabal S, et al. Radiation and stemness phenotype may influence individual breast cancer outcomes: the crucial role of mmps and microenvironment [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1781-1800.
- [ 18 ] Xu F, Si X, Wang J, et al. Nectin-3 is a new biomarker that mediates the upregulation of MMP2 and MMP9 in ovarian cancer cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110(20): 139-144.
- [ 19 ] Feng X, Yan NM, Sun WB, et al. miR-4521-FAM129A axial regulation on ccRCC progression through TIMP-1/MMP2/MMP9 and MDM2/p53/Bcl2/Bax pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2019, 5: 89-104.
- [ 20 ] 谢杏苗, 黄永军, 冯璐, 等. MTSS1 基因对骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制研究 [J]. *现代医院*, 2019, 19(8): 1179-1184.

[ 收稿日期 ] 2021-01-19

冯静, 张贤春. 复方天麻蜜环糖肽片对原发性高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1R/Smad3 蛋白作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 38-45.

Feng J, Zhang XC. Mechanism of compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets in T lymphocyte subsets, early kidney damage and AT1R/Smad3 proteins in essential hypertensive rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 38-45.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 006

## 复方天麻蜜环糖肽片对原发性高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1R/Smad3 蛋白作用机制研究

冯 静, 张贤春\*

(海口市人民医院, 海口 570208)

**【摘要】** 目的 探究复方天麻蜜环糖肽片对原发性高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1R/Smad3 蛋白的作用。方法 本实验共分为 3 组, 正常组(NC 组)、模型组(SHR 组)和药物组(TMGT 组)。分别比较 3 组大鼠不同时间的血压变化; 3 组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群用流式细胞仪进行检测比较; 3 组大鼠血清中的炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量用 ELISA 进行检测比较; 3 组大鼠早期肾组织损伤情况用 HE 染色和 PAS 染色观察比较; 3 组大鼠肾组织中 AT1R/Smad3 蛋白和 mRNA 表达分别用蛋白质印迹法和 RT-PCR 法进行检测比较。结果 于给药后 2、4 和 8 周时 NC 组大鼠相比较, SHR 组大鼠的尾动脉压升高 ( $P < 0.05$ ); 和 SHR 组大鼠相比, TMGT 组大鼠的尾静脉收缩压在给药后 2、4 和 8 周时得到了显著降低 ( $P < 0.05$ )。SHR 组大鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值较 NC 组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 干预后的 TMGT 组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值明显低于 SHR 组 ( $P < 0.05$ )。SHR 组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量较 NC 组明显升高 ( $P < 0.05$ ); 和 SHR 组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量相比, TMGT 组显著降低 ( $P < 0.05$ )。SHR 组大鼠肾组织较 NC 组损伤严重, 肾小球肥大且基底膜增厚, 大量肾小球变为空泡, 毛细血管狭窄且出现闭塞; 干预后的 TMGT 组大鼠肾组织较 SHR 组得到了明显的改善。和 NC 组相比, SHR 组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白及 mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 干预后的 TMGT 组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白及 mRNA 表达较 SHR 组均显著降低 ( $P < 0.05$ )。结论 复方天麻蜜环糖肽片可有效调节高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群, 改善机体的免疫功能, 缓解高血压导致的早期肾损伤, 同时抑制肾组织中的 Smad3 和 AT1R 蛋白表达, 进而对高血压疾病进行治疗。

**【关键词】** 复方天麻蜜环糖肽片; 原发性高血压; T 淋巴细胞亚群; 早期肾损伤; AT1R/Smad3 蛋白

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0038-08

### Mechanism of compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets in T lymphocyte subsets, early kidney damage and AT1R/Smad3 proteins in essential hypertensive rats

FENG Jing, ZHANG Xianchun\*

(Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets on T lymphocyte subsets, early renal injury, and angiotensin II receptor type 1 (AT1R)/Smad3 proteins in essential hypertensive rats. **Methods** The study was divided into three groups: normal (NC), model (SHR) and drug (TMGT)

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目(20A200118)。

[作者简介] 冯静(1984—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 内科学-老年病科的相关研究, 全科医学。E-mail: fengjing8404@163.com

[通信作者] 张贤春(1979—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 全科医学。E-mail: zhangxianchun30@163.com

groups. Changes in blood pressure, T lymphocyte subsets in peripheral blood, IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum, pathology in renal tissue, AT1R/Smad3 protein expression were assessed. Expression of AT1R/Smad3 mRNA was detected. **Results** Compared with the NC group, tail artery pressure in the SHR group was increased at 2, 4 and 8 weeks after administration ( $P < 0.05$ ). However, no significant difference was found between SHR and TMGT groups at week 0 ( $P < 0.05$ ). At 2, 4 and 8 weeks after administration, systolic blood pressure of the tail artery in the SHR group was significantly higher than that in the NC group, and the tail vein of the TMGT group was systolic after treatment. Blood pressure in the SHR group was significantly lower than that in the SHR group ( $P < 0.05$ ). The ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in the SHR group was significantly higher than that in the NC group ( $P < 0.05$ ). The ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in the TMGT group was significantly lower than that in the SHR group after treatment ( $P < 0.05$ ). Compared with the NC group, the serum levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the SHR group were increased significantly ( $P < 0.05$ ) and those in the TMGT group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Renal tissue of the SHR group was more seriously damaged than that of the NC group with glomerular hypertrophy and basement membrane thickening, a large number of glomeruli became vacuoles, capillary stenosis and occlusion. After treatment, renal tissue of the TMGT group was significantly improved compared with that of the SHR group. Compared with the NC group, protein and mRNA expression of Smad3 and AT1R in renal tissue of the SHR group was increased significantly ( $P < 0.05$ ) and that of Smad3 and AT1R in renal tissue of the TMGT group was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets effectively regulate T lymphocyte subsets, improve immune functions, alleviate early renal injury caused by hypertension, and inhibit the expression of Smad3 and AT1R proteins in renal tissue to treat hypertension.

**【Keywords】** compound Gastrodia honey cyclic glycopeptide tablets; essential hypertension; T lymphocyte subsets; early lung injury; AT1R/Smad3 protein

原发性高血压 (spontaneous hypertension, EH) 具有高致残率、高死亡率, 严重者会导致心血管疾病的发生<sup>[1]</sup>。原发性高血压在临床上主要表现为体循环动脉压的增高, 同时伴有器官功能或器质性损害, 严重的高血压患者导致脑卒中等疾病的发生<sup>[2]</sup>。目前, 高血压患者随着社会生活节奏的加快而逐年增加, 有数据统计发现, 我国目前为止高血压患者的患病率高达 25%。原发性高血压的发病机制相对复杂, 目前尚没有文献明确的报道。近些年研究显示, 血管的炎性反应和内皮损伤介导着高血压疾病的发生、发展<sup>[3]</sup>。还有学者研究发现, 在高血压患者的血管壁内有大量的炎症反应, 并且在高血压的发生中这种炎症反应起主导作用<sup>[4]</sup>。目前我国主要通过研究 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群来反应原发性高血压的炎症免疫反应, 虽有很多的文献报道, 但 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群在高血压疾病中的作用机制还不是十分清楚。血管紧张素 II 会和它的受体之一  $\alpha$ Ang II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT1R) 相结合, 进而让血管发生收缩, 释放大量的醛固酮, 增加细胞增生, 这些不良效应主要由 AT1R 所介导<sup>[5]</sup>。有文献报道显示, 在高血压患者的血清中发现了 AT1R 抗体, 因此推测机体的免疫功能介导高血压疾病的发生<sup>[6]</sup>。Smad (small mother against decapentaplegic) 蛋白是转化生长因子

(TGF) 信号通路中重要的细胞内作用底物, 其中 Smad3 是其中的一种亚型<sup>[7]</sup>。现有研究显示, TGF/Smad 信号通路在心血管疾病中的发生发展过程中发挥重要的作用, Smad 蛋白从基因转录水平参与调控心血管疾病的发生发展过程<sup>[8]</sup>, 但 AT1R、Smad3 在高血压中的表达还尚不清楚。复方天麻蜜环糖肽片是一种生物重要复方制剂, 主要提取于天麻蜜环菌、黄芪和当归中, 可以有效防止眩晕, 且对舒筋活血有一定的效果, 复方天麻蜜环糖肽片不仅服用方便, 不良反应也相对较小<sup>[9-10]</sup>。目前, 还没有复方天麻蜜环糖肽片对高血压作用的相关报道, 本文旨在探究复方天麻蜜环糖肽片对原发性高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1R、Smad3 蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

大鼠购自浙江中医药大学动物实验中心 [SCXK(浙)2017-0015], 所有大鼠饲养在海南医学院 [SYXK(琼)2019-0008]。40 只 SHR 大鼠, 20 只 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠, 所有大鼠皆为 SPF 级、雄性, 8 周龄, 体重 180~200 g。所有大鼠均饲养在统一的动物房内, 保证环境清洁, 且室内温度保持在 23℃~25℃, 相对湿度保持在 45%~50%, 动物实验

过程经海口市人民医院动物实验伦理委员会批准(20120LL077),本次实验符合 3R 原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

山西康欣药业有限公司生产的复方天麻蜜环糖肽片(批准文号:H14022944);美国 Assay Biotechnology 公司生产的 AT1R 抗体和 Smad3 抗体;美国 BD 公司生产的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 检测试剂盒。上海奥尔科技生物科技有限公司生产的大鼠无创血压测量分析系统;日本奥林巴斯株式会社生产的 BH2 型光学显微镜。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 动物分组与造模

20 只 WKY 大鼠作为正常组(NC 组)、40 只 SHR 大鼠分为模型组(SHR 组)和药物组(TMGT 组),每组 20 只。将 1 g 复方天麻蜜环糖肽片用生理盐水稀释成 3 mL 复方天麻蜜环糖肽溶液, TMGT 组大鼠给予 1 g/kg 天麻蜜环糖肽溶液灌胃干预,每天 3 次,连续干预 8 周;NC 组大鼠和 SHR 组大鼠均给予等量的生理盐水灌胃干预,每天 3 次,连续干预 8 周。

### 1.3.2 动物血压测量

在给药干预后 0、2、4 和 8 周时,分别测量 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠的尾动脉收缩压。在测量时先把无创血压检测仪进行预热,在大鼠的根部套上血压计的充气尾,在大鼠处于安静状态时,对大鼠的血压进行测量,每组大鼠分别测量 3 次,取平均值。

### 1.3.3 流式细胞仪检测外周血 T 淋巴细胞亚群

分别麻醉 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠,采集大鼠腹主动脉血液 3 mL,离心处理后,弃掉上清液,将 PBS 溶液加入其中进行稀释,充分混匀后,在淋巴细胞分离液上铺满液体,离心后把中间的白层膜部分取出,再次离心后,把上清液弃掉,重悬细胞制备成淋巴细胞悬液。将悬液放置在测定管中,分别设为空白管和对照管,在管中加入 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 荧光抗体,轻摇测定管混匀,在室温环境中孵育,20 min 后再次用 PBS 溶液重悬,最后对 T 淋巴细胞亚群进行检测。

### 1.3.4 ELISA 检测血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 的含量

分别取 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠的腹主动脉血,2000 r/min 的速度离心 5 min,取出离心后的上清液,分别测量各组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  的含量。

### 1.3.5 肾组织病理学观察

采用 HE 染色和 PAS 染色切片法,处死 3 组大鼠后取出肾组织,将制备好的切片组织放置在图像分析仪上,分别观察 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠肾组织的病理变化。

### 1.3.6 Western blot 检测肾组织中 AT1R、Smad3 蛋白表达

分别取 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠 50 mg 肾组织,用 Western blot 裂解液裂解后用玻璃均浆器在冰上对组织进行研磨,30 min 后以 12000 r/min 的速度离心 5 min,取上清液,蛋白浓度用 BCA 法进行检测,在每孔中加入 50  $\mu$ g 蛋白样品,根据蛋白浓度计算样本体积。把浓缩的 SDS-PAGE 缓冲液加入到上清液中,加热上清液,5 min 后在预制的胶孔中把蛋白样本加入,在封闭的环境中孵育。1 h 后加入一抗,TBST 溶液将蛋白样品清洗 3 次,凝胶成像系统曝光成像,进一步分析。

### 1.3.7 RT-PCR 检测 Smad3 和 AT1R 蛋白表达

分别取 NC 组、SHR 组和 TMGT 组大鼠 50 mg 肾组织,用 TRIzol 裂解液将组织裂解,而后提取组织中总的 RNA。分别检测肾组织中 AT1R、Smad3 mRNA 的表达。引物序列:AT1R 上游引物:5'-GAGAGGATTCGTGGCTTGAG-3',下游引物:5'-TAAGTCAGCCAAGGCGAGAT-3';Smad3 上游引物:5'-CCTGGCTACCTGAGTGAAGATG-3',下游引物:5'-AGTAGGAGATGGAGCACCAAAAC-3'。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s;60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共计 40 个循环。AT1R、Smad3 mRNA 相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算。

## 1.4 统计学方法

应用 SPSS 20.1 软件对 NC 组、PT 组和 miR-223 组的数据进行分析。用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式表示 3 组间的数据,3 组间的数据比较用单因素方差法进行检验,两组间比较采用 LSD-*t* 进行检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠尾动脉收缩压测量比较

和 NC 组大鼠相比,SHR 组和 TMGT 组大鼠给药后 0 周尾动脉收缩压均明显升高( $P < 0.05$ ),但给药后 0 周 SHR 组和 TMGT 组大鼠尾动脉收缩压没有明显的变化( $P > 0.05$ )。和 NC 组相比,SHR 组在给药后 2、4 和 8 周时大鼠尾动脉收缩压显著升高

( $P < 0.05$ ); 和 SHR 组给药后 2、4 和 8 周时大鼠尾动脉收缩压相比, TMGT 组大鼠均得到显著抑制 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 各组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞表达频率及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值**

NC 组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>细胞表达频率为 (63.21 ± 2.13), CD8<sup>+</sup>细胞表达频率为 (34.21 ± 1.65); SHR 组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup> (81.15 ± 2.62) 细胞表达频率较 NC 组显著升高 ( $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup> (25.33 ± 1.96) 细胞表达频率较 NC 组显著降低 ( $P < 0.05$ ); 干预后的 TMGT 组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup> (66.73 ± 1.57) 细胞表达频率较 SHR

组显著降低, CD8<sup>+</sup> (32.76 ± 2.35) 细胞表达频率较 SHR 组显著升高 ( $P < 0.05$ )。和 NC 组大鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值 (1.62 ± 0.15) 相比较, SHR 组大鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值 (2.26 ± 0.31) 显著升高 ( $P < 0.05$ ); 干预后的 TMGT 组大鼠的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值 (1.85 ± 0.12) 较 SHR 组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1 和图 2。

**2.3 血清中 IL-6、TNF-α 含量比较**

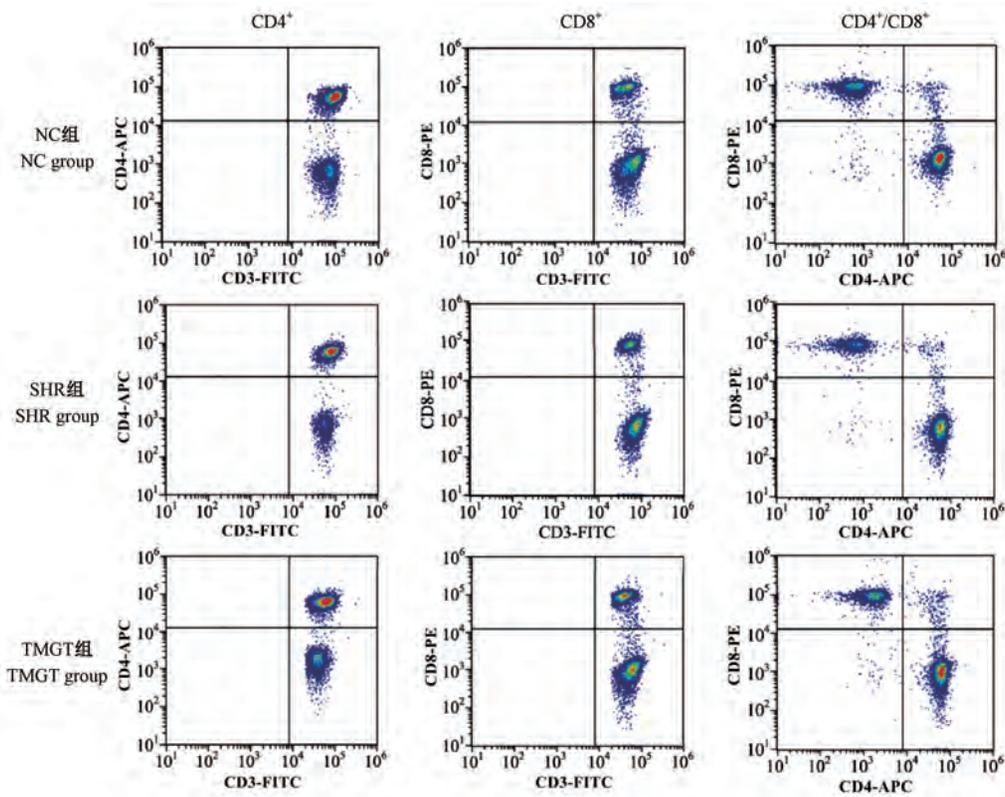
和 NC 组大鼠血清中炎症因子 IL-6 和 TNF-α 含量相比较, SHR 组大鼠显著升高 ( $P < 0.05$ ); 和 SHR 组相比, TMGT 组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 2 和图 3。

**表 1** 各组大鼠不同时间尾动脉收缩压测量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )  
**Table 1** Comparison of tail artery systolic blood pressure in different groups at different time

组别 Groups	0 周 0 week	2 周 2 weeks	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
NC 组 NC group	143.36 ± 3.98	148.71 ± 4.06	148.64 ± 3.87	147.32 ± 3.14
SHR 组 SHR group	162.78 ± 2.71 *	189.42 ± 3.77 *	192.76 ± 3.65 *	190.31 ± 3.27 *
TMGT 组 TMGT group	163.99 ± 2.46 *	168.25 ± 2.46 *#	167.33 ± 2.18 *#	165.54 ± 2.49 *#
F	275.1	676.8	890.3	1044.0
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

注: 与 NC 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 SHR 组相比, # $P < 0.05$ 。

Note. Compared with NC group, \* $P < 0.05$ . Compared with SHR group, # $P < 0.05$ .



**图 1** 流式细胞仪检测各组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>细胞表达频率及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值

**Figure 1** Expression frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in peripheral blood of rats in each group were detected by flow cytometry

## 2.4 三组大鼠肾组织病理学变化比较

和 NC 组大鼠肾组织比,SHR 组大鼠肾小球明显增大,基底膜增厚且肾小球出现大量的空泡,毛细血管明显狭窄,且出现闭塞;和 SHR 组大鼠肾组织比,TMGT 组肾组织得到了明显的改善,见图 4。

## 2.5 各组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白表达比较

和 NC 组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白表达相比较,SHR 组均显著增加( $P<0.05$ );和 SHR 组相比,TMGT 组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白表达均显著降低( $P<0.05$ ),见图 5。

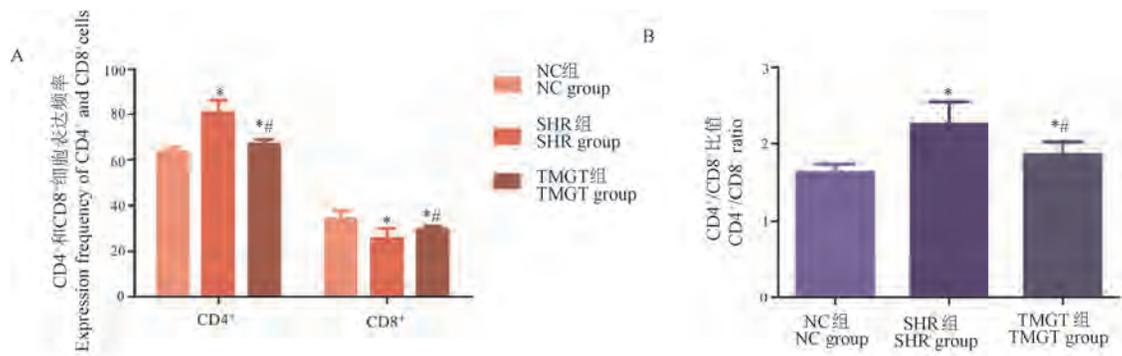
表 2 各组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量比较( $\bar{x}\pm s, n=20$ )

Table 2 Comparison of IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum of rats in each group

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)
NC 组 NC group	2.83 $\pm$ 0.41	282.41 $\pm$ 51.73
SHR 组 SHR group	3.96 $\pm$ 1.02*	1455.92 $\pm$ 111.34*
TMGT 组 TMGT group	3.17 $\pm$ 0.87*#	376.12 $\pm$ 89.76*#
F	10.26	1103.00
P	0.0002	<0.0001

注:与 NC 组相比,\* $P<0.05$ ;与 SHR 组相比,# $P<0.05$ 。

Note. Compared with NC group, \* $P<0.05$ . Compared with SHR group, # $P<0.05$ .

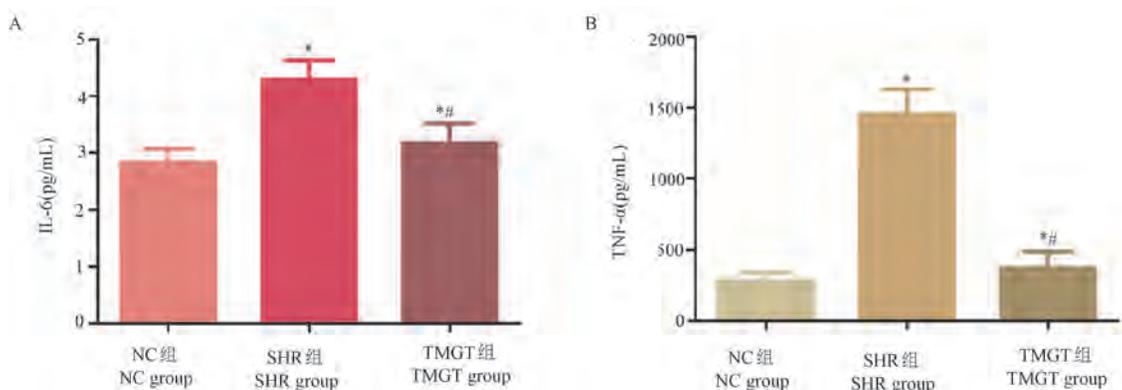


注:与 NC 组相比,\* $P<0.05$ ;与 SHR 组相比,# $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞表达频率及 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值比较

Note. Compared with NC group, \* $P<0.05$ . Compared with SHR group, # $P<0.05$ .

Figure 2 Comparison of the expression frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in peripheral blood in each group of rats

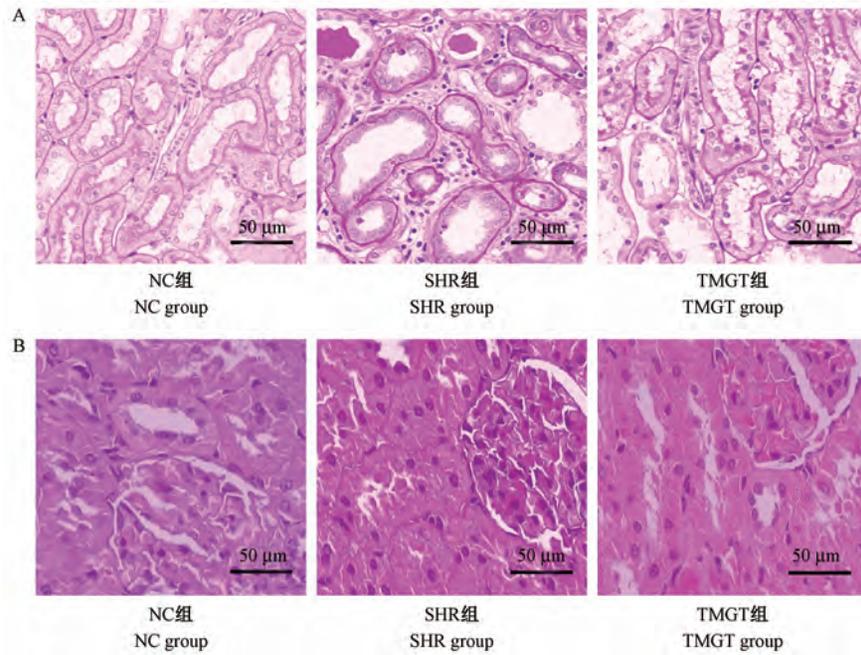


注:与 NC 组相比,\* $P<0.05$ ;与 SHR 组相比,# $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量比较

Note. Compared with NC group, \* $P<0.05$ . Compared with SHR group, # $P<0.05$ .

Figure 3 Comparison of IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum of rats in each group

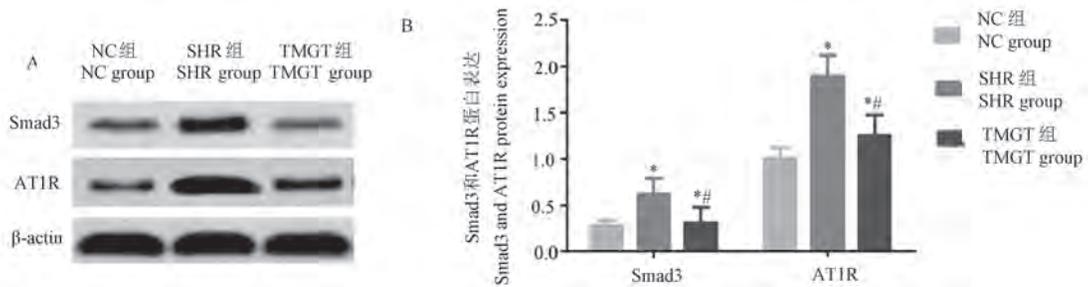


注:A:大鼠肾组织 HE 染色;B:大鼠肾组织 PAS 染色。

图 4 各组大鼠肾组织 HE 染色和 PAS 染色

Note. A, HE staining of rat kidney tissue. B, PAS staining of rat kidney tissue.

Figure 4 HE staining and PAS staining of rat kidney tissues in each group



注:A:3 组大鼠肾组织中 Smad3 蛋白和 AT1R 蛋白表达;B:3 组大鼠肾组织中 Smad3 蛋白和 AT1R 蛋白表达比较。与 NC 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 SHR 组相比, # $P < 0.05$ 。

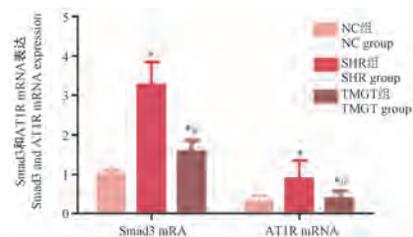
图 5 各组大鼠肾组织中 Smad3 蛋白和 AT1R 蛋白表达

Note. A, Expression of Smad3 protein and AT1R protein in renal tissue of three groups of rats. B, Comparison of the expression of Smad3 protein and AT1R protein in renal tissue of three groups of rats. Compared with NC group, \* $P < 0.05$ . Compared with SHR group, # $P < 0.05$ .

Figure 5 Expression of Smad3 protein and AT1R protein in renal tissue in each group of rats

## 2.6 各组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R mRNA 表达比较

NC 组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R mRNA 分别为  $(1.01 \pm 0.10)$  和  $(0.27 \pm 0.02)$ ; SHR 组大鼠肾组织中 Smad3 mRNA  $(3.27 \pm 1.21)$  和 AT1R mRNA  $(0.89 \pm 0.05)$  较 NC 组均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 和 SHR 组相比, TMGT 组大鼠肾组织中 Smad3 mRNA  $(1.58 \pm 0.23)$  和 AT1R mRNA  $(0.34 \pm 0.03)$  显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。



注:与 NC 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 SHR 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R mRNA 表达比较

Note. Compared with NC group, \* $P < 0.05$ . Compared with SHR group, # $P < 0.05$ .

Figure 6 Comparison of Smad3 and AT1R mRNA expression in renal tissue of rats in each group

### 3 讨论

高血压是一种慢性的炎症反应,其发病机制和很多因素都有密切关系,例如遗传基因、肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活、胰岛素抵抗及血管内皮功能受损等,以上因素均可导致机体的免疫功能发生紊乱<sup>[11]</sup>。研究发现,免疫功能在高血压疾病中起主导作用,高血压发生时,在血管周围常发现大量的炎症反应,在机体中炎症免疫发生作用,增加趋化因子的表达,升高黏附因子的含量,同时增加超氧化物的释放,从而加强机体的氧化应激反应<sup>[12]</sup>。炎症免疫系统会降低血管的舒张功能,召集大量的内皮细胞,包括 T 淋巴细胞等,增加内皮细胞的数量且增强细胞的粘附性,进而升高血压<sup>[13]</sup>。文献显示,炎症免疫失调介导着高血压的发生发展,高血压的患病率会随着炎症因子的增加而增加<sup>[14]</sup>。可见,免疫炎症反应参与者高血压的发生、发展。天麻为兰科植物,其干燥块茎为常用名贵中药,其具有很高的药用价值和经济价值。蜜环菌隶属于担子菌亚门伞菌目白磨科蜜环菌属。蜜环菌是天麻生长发育的基础,为天麻的生长发育提供养分。有研究发现,复方天麻蜜环糖肽片可提高外周动脉血管的顺应性,让大脑的血量得到增加,与此同时也加强了中央血管的顺应性,进而达到降低血压的效果<sup>[15]</sup>。本实验结果显示,SHR 组大鼠尾静脉收缩压较 NC 组显著升高,在复方天麻蜜环糖肽片干预后大鼠的动脉收缩压得到明显抑制,提示复方天麻蜜环糖肽片可有效改善高血压大鼠血管的舒缩功能,进而实现降压的目的。

T 淋巴细胞参与着高血压疾病的发生发展,在高血压发生时,活化的 T 淋巴细胞向肾及外周血管迁移,可见调节免疫系统和高血压的发生密切相关。本研究发现,SHR 组大鼠外周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的比值较 NC 组明显升高,说明机体内的 T 淋巴细胞数量发生异常变化,导致免疫系统失衡,让机体处于免疫抑制状态。经过复方天麻蜜环糖肽片干预后大鼠的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>淋巴细胞比值得到明显抑制,可见复方天麻蜜环糖肽片对高血压大鼠的 T 淋巴细胞的数量进行调节,改善机体的免疫系统,进而调节机体的血压处于正常状态。张小娟等<sup>[16]</sup>通过对高血压患者临床研究证实,给予复方天麻蜜环糖肽片的观察组患者的治疗效果明显好于给予非洛地平缓释片联合缬沙坦的对照组患者,以

复方天麻蜜环糖肽片对辅助治疗高血压的效果显著。近些年有学者研究发现和高血压有关的炎症标记物有 IL-6、TNF- $\alpha$  等,本研究结果发现,SHR 组大鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著高于 NC 组,复方天麻蜜环糖肽片干预后高血压患者血清中炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  含量均得到明显抑制,可见复方天麻蜜环糖肽片在高血压发生中有效调控 IL-6、TNF- $\alpha$  促炎因子,进而发挥良好的抗炎效果。丁东新等<sup>[17]</sup>研究发现,老年原发性高血压患者血清中有大量炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  标记物,且炎症标记物和血压的严重程度成正相关。

血管紧张素 II 是 RAS 最重要的血管活性物质,主要通过 AT1R、AT2R 来实现多种生理调节作用。血管紧张素 II 通过 AT1R 在循环系统内发挥着收缩血管、调节血压和水钠平衡等作用,而通过 AT2R 受体调节扩血管的同时抑制肾小球旁细胞肾素合成<sup>[18]</sup>。Smad 可分为 Smad1~Smad8,其中 Smad3 对受体有一定的调节作用。有研究发现,激活 smad 蛋白可通过转录抑制 PPAY- $\gamma$  的表达,降低 PPAY- $\gamma$  对血管的保护作用,进而加重肺动脉高压的发生。本研究显示,SHR 组大鼠组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白及相对表达量均高于 NC 组大鼠,Smad3 升高说明高血压大鼠肾受损,给予复方天麻蜜环糖肽片干预后高血压大鼠肾组织中 Smad3 和 AT1R 蛋白及相对表达量得到明显抑制,提示复方天麻蜜环糖肽片可抑制 Smad3 和 AT1R 蛋白表达,进而延缓高血压性肾病的进程。伊林等<sup>[19]</sup>研究发现,当归可能通过其有效成分藁苯内酯对血压有干预作用,可能通过 AT1R 靶点发挥作用。李撵萍<sup>[20]</sup>研究发现,复方天麻蜜环糖肽片联合硝苯地平对高血压患者起有效的治疗效果,并且无严重的不良反应发生,值得临床使用。

综上所述,复方天麻蜜环糖肽片可有效调节高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群,改善机体的免疫功能,缓解高血压导致的早期肾损伤,同时抑制肾组织中的 Smad3 和 AT1R 蛋白表达,进而对高血压疾病进行治疗。

#### 参考文献:

- [1] Fu YS, Lue SI, Lin SY, et al. *Plantago asiatica* seed extracts alleviated blood pressure in Phase spontaneous hypertension rats [J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1734.
- [2] Gonzalez-Vicente A, Saez F, Monzon CM, et al. Thick ascending limb sodium transport in the pathogenesis of hypertension [J].

- Physiol Rev, 2019, 99(1): 235-309.
- [ 3 ] Donertas B, Zubcevic J. Gut microbiota and neuroinflammation in pathogenesis of hypertension: A potential role for hydrogen sulfide [J]. Pharmacol Res, 2020, 43(7): 597-608.
- [ 4 ] Serkan G, Gkaslan O, Emin D, et al. Role of aortic stiffness and inflammation in the etiology of young-onset hypertension [J]. Turk J Med Sci, 2019, 49(6): 1748-1753.
- [ 5 ] Xing J, Tian HF, Tang XQ, et al. Kinetics of T lymphocyte subsets and B lymphocytes in response to immunostimulants in flounder (*Paralichthys olivaceus*): implications for CD4<sup>+</sup> T lymphocyte differentiation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13827.
- [ 6 ] 黄晓燕, 高宏, 艾尼瓦尔·吾买尔. 半夏白术天麻汤对自发性高血压大鼠血管内皮因子及 AT1R 表达的影响 [J]. 中国药师, 2020, 23(4): 609-613.
- [ 7 ] 杨亚, 陈鹏, 戴红卫, 等. 大鼠正畸牙移动过程中转化生长因子- $\beta$ /Smad 信号通路相关蛋白质在 Malassez 上皮剩余细胞的表达变化 [J]. 国际口腔医学杂志, 2019, 46(3): 28-34.
- [ 8 ] 陈方旭, 米焱, 王彩丽. TGF- $\beta$ /Smad、p38MAPK 及 JNK/SAPK 信号通路在糖尿病肾病发生发展中作用机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(9): 106-109.
- [ 9 ] 徐静, 徐梦怡, 周俊山. 复方天麻蜜环糖肽片联合倍他司汀治疗老年良性位置性眩晕的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(10): 2525-2528.
- [ 10 ] 王玉红, 刘晖, 邹小琼, 等. 复方天麻蜜环糖肽片联合长春西汀治疗后循环缺血性眩晕的临床观察 [J]. 广东医学院学报, 2019, 37(1): 35-37.
- [ 11 ] 张楠, 吴嘉, 李卓玲, 等. 原发性高血压患者血清补体 C1q 水平及其对心血管疾病发生风险的评估价值 [J]. 临床检验杂志, 2019, 37(4): 287-289.
- [ 12 ] Baev VM, Vagapov TF, Shmeleva SA. Severe parasympathictonia in men with hypertension is accompanied by an increase in the chronic venous diseases' signs [J]. Russ J Cardiol, 2019, 24(1): 52-55.
- [ 13 ] 马文娟, 孙丽君, 赵世刚. 瑞舒伐他汀对家族性高胆固醇血症患者血脂水平和颈动脉内膜中层厚度及血管内皮舒张功能的影响 [J]. 中国医药, 2019, 14(1): 65-68.
- [ 14 ] 李立峰, 邢同生, 赵存马. 阿托伐他汀钙片联合厄贝沙坦治疗伴高胆固醇高血压病人的临床效果及对心肌缺血标志物和炎症因子的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(3): 497-500.
- [ 15 ] 刘涛, 刘维红. 养血清脑颗粒联合复方天麻蜜环糖肽片治疗脑动脉硬化症的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 1891-1895.
- [ 16 ] 张小娟, 王炳华, 王文英, 等. 高血压患者应用复方天麻蜜环糖肽片辅助治疗的临床分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2015, 26(24): 5545-5546.
- [ 17 ] 丁东新, 薛冰, 沈琪, 等. 老年原发性高血压患者 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平与血压、颈动脉粥样硬化的关系 [J]. 同济大学学报(医学版), 2013, 34(5): 61-64.
- [ 18 ] 吕宏娟, 康晓敏. Toll 样受体 2 在血管紧张素 II 致高血压小鼠心肌纤维化中的作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(8): 860-862.
- [ 19 ] 伊琳, 王利红, 纪禄凤, 等. 藜苯内酯对自发性高血压大鼠 AT1R 基因表达的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37(4): 9-12.
- [ 20 ] 李攀萍. 复方天麻蜜环糖肽联合硝苯地平治疗高血压随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2016, 30(11): 66-68.

[收稿日期] 2021-01-19

王龙梅, 孙永显, 张新鹃, 等. ORMDL3 通过内质网应激介导的细胞自噬在中性粒细胞哮喘中的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 46-53.

Wang LM, Sun YX, Zhang XJ, et al. Role and mechanism of ORMDL3 in neutrophil asthma through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 46-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.007

# ORMDL3 通过内质网应激介导的细胞自噬在中性粒细胞哮喘中的作用机制研究

王龙梅\*, 孙永显, 张新鹃, 陈晓艳

(山东中医药高等专科学校, 西医教学部, 山东 烟台 264199)

**【摘要】** 目的 研究 ORMDL3 通过内质网应激(ERS)介导的细胞自噬在中性粒细胞哮喘中的作用机制。方法 成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、模型+NC-siRNA 组、模型+ORMDL3-siRNA 组、溶剂对照组、模型+溶剂组、模型+NC-siRNA+溶剂组、模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组、模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组,采用脂多糖+卵白蛋白联合致敏的方式建立中性粒细胞哮喘模型,经气道注射 ORMDL3-siRNA 慢病毒或阴性对照(NC)-siRNA 慢病毒,腹腔注射 ERS 激动剂毒胡萝卜素或溶剂。检测气道功能 0.2 s 用力呼气容积(FEV<sub>0.2</sub>)/用力肺活量(FVC)以及呼气峰流速(PEF),肺组织病理改变,ORMDL3、ERS 标志基因 PERK、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 及自噬标志基因 Beclin-1、LC3 的表达水平。结果 模型组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平低于对照组,肺组织中 ORMDL3、PERK、IRE1 $\alpha$ 、ATF6、Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平高于对照组( $P<0.05$ );模型+ORMDL3-siRNA 组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平高于模型+NC-siRNA 组,肺组织中 ORMDL3、ATF6、Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平低于模型+NC-siRNA 组( $P<0.05$ )。PERK、IRE1 $\alpha$  的表达水平与模型+NC-siRNA 组比较无差异( $P>0.05$ );模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平低于模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组,肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平高于模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组( $P<0.05$ )。结论 在中性粒细胞哮喘的发病中,ORMDL3 通过 ERS 的 ATF6 通路激活细胞自噬是可能的分子机制,阻断 ORMDL3 是治疗中性粒细胞哮喘的可能靶点。

**【关键词】** 中性粒细胞哮喘;ORMDL3;内质网应激;自噬;分子机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0046-08

## Role and mechanism of ORMDL3 in neutrophil asthma through endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy

WANG Longmei\*, SUN Yongxian, ZHANG Xinjuan, CHEN Xiaoyan

(Western Medicine Teaching Department, Shandong College of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264199, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role and mechanism of ORMDL3 in neutrophil asthma through endoplasmic reticulum stress (ERS)-mediated autophagy. **Methods** Adult male SD rats were randomly divided into control, model, model+NC siRNA, model+ORMDL3 siRNA, solvent control, model+solvent control, model+NC siRNA group+ solvent control, model + ORMDL3 siRNA + solvent control and model + ORMDL3 siRNA + agonist groups. The neutrophil asthma model was established by lipopolysaccharide and ovalbumin sensitization. An ORMDL3 siRNA lentivirus or negative control (NC)-siRNA lentivirus was administered through the airway and ERS agonist, carotene, or solvent was injected intraperitoneally. Airway function, 0.2 s forced expiratory volume (FEV<sub>0.2</sub>)/forced vital capacity (FVC), peak

[基金项目] 山东省卫计委课题项目(2018020807)。

[作者简介] 王龙梅(1972—),女,硕士,副主任医师,研究方向:儿科呼吸系统及心血管疾病。E-mail: wangshun10171@163.com

expiratory flow (PEF), pathological changes of lung tissue and the expression levels of ORMDL3, ERS marker genes PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6 and autophagy marker genes Beclin-1 and LC3 were analyzed. **Results** FEV0.2/FVC and PEF levels of the model group were lower than those of the control group and the expression levels of ORMDL3, PERK, IRE1 $\alpha$ , ATF6, Beclin-1 and LC3-II/LC3-I in lung tissue were higher than those of the control group ( $P < 0.05$ ). FEV0.2/FVC and PEF levels of the model+ORMDL3-siRNA group were higher than those of the model+NC-siRNA group and the expression levels of ORMDL3, ATF6, Beclin-1 and LC3-II/LC3-I in lung tissue were lower than those of the model+NC-siRNA group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of PERK and IRE1 $\alpha$  showed no difference compared with the model+NC-siRNA group ( $P > 0.05$ ). FEV0.2/FVC and PEF levels in the model+ORMDL3 siRNA+agonist group were lower than those in the model+ORMDL3 siRNA+solvent group and the expression levels of Beclin-1 and LC3-II/LC3-I in lung tissue were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** In the pathogenesis of neutrophil asthma, ORMDL3-induced autophagy through ERS ATF6 pathway is a possible molecular mechanism. Blocking ORMDL3 is a possible treatment method for neutrophil asthma.

**【Keywords】** neutrophil asthma; ORMDL3; endoplasmic reticulum stress; autophagy; molecular mechanism

支气管哮喘是由多种细胞及细胞组分参与的气道炎症性疾病,过去的研究认为嗜酸性粒细胞浸润是哮喘发病过程中气道炎症反应的主要原因,近些年的研究认为超过 50% 的哮喘以中性粒细胞浸润为主,中性粒细胞哮喘的临床表现及肺功能均较嗜酸性粒细胞哮喘更差<sup>[1-2]</sup>,但关于中性粒细胞哮喘的发病机制尚不十分清楚。有研究报道,在哮喘发病过程中,气道内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)及细胞自噬均过度激活,ERS 介导细胞自噬激活、自噬标志基因 Beclin-1 表达增加且 LC3-I 向 LC3-II 转化,可能引起气道上皮损伤、增加气道反应性<sup>[3-4]</sup>。

ORMDL3 (ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3) 基因是新发现的哮喘易感基因,定位于 17q21 染色体区,主要的生物学功能包括调控 ERS 及细胞自噬等<sup>[5-6]</sup>。ERS 相关的信号通路包括蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) 通路、肌醇酶 1 (inositol-requiring enzyme 1, IRE1) 通路、活化转录因子 6 (activating transcription factor, ATF6) 通路,其中 ORMDL3 重要通过 ATF6 通路实现对 ERS 的调控。但 ORMDL3 在中性粒细胞哮喘发病中的作用是否与 ERS 介导的细胞自噬有关尚不明确。因此,本研究将通过一系列动物实验来阐明 ORMDL3 通过 ERS 介导的细胞自噬在中性粒细胞哮喘发病中的作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物公司[SCXK(沪)2018-0006],共 72 只,SPF 级,8~

10 周龄,体重 180~200 g。饲养单位为山东中医药大学高等专科学校[SYXK(鲁)2019-0051]。动物实验获得山东中医药高等专科学校伦理委员会批准(ktyd-2019-023),实验过程遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

脂多糖(LPS,批号 L2880)、卵白蛋白(OVA,批号 A5253)(Sigma 公司,美国);ORMDL3-siRNA 慢病毒、阴性对照(negative control,NC)-siRNA 慢病毒(吉凯公司,上海),滴度均为  $1 \times 10^9$  TU/mL;ERS 激动剂毒胡萝卜素(批号 HY-13433, MCE 公司,美国);ORMDL3(批号 ab211522)、PERK(批号 ab229912)、IRE1 $\alpha$ (批号 ab37073)、ATF6(批号 ab122897)、Beclin-1(批号 ab207612)、LC3(批号 ab192890)一抗(Abcam 公司,美国)。

小动物肺功能仪(新行兴业科贸公司,北京);正置显微镜(Nikon 公司,日本);凝胶电泳系统(Bio-rad 公司,美国);凝胶成像系统(勤翔公司,上海)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及干预

动物实验分为两部分,第 1 部分研究 ORMDL3 在中性粒细胞哮喘中的作用,实验动物随机分为对照组、模型组、模型+NC-siRNA 组、模型+ORMDL3-siRNA 组,后 3 组进行中性粒细胞哮喘模型制备:第 1、7、14 天时给予 0.1  $\mu$ g LPS 滴鼻、100  $\mu$ g OVA 腹腔注射,第 15 天起给予 10 g/L OVA 雾化吸入激发、每天 1 次、每次 30 min、连续 14 d。模型+NC-siRNA 组、模型+ORMDL3-siRNA 组在第 15 天、即 OVA 激发前进行干预,分别给予 NC-siRNA 慢病毒、ORMDL3-siRNA 慢病毒 50  $\mu$ L 经气道注入。

第 2 部分研究 ERS 在 ORMDL3 参与中性粒细

胞哮喘中的作用,实验动物随机分为溶剂对照组、模型+溶剂组、模型+NC-siRNA+溶剂组、模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组、模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组,造模方法和慢病毒注射方法同第 1 部分,模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组第 15 天起,给予 300 ng/kg 毒胡萝卜素腹腔注射、每天 1 次,其余各组给予等剂量溶剂腹腔注射、每天 1 次。

### 1.3.2 气道功能检测

末次激发后 24 h,采用小动物肺功能仪连接,测定 0.2 s 用力呼气容积 (FEV<sub>0.2</sub>) 占用力肺活量 (FVC) 的比值,FEV<sub>0.2</sub>/FVC 以及呼气峰流速 (PEF)。

### 1.3.3 肺组织病理改变检测

完成气道功能检测后,处死大鼠并收集适量肺组织,生理盐水清洗后 4% 多聚甲醛固定,制作病理切片后采用 HE 染色试剂盒进行实验,按照试剂盒说明书进行染色并在显微镜下观察肺组织病理改变。

### 1.3.4 蛋白表达水平检测

另取适量肺组织,采用组织裂解液进行匀浆、提取组织蛋白,检测蛋白浓度并取 30 μg 蛋白进行实验,将蛋白样本加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,电泳分离不同分子量的蛋白后电转移至 NC 膜,4℃ 孵育 1:1000 稀释的 ORMDL3、PERK、IRE1α、ATF6、Beclin-1、LC3 一抗或 1:2500 稀释的 β-actin 一抗 16~24 h,室温孵育 1:2000 稀释的二抗 1 h,最后在凝胶成像系统中显影得到蛋白条带,根据条带吸光

值、以 β-actin 为内参,计算 ORMDL3、PERK、IRE1α、ATF6、Beclin-1、LC3 的表达水平。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件及 Prism 6.0 进行统计学分析及制图,实验数据均为计量资料,经正态性检验符合正态分布,采用平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,有统计学差异的资料进一步采用 LSD-*t* 法进行两两比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

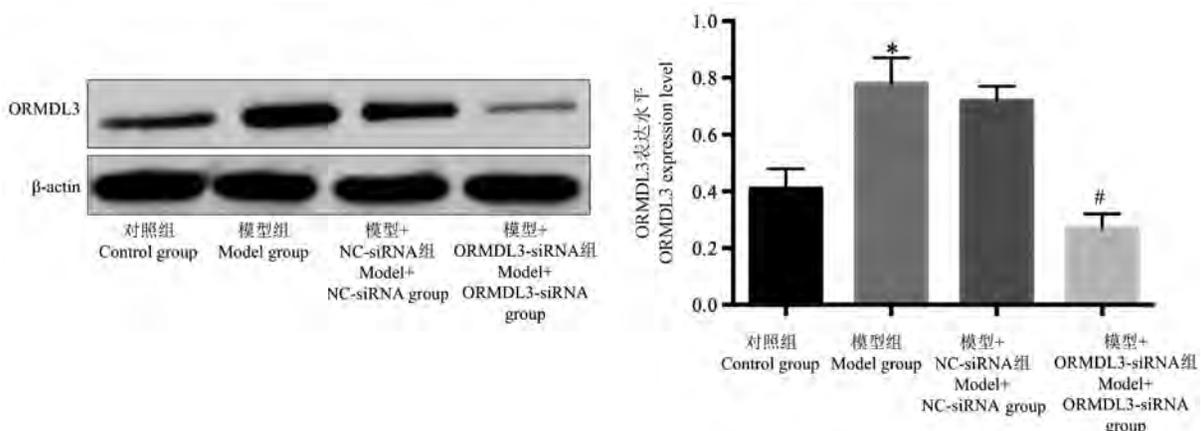
## 2 结果

### 2.1 中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织中 ORMDL3 表达的变化及注射慢病毒敲低 ORMDL3 的效果

模型组大鼠肺组织中 ORMDL3 的表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ),模型+NC-siRNA 组肺组织中 ORMDL3 的表达水平较模型组无明显变化 ( $P > 0.05$ ),模型+ORMDL3-siRNA 组肺组织中 ORMDL3 的表达水平较模型+NC-siRNA 组降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 敲低 ORMDL3 对中性粒细胞哮喘模型大鼠气道功能的影响

模型组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较对照组降低 ( $P < 0.05$ ),模型+NC-siRNA 组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较模型组无明显变化 ( $P > 0.05$ ),模型+ORMDL3-siRNA 组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较模型+NC-siRNA 组升高 ( $P < 0.05$ )。见图 2。



注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型+NC-siRNA 组相比,# $P < 0.05$ 。

图 1 4 组大鼠肺组织中 ORMDL3 表达水平的比较

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA group, # $P < 0.05$ .

Figure 1 Comparison of ORMDL3 expression level in lung tissues among four groups of rats

### 2.3 敲低 ORMDL3 对中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织病理改变的影响

对照组肺组织结构正常、未出现病理改变;模型组、模型+NC-siRNA 组均出现炎症细胞浸润,支气管管壁及平滑肌、基底膜增厚,管腔变窄等病理改变;模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组大鼠的肺组织病理改变较模型+NC-siRNA+溶剂组改善;模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组大鼠的肺组织病理改变较模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组加重。见图 3。

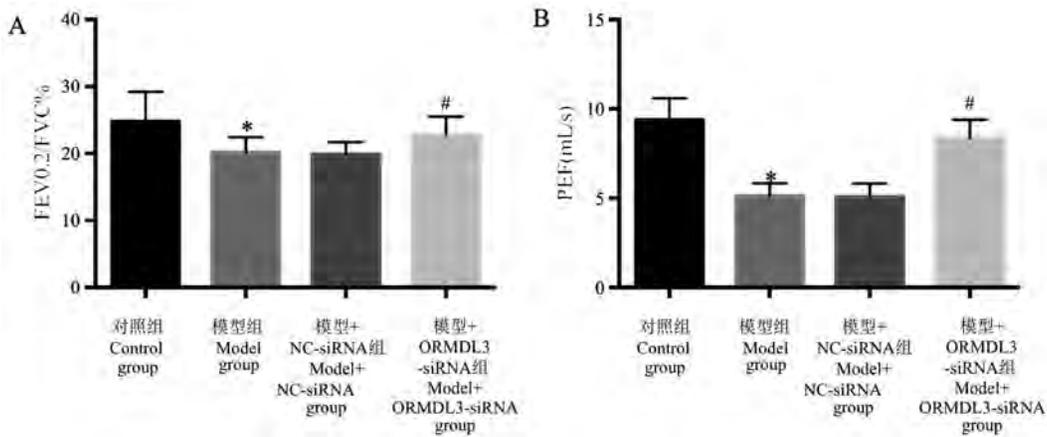
### 2.4 敲低 ORMDL3 对中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织中 ERS 标志基因表达的影响

模型组大鼠肺组织中 PERK、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 的表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ),模型+NC-

siRNA 组肺组织中 PERK、IRE1 $\alpha$ 、ATF6 的表达水平较模型组无明显变化 ( $P > 0.05$ ),模型+ORMDL3-siRNA 组肺组织中 ATF6 的表达水平较模型+NC-siRNA 组降低 ( $P < 0.05$ )、PERK 及 IRE1 $\alpha$  的表达水平较模型+NC-siRNA 组无明显变化 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

### 2.5 敲低 ORMDL3 对中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织中自噬标志基因表达的影响

模型组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较对照组升高 ( $P < 0.05$ ),模型+NC-siRNA 组肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较模型组无明显变化 ( $P > 0.05$ ),模型+ORMDL3-siRNA 组肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较模型+NC-siRNA 组降低 ( $P < 0.05$ )。见图 5。



注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型+NC-siRNA 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 4 组大鼠气道功能的比较

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA group, # $P < 0.05$ .

Figure 2 Comparison of airway function among four groups of rats

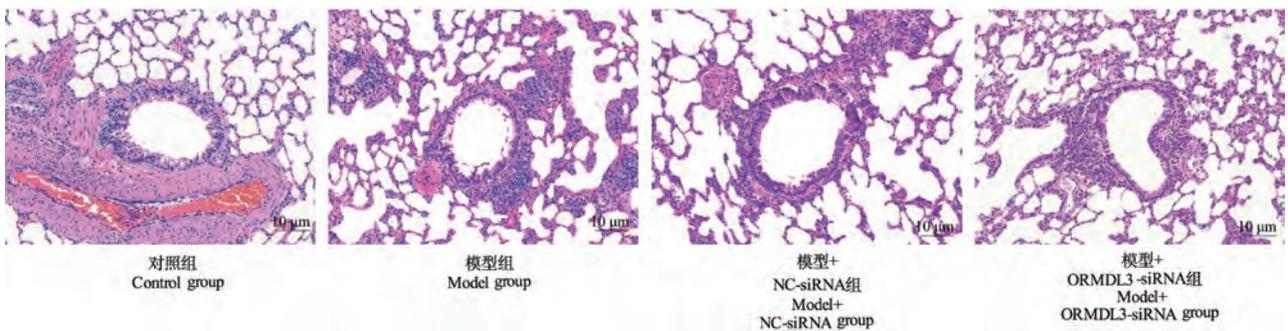


图 3 4 组大鼠肺组织病理改变的比较(HE 染色)

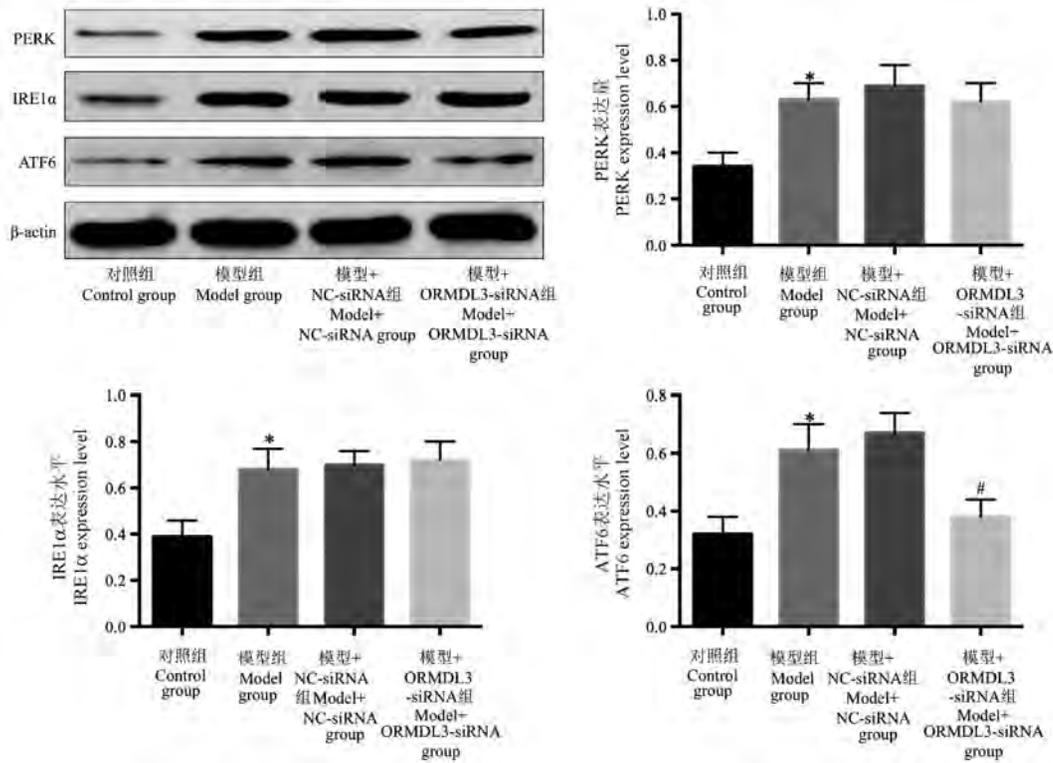
Figure 3 Comparison of pathological changes of lung tissue among four groups (HE staining)

**2.6 ERS 激动剂对敲低 ORMDL3 改善中性粒细胞哮喘模型大鼠气道功能的影响**

模型+溶剂组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较溶剂对照组降低 ( $P < 0.05$ ), 模型+NC-siRNA 组+溶剂组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较模型+溶剂组无变化 ( $P > 0.05$ ), 模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较模型+NC-siRNA 组+溶剂组升高 ( $P < 0.05$ ), 模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组大鼠的 FEV<sub>0.2</sub>/FVC、PEF 水平较模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组降低 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

**2.7 ERS 抑制剂对敲低 ORMDL3 改善中性粒细胞哮喘模型大鼠肺组织病理改变的影响**

溶剂对照组肺组织结构正常、未出现病理改变; 模型+溶剂组、模型+NC-siRNA 组+溶剂组均出现炎症细胞浸润, 支气管管壁及平滑肌、基底膜增厚, 管腔变窄等病理改变; 模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组大鼠的肺组织病理改变较模型+NC-siRNA 组+溶剂组改善; 模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组大鼠的肺组织病理改变较模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组加重。见图 7。

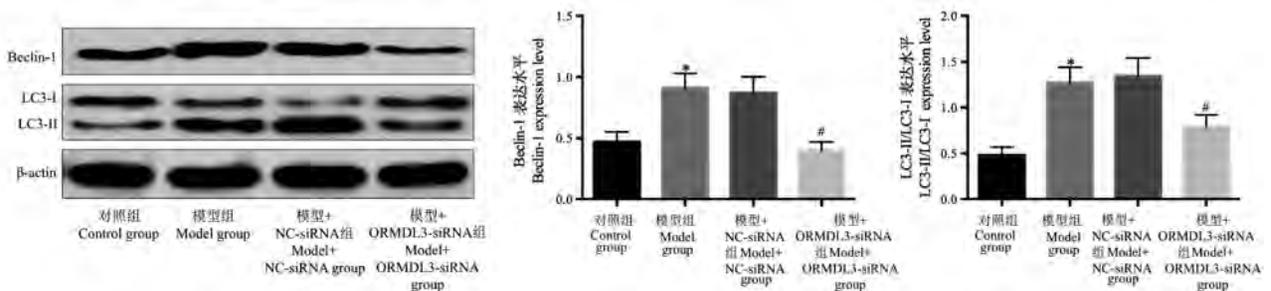


注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型+NC-siRNA 组相比, # $P < 0.05$ 。

**图 4** 4 组大鼠肺组织中 PERK、IRE1α、ATF6 表达水平的比较

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA group, # $P < 0.05$ .

**Figure 4** Comparison of PERK, IRE1α, ATF6 expression levels in lung tissue among four groups of rats



注: 与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型+NC-siRNA 组相比, # $P < 0.05$ 。

**图 5** 4 组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 表达水平的比较

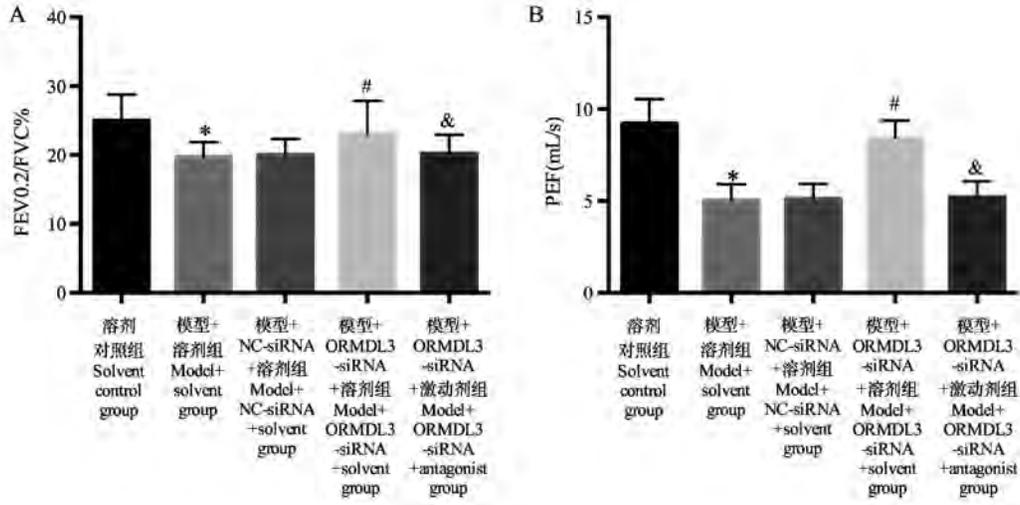
Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA group, # $P < 0.05$ .

**Figure 5** Comparison of Beclin-1, LC3-II/LC3-I expression levels in lung tissues among four groups of rats

**2.8 ERS 抑制剂对敲低 ORMDL3 抑制中性粒细胞哮喘模型小鼠肺组织自噬的影响**

模型+溶剂组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较溶剂对照组升高 ( $P < 0.05$ ), 模型+NC-siRNA 组+溶剂组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较模型+溶剂组无明显变

化 ( $P > 0.05$ ), 模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较模型+NC-siRNA 组+溶剂组降低 ( $P < 0.05$ ), 模型+ORMDL3-siRNA+激动剂组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 的表达水平较模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组升高 ( $P < 0.05$ )。见图 8。



注:与溶剂对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型+NC-siRNA+溶剂组相比, # $P < 0.05$ ;与模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组相比, & $P < 0.05$ 。

图 6 5 组大鼠气道功能的比较

Note. Compared with the solvent control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA+solvent group, # $P < 0.05$ . Compared with model+ORMDL3 siRNA+solvent group, & $P < 0.05$ .

Figure 6 Comparison of airway function among five groups of rats

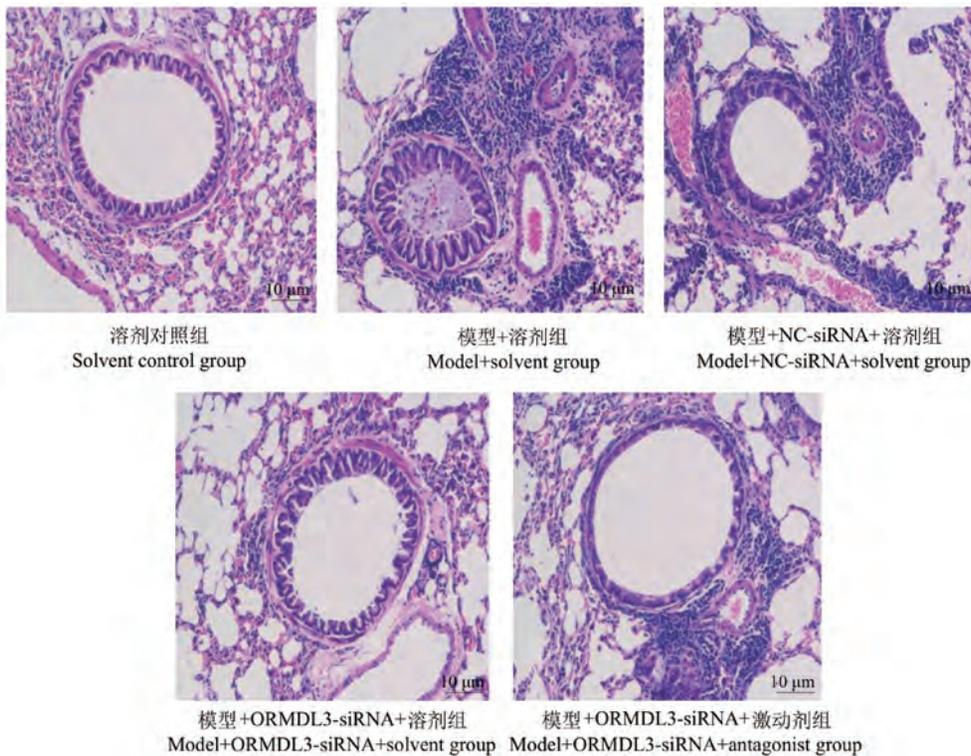
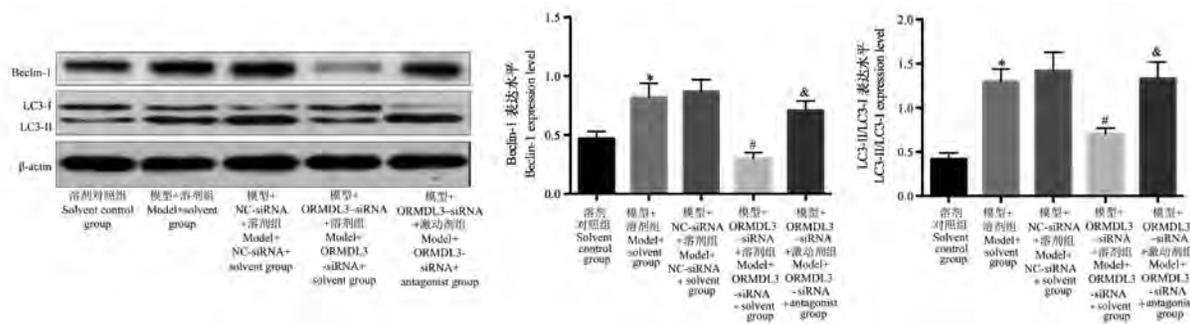


图 7 5 组大鼠肺组织病理改变的比较 (HE 染色)

Figure 7 Comparison of pathological changes of lung tissue among five groups (HE staining)



注:与溶剂对照组比较, \* $P < 0.05$ ;与模型+NC-siRNA+溶剂组比较, # $P < 0.05$ ;与模型+ORMDL3-siRNA+溶剂组比较, & $P < 0.05$ 。

图 8 5 组大鼠肺组织中 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 表达水平的比较

Note. Compared with the solvent control group, \* $P < 0.05$ . Compared with model+NC siRNA+solvent group, # $P < 0.05$ . Compared with model+ORMDL3 siRNA+solvent group, & $P < 0.05$ .

Figure 8 Comparison of Beclin-1, LC3-II/LC3-I expression levels in lung tissues among five groups of rats

### 3 讨论

中性粒细胞哮喘是哮喘的独立亚型,临床症状重、激素治疗反应差且机制未完全阐明。ORMDL3 基因属于 ORM 家族、定位于 17q21 染色体区,是哮喘易感基因;该家族另两个成员分别是 ORMDL1 及 ORMDL2,分别定位于 2q32 和 12q13.2 染色体区,未见其与哮喘相关的报道。本研究采用 LPS+OVA 致敏、OVA 激发的方式建立了中性粒细胞哮喘模型,模型大鼠出现了哮喘典型的气流受限、肺组织病理改变,且肺组织中 ORMDL3 表达增加,表明中性粒细胞哮喘模型制备成功且 ORMDL3 高表达与中性粒细胞哮喘的发病有关。进一步在 OVA 激发诱导哮喘前通过注射 ORMDL3-siRNA 慢病毒的方式敲低 ORMDL3 的表达,结果发现敲低 ORMDL3 的表达能够改善哮喘大鼠的气道功能及肺组织病理改变,表明 ORMDL3 表达增加与中性粒细胞哮喘的发病有关。

ORMDL3 具有多样的生物学功能,有研究报道 ORMDL3 在脾细胞<sup>[7]</sup>、β 细胞<sup>[8]</sup>、白细胞<sup>[9]</sup>中参与 ERS 的调控。ERS 是一种病理刺激下未折叠或错误折叠蛋白在内质网聚集引发的未折叠蛋白反应,由 PERK、IRE1α、ATF6 进行信号转导,其中 ORMDL3 主要通过 ATF6 通路激活 ERS。已有研究报道,在哮喘发病过程中存在 ERS 过度激活<sup>[10-12]</sup>,本研究也证实模型大鼠肺组织中 3 种 ERS 标志基因的表达水平均明显增加,与既往文献关于 ERS 与哮喘的报道一致<sup>[10-12]</sup>。在注射慢病毒敲低 ORMDL3 后,哮喘大鼠肺组织 ATF6 的表达水平降低,而 PERK、IRE1α 的表达水平无明显变化,表明

ORMDL3 参与 ERS 中 ATF6 通路的调控,高表达的 ORMDL3 可能通过激活 ERS 的 ATF6 通路参与哮喘发病,阻断 ORMDL3 抑制哮喘发病过程中 ERS 的 ATF6 通路并起到治疗作用。

ERS 在哮喘发病过程中的作用复杂,心脑血管相关的研究证实 ERS 是自噬的上游调控机制<sup>[13-14]</sup>。自噬是细胞内各种基质及细胞器通过溶酶体系统发生降解的过程,适度自噬有利于细胞在压力环境下存活,但过度激活的自噬会引起细胞损伤。在哮喘发病过程中自噬过度激活,使用自噬抑制剂能够改善哮喘大鼠的气道功能<sup>[15-16]</sup>。本研究在模型大鼠肺组织中检测到自噬标志基因 Beclin-1 及 LC3-II/LC3-I 的表达水平增加,敲低 ORMDL3 后 Beclin-1 及 LC3-II/LC3-I 的表达水平降低,表明高表达的 ORMDL3 在哮喘发病过程中参与自噬的激活。为了进一步阐明 ERS 介导的细胞自噬在 ORMDL3 参与中性粒细胞哮喘中的作用,本研究在敲低 ORMDL3 后给予 ERS 激动剂毒胡萝卜素干预,通过毒胡萝卜素激活 ERS 后,敲低 ORMDL3 改善气道功能、肺组织病理改变及抑制细胞自噬的作用发生逆转,表明 ORMDL3 参与中性粒细胞哮喘的作用与 ERS 介导的细胞自噬有关,阻断 ORMDL3 抑制哮喘发病过程中 ERS 介导的细胞自噬并起到治疗作用。

综上所述,在中性粒细胞哮喘的发病中,ORMDL3 参与 ERS 及细胞自噬的调控,高表达的 ORMDL3 通过 ERS 的 ATF6 通路激活细胞自噬,进而引起气流受限、肺组织病理改变。将来;阻断 ORMDL3 通过抑制 ERS ATF6 通路介导的细胞自噬改善气流受限、肺组织病理改变,有望成为治疗中性粒细胞哮喘的可能靶点。

## 参考文献:

- [ 1 ] Graff S, Bricmont N, Moermans C, et al. Clinical and biological factors associated with irreversible airway obstruction in adult asthma [J]. *Respir Med*, 2020, 175: 106202.
- [ 2 ] Daya M, Ortega VE. Asthma genomics and pharmacogenomics [J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 66: 136-142.
- [ 3 ] Miao K, Zhang L, Pan T, et al. Update on the role of endoplasmic reticulum stress in asthma [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(4): 1168-1183.
- [ 4 ] Dastghaib S, Kumar PS, Aftabi S, et al. Mechanisms targeting the unfolded protein response in asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(1): 29-38.
- [ 5 ] Dileepan M, Ha SG, Rastle-Simpson S, et al. Pulmonary delivery of ORMDL3 short hairpin RNA-a potential tool to regulate allergen-induced airway inflammation [J]. *Exp Lung Res*, 2020, 46(7): 243-257.
- [ 6 ] Kitazawa H, Masuko H, Kanazawa J, et al. ORMDL3/GSDMB genotype as a risk factor for early-onset adult asthma is linked to total serum IgE levels but not to allergic sensitization [J]. *Allergol Int*, 2021, 70(1): 55-60.
- [ 7 ] Dang J, Bian X, Ma X, et al. ORMDL3 facilitates the survival of splenic B cells via an ATF6 $\alpha$ -endoplasmic reticulum stress-beclin1 autophagy regulatory pathway [J]. *J Immunol*, 2017, 199(5): 1647-1659.
- [ 8 ] Yang W, Sheng F, Sun B, et al. The role of ORMDL3/ATF6 in compensated beta cell proliferation during early diabetes [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9): 2787-2796.
- [ 9 ] Liu YP, Rajamanikham V, Baron M, et al. Association of ORMDL3 with rhinovirus-induced endoplasmic reticulum stress and type I Interferon responses in human leucocytes [J]. *Clin Exp Allergy*, 2017, 47(3): 371-382.
- [ 10 ] Delmotte P, Sieck GC. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial function in airway smooth muscle [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 15(7): 374.
- [ 11 ] Rosen DA, Seki SM, Fernández-Castañeda A, et al. Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(478): eaau5266.
- [ 12 ] Unno H, Miller M, Rosenthal P, et al. Activating transcription factor 6 $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ ) regulates airway hyperreactivity, smooth muscle proliferation, and contractility [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1): 439-442.
- [ 13 ] 高鲁方, 周涛, 杨列红, 等. 自噬在内质网应激预处理减轻缺血再灌注心肌损伤中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(6): 1076-1079.
- [ 14 ] 齐文涛, 武永康. 内质网应激在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的作用 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2017, 25(7): 655-659.
- [ 15 ] 冉琴, 张雷, 邱玉环, 等. 3-甲基腺嘌呤对支气管哮喘小鼠气道炎症及气道高反应和黏液分泌的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42(3): 185-192.
- [ 16 ] Silveira JS, Antunes GL, Kaiber DB, et al. Autophagy induces eosinophil extracellular traps formation and allergic airway inflammation in a murine asthma model [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 267-280.

[收稿日期]2021-01-18

王君, 吴滨滨, 王晓东, 等. 补肾益气化痰冲剂对去卵巢骨质疏松模型大鼠血管形成的影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 54-61.

Wang J, Wu BB, Wang XD, et al. Effect of Bushen Yiqi Huayu granules on blood vessel formation in ovariectomized rats with osteoporosis and the mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 54-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.008

## 补肾益气化痰冲剂对去卵巢骨质疏松模型大鼠血管形成的影响及机制研究

王君<sup>1</sup>, 吴滨滨<sup>2</sup>, 王晓东<sup>3</sup>, 赵璇<sup>4</sup>, 张鑫<sup>5</sup>, 王若霖<sup>6</sup>, 修晓光<sup>2\*</sup>

(1. 青岛市中医医院(青岛市海慈医院)血管外科, 山东 青岛 266033; 2. 青岛市中医医院(青岛市海慈医院)关节外科, 山东 青岛 266033; 3. 黄岛区人民医院创伤、手足外科, 山东 青岛 266400; 4. 黄岛区人民医院呼吸内科, 山东 青岛 266400; 5. 青岛颐生健中西医结合骨伤医院骨科, 山东 青岛 266100; 6. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

**【摘要】** 目的 基于TLRs/NF- $\kappa$ B信号通路探究补肾益气化痰冲剂对骨质疏松大鼠血管形成的作用。方法 取60只SPF级雌性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、冲剂组和阳性对照组, 每组15只, 除假手术组外其余3组大鼠行双侧卵巢摘除术制备骨质疏松模型, 假手术组仅进行手术, 不摘除卵巢作为对照。冲剂组大鼠灌胃给药5 g/kg补肾益气化痰冲剂, 阳性对照组大鼠给予0.5 mg/kg阿仑磷酸钠灌胃处理, 模型组大鼠和假手术组大鼠进行等量生理盐水灌胃。连续给药12周后处死大鼠, 对大鼠股骨组织进行骨密度检测、HE染色观察、Micro-CT三维重建分析、CD31荧光免疫分析和血液灌注成像分析; ELISA检测血清中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 浓度; Western blot检测p50/p-p50和p65/p-p65蛋白的表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠骨密度低( $P < 0.05$ ), 骨小梁生长稀疏, 血管形成较慢, 数目较少, 血清中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 浓度明显下降( $P < 0.05$ ), 股骨组织中p50/p-p50、p65/p-p65蛋白表达明显升高; 与模型组比较, 冲剂组和阳性对照组大鼠骨小梁生长良好, 血管形成数目较多, 骨密度明显增加, 血清中VEGF和HIF-1 $\alpha$ 浓度明显上升( $P < 0.05$ ), p50/p-p50、p65/p-p65蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。结论 补肾益气化痰冲剂可能通过调控TLRs/NF- $\kappa$ B信号通路, 促进骨质疏松大鼠血管形成, 对缓解骨质疏松有重要作用。

**【关键词】** TLRs/NF- $\kappa$ B信号通路; 骨质疏松; 血管形成

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0054-08

### Effect of Bushen Yiqi Huayu granules on blood vessel formation in ovariectomized rats with osteoporosis and the mechanism

WANG Jun<sup>1</sup>, WU Binbin<sup>2</sup>, WANG Xiaodong<sup>3</sup>, ZHAO Xuan<sup>4</sup>, ZHANG Xin<sup>5</sup>, WANG Ruolin<sup>6</sup>, XIU Xiaoguang<sup>2\*</sup>

(1. Vascular Surgery, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine(Qingdao Hiser Hospital), Qingdao 266033, China.

2. Joint Surgery, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine(Qingdao Hiser Hospital), Qingdao 266033.

3. Department of Trauma, Hand and Foot Surgery, People's Hospital of Huangdao District, Qingdao 266400.

4. Department of Respiratory Medicine, Huangdao District People's Hospital, Qingdao 266400. 5. Department of

Orthopaedics, Qingdao Yisheng Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Bone Injury Hospital,

Qingdao 266100. 6. Yantai University School of Pharmacy, Yantai 264005)

**【基金项目】** 青岛市2018-2019年度中医药科研项目(2019-zyy026)。

**【作者简介】** 王君(1977—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 血管狭窄, 骨质疏松。E-mail: 408377925@QQ.com

**【通信作者】** 修晓光(1975—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 骨质疏松, 骨组织工程。E-mail: uar5q0@163.com

**【Abstract】 Objective** In terms of the TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway, we explored the effect of Bushen Yiqi Huayu granules on the formation of blood vessels in osteoporotic rats. **Methods** Sixty SPF female SD rats were randomly divided into sham operation, model, granule and positive control groups with 15 rats in each group. Except for the sham operation group, the other three groups were subjected to bilateral ovarian extraction to prepare an osteoporotic model. The sham operation group underwent surgery only without removing the ovaries as a control. Rats in the granule group were administered 5 g/kg Bushen Yiqi Huayu granules by gavage, rats in the positive control group were administered 0.5 mg/kg alendronate sodium tablets by gavage, and rats in model and sham operation groups were administered a gavage with the same amount of normal saline. After 12 weeks of continuous administration, the rats were sacrificed. Femoral tissues of the rats were subjected to bone density testing, HE staining, Micro-CT three-dimensional reconstruction analysis, CD31 fluorescence immunoassay, and blood perfusion imaging analysis. Serum VEGF and HIF-1 $\alpha$  concentrations were measured by ELISA. Western blot was used to detect expression of p50/p-p50 and p65/p-p65 protein. **Results** Compared with the sham operation group, rats in the model group had a low bone density ( $P < 0.05$ ), trabecular bone growth was sparse, blood vessel formation was slower, the number of blood vessels was smaller, serum VEGF and HIF-1 $\alpha$  concentrations were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and expression of p50/p-p50 and p65/p-p65 proteins in femoral tissues was increased significantly. Compared with the model group, the trabeculae of rats in granule and positive control groups grew well, the number of blood vessels was formed, bone density was increased significantly, serum levels of VEGF and HIF-1 $\alpha$  were increased significantly ( $P < 0.05$ ), and the protein levels of p50/p-p50 and p65/p-p65 were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Bushen Yiqi Huayu granules may promote the angiogenesis in osteoporotic rats by regulating the TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway and plays an important role in alleviating osteoporosis.

**【Keywords】** TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway; osteoporosis; angiogenesis

随着人口老龄化的加剧,中老年群体高发疾病受到更多关注,其中骨质疏松症(osteoporosis, OP)中多发于绝经妇女和老年群体,据流行病学调查,我国 64.6% 老年人患有骨质疏松症<sup>[1]</sup>。骨质疏松症主要表现为以骨密度(bone mineral density, BMD)降低、骨量减少、骨微结构破坏导致脆性增加,骨骼质量下降,骨折发生风险提高的骨代谢性疾病<sup>[2]</sup>。女性停经后骨密度急速下降,绝经后骨质丢失情况加剧,绝经 5 年内丢失骨量达到总骨量的 10%, 出现绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)<sup>[3]</sup>。PMOP 的致病机制是研究的热点,主要集中于雌激素的下降和骨-血管的耦联<sup>[4]</sup>。血管的形成能为骨骼发育以及再生修复提供所需营养,在减缓骨质疏松症中起到了重要作用<sup>[5]</sup>。

Toll 样受体(Toll-like receptor, TLRs)是一类 I 型跨膜蛋白,通过特异性识别病原体,参与机体的非特异性免疫反应,并进行跨膜转运,产生级联信号反应,活化下游转录因子,介导免疫应答<sup>[6]</sup>。核因子  $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)是细胞内影响成骨细胞和破骨细胞分化形成的转录因子,其所在信号通路对成骨细胞的增殖和分化有重要调控作用<sup>[7]</sup>。TLRs/NF- $\kappa$ B 通路参与调解机体的炎症反应和免疫反应,并通过影响成骨细胞和破骨细胞介

导骨质疏松症的发展。已有研究发现补肾类中药方剂对 OP 有较好疗效<sup>[8]</sup>。本研究利用卵巢去势大鼠构建骨质疏松模型,从血管形成的角度来看探究补肾益气冲剂基于 TLRs/NF- $\kappa$ B 通路对骨质疏松症的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

60 只 9 周龄 SPF 级健康雌性 SD 大鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SYXK(沪)2017-0008],平均体重(220 $\pm$ 15)g,饲养于青岛汉德森生物科技有限公司[SYXK(鲁)2019-0010],饲养室保持良好通风,温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度(50 $\pm$ 10)%,12 h 明/12 h 暗,标准饲料,自由饮水,饲养 1 周以适应环境,第 2 周开始进行实验。动物实验已通过本院实验动物伦理与管理委员会审批(2019050802),严格按照 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

补肾益气化痰冲剂制于青岛市中医医院药剂科(生产批号:201932);阿仑磷酸钠片购于中国扬子江药业集团;Microfil 硅胶灌注显影剂购于美国 Flow Tech 公司;EDTA 脱钙液购自上海如吉生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购于上海恒远生物公司;兔抗 CD31 单克隆抗体、HE 染色试剂

盒和 DAPI 染色液购自上海碧云天公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒购于上海晶抗生物工程有限公司。

台式低温高速离心机(济南来宝医疗器械有限公司);恒冷切片机(德国徕卡公司);SktScan1176 Micro-CT 扫描仪(德国 Bruker 公司);双能 X 线骨密度测试仪(美国 GE 公司);光学显微镜(日本奥林巴斯公司);倒置荧光显微镜(德国徕卡公司);Western blot 垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组和骨质疏松症模型构建

60 只大鼠根据体重分层随机化原则分为 4 组:假手术组、模型组、冲剂组、阳性对照组,每组 15 只。大鼠禁食 24 h 后,造模大鼠行双侧卵巢摘除术。对所有大鼠进行称重,根据体重腹腔注射 40 mg/kg 的戊巴比妥钠进行麻醉,碘伏消毒后,经背部中线纵行 1.5 cm 切口,依次分离进入腹腔,假手术组大鼠仅进行手术,不切除双侧卵巢,其余 3 组大鼠沿输卵管,找到桑葚状卵巢组织,轻提出卵巢并分离周围脂肪组织,严密结扎输卵管,切除双侧卵巢,逐层缝合,术后连续肌肉注射 10 万 U 青霉素 3 d,预防感染。

#### 1.3.2 给药处理

造模 2 周后,各组大鼠分别进行给药处理:冲剂组给予 5 g/kg 补肾益气化痰冲剂灌胃处理;阳性对照组给予 0.5 mg/kg 阿仑磷酸钠片灌胃处理;假手术组和模型组大鼠给予等量生理盐水灌胃处理。各组大鼠每天灌胃给药 1 次,连续给药 12 周。各组大鼠统一饲养环境条件,自由饮水和进食标准饲料,分笼饲养,定期消毒和通风。

#### 1.3.3 样本处理

最后 1 次灌胃给药后禁食 24 h,腹腔注射 10% 戊巴比妥钠麻醉,每组 15 只大鼠中选取 10 只处死,打开腹腔,腹腔主动脉采血 5 mL,转速 3000 r/min,离心 15 min,取上层血清 1.5 mL, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。剥离大鼠双侧股骨并剔除周围软组织, 0.9% NaCl 冲洗 1 min, 右侧股骨用 PBS 浸湿的纱布包裹放入 -20 $^{\circ}$ C 的冰柜中保存,用于骨密度检测、Micro-CT 分析、骨组织冷冻切片;左侧股骨用于提取组织蛋白。每组另外 5 只大鼠采取麻醉后腹主动脉放血法处死<sup>[9]</sup>,用于硅酮橡胶(MicroFil)灌注。

#### 1.3.4 HE 染色观察

取右侧股骨,放入液氮中速冻 10 s, OCT 包埋胶

固定,使用冷冻切片机进行切片,取股骨组织冷冻切片,固定,经苏木素-伊红染色,乙醇脱水,二甲苯透明,干燥,中性树胶封片,光学显微镜下观察大鼠股骨组织细胞形态并拍摄照片。

#### 1.3.5 骨密度检测、Micro-CT 和血管灌注成像

取大鼠右侧股骨,在双能 X 线骨密度测试仪 BMD 测量,分辨率设为 1.0 mm $\times$ 1.0 mm,扫描速度设为 60 mm/s,以股骨头中心区域 2.0 mm $\times$ 1.5 mm 为扫描兴趣区域,分析 BMD (g/cm<sup>2</sup>),连续测量 5 次,并记录。

使用 Micro-CT 分析四组大鼠远端股骨,分辨率为 10  $\mu$ m,管电压为 50 kV,管电流为 400  $\mu$ A,曝光时间 300 ms, 360 $^{\circ}$  扫描股骨近端部位,使用 Micro View 和 Med Project 4.1 软件对大鼠股骨标本进行三维重建,并测量骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)和骨小梁间距(trabecular spacing, Tb.Sp),每组图片 3 D 重建条件一致。

每组用于血管灌注的 5 只大鼠麻醉后,打开腹腔,在腹主动脉近心端结扎,结扎线远端置入留置针,并连接至生理盐水瓶中,排出血液,灌 10% 甲醛溶液,使血管硬化,小鼠双腿和尾巴出现抖动后灌注 MicroFil 溶液,大鼠后肢足趾出现黄色造影剂,说明灌注成功,大鼠标本在 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,次日收集股骨, 10% 甲醛溶液室温固定, 10% EDTA 脱钙液进行脱钙 5 周,使用 Micro-CT 检测股骨组织微血管形态。

#### 1.3.6 免疫荧光染色分析

取大鼠右侧股骨冷冻切片, PBS 漂洗,室温封闭 1 h,加入 CD31 单抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h; PBS 漂洗; DAPI 避光复染 5 min; PBS 漂洗,封片后荧光显微镜观察并拍摄照片。

#### 1.3.7 ELISA 检测血清 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$ 浓度

取大鼠血清,按照 VEGF、HIF-1 $\alpha$  ELISA 试剂盒及 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作。用酶标仪在波长 450 nm 处测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算 4 组大鼠血清样本中 VEGF、HIF-1 $\alpha$  的浓度。

#### 1.3.8 Western blot 分析 p-p50/p50 和 p-p65/p65 蛋白的表达

分别称取 4 组大鼠的左侧股骨组织 90 mg,加入液氮研磨成粉状,加入蛋白裂解液制得组织匀浆液,用 TRIzol 法提取组织总蛋白,采用 BCA 法对蛋白进行定量,上样进行凝胶电泳 30 min,转膜,室温下 5% BSA 封闭 3 h,加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,

室温孵育二抗,显色成像,用 Image-Lab 分析灰度值,GAPDH 作为内参对照。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad 5.0 软件分析实验数据,定量数据用平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,实验数据进行正态性和方差性检验,骨密度比较采用重复测量资料的方差分析,VEGF、HIF-1 $\alpha$  浓度及 p50/p-p50、p65/p-p65 的表达采用单因素方差分析进行组间比较,两两比较采用 SNK 法, $P<0.05$  表示差异显著,结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠骨密度检测结果比较

各组大鼠股骨远端骨密度检测结果比较见图 1,与假手术组比较,模型组股骨 BMD 明显降低,冲剂组和阳性对照组较模型组股骨 BMD 明显增加,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。通过模型组 BMD 再次说明本次骨质疏松大鼠模型制备成功( $P<0.05$ )。

2.2 4 组大鼠股骨组织形态观察结果比较

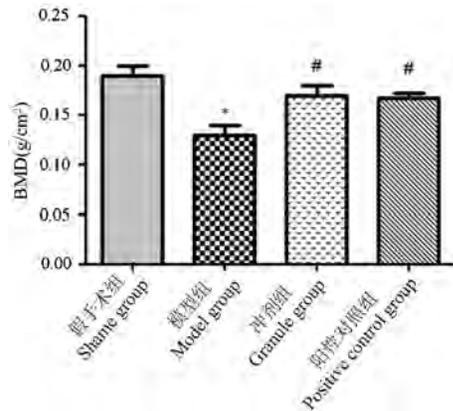
4 组大鼠股骨组织 HE 染色观察结果见图 2,假手术组大鼠股骨有大量新生血管形成,骨小梁排列致密;模型组新生血管少,骨小梁生长稀疏;冲剂组新生血管较模型组多,有部分骨小梁生长,排列有序;阳性对照组新生血管情况与冲剂组相近,骨小梁生长良好。

2.3 4 组大鼠 MicroFil 血管灌注结果比较

4 组大鼠 MicroFil 血管灌注结果见图 3,与假手术组比较,模型组血管数量少,冲剂组和阳性对照组血管数量明显比模型组多。

2.4 4 组大鼠 Micro-CT 分析结果比较

Micro-CT 的三维重建图像和定量分析结果见图 4,可看出模型组大鼠骨量和骨小梁厚度明显低于假手术组,骨小梁间距明显高于假手术组;冲剂组和阳性对照组大鼠的股骨骨量及骨小梁厚度与假手术组相近,较模型组明显增多,骨小梁间距明显低于模型组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。



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

图 1 4 组大鼠股骨 BMD 比较( $n=10$ )

Note. Compared with Sham group, \* $P<0.05$ . Compared with Model group, # $P<0.05$ .

Figure 1 BMD comparison of femur among four groups rats

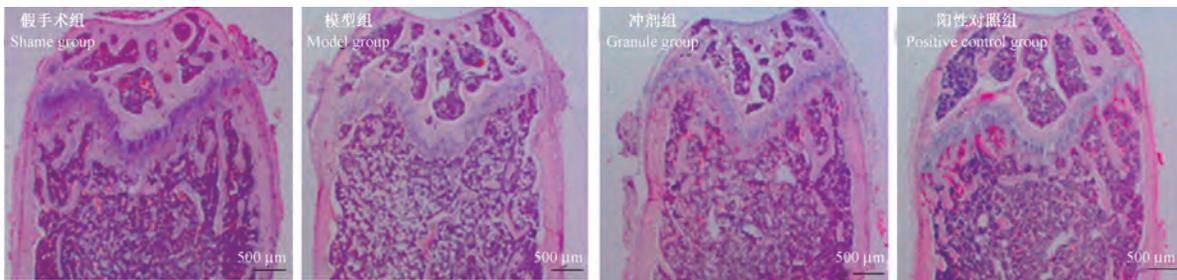


图 2 4 组大鼠股骨组织 HE 染色形态观察比较

Figure 2 HE staining morphology comparison of femur tissues among four groups rats

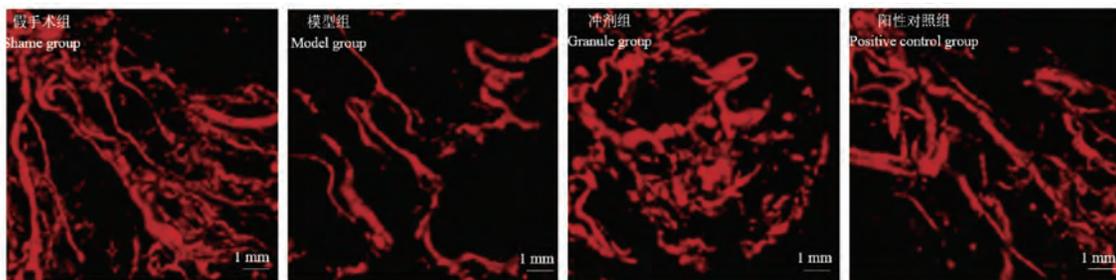


图 3 大鼠股骨的 MicroFil 血管造影

Figure 3 MicroFil angiography of rat femur

**2.5 4 组大鼠 CD31 免疫荧光分析结果**

大鼠股骨组织冷冻切片 CD31 的免疫荧光结果见图 5, 与假手术组比较, 模型组 CD31 荧光数目明显减少, 冲剂组和阳性对照组荧光数目减少, 但明显多于模型组。

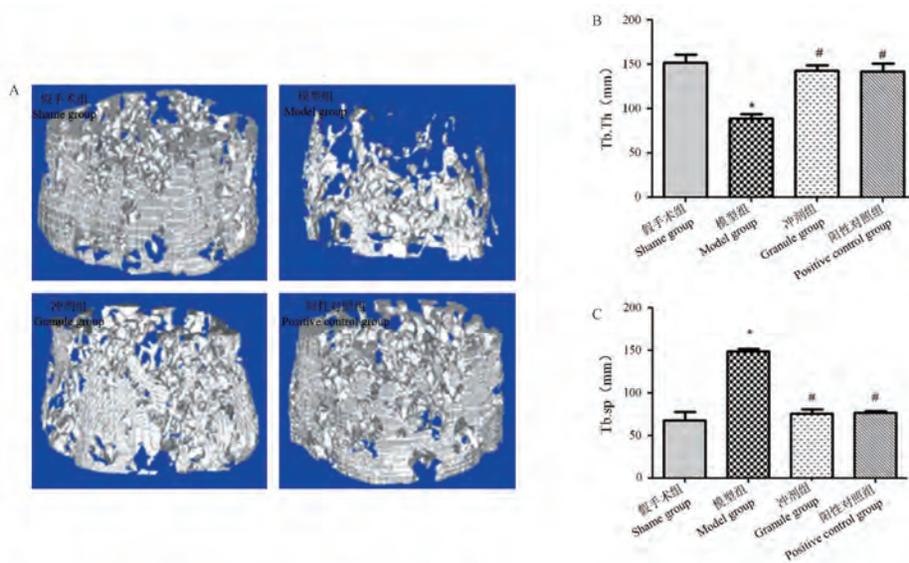
**2.6 4 组大鼠血清 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  含量比较**

4 组大鼠血清 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  浓度比较见图 6, 模型组大鼠血清 VEGF 与 HIF-1 $\alpha$  浓度较假手术组明显降低, 冲剂组和阳性对照组与假手术组差异

不显著, 较模型组浓度明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.7 p-p50/p50 和 p-p65/p65 蛋白表达情况比较**

与假手术组比, 模型组 p-p50/p50 和 p-p65/p65 蛋白表达比值上升, 冲剂组和阳性对照组蛋白表达比值上升不明显; 与模型组比, 冲剂组和阳性对照组蛋白表达比值明显下降表达水平明显上升, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 4 组大鼠股骨组织 Western blot 电泳图和蛋白表达量比较结果见图 7。

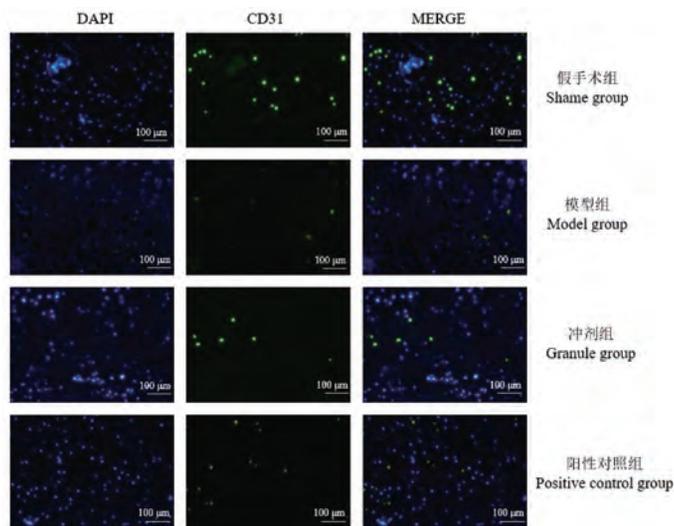


注: A: 股骨扫描图像比较; B: Micro-CT 定量分析 Tb.Th 比较; C: Micro-CT 定量分析 Tb.Sp 比较。与假手术组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

**图 4** 4 组大鼠 Micro-CT 分析

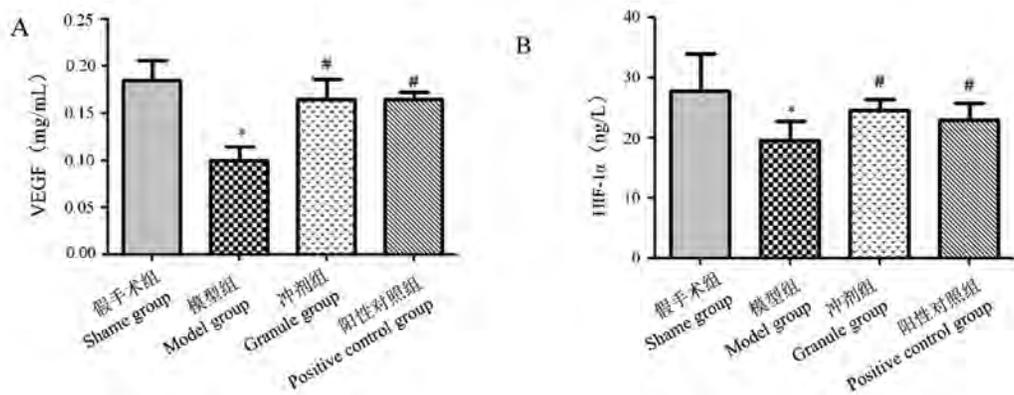
Note. A, Femoral scan image comparison. B, Micro-CT quantitative analysis Tb.Th comparison. C, Micro-CT quantitative analysis Tb.Sp comparison. Compared with Sham group, \* $P < 0.05$ . Compared with Model group, # $P < 0.05$ .

**Figure 4** Micro-CT analysis among four groups rats



**图 5** 4 组大鼠股骨组织中 CD31 和 DAPI 的免疫荧光结果

**Figure 5** Immunofluorescence results of CD31 and DAPI in the femur tissues among four groups rats

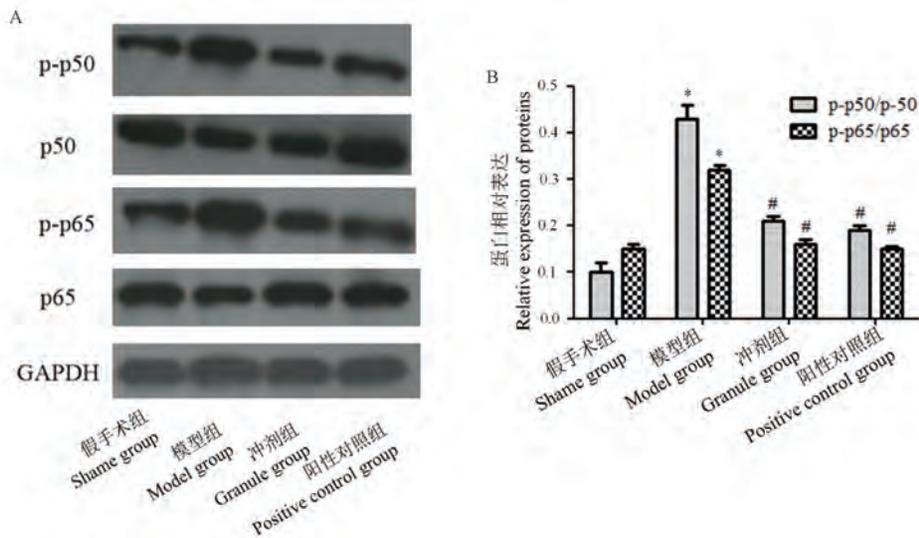


注:与假手术组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠血清 VEGF 和 HIF-1α 浓度比较

Note. Compared with Sham group, \* $P < 0.05$ . Compared with Model group, # $P < 0.05$ .

Figure 6 Serum VEGF and HIF-1α concentrations comparison among four groups rats



注:A:四组大鼠 p-p50/p50 和 p-p65/p65 凝胶电泳图;B:4 组大鼠 p-p50/p50 和 p-p65/p65 蛋白表达水平定量比较。与假手术组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 Western blot 检测 p-p50/p50 和 p-p65/p65 蛋白表达水平

Note. A, p-p50/p50 and p-p65/p65 gel electrophoresis. B, Quantitative comparison of p-p50/p50 and p-p65/p65 protein expression levels. Compared with Sham group, \* $P < 0.05$ . Compared with Model group, # $P < 0.05$ .

Figure 7 Western blot detection of p-p50/p50 and p-p65/p65 protein expression levels

### 3 讨论

PMOP 发病率在绝经女性中高达 40%, BMD 下降速度为绝经前的 3 倍, 骨折风险随之增加, 严重影响女性身心健康和生活<sup>[10]</sup>。OP 是多阶段的复杂氧化应激过程, 对体内细胞有毒性作用, 会引起内皮细胞受损或者细胞坏死, OP 的发生受到多个因素的影响<sup>[11]</sup>。PMOP 的发生可能与绝经女性体内雌激素水平显著下降有关<sup>[12]</sup>, 部分研究者认为 OP 的发生与骨组织微血管减少有关<sup>[13]</sup>, 目前关于骨质疏

松的发病机制并没有明确的结论。机体内骨形成和骨吸收处于一个动态代谢过程, 随着年龄增长, 血管功能受损, 成骨所需营养不足, 骨形成速度低于骨吸收速度, 骨质下降, 骨量减少, 出现骨质疏松的症状。研究表明血管数目的减少加速了骨质疏松症状的发生和发展, 促进局部血管生长对骨质疏松的症状有缓解作用<sup>[14]</sup>。据已有实验研究报道, 去势小鼠雌激素减少, 骨代谢平衡遭到破坏, 骨转换率增加, 单位体积内骨组织量减少, 骨质疏松小鼠骨组织内部血管明显少于对照组小鼠, 再一次验证

骨组织血管形成与骨质疏松有关<sup>[15]</sup>。PMOP 在中医理论里属于“骨萎”，肾精渐衰，骨髓空虚，遂致骨质疏松<sup>[16]</sup>。本研究通过切除双侧卵巢，构建骨质疏松大鼠模型，通过对 4 组大鼠进行股骨 BMD 测定和骨组织形态观察，可以说明卵巢去势大鼠构建 OP 模型成功，同时通过补肾化痰冲剂和阿仑磷酸钠片治疗的大鼠，骨密度增加，骨小梁生长状况较好，说明补肾化痰冲剂对骨质疏松症有治疗效果。骨组织 HE 染色结果和 Micro-CT 扫描结果表明冲剂组用药治疗后，OP 大鼠血管形成状况好转，说明补肾益气化痰方剂可能对骨质疏松群体的血管形成有促进作用。

骨组织血管状态可以为骨发育提供氧气、无机盐、激素等生长所需物质，并运送新陈代谢产物，对骨重建起到了重要作用<sup>[17]</sup>。CD31 是血小板内皮细胞黏附分子，其抗原广泛分布于血管内皮细胞、血小板、巨噬细胞、淋巴细胞，主要参与血管形成、白细胞迁移等生理活动，可作为评估血管形成的标记分子<sup>[18]</sup>。王亮等<sup>[19]</sup>通过对 CD31 和 EMCN 进行免疫荧光染色，对骨标本的 H 型血管进行显像，来表现 OP 小鼠 H 型血管的变化。HIF-1 $\alpha$  是氧依赖性调节蛋白，在低氧条件下，能转入核内，与 HIF-1 $\beta$  作用，激活体内的缺氧适应性反应<sup>[20]</sup>。OP 导致血管受损，骨组织微血管减少，骨重建所需营养物质运送不足，形成骨组织的低氧环境。缺氧条件下，骨组织中 HIF-1 $\alpha$  能激活 VEGF 表达，形成骨组织血管网络<sup>[21]</sup>。VEGF 是重要的促进血管形成的细胞因子，能增加血管内皮细胞的通透性，并刺激血管内皮细胞的有丝分裂<sup>[22]</sup>。一研究通过染料木黄酮干预治疗 OP 大鼠，来比较干预组大鼠和模型组大鼠间 VEGF 的表达差异，结果表明干预组大鼠血清和骨组织中 VEGF 的表达均高于模型组，且 BMD 值也高于模型组说明 VEGF 的表达有助于 OP 发生后骨重建过程<sup>[23]</sup>。本研究对 4 组大鼠的股骨组织进行 CD31 免疫荧光染色和血清中 VEGF、HIF-1 $\alpha$  的浓度测定，发现经过药物治疗，CD31 染色情况显示大鼠骨组织中血管形成情况优于未经治疗的 OP 模型组大鼠，并且血清中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的含量较模型组大鼠也有明显升高，说明补肾化痰冲剂可能通过调节机体的 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达来影响血管形成。

NF- $\kappa$ B 在 TLRs 的下游，受到 TLRs 的调控，TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路参与机体细胞的增殖和分化及免疫反应等生理过程<sup>[24]</sup>。杨明镜等<sup>[25]</sup>研究表明

通过番茄红素预处理，细胞中 NF- $\kappa$ B 表达下调，揭示了番茄红素对 TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路的抑制，可能抑制机体的氧化应激反应，从而减轻细胞的缺氧损伤，说明 TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路与机体的氧化应激反应有关。阿仑磷酸钠通过诱导破骨细胞凋亡，能抑制骨吸收过程，已广泛应用于 OP 的治疗中。已有研究报道，通过对 OP 大鼠给予阿仑磷酸钠灌胃，发现给药大鼠 BMD 值，血液中钙、磷、雌激素含量和骨小梁明显增加，而骨组织中 p-p50/p50 和 p-p65/p65 的表达显著降低<sup>[26]</sup>。说明阿仑磷酸钠片可抑制 OP 大鼠骨组织中 p-p50/p50 和 p-p65/p65 的表达，从而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路，影响破骨细胞的形成。研究表明 NF- $\kappa$ B 对 HIF-1 $\alpha$  的表达具有调控作用，但作用机制较为复杂，在不同条件下，NF- $\kappa$ B 对 HIF-1 的表达具有正向或负向调控的作用。缺氧条件下，抑制 NF- $\kappa$ B，会激活 HIF-1 $\alpha$  的表达<sup>[27]</sup>。本研究采用阿仑磷酸钠片灌胃给药的大鼠作为阳性对照，对 4 组大鼠骨组织中 p-p50/p50 和 p-p65/p65 的表达水平进行分析，发现冲剂组和阳性对照组大鼠 p-p50/p50 和 p-p65/p65 的表达量低于模型组大鼠，说明在治疗过程中，冲剂组大鼠骨组织中 NF- $\kappa$ B 通路可能受到抑制。而冲剂组大鼠血清中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的含量高于模型组大鼠，说明抑制 NF- $\kappa$ B 通路，可能对 HIF-1 $\alpha$  具有正向调控的作用。补肾化痰冲剂影响 TLRs/NF- $\kappa$ B 通路，进而调控 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的具体机制仍需进一步的分子实验研究。

综上所述，补肾益气化痰冲剂可能通过调控 TLRs/NF- $\kappa$ B 通路，对卵巢去势大鼠血管形成起到了促进作用，有助于骨质疏松症的缓解。

#### 参考文献：

- [1] 岳剑宁. 中国骨质疏松症现状及其相关慢性疼痛的社区层面诊治方法 [J]. 中国全科医学, 2020, 23(18): 2223-2228.
- [2] Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis [J]. Ann Intern Med, 2017, 167(3): ITC17-ITC32.
- [3] Yang C, Ren J, Li B, et al. Identification of gene biomarkers in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 1065-1073.
- [4] 申震, 姜自伟, 陈国茜, 等. 成血管-成骨耦联相关因子、细胞在骨中作用机制的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3): 458-463.
- [5] 韩钧, 孙伟, 高福强, 等. H 亚型血管与骨质疏松症 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(10): 1353-1356.
- [6] Dolasia K, Bisht MK, Pradhan G, et al. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity [J]. Int Rev Immunol, 2018, 37

- (1): 3-19.
- [ 7 ] Yin Z, Zhu W, Wu Q, et al. Glycyrrhizic acid suppresses osteoclast differentiation and postmenopausal osteoporosis by modulating the NF- $\kappa$ B, ERK, and JNK signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859(17): 255-263.
- [ 8 ] 闵文, 韩龙, 韩诗雨, 等. 补肾通络方对骨质疏松大鼠骨吸收的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(19): 4743-4746.
- [ 9 ] 谢思颖, 李遥金, 周文涛, 等. 聚合人脐带血红蛋白复苏液对失血性休克大鼠肝脏影响初步探究 [J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(3): 212-216.
- [ 10 ] 崔路坤, 吴云丹. 观察重组人甲状旁腺素(1-34)应用于绝经后骨质疏松症 (PMOP) 患者的治疗价值 [J]. *吉林医学*, 2020, 41(5): 1163-1164.
- [ 11 ] 彭涛, 李爱国, 何培亮. 绝经后骨质疏松与氧化应激相关研究进展 [J]. *中外医学研究*, 2020, 18(10): 186-188.
- [ 12 ] 张益舸. 不同浓度雌激素替代治疗卵巢去势大鼠骨质疏松中血管形成的作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [ 13 ] 刘佳明, 金秀平, 万秋霞, 等. 2 型糖尿病患者微血管病变与骨密度、骨代谢指标的相关性分析 [J]. *华北理工大学学报 (医学版)*, 2019, 21(3): 226-230.
- [ 14 ] 康思凤, 汤光宇. 脂肪组织与骨质疏松相关性及其机制的研究进展 [J]. *国际医学放射学杂志*, 2018, 41(1): 72-76.
- [ 15 ] 谭磊, 邢攸军. 甲状旁腺激素通过增加血管及骨的形成防治骨质疏松 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(9): 1112-1115.
- [ 16 ] 张洁, 林静, 陈燕. 补肾药膳方影响卵巢去势骨质疏松模型大鼠骨形成机制探讨 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(3): 353-356.
- [ 17 ] 刘颖, 孙昌俊, 王乐, 等. 甲状旁腺激素联合阿仑膦酸钠对大鼠骨质疏松性骨折骨痂血管形成的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(5): 669-673.
- [ 18 ] 张赐童. 软骨细胞通过转录因子 FoxO1 促进骨折愈合中血管的形成 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [ 19 ] 王亮, 盛茂, 袁晔, 等. 骨内 H 型血管在去势骨质疏松症模型中的变化 [J]. *中华骨科杂志*, 2020, 40(13): 873-879.
- [ 20 ] 熊权鑫. PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路对高原红细胞增多症大鼠骨髓组织中 HIF-1 $\alpha$  表达变化的调控作用研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [ 21 ] 左新慧, 李君, 韩祥祯, 等. 体外研究 BMSCs 中 HIF-1 $\alpha$  过表达与低表达对成骨和成血管相关因子的影响研究 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2020, 282(4): 15-20.
- [ 22 ] Garcia JR, Clark AY, Garcia AJ, et al. Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(4): 889-900.
- [ 23 ] 蔡吓明, 魏建铭. 染料木黄酮通过促进 VEGF 表达改善去势大鼠骨质疏松的作用机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(1): 10-13.
- [ 24 ] Gan F, Liu Q, Liu Y, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides improve CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis, inflammatory response and TLRs/NF- $\kappa$ B signaling pathway expression in wistar rats [J]. *Life Sci*, 2018, 192(10): 205-212.
- [ 25 ] 杨明镜, 刘伟伟, 印武. 番茄红素预处理对大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤时 TLRs/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2020, 40(1): 52-55.
- [ 26 ] 沈云玲, 魏静, 徐小宇. 阿仑膦酸钠通过调控 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路改善大鼠骨质疏松的发展 [J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(5): 391-395.
- [ 27 ] Jiang Y, Zhu Y, Wang XX, et al. Temporal regulation of HIF-1 and NF- $\kappa$ B in hypoxic hepatocarcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 9409-9419.

[ 收稿日期 ] 2021-01-28

蒋嘉烨, 栗源, 可燕. 卡托普利对 SHR 大鼠 eNOS、iNOS 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 62-69.

Jiang JY, Li Y, Ke Y. Effect of captopril on expression of eNOS and iNOS in spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 62-69.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.009

## 卡托普利对 SHR 大鼠 eNOS、iNOS 表达的影响

蒋嘉烨<sup>1</sup>, 栗源<sup>1</sup>, 可燕<sup>2\*</sup>

(1.上海中医药大学教学实验中心,上海 201203; 2.上海中医药大学科技实验中心,上海 201203)

**【摘要】目的** 探讨自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)在高血压发展进程中,卡托普利对 SHR 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的改善作用。**方法** 以 WKY(Wistar-Kyoto)大鼠为空白对照,SHR 为模型进行分组实验,7~24 周龄 SHR 灌服卡托普利(3.375 g/(kg·d)),后停药观察至 32 周龄。测量血压、左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)、主动脉舒张功能、血清亚硝酸根离子( $\text{NO}_2^-$ )含量、iNOS、eNOS mRNA 以及蛋白含量变化。**结果** (1)不同周龄的 SHR 左室质量指数、血清  $\text{NO}_2^-$  浓度均高于 WKY,主动脉的舒张度均显著低于 WKY。(2)mRNA 表达含量变化:与 WKY 相比,不同周龄的 SHR 的心肌和动脉 eNOS 和 iNOS mRNA 表达均较高,其中 eNOS/iNOS 最大值出现在 18 周龄;通过灌服卡托普利,在 24、32 周龄时可显著降低心肌和动脉 iNOS 和 eNOS mRNA 的表达。(3)蛋白表达含量变化:与 WKY 相比,18、24 周龄 SHR 的心肌和动脉 iNOS 蛋白含量显著升高,24 周龄 SHR 的动脉以及 18、24 周龄 SHR 的心肌 eNOS 蛋白含量显著升高;通过灌服卡托普利,在 18、24 周龄显著降低动脉 iNOS 蛋白表达,停药后作用消失;在 24 和 32 周龄显著降低心肌 iNOS 蛋白表达,在 32 周龄显著降低动脉 eNOS 蛋白表达和升高心肌 eNOS 蛋白表达。**结论** 高血压病理状态可导致 iNOS、eNOS 的过度表达,而 iNOS 和 eNOS 在体内的大量积聚反过来影响高血压的发生;伴随 SHR 高血压的发病进程,一氧化氮合酶—一氧化氮系统与左室肥厚和内皮功能具有一定的相关性;卡托普利能一定程度上抑制体内 iNOS 和 eNOS 的表达,并改善左室肥厚及血管内皮功能。

**【关键词】** 自发性高血压;内皮型一氧化氮合酶;诱导型一氧化氮合酶;卡托普利

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0062-08

## Effect of captopril on expression of eNOS and iNOS in spontaneously hypertensive rats

JIANG Jiaye<sup>1</sup>, LI Yuan<sup>1</sup>, KE Yan<sup>2\*</sup>

(1. the Experimental Center for Teaching and Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201023, China.

2. the Experiment Center of Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of captopril on expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in spontaneously hypertensive rats. **Methods** WKY (Wistar Kyoto) rats were used as the blank control. Spontaneous hypertensive rats (SHR) were used as the model group. SHR aged 7~24 weeks were administered captopril (3.375 g/(kg·d)) and observed at 32 weeks. Blood pressure, left ventricular mass index (LVMI), aortic diastolic function, serum nitrite ion ( $\text{NO}_2^-$ ), and mRNA and protein contents of iNOS and eNOS were measured. **Results** (1) The left ventricular mass index and serum  $\text{NO}_2^-$  concentration of SHR were higher than those

**【基金项目】** 上海中医药大学预算内项目(2021LK031)。

**【作者简介】** 蒋嘉烨(1984—),男,高级实验师,研究方向:中药活性成分筛选。E-mail: jiayejiang@163.com

**【通信作者】** 可燕(1969—),女,博士,教授,研究方向:中药活性成分筛选。E-mail: keyantcm@163.com

of WKY rats at various weeks and relaxation of the aorta was significantly lower than in WKY rats. (2) mRNA expression changes: compared with WKY rats, mRNA expression of eNOS and iNOS in the myocardium and arteries of SH rats were higher at various weeks, among which the maximum value of eNOS/iNOS appeared at 18 weeks. After administration of captopril, mRNA expression of iNOS and eNOS in the myocardium and arteries was significantly reduced at 24 and 32 weeks. (3) Protein expression changes: compared with WKY rats, the iNOS protein content in the myocardium and arteries of 18 and 24 weeks SHR were increased significantly, and that of 24 weeks SHR and 18 and 24 weeks SHR was increased significantly. Protein expression of iNOS in arteries was significantly reduced at 18 and 24 weeks by captopril and the effect disappeared after discontinuation. iNOS protein expression was significantly reduced at 24 and 32 weeks. Additionally, at 32 weeks, eNOS protein expression was significantly reduced in arteries and increased in the myocardium. **Conclusions** The pathological state of hypertension can lead to overexpression of iNOS and eNOS, and accumulation of iNOS and eNOS affects the occurrence of hypertension. Along with the pathogenesis of SHR hypertension, the nitric oxide system has a certain correlation with left ventricular hypertrophy and endothelial function. Captopril inhibits the expression of iNOS and eNOS *in vivo* to a certain extent and improves the left ventricular fat thickness and endothelial function.

**【Keywords】** spontaneous hypertension; inducible nitric oxide synthase; endothelial nitric oxide synthase; captopril

高血压可引起左室肥厚,同时,导致引起血管内皮功能障碍<sup>[1]</sup>。通常认为一氧化氮(NO)低浓度时主要发挥生理作用,而NO高浓度时参与许多病理过程,大量研究显示,NO与高血压密切相关。在各种临床和实验文献报道显示随着高血压的发生发展,体内产生NO量的多少存在一定的争议,血压升高导致NO减少、不变或增加都有报道<sup>[2-4]</sup>。

NO的产生主要由一氧化氮合成酶(NOS)催化L-精氨酸与氧分子通过氧化还原反应生成。由于NOS是体内生成NO的唯一限速酶,它催化L-精氨酸生成NO。在迄今为止发现的NOS的3种亚型中,神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在生理情况下表达发挥生理功能,只有诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在病理状态下表达<sup>[5]</sup>。NO影响高血压的发生、发展,但是NO半衰期极短,不容易检测,因此往往只能通过检测一氧化氮合酶(NOS)来间接研究NO的作用。已有报道表明随着年龄的增长,自发性高血压大鼠(SHR)存在一氧化氮合酶的过度表达<sup>[6-7]</sup>,但SHR随年龄增加,心脏与动脉iNOS和eNOS的动态变化及不同时期参与NO生成的具体NOS并未有系统的研究报道。

本研究中以SHR为模型,研究其随着年龄增大,心脏与动脉iNOS和eNOS的变化情况,并应用卡托普利干预,考察药物对SHR模型一氧化氮合酶-一氧化氮系统的影响,探讨SHR不同时期iNOS和eNOS在心脏与动脉中可能参与NO生成的机制及卡托普利对左室肥厚和血管内皮功能改善的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康6周龄雄性SPF级Wistar-Kyoto大鼠(WKY)(24只)和SHR(42只),体重150~180g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005],所有动物在上海中医药大学实验动物中心实验室SPF级动物房饲养[SYXK(沪)2020-0009],室温(22±1)℃,12h光照/12h黑暗循环,自由获取食物和水。适应性喂养1周后入组,进行相应的操作。在实验过程中,在3R原则的指导下给予实验动物人道主义关怀,并参照上海中医药大学动物管理伦理委员会的相关规定有序进行(P2SHUTCM210129001),实验遵守3R原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

卡托普利由中美上海施贵宝制药有限公司提供(批号:0809031);TRIzol(美国Invitrogen);RealMasterMix(天根生化科技有限公司);BioDev RT-PCR kit(立陶宛MBI);Rotor-6000荧光定量PCR仪(基因有限公司)。PCR扩增仪(德国Biometra);D-78532高速冷冻离心机(德国Hettich);超低温冰箱(美国Thermo);全自动多功能酶标仪(美国Molecular Devices);Griess试剂盒(美国Promega);BP-600A全自动大小鼠无创血压测量系统(成都泰盟有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及处理

6周龄雄性WKY(24只)和SHR(42只),6周龄时分别处理WKY和SHR各6只,剩余18只

WKY 大鼠和 36 只 SHR。将其余 SHR 大鼠分为两组:卡托普利对照组和高血压模型 (SHR) 组,每组 18 只大鼠。对照组灌服卡托普利 (3.375 g/(kg·d)),SHR 组和 WKY 组给予等量的蒸馏水。灌胃至 24 周龄结束,后停药继续观察至 32 周龄。各组在 18、24 和 32 周龄时各处理 1 批 ( $n=6$ )。

### 1.3.2 血压

实验期间,每两周无创鼠尾动脉血压测定分析系统实时监测大鼠血压变化,实验过程中使大鼠处于熟悉环境中,实验动作轻柔,减少大鼠应激反应,每只大鼠测 3 次,取其平均值,减少实验误差。整个实验过程设定专人规范化定时测定,减少实验误差。

### 1.3.3 左心室质量指数

各组大鼠取血完毕后,将心脏取出,并沿房室间沟及室间隔剪去主、肺动脉血管,大静脉,两心房及右心室,保留室间隔,用 0.9% 生理盐水冲洗,用吸水纸吸干水分,称量左心室重量 (左心室+室间隔重量) 并计算其与体重的比值作为左室质量指数 (LVMI)。

### 1.3.4 Griess 法测定血清 $\text{NO}_2^-$ 浓度

大鼠血清  $\text{NO}_2^-$  浓度的测定采用 Griess 试剂盒。大鼠通过戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉后,腹主动脉取血约 10 mL,3000 r/min 离心 10 min,取上清液于  $-80^\circ\text{C}$  保存用于检测。取 0.4 mL 样品,加入 0.1 mL Griess 试剂反应 10 min 后,通过多功能酶标仪检测 540 nm 处的吸光值,结果用  $\mu\text{mol/L}$   $\text{NO}_2^-$  浓度表示。

### 1.3.5 Ach 浓度依赖性血管舒张实验

所有 WKY 和 SHR 大鼠处死后,分离胸主动脉放置于 Krebs-Henseleit 缓冲液 (K-H 液) 中,剔除血管周围脂肪后,将胸主动脉剪成 3 mm 左右的血管环。挑选长度相当的两条分别置于 5 mL 体积  $37^\circ\text{C}$  恒温浴槽内,槽内一直通入含有 95%  $\text{O}_2$  和 5%  $\text{CO}_2$  的混合气体。血管环一端固定于槽底,另一端连接张力换能器,胸主动脉每条血管环给予 2.0 g 拉力,20 min 换液 1 次平衡 3 次共计 60 min。60 mmol/L 的 KCl 预收缩两次后加入  $10^{-6}$  mol/L 浓度的 PE 收缩,待血管拉力达到坪值后,加入梯度浓度的乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) ( $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L),观察血管随 Ach 加入的舒张情况。以 FSK  $10^{-6}$  mol/L 的舒张程度作为 100% 舒张度,根据  $10^{-5}$  mol/L 浓度 Ach 的舒张度判断内皮完整性<sup>[7]</sup>。

### 1.3.6 实时定量 PCR 检测

取约 100 mg 大鼠心肌组织,加入 1 mL TRIzol

试剂,按说明书进行 RNA 提取,所用 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  需再在 1.8~2.0 之间。逆转录得到 cDNA,分别由 iNOS、eNOS 和 GAPDH 引物进行实时荧光定量 PCR 反应。引物序列分别为,iNOS 上游引物:5'-ATCCCCGAAACGCTACACTT-3',下游引物:5'-CGGCTGGACTTCTCACTC-3'。eNOS 上游引物:5'-CCGGCGCTACGAAGAATG-3',下游引物:5'-CAGTGCCACGGATGGAAATT-3'。GAPDH 上游引物:5'-CAGAACATCATCCCTGCATC-3',下游引物:5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'。RT 反应条件为  $42^\circ\text{C}$ ,2 h; $95^\circ\text{C}$ ,5 min。实时荧光定量 PCR 反应条件为: $95^\circ\text{C}$  预变性 15 min,1 个循环; $95^\circ\text{C}$  15 s, $60^\circ\text{C}$  20 s, $72^\circ\text{C}$  30 s,40 个循环,绘制熔解曲线。结果由荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和对照基因的 Ct 值,参照文献将 Ct 值转化为相对倍数,基因表达量采用实验组/对照组 =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  进行计算,其中  $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{对照}})_{\text{实验}} - (\text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{对照}})_{\text{对照}}$ 。心肌和动脉 eNOS 和 iNOS mRNA 表达之间的倍数按  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  进行计算,即为  $(2^{-\Delta\text{Ct}})_{\text{eNOS}} / (2^{-\Delta\text{Ct}})_{\text{iNOS}}$ ,其中  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的}} - \text{Ct}_{\text{对照}}$ 。

### 1.3.7 Western blot 检测

采用提取大鼠心肌组织的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。制备 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,样品加热变性后每孔上样 80  $\mu\text{g}$ 。电泳在浓缩胶中时使用 80 V 电压,到分离胶以后使用 120 V,电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳。采用湿式电转移仪将蛋白转到硝酸纤维素膜上, $4^\circ\text{C}$  下恒流 400 mA 转膜 1.5 h。5% 脱脂奶粉 TBST 缓冲液室温封闭 1 h。一抗 iNOS (1:200)、GAPDH (1:5000)  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。TBST 洗膜,分别加入抗兔二抗 (1:5000),摇床上杂交 1 h。TBST 洗膜后,加入 ECL 1 min,暗室显影 2~5 min,冲洗胶片。结果扫描后,经光密度分析系统计算灰度值 (目的蛋白相对值 = 目的灰度值/GAPDH 灰度值)。

## 1.4 统计学方法

结果用平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,使用 SPSS 16.0 版本软件独立样本的  $t$  检验进行统计学分析, $P < 0.05$  显示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血压结果

每两周测定血压结果见图 1,结果显示与 WKY 组相比,SHR 在 6~32 周龄中血压显著升高 ( $P <$

0.01)。卡托普利在 16~26 周龄可显著降低 SHR 血压,停药后该作用消失,血压上升至 SHR 空白水平。

### 2.2 左室质量指数和血清 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>含量

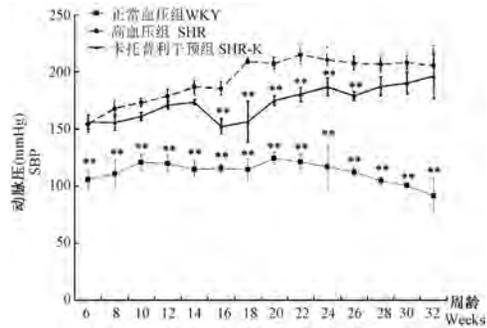
6、18、24 和 32 周龄处理时结果见表 1,SHR 在 6 周龄时左室质量指数已达到一个稳定值,推测此时左室肥厚模型已建立<sup>[8]</sup>。与 WKY 组相比,随着 SHR 组左室质量指数的升高,血清中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>浓度也得到了显著提升( $P<0.05$ ),说明在 SHR 高血压进程中,随着周龄的增加,NO 过量生成,其可能是对高血压引发心肌收缩力增加的一种代偿机制。卡托普利组 18 周龄时对 SHR 的左室质量指数无显著影响,但在 24 周龄可显著降低左室质量指数和显著升高血清 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>水平( $P<0.05$ ),说明长期服用卡托普利对减轻左室肥厚有较好的作用。

### 2.3 不同周龄血管 Ach 浓度依赖性血管舒张功能

6、18、24 和 32 周龄处理时结果见图 2 和图 3,SHR 6 周龄的胸主动脉内皮舒张功能均完好。跟 SHR 6 周龄相比,胸主动脉 18 周龄舒张度显著降低( $P<0.01$ ),24~32 周龄进一步降低,显示年龄越大舒张度越低的趋势,但 24 周龄后稳定(图 2)。与 WKY 组相比,SHR 组各个时期的舒张度显著降低( $P<0.01$ )。卡托普利组在 18 周龄时胸主动脉的舒张度跟 SHR 空白组比较显著增大( $P<0.05$ ) (图 3A)、24 周龄(图 3B)和 32 周龄(图 3C)时差异无显著。说明给予卡托普利在 SHR 发病早期能显著改善胸主动脉舒张功能。

### 2.4 心肌和动脉 iNOS、eNOS mRNA 表达

18、24 和 32 周龄处理时心肌和动脉 iNOS 和 eNOS mRNA 表达见表 2 及表 3,结果显示随着周龄的增加,SHR 心肌和动脉 eNOS、iNOS mRNA 表达有升高趋势(表 2),其中 eNOS/iNOS mRNA 最大值出现在 18 周龄(表 3),提示 SHR 心肌在高血压发生早期可能有 eNOS 脱偶联病理现象的存在。另外数据显示各周龄 SHR 的 eNOS 和 iNOS mRNA 表达含量均显著高于 WKY 组( $P<0.05$ ),且 iNOS 较 eNOS 变化幅度更大,提示 iNOS 的过度表达是 SHR 心肌和动脉在高血压进程中发生的一种代偿机制。给与卡托普利组干预后发现药物能显著降低 24、32 周龄心肌、动脉 iNOS mRNA 表达( $P<0.05$ ),同时显著降低 18、24、32 周龄心肌、动脉 eNOS mRNA 表达( $P<0.01$ )。结果显示随着周龄的增加,SHR 心肌和动脉 iNOS mRNA 表达有升高趋势,而心肌和动脉



注:与 SHR 组相比, \*\*  $P<0.01$ 。

图 1 不同周龄大鼠平均动脉压

Note. Compared with SHR group, \*\*  $P<0.01$ .

Figure 1 Mean systolic blood pressure (SBP) in each group of different ages of rats

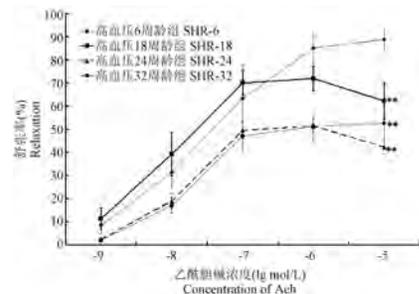
表 1 卡托普利对不同周龄大鼠左心室指数和血清中亚硝酸含量的作用

Table 1 Effect of Captopril to left ventricular mass index and concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> of different ages of rats

组别 Groups	周龄(weeks) Age	左心室重量/ 体重(mg/g) LVW/BW	亚硝酸根 ( $\mu\text{mol/L}$ ) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
WKY	6	2.68±0.19*	/
	18	2.47±0.25**	1.29±0.13##
	24	2.34±0.13**	1.13±0.06##
	32	2.44±0.18**	1.21±0.19##
SHR	6	2.98±0.25	/
	18	3.02±0.13	1.65±0.09
	24	3.08±0.13	1.60±0.09
	32	3.05±0.17	1.78±0.08
SHR-K	18	2.85±0.07	1.75±0.05
	24	2.84±0.11*	2.75±0.02#
	32	2.99±0.23	1.43±0.16

注:与 SHR 组左心室指数相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与 SHR 组亚硝酸含量相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ 。

Note. Compared with SHR group of left ventricular mass index, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . Compared with SHR group of concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ .



注:与 6 周龄 SHR 组相比, \*\*  $P<0.01$ 。

图 2 不同周龄大鼠乙酰胆碱引起胸主动脉内皮依赖舒张

Note. Compared with 6 weeks SHR group, \*\*  $P<0.01$ .

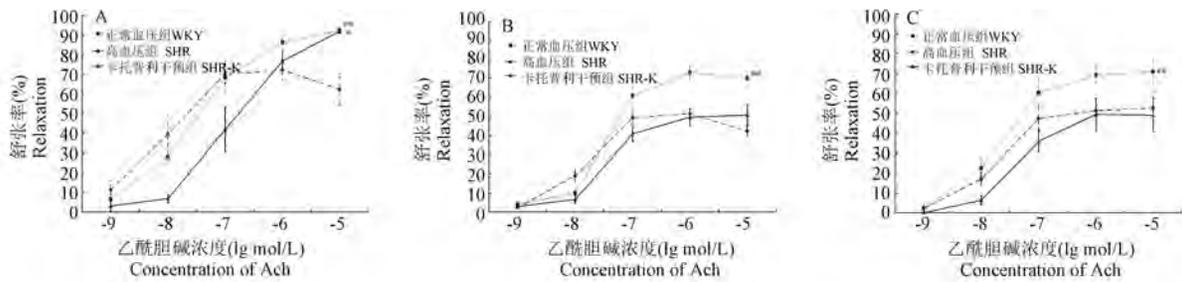
Figure 2 Ach-dependent relaxation in theoretic aorta in each group of different ages of rats

eNOS mRNA 表达在 24 周时较低。与 WKY 相比,3 个不同周龄的 SHR 的心肌和动脉 iNOS 和 eNOS mRNA 表达较高 ( $P < 0.05$ )。卡托普利组在 24、32 周龄时显著降低心肌和动脉 iNOS mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。在 3 个不同周龄时都能显著降低心肌和动脉 eNOS mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。SHR 在 18 周龄时心肌和动脉 eNOS mRNA 的表达远远超过 iNOS mRNA 的表达,分别为 89.13 和 123.52 倍。

### 2.5 心肌和动脉 iNOS、eNOS 蛋白表达

18、24 和 32 周龄处理时心肌和动脉 iNOS 蛋

白表达见图 4、图 5,结果显示与 WKY 相比,SHR 动脉在 18、24、32 周龄,心肌在 18、24 周龄 iNOS 蛋白表达较高 ( $P < 0.01$ ),动脉在 24 周龄,心肌在 18、24 周龄 eNOS 蛋白表达较高 ( $P < 0.05$ )。卡托普利干预后,数据显示药物在 18、24 周龄可显著降低动脉、心肌 iNOS 蛋白表达 ( $P < 0.01$ );同时药物在 32 周龄显著降低心肌 iNOS 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),在 32 周龄显著降低动脉 eNOS 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ) 和升高心肌 eNOS 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。

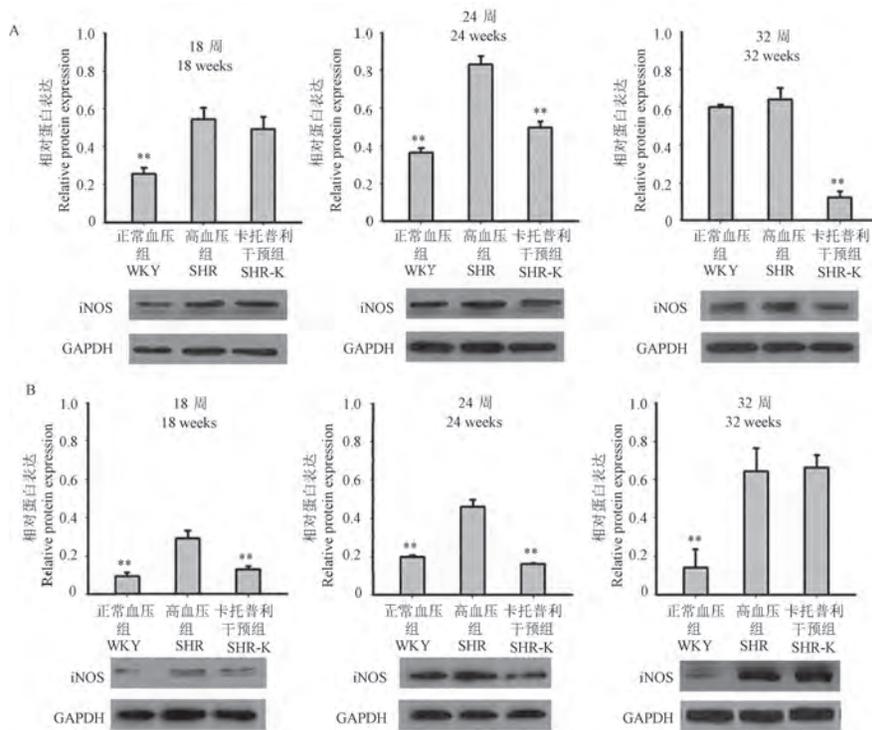


注:A:18周;B:24周;C:32周。与SHR组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图3 18、24和32周各组大鼠乙酰胆碱引起胸主动脉内皮依赖舒张比较

Note. A, 18 weeks. B, 24 weeks. C, 32 weeks. Compared with SHR group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 3 Comparison of Ach-dependent relaxation in theoretic aorta at 18, 24 and 32 weeks

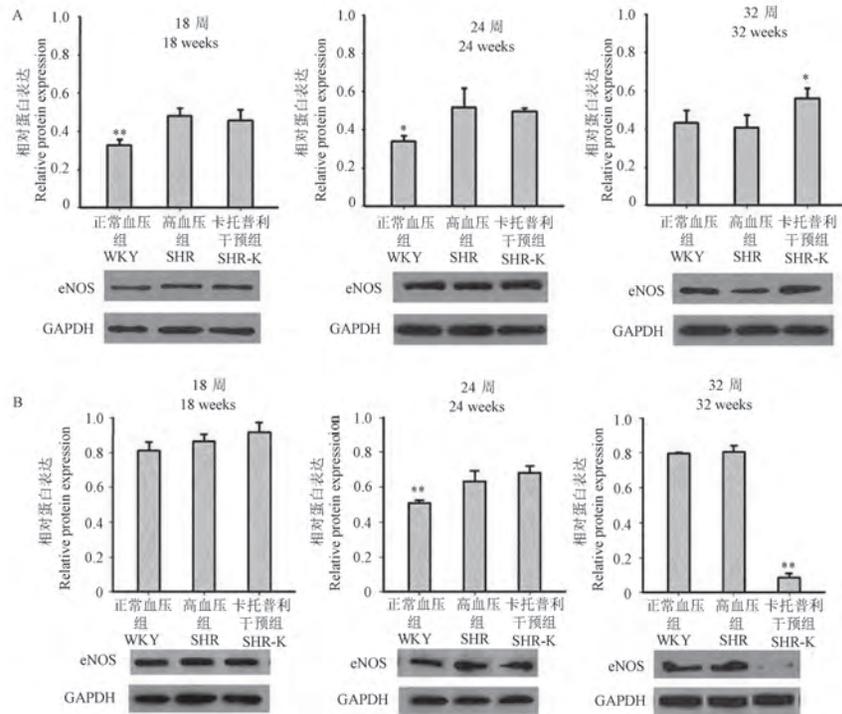


注:A:心肌;B:胸主动脉。与SHR组iNOS蛋白表达比较,\*\* $P < 0.01$ 。

图4 卡托普利对不同周龄心肌和动脉 iNOS 蛋白表达的影响

Note. A, Heart. B, Aorta. Compared with SHR group of iNOS protein, \*\* $P < 0.01$ .

Figure 4 Effect of Captopril on protein expression of iNOS in heart and aorta of different aged rats



注:A: 心肌; B: 胸主动脉。与 SHR 组 eNOS 蛋白表达比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 卡托普利对不同周龄心肌和动脉 eNOS 蛋白表达的影响

Note. A, Heart. B, Aorta. Compared with SHR group of eNOS protein, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 5 Effect of Captopril on protein expression of eNOS in heart and aorta of different aged rats

表 2 卡托普利对不同周龄心肌和动脉 iNOS 和 eNOS mRNA 的表达影响 ( $n = 6$ )

Table 2 Effect of Captopril on heart and aorta iNOS and eNOS mRNA expression of different aged rats

组别 Groups	周龄 (weeks) Age	心肌 iNOS Heart iNOS	动脉 iNOS Aorta iNOS	心肌 eNOS Heart eNOS	动脉 eNOS Aorta eNOS
WKY	18	0.80±0.07**	0.44±0.01**	0.26±0.01##	0.64±0.04#
	24	1.80±0.03**	2.36±0.33**	0.36±0.04##	0.36±0.01##
	32	1.32±0.19**	1.81±0.27**	0.53±0.17##	0.30±0.03##
SHR	18	1.02±0.03	1.01±0.15	0.97±0.03	0.97±0.13
	24	2.12±0.02	5.79±0.05	0.70±0.05	0.76±0.10
	32	5.59±0.77	4.64±0.40	1.73±0.06	1.61±0.27
SHR-K	18	0.99±0.30	1.05±0.13	0.31±0.03##	0.32±0.05##
	24	1.62±0.20*	1.90±0.16**	0.56±0.02##	0.30±0.03##
	32	0.78±0.16**	0.48±0.02**	0.52±0.03##	0.27±0.02##

注:与 SHR 组 iNOS mRNA 表达比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与 SHR 组 eNOS mRNA 表达比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with SHR group of iNOS mRNA, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with SHR group of eNOS mRNA, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ .

表 3 不同周龄 SHR 心肌和动脉 eNOS 与 iNOS mRNA 表达的比值比较

Table 3 Heart and aorta eNOS/iNOS mRNA expression of different aged rats

组别 Groups	eNOS/iNOS		
	18 周龄 18 weeks	24 周龄 24 weeks	32 周龄 32 weeks
心脏 Heart	89.13±4.35	30.73±1.83	34.17±1.72
胸主动脉 Aorta	123.52±12.95	18.03±2.42	46.68±2.45

### 3 讨论

SHR 在血压动态的变化过程中存在着不同程度的左室肥厚及血管病变,具体表现在左室质量指数的增加及动脉 Ach 浓度依赖性舒张作用较弱。目前如何改善高血压引起的靶器官损害已越来越受研究者关注,而一氧化氮合酶-一氧化氮系统更是近年来研究的热点<sup>[9]</sup>。NO 是一个活跃的反应性分子,可通过检测 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量,在一定程度上正比反映微环境内 NO 水平<sup>[10]</sup>。研究表明在高血压进程中,eNOS 和 iNOS 对 NO 的生成具有重要的影响<sup>[11]</sup>。eNOS 存在于多种类型的细胞中,负责正常血管内皮中 NO 的产生,正常生理情况下,eNOS 催化合成的 NO 参与维持循环系统的稳态平衡,起到舒张血管、抑制血小板聚集黏附、血管平滑肌细胞增生等作用。高血压在病理状态下,往往伴随着 eNOS 脱偶联的现象,此时 eNOS 不再产生 NO 而是产生大量的氧自由基,而且过氧化氢能够刺激 eNOS 在血管壁的过度增加,具有一定的毒性<sup>[12]</sup>。iNOS 只在病理状态下诱导,几秒中即大量合成 NO,数量可达 10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mol/L,此过程远远超过 eNOS 所产生的 NO,其产生的 NO 可通过杀死微生物起到抗肿瘤、抗菌和其它侵入微生物等起到宿主防御作用,同时 iNOS 产生的过量 NO 又具有一定的细胞毒性作用。

通过本实验数据分析,我们推测在高血压的发生和发展中,高血压引起心肌肥厚及血管扩张导致 eNOS 和 iNOS 过度产生,而 eNOS 和 iNOS 过度表达是对产生大量 NO 的一种反馈机制,其在一定程度上保护了高血压进程中血压增高对心脏和动脉的进一步损伤<sup>[13]</sup>。然而,在 SHR 高血压进程中,具体是 eNOS 或者 iNOS 还是两者共同作用生成 NO 存在着一定的争议<sup>[14]</sup>。通过本实验数据分析,18 周龄时 eNOS mRNA 的表达远远高于 iNOS mRNA 的表达;24 周龄时,心肌和动脉 iNOS mRNA 和蛋白的表达均较高,而心肌和动脉 eNOS mRNA 和蛋白的表达均较低,而且 eNOS/iNOS mRNA 的比例达到了比较稳定的数值,此时 SHR 血清 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度明显高于 WKY。综合本研究我们推测:在 SHR 早期 NO 主要由 eNOS 产生,SHR 后期(24 ~ 32 周龄以后) NO 主要由 iNOS 产生。本研究还对卡托普利的作用方式

进行了新的研究和分析,发现卡托普利在一定程度上能改善左室肥厚及血管内皮功能,18、24 周龄能够显著降低 SHR 动脉 iNOS 的表达水平,停药后作用消失,在 24、32 周龄显著降低 SHR 心肌 iNOS 的表达水平,对 eNOS 的 mRNA 有改善作用,而对蛋白基本无作用,推测卡托普利对动脉的调节作用早于心肌,可能主要干预 iNOS 过度表达而改善心肌和动脉的功能。

本研究发现随着高血压进程的发展,iNOS 和 eNOS 的表达会随着病情发展过度增加,同时病理状态下诱导 iNOS 和 eNOS 在体内的大量积聚反过来影响高血压的发生。卡托普利能一定程度上抑制体内 iNOS 和 eNOS 的表达。高血压心脏和血管病变与一氧化氮合酶-一氧化氮系统以改善心肌和动脉的功能,为治疗高血压提供一个新思路。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Cowan BR, Young AA. Left ventricular hypertrophy and renin-angiotensin system blockade [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2009, 11(3): 167-172.
- [ 2 ] Calver A, Collier J, Moncada S, et al. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal [J]. *J Hypertens*, 1992, 10(9): 1025-1031.
- [ 3 ] Yamazaki J, Fujita N, Nagao T. N-monomethyl-L-arginine-induced pressor response at developmental and established stages in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 259(1): 52-57.
- [ 4 ] Kelm M, Feelisch M, Krebber T, et al. The role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular resistance in arterial hypertension: comparison of normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, 20(12): S183-S186.
- [ 5 ] Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase [J]. *FASEB J*, 1998, 12(10): 773-790.
- [ 6 ] 田永路,李艳丽,李军,等.不同周龄自发性高血压大鼠的动态血压变化与心脏的组织学改变[J].*中国实验动物学报*, 2010, 18(2): 164-167, 191.
- [ 7 ] Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, et al. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats [J]. *J Hypertens*, 2000, 36(6): 957-964.
- [ 8 ] 刘林,李弘,王宇红,等.天麻苧苧止眩片对自发性与肾性

- 高血压模型大鼠影响的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 781-789.
- [ 9 ] Vaziri ND, Wang XQ, Ni ZN, et al. Effects of aging and AT-1 receptor blockade on NO synthase expression and renal function in SHR [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1592(2): 153-161.
- [10] Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric oxide synthases [J]. J Biol Chem, 2001, 276(18): 14533-14536.
- [11] Cengel A, Sahinarslan A. Nitric oxide and cardiovascular system [J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2006, 6(4): 364-368.
- [12] Drummond GR, Cai H, Davis ME. Transcription of the human endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide [J]. Circ Res, 2000, 86(3): 347-354.
- [13] Costa MA, Elesgaray R, Caniffi C, et al. Role of nitric oxide as a key mediator on cardiovascular actions of atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(3): 778-786.
- [14] Piech A, Dessy C, Havaux X, et al. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(2): 456-467.

[收稿日期]2021-01-24

## *Rnf43* 缺失促进 *Kras* 活化突变介导的胰腺癌前病变和恶性转化

成年人中有 8% 胰腺囊性病变 (pancreatic cystic lesions, PCLs)。PCLs 是一组无症状、异质性强的良性肿瘤,其中一部分导管内乳头状黏液性肿瘤 (intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) 最终会演变为胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)。胰腺癌素有“癌症之王”的称号,确诊后 5 年生存率约为 10%,预后极差。由于没有办法鉴别哪些 PCLs 可能发展为胰腺癌,保守监测还是手术干预是临床一大难题。因此,寻找此类囊肿发展为癌的分子机制,对于高危 PCLs 和 PDAC 的治疗极为重要。

鉴于 *RNF43* 失活突变和 *KRAS* 激活突变在部分 IPMN 和 PDAC 的肿瘤组织中共同出现,北京协和医学院-中国医学科学院基础医学研究所张宏冰教授率领的研究团队分别构建了胰腺 *Rnf43* 敲除和 *Kras* 激活 (*Rnf43*<sup>-/-</sup>; *Kras*<sup>G12D</sup>) 小鼠,这些小鼠出现胰腺囊性肿瘤,随后出现胆管、十二指肠的侵袭及肺部的转移,生存期缩短,而 *wnt/β-catenin* 通路抑制剂 LGK974 能明显延长小鼠生存。

综上所述,*RNF43* 是一种预防胰腺恶性转化的肿瘤抑制因子,*RNF43* 失活突变是 PCLs 癌变的高危因素,对 *RNF43/KRAS* 变异胰腺囊肿应尽早外科手术和用 *Wnt/β-catenin* 信号通路抑制剂靶向治疗。本项研究为鉴别高危胰腺囊肿病人,精准治疗胰腺囊肿和胰腺癌患者提供了依据。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(1): 61-71; <https://doi.org/10.1002/ame2.12203>)。

毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 的表达及意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 70-77, 135.

Mao HX, Kang T, Wu WH, et al. Expression and significance of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 in rats with adenine-induced chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 70-77, 135.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.010

## 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 的表达及意义

毛海霞<sup>1,2</sup>, 康婷<sup>1,2</sup>, 吴蔚桦<sup>1,2</sup>, 朱婷婷<sup>1,2</sup>, 张丽玲<sup>1,2</sup>, 欧三桃<sup>1,2\*</sup>

(1. 西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000;  
2. 四川省肾脏疾病临床医学研究中心, 四川 泸州 646000)

**【摘要】** 目的 观察腺嘌呤诱导大鼠慢性肾病模型中 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 的表达及其与肾间质纤维化的关系。方法 将 20 只大鼠随机分为对照组 (Con 组) 和模型组 (腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型)。分别于第 3、6 周处死大鼠。观察肾形态改变; 分别检测大鼠肾功及 24 h 尿蛋白水平; HE 染色观察肾病理变化; 天狼星红染色观察肾小管间质纤维化情况; 免疫组化染色观察肾组织中 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9、Col-I 和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达; RT-PCR 检测大鼠肾 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 水平, 分析 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 表达程度与肾小管间质纤维化的相关性; ELISA 检测两组大鼠血清 SOX9 水平。结果 与 Con 组相比, CKD 组大鼠 24 h 尿蛋白和血清 BUN、Scr 均明显增加 ( $P < 0.05$ ); CKD 组 HE 染色和天狼星红染色见明显肾小管扩张及间质纤维化, 且随时间进展加重; 免疫组化及 RT-PCR 均提示 CKD 组 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 蛋白及 mRNA 表达均增加; CKD 组大鼠血清中 SOX9 水平较对照组升高, 且随造模时间延长增加。相关性分析提示 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 mRNA 表达与 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 相关, 且 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 三者也存在正相关关系。结论 在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中, 存在 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 的高表达, 且可能与肾间质纤维化进程密切相关; 血清 SOX9 的水平有望成为早期诊断 CKD 的分子标记物。

**【关键词】** 慢性肾病; HIF-1 $\alpha$ ; RhoA; SOX9

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0070-08

### Expression and significance of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 in rats with adenine-induced chronic kidney disease

MAO Haixia<sup>1,2</sup>, KANG Ting<sup>1,2</sup>, WU Weihua<sup>1,2</sup>, ZHU Tingting<sup>1,2</sup>, ZHANG Liling<sup>1,2</sup>, OU Santao<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Nephrology, Affiliated hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.  
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

**【Abstract】** **Objective** To observe expression of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 proteins in kidneys and to determine their relationship with tubulointerstitial fibrosis in rats with adenine-induced chronic kidney disease. **Methods** Twenty rats were randomly divided into a control (Con) group and model group (adenine-induced CKD rat model). The rats were sacrificed after 3 and 6 weeks. Morphological changes of the kidney were observed and the renal functions and 24 h urinary protein were assessed. Renal pathological changes were observed by HE staining and interstitial fibers of renal tubules were

[作者简介] 毛海霞 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 慢性肾病与血管钙化。E-mail: 1245622086@qq.com

[通信作者] 欧三桃 (1976—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 慢性肾病与血管钙化。E-mail: ousantao@163.com

observed by Sirius red staining. Immunohistochemical staining was used to observe expression of HIF-1 $\alpha$ , RhoA, SOX9, Col-I and  $\alpha$ -SMA proteins in renal tissue. HIF-1 $\alpha$ , RhoA, SOX9, Col-I and  $\alpha$ -SMA mRNA levels in the kidney were measured by RT-PCR and the relationship between the expression levels of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9, and renal tubular interstitial fibrosis was analyzed. The expression level of SOX9 in serum of the two groups was measured by an ELISA.

**Results** Compared with the Con group, 24 h urinary protein, serum BUN and Scr in the CKD group were increased significantly ( $P < 0.05$ ). In the CKD group, HE staining and Sirius red staining showed obvious renal tubule dilatation, interstitial fibrosis and aggravation over time. Immunohistochemistry and RT-PCR showed that the expression of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 was increased in the CKD group and the serum level of SOX9 in the CKD group was higher than that in the control group, which was increased over time. Correlation analysis showed that the mRNA expression of HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 was correlated with Col-I and  $\alpha$ -SMA, and there was a positive correlation among HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9.

**Conclusions** HIF-1 $\alpha$ , RhoA and SOX9 are highly expressed in the adenine-induced CKD rat model, which may be closely related to the progression of renal interstitial fibrosis. Moreover, the serum level of SOX9 is expected to be a molecular marker for early diagnosis of CKD.

**【Keywords】** chronic kidney disease; HIF-1 $\alpha$ ; RhoA; SOX9

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是一种以肾功能丢失逐渐加重为特征的进展性疾病<sup>[1]</sup>,已成为全球的重大公共健康问题,是导致世界人口死亡的主要疾病<sup>[2]</sup>。CKD 发病机制复杂多样,其中肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)是其最常见的病理特征和 CKD 进展的共同途径<sup>[3]</sup>。影响肾间质纤维化的因素众多,涉及多种信号因子和信号通路调控系统。上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可通过改变分泌的细胞外基质促进 TIF 的发展,其中,缺氧参与并促进了该过程的发生、发展<sup>[4-5]</sup>。缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )作为缺氧敏感的关键转录因子,被证实与肾纤维化有关<sup>[6-7]</sup>。近年来,RhoA/ROCK 信号通路被证实在促进肾纤维化方面起到积极作用<sup>[8]</sup>,而 SOX9 作为下游因子发挥作用,HIF-1 $\alpha$  同时也是 RhoA 转录的重要调节因子<sup>[9]</sup>。缺氧可通过 HIF-1 $\alpha$  激活 RhoA/ROCK 信号通路来诱导细胞骨架损伤和重塑,KEGG 信号通路显示 SOX9 参与 HIF-1 $\alpha$  信号通路<sup>[10]</sup>,但 HIF-1 $\alpha$  是否可通过 RhoA、SOX9 发挥促进肾间质纤维化的作用,目前尚无相关报道。因此,本研究主要观察 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 在腺嘌呤诱发大鼠 CKD 模型中的表达以及与 CKD 肾间质纤维化的关系,以进一步探讨 CKD 肾间质纤维化的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 5~6 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,体重 180~240 g,购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2018-0017]。饲养于西南医科大学动物研究

中心[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU20210350),并遵循实验动物的 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471-100G, Sigma 公司,美国); HIF-1 $\alpha$  抗体、SOX9 抗体(ab8366, ab185230, Abcam, 英国); RhoA 抗体(10749-1-AP, 武汉三鹰公司); Col-I 抗体(BS1530, bioworld 公司, 美国);  $\alpha$ -SMA 抗体(19245S, CST 公司, 美国); SABC 试剂盒(bioworld 公司, 美国); RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(R701、R323-01、Q711-02/03, 南京维诺赞公司); HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9、Col-I、 $\alpha$ -SMA 和 GAPDH 上下游引物(上海生工生物工程有限公司); SOX9 ELISA 试剂盒(30899, 泉州睿信生物科技有限公司)。全自动生化分析仪(西门子, 德国); 光学显微镜(Nikon 公司, 日本); RNA 逆转录仪(Eppendorf 公司, 德国); RT-PCR 仪(Eppendorf 公司, 德国); 自动酶标仪(BioTek 公司, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组及造模

将 20 只大鼠随机分为对照组( $n = 10$ )和 CKD 组( $n = 10$ )。所有大鼠自由进食普通饲料、饮水,昼夜节律光照,室温喂养,适应性喂养 1 周后,开始实验。CKD 组给予 250 mg/(kg·d)的 2.5%腺嘌呤混悬液每天灌胃,1~3 周每天灌胃 1 次,4~6 周每天减半灌胃 1 次;对照组给予等量生理盐水灌胃。

#### 1.3.2 留取血、尿、肾组织标本

造模后第 3、6 周时,分别处死两组大鼠各 5 只;处死前 24 h 将大鼠置于清洁的代谢笼中,收集 24 h

尿液测定 24 h 尿蛋白,行 10%戊巴比妥麻醉后经腹主动脉采血,离心后取血清分装并保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用,部分血清用于行肾功能检测,部分用于 ELISA 检测;处死后取右肾称重及行剖面观察,左肾部分肾组织于 10%中性福尔马林中浸泡固定,制作石蜡切片( $4\ \mu\text{m}$ ),用作形态学观察,部分肾组织冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

### 1.3.3 肾组织形态学观察

HE 染色:取大鼠肾组织石蜡切片,二甲苯脱蜡至水后行苏木素液、伊红复染,透明,中性树脂胶封片。于光镜下观察肾组织病理改变。

天狼星红染色:切片脱蜡至水,苏木素液染 3~5 min,水洗后天狼星红染液染 15~30 min,无水乙醇直接分色与脱水,二甲苯透明,风干后中性树脂胶封片,镜检。

### 1.3.4 免疫组化染色检测肾组织中 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9、Col-I 和 $\alpha$ -SMA 蛋白的表达

肾组织切片  $60^{\circ}\text{C}$  脱蜡水化,热抗原修复,免疫组化笔画圈围住组织,灭活内源酶活性,封闭非特异性位点,依次添加一抗、二抗、ABC 复合物、DAB 显色液,苏木素复染,脱水晾干后中性树脂胶封片,显微镜下观察。

### 1.3.5 RT-PCR 检测大鼠肾 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA

取冻存肾组织,按说明书提取总 RNA,再将 RNA 逆转录为 cDNA。设计 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9、Col-I 和  $\alpha$ -SMA 引物序列,见表 1 参照试剂盒行体外 PCR 扩增,记录 PCR 反应的循环阈值(CT 值),以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  表示目的基因的相对表达量。

### 1.3.6 ELISA 检测血清 SOX9 水平

取大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒操作步骤,并用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中 SOX9 含量。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析,两变量间的相关性分析用 Pearson 检验,以  $P<0.05$  为有差异,具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾整体和切面大体病理改变及肾重、肾重/体重比较

对照组大鼠肾大小形态正常,呈暗红色,触之有弹性,切面皮髓质界限分明;CKD 组大鼠肾呈“大白肾”,体积变大,色灰白,质韧,触之有颗粒感,且切面皮髓质稍模糊。CKD 组肾重、肾重/体重均比对照组增加,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2、图 1。

### 2.2 两组大鼠肾功能及 24 h 尿蛋白定量比较

CKD 组大鼠肾功能指标(BUN、Scr)和 24 h 尿蛋白定量在 3、6 周较对照组均明显升高,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列表

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
HIF-1 $\alpha$	Forward, 5'-CTCCCTTTTTC AAGCAGCAG-3'
	Reverse, 5'-GCTCCATCCATCCTGTCA-3'
RhoA	Forward, 5'-GCTTGTTGGTAAGACATGCTTGCTC-3'
	Reverse, 5'-GGCCTCAGACGGTCATAATCTTCC-3'
SOX9	Forward, 5'-CTCCTACTACAGCCACGCAG-3'
	Reverse, 5'-AGCTGTGTGTAGACGGGTTG-3'
Col-I	Forward, 5'-GGATCGACCCTAACCAAGCC-3'
	Reverse, 5'-GATCGGAACCTTCGCTTGA-3'
$\alpha$ -SMA	Forward, 5'-GCGTGGCTATTCTTCGTGACTAC-3'
	Reverse, 5'-CCATCAGGCAGTTCGTAGCTTCTC-3'
GAPDH	Forward, 5'-CCCCAATGTATCCGTTGTG-3'
	Reverse, 5'-TAGCCCAGGATGCCCTTACT-3'

表 2 两组大鼠肾重、肾重/体重比较( $n=5$ )

Table 2 Comparison of kidney weight and kidney weight/body weight between two groups of rats

组别 Groups	3 周 3 weeks		6 周 6 weeks	
	对照组 Con group	模型组 CKD group	对照组 Con group	模型组 CKD group
	肾重 Weight of kidney	1.316 $\pm$ 0.112	4.482 $\pm$ 1.293 **	1.404 $\pm$ 0.111
肾重/体重 Kidney weight/body weight	0.004 $\pm$ 0.001	0.018 $\pm$ 0.004 **	0.003 $\pm$ 0.000	0.016 $\pm$ 0.002 **

注:与同期对照组相比, \*\*  $P<0.01$ 。

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

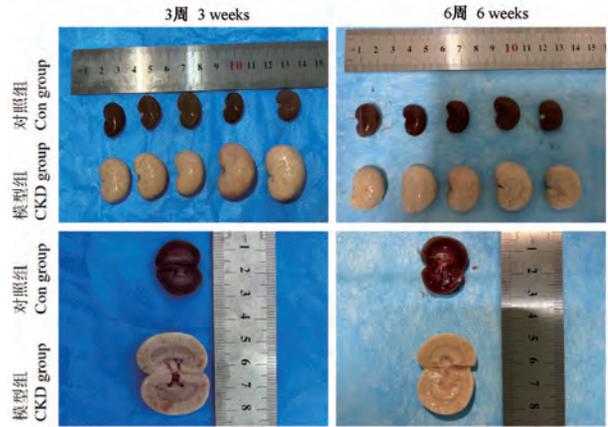
**2.3 肾组织病理改变**

HE 染色可见对照组第 3、6 周大鼠肾组织结构清晰,无明显异常。CKD 组大鼠肾组织随时间进展结构变得紊乱,肾小球数量逐渐减少,囊腔扩张明显,肾小管扩张伴棕黄色颗粒沉积。天狼星红染色见对照组大鼠肾间质无明显胶原沉积,而 CKD 组大鼠肾间质明显红染,胶原纤维较为丰富,且随时间进展其程度加重。见图 2。

**2.4 肾组织 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9、Col-I 和  $\alpha$ -SMA 免疫组化**

免疫组化结合 Image Pro Plus 分析结果显示,对照组大鼠可见肾小管 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 表达较少,且主要集中在靠近肾小球的周围。CKD 组大鼠肾小管及间质可见较多棕黄色颗粒沉积,提示 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA、SOX9 的表达较多,且随时间进展其表达逐渐增强,肾小球上也有不均匀表达。Col-I 和

$\alpha$ -SMA 蛋白在对照组肾间质表达较少,而在 CKD 组肾间质显著表达,且随时间进展其表达程度加重。见图 3。



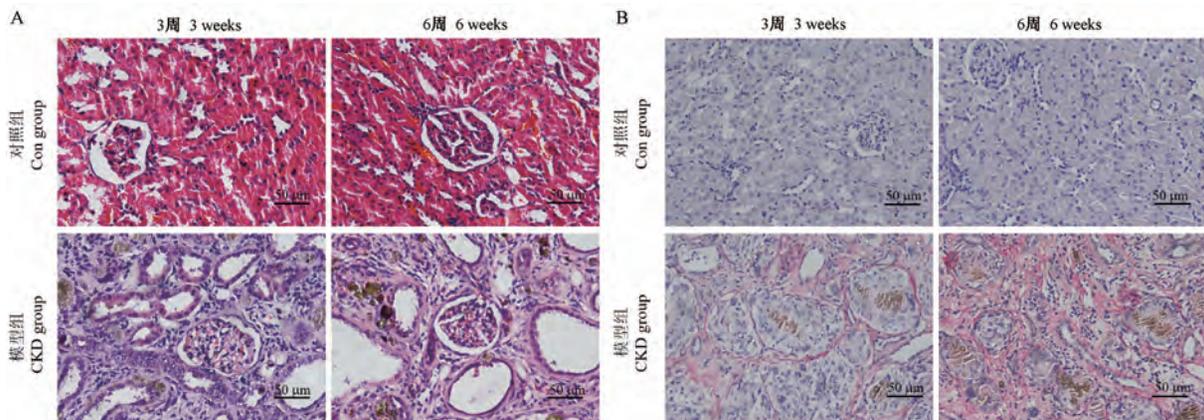
**图 1** 两组大鼠肾大体病理改变  
**Figure 1** Pathologic change between two groups of rats

**表 3** 两组大鼠肾功及 24 h 尿蛋白定量比较(n=5)

**Table 3** Comparison of renal function and 24 h urinary protein quantity between two groups of rats

组别 Groups	3 周 3 weeks		6 周 6 weeks	
	对照组 Con group	模型组 CKD group	对照组 Con group	模型组 CKD group
	尿素氮 (mmol/L) BUN	6.26±0.65	54.44±19.70**	5.80±0.67
肌酐 (μmol/L) Scr	29.36±7.34	215.10±55.82**	24.04±1.18	199.40±46.56**
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 h urine protein	13.32±1.50	23.32±2.64**	10.45±10.45	28.75±5.52**

注:与同期对照组相比,\*\*P<0.01。  
Note. Compared with the Con group, \*\*P<0.01.



注:A:HE 染色结果,B:天狼星红染色结果。

**图 2** 两组大鼠肾组织 HE 染色及天狼星红染色

Note. A, HE staining. B, Sirius red staining.

**Figure 2** HE staining and Sirius red staining in the two groups of rats

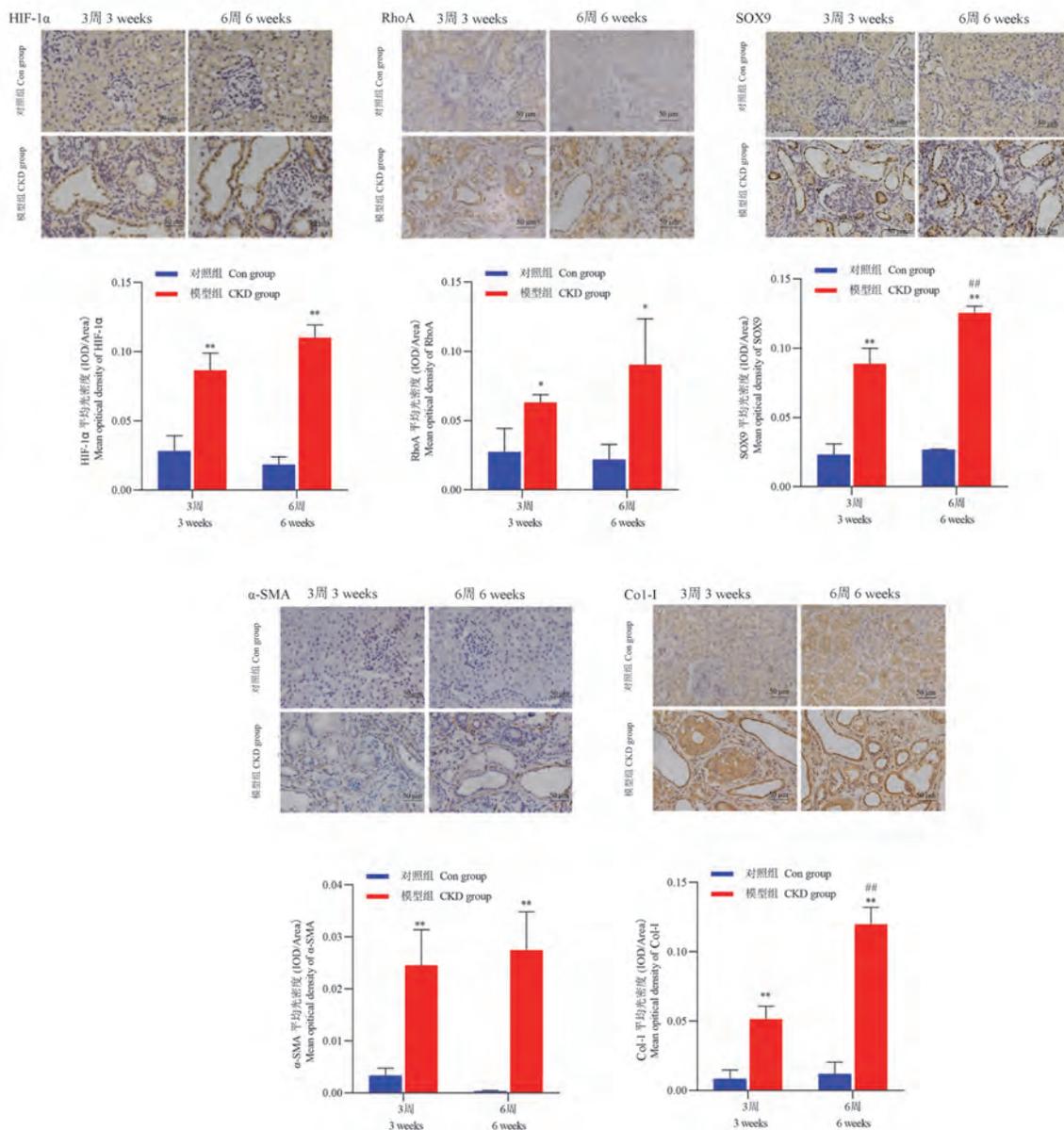
## 2.5 肾组织 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达情况

与对照组相比,CKD 组大鼠肾 HIF-1 $\alpha$ 、和 SOX9 mRNA 水平随时间进展均明显增加,且 HIF-1 $\alpha$  和 SOX9 mRNA 在各时间点的差异均具有统计学意义,RhoA 在第 6 周时差异具有统计学意义;CKD 组大鼠各时间点肾 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 均较对照组升高,且差异具有统计学意义。见图 4。

## 2.6 相关性分析

采用 Pearson 对各指标进行相关性分析,结果提

示 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 mRNA 表达与 Col-I mRNA 表达呈显著正相关( $r=0.993, P<0.000; r=0.864, P<0.000; r=0.957, P<0.000$ ); HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 mRNA 表达与  $\alpha$ -SMA mRNA 也呈明显正相关( $r=0.820, P=0.001; r=0.758, P=0.004; r=0.779, P=0.003$ )。随后,进一步分析 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 之间的相关性,发现其两两间均存在显著正相关(HIF-1 $\alpha$  与 RhoA mRNA  $r=0.871, P<0.000$ ; HIF-1 $\alpha$  与 SOX9 mRNA  $r=0.944, P<0.000$ ; RhoA 和 SOX9 mRNA  $r=0.715, P=0.009$ )。见图 5。

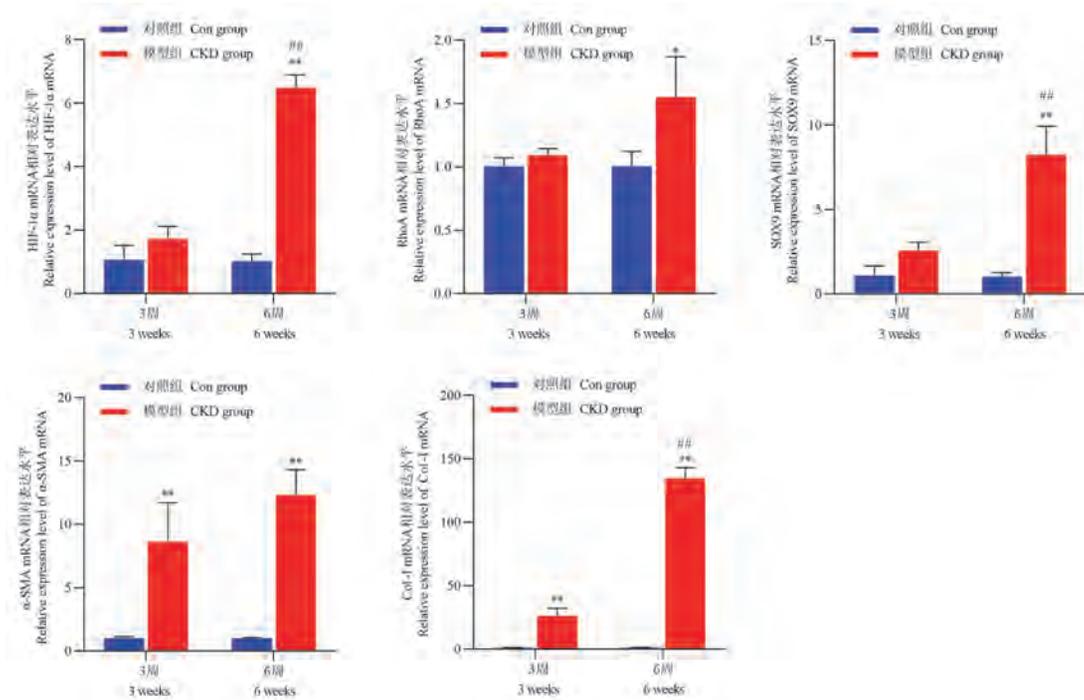


注:与同期对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与前一时间 CKD 组相比,### $P<0.01$ 。

图 3 免疫组化结果

Note. Compared with the Con group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . Compared with the previous time point of CKD group, ### $P<0.01$ .

Figure 3 Immunohistochemical results of renal tissue



注:与同期对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与前一时间 CKD 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 4 两组大鼠肾 mRNA 相对表达量

Note. Compared with the Con group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Compared with the previous time point of CKD group, ## $P < 0.01$ .

Figure 4 Relative mRNA expression of the kidneys in the two group of rats

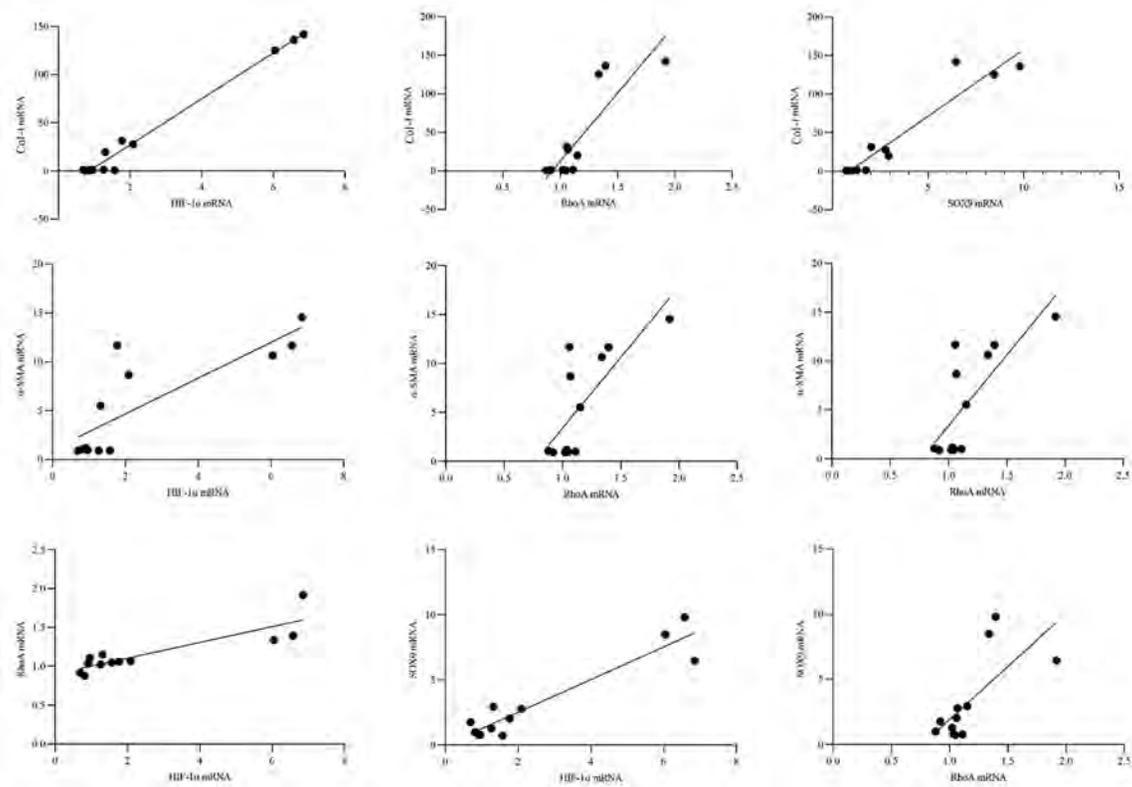


图 5 mRNA 相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of the mRNA

## 2.7 大鼠血清 SOX9 的水平

3 周大鼠对照组血清中 SOX9 水平为  $(13.63 \pm 1.595)$  ng/mL, CKD 组为  $(16.16 \pm 1.390)$  ng/mL; 6 周大鼠对照组血清中 SOX9 水平为  $(12.63 \pm 1.540)$  ng/mL, CKD 组为  $(18.27 \pm 1.334)$  ng/mL。CKD 组大鼠血清中 SOX9 水平较同期对照组均升高, 且差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 血清 SOX9 水平随造模时间延长而增加, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.8 血清 SOX9 水平与肾功能、24 h 尿蛋白的相关性分析

用 Pearson 检验得出: 血清中 SOX9 水平与尿素氮、肌酐、24 h 尿蛋白定量均存在正相关关系 ( $r_1 = 0.759, P = 0.000; r_2 = 0.757, P = 0.000; r_3 = 0.822, P = 0.000$ )。见图 6。

## 3 讨论

CKD 最常见的病理表现是肾纤维化, 主要包括肾小球硬化、肾小管萎缩和肾间质纤维化。而肾间质纤维化作为发展为终末期肾病的主要病变之一, 涉及信号通路繁多, 目前研究较多的有 TGF- $\beta$ /Smad3、JAK/STAT 和 PI-3K 通路等<sup>[11]</sup>, 但并不能完全解释其进展过程。近年来研究发现, 在慢性肾病组织中普遍存在缺氧状态, 而缺氧主要通过缺氧诱导因子 (HIF-1) 途径来促进肾间质纤维化从而参与慢性肾病的进展。既往研究表明 RhoA 和 SOX9 均与 HIF-1 相关, 且都不同程度参与肾间质纤维化过程, 因此本研究通过检测 HIF-1、RhoA 和 SOX9 表达及相关肾纤维化指标, 探讨 HIF-1、RhoA 和 SOX9 是否参与了 CKD 的肾间质纤维化过程。

腺嘌呤灌胃诱导 CKD 主要是通过促进肾小管间质纤维化、肾小管萎缩和晶体形成, 能较好的模拟人类的正常 CKD 的发展, 故成为广泛采用的诱导 CKD 的造模方式<sup>[12-13]</sup>。本实验采用腺嘌呤灌胃, 可见模型组大鼠肾呈“大白肾”改变, 肾功能下降且 24

h 尿蛋白定量升高, 且 HE 染色发现肾结构紊乱伴肾小管明显扩张, 天狼星红染色发现 CKD 组胶原纤维沉积且其纤维化程度随时间进展加重, 证实腺嘌呤诱导 CKD 大鼠模型成功。

HIF-1 $\alpha$  是缺氧诱导因子家族中的一员, 普遍存在于人和哺乳动物的细胞内, 可以激活下游 100 多种与缺氧相关的因子转录表达, 主要通过调控细胞增殖、自噬, 炎症, 氧化应激等介导细胞产生缺氧应答, 近年来发现其与慢性病的发生发展密切相关<sup>[14]</sup>。CKD 时, HIF-1 $\alpha$  可通过激活 NF- $\beta$ 、EPO、GLUT-1、IGF-1 和 INOS 发生等促进肾间质成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 进而促进肾间质纤维化, 同时还可促进血管生成<sup>[15]</sup>。本研究发现在腺嘌呤诱发的 CKD 大鼠肾小管上皮细胞核中存在 HIF-1 $\alpha$  的高表达, 其 mRNA 水平同高表达, 且其表达与肾纤维化因子 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 呈显著正相关, 提示 HIF-1 $\alpha$  可能参与并促进了 CKD 的肾间质纤维化过程, 与既往类似研究结果一致。其次, HIF-1 $\alpha$  与 RhoA 和 SOX9 mRNA 的表达也高度相关, 且 RhoA 和 SOX9 在肾小管上皮细胞核中均明显高表达。既往研究发现在乳腺癌中 HIF-1 $\alpha$  可激活 RhoA/RhoA 轴, 导致细胞和基质收缩<sup>[16]</sup>。在肿瘤、肺动脉高压等多种疾病中都证实了 HIF-1 $\alpha$ /RhoA 轴的存在, 但与 CKD 的相关研究较少, 本研究发现在 CKD 间质纤维化中, HIF-1 $\alpha$  与 RhoA 存在相关关系, 但还需进一步研究证实。

RhoA 作为研究最透彻的 RhoA-GTP 酶家族成员, 在调节细胞骨架蛋白, 细胞形态和迁移、调控细胞增殖和转录等方面发挥了巨大的作用, 因此, 是目前研究的热点之一。晚近发现其转录主要受 c-Myc、HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$ 、Stat 6 和 NF- $\kappa$ B 等调控, 下游可激活 MAL、AP-1、NF- $\kappa$ B、YAP/TAZ、 $\beta$ -catenin 和 SOX9 等发挥生物活性作用<sup>[9]</sup>。多项研究也表明, RhoA 通过不同通路参与并促进了肾间质纤维化的

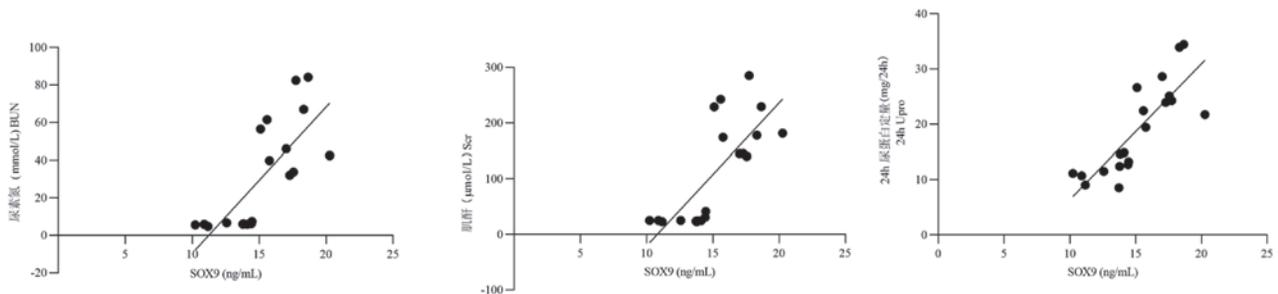


图 6 血清 SOX9 水平与肾功、24 h 尿蛋白定量的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis of SOX9 with renal function and 24 h urinary protein quantity

进程<sup>[8,17-18]</sup>。本研究也发现 RhoA 在 CKD 组大鼠肾小管上皮细胞核中高表达,且其 mRNA 水平与 Col-I 和  $\alpha$ -SMA mRNA 表达呈正相关,进一步证明了 RhoA 可能促进肾间质纤维化从而参与 CKD 的进展。RhoA 与 SOX9 mRNA 表达呈明显正相关关系,表明 RhoA 可能通过激活 SOX9 在肾间质纤维化的进程中发挥作用。

SOX9(sex-determining region Y box9)参与早期胚胎的多种器官的发育成熟,也与肿瘤的发生有关。近年来发现其可介导上皮细胞间质转分化和通过促进细胞外基质的产生参与器官纤维化。然而,SOX9 在肾间质纤维化中的研究相对较少,目前有研究表明 SOX9 可通过 PI3K-AKT 途径促进肾小管间质转分化和细胞外基质沉积<sup>[19]</sup>。同时,大量研究表明在急性肾损伤后 SOX9 表达增强,可促进肾内源性的修复,从而延缓肾间质纤维化的发生<sup>[20-21]</sup>。因此 SOX9 可能在早期肾损伤中起保护作用,在晚期肾损伤中起促进作用,但在肾间质纤维化中的具体作用还需要更深入的研究来证明。本研究发现随 CKD 进展,SOX9 在肾小管上皮细胞中高表达,在 6 周达高峰,且其 mRNA 水平与 Col-I、 $\alpha$ -SMA mRNA 呈显著正相关,表明在 CKD 模型中存在 SOX9 的表达增强,且其表达可能参与并促进了肾间质纤维化过程,进一步证实了关于 SOX9 在肾间质纤维化的作用<sup>[22]</sup>。此外,本研究同时还发现血清 SOX9 水平在 CKD 大鼠中明显升高,与对照组相比差异具有统计学意义,且 CKD 组 6 周较 3 周表达进一步升高,表明其血清水平随 CKD 进展而上升。Nakagawa 等<sup>[23]</sup>提出 SOX9 可作为提示肾小管损伤和间质纤维化的新型标志物,但目前尚无在血清学方面的报道,而本研究结果提示血清 SOX9 水平可能在一定程度上诊断 CKD 以及提示 CKD 病程的进展。

综上,本研究发现在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中,存在 HIF-1 $\alpha$ 、RhoA 和 SOX9 的激活,且其表达增加可能与肾间质纤维化有关,今后还应进一步研究验证该通路并证明抑制其激活有助于抑制肾间质纤维化的发展,进而减缓 CKD 进程。此外血清 SOX9 水平有望成为早期诊断 CKD 以及提示其病情进展的新型标志物。

#### 参考文献:

[ 1 ] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives [J]. *Lancet*, 2013, 382

(9888): 260-272.

- [ 2 ] Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. *JAMA*, 2019, 322(13): 1294-1304.
- [ 3 ] Tan HL, Yap JQ, Qian Q. Acute kidney injury: tubular markers and risk for chronic kidney disease and end-stage kidney failure [Z]. *Blood Purif*, 2016, 41(1-3): 144-150.
- [ 4 ] Wei X, Zhu X, Jiang L, et al. Recent advances in understanding the role of hypoxia-inducible factor 1alpha in renal fibrosis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2020, 52(7): 1287-1295.
- [ 5 ] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia [J]. *Kidney Int*, 2004, 65(3): 871-880.
- [ 6 ] Hu J, Wang W, Zhang F, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  mediates the profibrotic effect of albumin in renal tubular cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15878.
- [ 7 ] Baumann B, Hayashida T, Liang X, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promotes glomerulosclerosis and regulates COL1A2 expression through interactions with Smad3 [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(4): 797-808.
- [ 8 ] 柳飞, 付平. RhoA/Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶信号通路与慢性肾脏疾病 [J]. *华西医学*, 2011, 26(5): 781-783.
- [ 9 ] Jae-Gyu K, Rokibul I, YC J, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [ 10 ] Huang D, Cao L, Xiao L, et al. Hypoxia induces actin cytoskeleton remodeling by regulating the binding of CAPZA1 to F-actin via PIP2 to drive EMT in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2019, 448: 117-127.
- [ 11 ] 姚兰. 肾纤维化相关信号通路研究进展 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2015, 35(1): 147-150.
- [ 12 ] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23(1): 5-11.
- [ 13 ] 马园园, 刘成海, 陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 398-403.
- [ 14 ] 王慧星, 史可梅. 低氧诱导因子-1 $\alpha$  在相关慢性疾病发病中作用的研究进展 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2019, 27(9): 708-711.
- [ 15 ] Sulikowska B, Rutkowski B, Marszałek A, et al. The role of interstitial changes in the progression of chronic kidney disease [J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015, 69: 830-837.
- [ 16 ] Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, et al. Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(3): E384-E393.
- [ 17 ] Babelova A, Jansen F, Sander K, et al. Activation of Rac-1 and RhoA contributes to podocyte injury in chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80328.

(下转第 135 页)

赵慧, 陈文文, 朱丽萍, 等. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过抑制 TLR2/NF-κB 信号通路保护实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 78-86.

Zhao H, Chen WW, Zhu LP, et al. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> protects thyroid functions in experimental autoimmune thyroiditis rats by inhibiting the TLR2/NF-κB signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 78-86.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.000

# 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过抑制 TLR2/NF-κB 信号通路 保护实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能研究

赵 慧<sup>1</sup>, 陈文文<sup>1\*</sup>, 朱丽萍<sup>1</sup>, 葛 鸿<sup>2</sup>

(1. 青岛市中医医院(市海慈医院)内分泌科, 山东 青岛 266033; 2. 青岛市中医医院(市海慈医院)神经外科, 山东 青岛 266033)

**【摘要】** 目的 基于 TLR2/NF-κB 信号通路研究 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠的保护作用机制。方法 将大鼠随机分为对照组、模型组、硒酵母片对照组和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 低、中、高剂量组。除对照组外,其余大鼠采用皮下注射甲状腺球蛋白 (PTg) 建立自身免疫性甲状腺炎大鼠模型,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 低、中、高剂量组分别给予腹腔注射 0.5、1.0、1.5 μg/kg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 注射剂,对照组和模型组注射等量蒸馏水,硒酵母片对照组注射等量硒酵母混悬液(每天1次),连续4周。观察大鼠甲状腺组织变化,检测大鼠甲状腺功能因子、血清炎症因子、甲状腺自身抗体含量及 TLR2/NF-κB 信号通路相关蛋白水平及基因表达量。结果 与模型组大鼠比较,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各组大鼠血清游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3)、游离甲状腺素 (FT4) 及促甲状腺激素 (TSH) 水平、甲状腺球蛋白抗体 (TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-12 (IL-12)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 及甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 和蛋白表达均不同程度降低,而白细胞介素-10 (IL-10) 不同程度增加,高剂量 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 组与模型组差异具有统计学意义 (P<0.05)。结论 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对自身免疫性甲状腺炎大鼠的甲状腺功能有一定的改善作用,并能提高自身免疫抗体水平,其机制可能与 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 TLR2/NF-κB 信号通路活性,从而调控 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF-α 等炎症因子释放有关。

**【关键词】** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 自身免疫甲状腺炎; 大鼠; TLR2; NF-κB

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0078-09

## 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> protects thyroid functions in experimental autoimmune thyroiditis rats by inhibiting the TLR2/NF-κB signaling pathway

ZHAO Hui<sup>1</sup>, CHEN Wenwen<sup>1\*</sup>, ZHU Liping<sup>1</sup>, GE Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine (Hiser Hospital), Qingdao 266033, China.

2. Department of Neurosurgery, Qingdao Hospital of Traditional Chinese Medicine (Hiser Hospital), Qingdao 266033)

**【Abstract】** **Objective** To study the protective mechanism of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in experimental autoimmune thyroiditis rats based on the TLR2/NF-κB signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, and selenium yeast tablet control groups, and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> low, medium and high dose groups. Except for the control group, the rats were injected subcutaneously with thyroglobulin (PTg) to establish an autoimmune thyroiditis model. The low, medium and high dose groups of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were injected intraperitoneally with 0.5, 1.0 and 1.5 μg/kg 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, the control and model groups were injected with the same amount of distilled water and selenium yeast tablets, and the control group was injected with the same amount of selenium yeast suspension (once a day) for 4 weeks. Thyroid

[作者简介] 赵慧(1981—),女,本科,主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: zhaohuiqd2018@163.com

[通信作者] 陈文文(1984—),女,硕士,主治医师,研究方向:内分泌。E-mail: chenwen129@126.com

function factors, serum inflammatory factors, thyroid autoantibodies, TLR2/NF- $\kappa$ B signaling pathway-related protein levels, and gene expression were analyzed. **Results** Compared with autoimmune thyroiditis rats, serum free thyroid glycine, free thyroxine, thyroid-stimulating hormone, thyroglobulin antibody, and thyroid peroxidase antibody, and interleukin (IL)-6, IL-12, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), thyroid tissue TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF- $\kappa$ B mRNA and protein expression were reduced, and IL-10 was increased in 1,25(OH) $_2$ D $_3$  group rats. The difference between high dose 1,25(OH) $_2$ D $_3$  and model groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** 1,25(OH) $_2$ D $_3$  improves the thyroid functions of rats with autoimmune thyroiditis and increases the level of autoimmune antibodies. The mechanism may be related to inhibition of the TLR2/NF- $\kappa$ B signaling pathway by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , which regulates the release of inflammatory factors such as IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ .

**【Keywords】** 1,25(OH) $_2$ D $_3$ ; autoimmune thyroiditis; rats; TLR2; NF- $\kappa$ B

自身免疫性甲状腺疾病(autoimmune thyroid disease, AITD)是病变部位主要发生在甲状腺的自身免疫性疾病,主要包括 Grave 病(GD)和桥本甲状腺炎(hashimotos thyroiditis, HT),其发病机制复杂,涉及遗传、免疫和环境等多种因素<sup>[1-2]</sup>。目前的研究发现,AITD 与甲状腺细胞炎症相关信号转导异常、炎症反应有关<sup>[3]</sup>,而维生素 D 在机体多种自身免疫性疾病中起调节免疫系统、增强固有免疫系统和抑制抑制适应性免疫系统的作用<sup>[4]</sup>。1,25 二羟基维生素 D $_3$ (1,25-dihydroxy vitamin D $_3$ , 1,25(OH) $_2$ D $_3$ )是维生素 D 在体内的主要活性代谢产物,通过与细胞内的特异性维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合在机体骨钙代谢、细胞生长和分化中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。大量的研究表明,维生素 D 与 AITD 相关,缺乏维生素 D 可能增加罹患 AITD 的风险,但关于其对 AITD 的作用机制及其对机体自身免疫情况的研究还较为缺乏<sup>[7-10]</sup>。因此,本研究建立实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠模型,研究 1,25(OH) $_2$ D $_3$  对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫指标及以 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响,以期对自身免疫性甲状腺炎的临床治疗提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性健康大鼠 120 只,4~5 周龄,体重(200 $\pm$ 10)g,由青岛博隆实验动物有限公司提供[SCXK(鲁)2017-0006]。所有动物饲养于青岛市中医医院动物中心[SYXK(鲁)2018-0026]暂养,温度保持在 21 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C,相对湿度为 50%~60%,自然光照明,自由进食进水,保持饲养环境清洁,适应性饲养 1 周后进行实验分组和造模。所有实验动物经青岛市中医医院实验伦理委员会审核并批准(IACUC-2018-0141),实验过程遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

1,25(OH) $_2$ D $_3$  注射剂(江苏吴中医药集团有限公司,15 mg/mL,批号 130232);完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA)(美国 Sigma 公司);大鼠甲状腺球蛋白(mouse thyroglobulin, mTg)(上海源叶生物科技有限公司);血清游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)、血清游离甲状腺素(free thyroxine, FT4)及促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-12 及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海广锐生物科技有限公司);甲状腺球蛋白抗体(thyroglobulin antibody, TGAb)、甲状腺过氧化物酶抗体(thyroid peroxidase antibody, TPOAb)(武汉基因美生物科技有限公司);兔抗大鼠 TLR2、NF- $\kappa$ B、MyD88、TRAF-6 抗体, $\beta$ -actin 蛋白抗体(英国 Abcam 公司);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);HRP 标记羊抗兔 IgG(上海拜沃生物科技有限公司);TRIzol 总 RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);超敏化学发光试剂盒(瑞士 Thermo 公司);HE 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

CX41 型光学显微镜购自日本 Olympus 公司;ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;Centrifuge 5430R 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;HM 340E 切片仪购自赛默飞世尔(中国)有限公司;UV2100 型紫外分光光度计(日本岛津有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物造模

按照参考文献<sup>[11]</sup>对除对照组外的实验大鼠进行造模,对造模大鼠给予 100  $\mu\text{g}$  的 mTg+CFA 皮下注射,连续 2 周,每周 1 次,完成大鼠初次免疫;从第 3~6 周,再对造模大鼠给予相同剂量的 mTg+CFA 皮下注射进行重复免疫,对照组大鼠给予水+CFA 皮下注射,注射时间及次数与模型组一致。第 7 周取造模大鼠眶静脉血,采用 ELISA 法测定血清 TPOAb 水平,TPOAb>60 IU/mL 即为造模成功。造模过程中死亡 3 只大鼠,造模成功率为 97%。

#### 1.3.2 分组及给药

将造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 低、中、高剂量组,每组 15 只。从第 7 周开始对治疗组大鼠进行药物干预,低、中、高剂量组每天给予大鼠腹腔注射 0.5、1.0、1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 注射剂,对照组和模型组注射等量蒸馏水,硒酵母片对照组注射硒酵母混悬液(每天 1 次),连续干预 4 周。

#### 1.3.3 HE 染色

末次给药后麻醉处死大鼠,摘取大鼠甲状腺组织,采用 4% 多聚甲醛溶液固定大鼠甲状腺组织 1 周,经乙醇脱水、石蜡包埋、苏木精-伊红(HE)染色后切片(5  $\mu\text{m}$ ),光学显微镜下观察各组大鼠甲状腺组织病理结构改变,应用 Image J 图像分析软件统计细胞核数和甲状腺滤泡面积。

#### 1.3.4 大鼠血清甲状腺激素、自身免疫抗体及炎症因子检测

末次给药后麻醉大鼠,采集心脏血 2 mL,离心 20 min(3000 r/min),收集上清液,采用 ELISA 试剂

盒按操作规程检测各组大鼠血清自身免疫抗体(TGAb、TPOAb)水平及炎症因子(IL-6、IL-10、IL-12、TNF- $\alpha$ )水平;采用 RIA 法检测大鼠血清 FT3、FT4 及 TSH 水平。

#### 1.3.5 RT-PCR

大鼠基因序列从美国国家生物技术中心相关数据库查询获得,通过 Primer Premier 6.0 软件设计,引物序列(见表 1),由上海生物工程股份有限公司合成。取大鼠甲状腺组织并采用超声粉碎,TRIzol 提取总 RNA,紫外分光光度计测定吸光度值,分析总 RNA 纯度。用反转录试剂盒合成 cDNA,PCR 扩增,荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 表达水平。反应体系为 30  $\mu\text{L}$ (SYBR Green PCR Master Mix(2 $\times$ ) 15  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , Primer A、Primer B 各 0.5  $\mu\text{L}$ ,无 RNA 酶 H<sub>2</sub>O 13  $\mu\text{L}$ )。定量扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$  退火 50 s,共 40 个循环。反应均以  $\beta$ -actin 为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  算法计算 mRNA 相对表达量。

#### 1.3.6 Western blot

取小鼠甲状腺组织,置于匀浆器中,加入 RIPA 细胞裂解液裂解后匀浆,低温高速离心机离心(12000 r/min,10 min),收集上清液并采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30  $\mu\text{L}$  蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转至 PVDF 膜,浸入含有 5% 脱脂奶粉的封闭液中孵育 1 h,加入适宜浓度一抗室温下封闭过夜。次日加入辣根过氧化物酶标记二抗孵育 1 h, TBST 冲洗后采用 ECL 化学发光试剂盒进行检测,凝胶成像系统成像,以 GAPDH 为内参,分析条带灰度值,计算小鼠 TLR4、NF- $\kappa\text{B}$  p65 和 I- $\kappa\text{B}\alpha$  蛋白相对表达量。

表 1 TLR2/NF- $\kappa\text{B}$  信号通路相关基因及内参引物序列  
Table 1 TLR2/NF- $\kappa\text{B}$  signaling pathway related genes and primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增产物大小 Amplification product size
TLR2-F	5'-GCTCACCGATGAAGAAG-3'	106 bp
TLR2-R	5'-TCCAAGATGTAACGCAA-3'	
NF- $\kappa\text{B}$ -F	5'-AAAATGCCCCACGGTTATG-3'	134 bp
NF- $\kappa\text{B}$ -R	5'-ATTCGCTTTGCCTTCCTCC-3'	
MyD88-F	5'-GCCAGGTTTGCATCTTCTTATT-3'	110 bp
MyD88-R	5'-GGAGACTCACTTCTTGGGGAC-3'	
TRAF-6-F	5'-TCTGCTTGATGGCTTTACGG-3'	183 bp
TRAF-6-R	5'-TTACCGTCAGGAAAGAATCTC-3'	
$\beta$ -actin-F	5'-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3'	175 bp
$\beta$ -actin-R	5'-GAACCGTCATTGCCGATAG-3'	

## 1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS 21.0 软件,数据采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-*t* 检验,采用 Graphpad 5.0 进行绘图分析, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

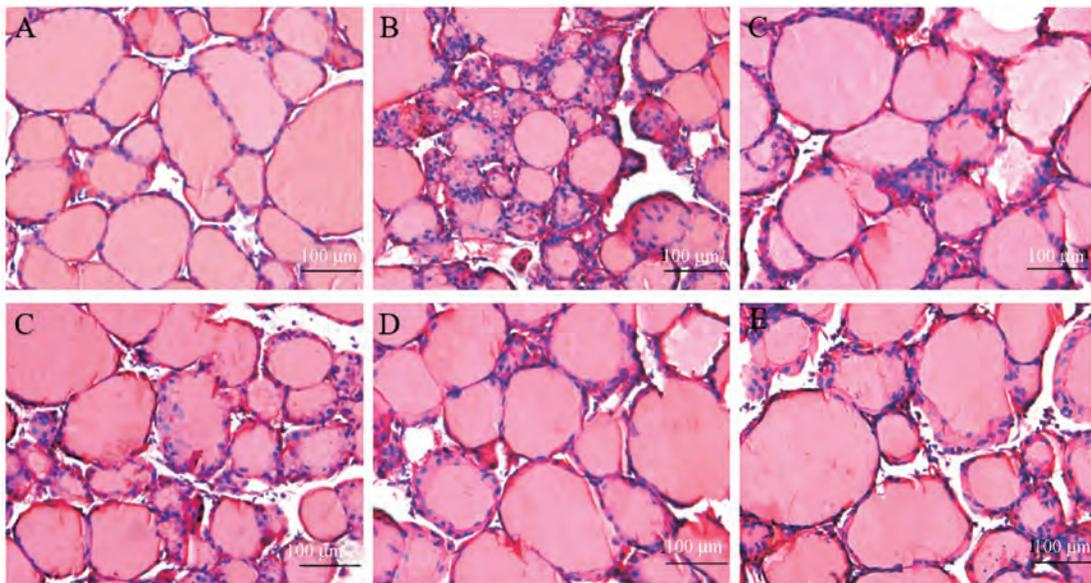
### 2.1 各组大鼠甲状腺组织病理改变情况

对照组大鼠甲状腺滤泡大小适中,腔内胶质充盈,滤泡上皮细胞完整,呈低立方状;模型组滤泡变小或被破坏,滤泡上皮细胞呈高柱状,细胞核数量明显增多,胶质减少,形状不规则,细胞腔内及细胞间质可见大量炎性细胞浸润;各给药组大鼠甲状腺

炎性细胞浸润减少,滤泡上皮细胞由高柱状变为立方柱状,细胞核数量减少,滤泡细胞腔内胶质增多,硒酵母片对照组小灶状改变,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 低剂量组呈小片状改变,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 中剂量组仅见散在淋巴细胞浸润,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 高剂量组呈点片状改变,见图 1、表 2。

### 2.2 各组大鼠甲状腺抗体和甲状腺功能比较

与对照组比较,模型组、硒酵母片对照组以及 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组 TGAAb、TPOAb、FT3、FT4 均增加,TSH 均降低,其中模型组与对照组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,硒酵母片对照组和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组 TGAAb、TPOAb、FT3、FT4 均降低,TSH 均增加,呈现出剂量依赖性,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。



注:A:对照组,大鼠甲状腺滤泡完整,大小适中,腔内胶质充盈,间质未见炎性细胞浸润;B:自身免疫性甲状腺炎模型组,大鼠甲状腺滤泡缩小或被破坏,大小不均,间质有大量炎性细胞浸润,腔内胶质减少;C:硒酵母片对照组,大鼠甲状腺滤泡结构较完整,间质炎性细胞浸润减少,胶质含量略减少;D:1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 低剂量组,呈点片状改变,甲状腺滤泡大小不均,间质可见炎性细胞浸润,腔内胶质较少;E:1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 中剂量组,大鼠甲状腺滤泡增大,间质少量炎性细胞浸润,腔内胶质增加;F:1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 高剂量组,呈小片状改变,大鼠甲状腺滤泡结构较为完整,间质仅见散在炎性细胞浸润,胶质含量增加。

图 1 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对各组大鼠甲状腺形态学的影响( $n=5$ )

Note. A, Control group, the thyroid follicles of rats were complete, moderate in size, filled with colloid in the cavity, and no inflammatory cell infiltration was found in the stroma. B, Autoimmune thyroiditis model group, the thyroid follicles were reduced or destroyed with uneven size, a large number of inflammatory cells infiltrated in the stroma, and the colloid in the cavity was reduced. C, Selenium yeast tablet control group, the structure of thyroid follicles in rats was relatively complete, the infiltration of interstitial inflammatory cells was reduced, and the content of glia was slightly reduced. D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> low dose group, there were patchy changes, uneven size of thyroid follicles, infiltration of inflammatory cells in the stroma and less colloid in the cavity. E, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> medium dose group, the thyroid follicles were enlarged, a few inflammatory cells infiltrated in the stroma, and the colloid in the cavity was increased. F, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> high dose group, the follicular structure of rat thyroid was relatively complete, only scattered inflammatory cell infiltration was found in the stroma, and the content of colloid increased.

Figure 1 Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on thyroid morphology of rats in each group

2.3 各组大鼠血清炎症因子水平

与对照组比较,模型组大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF-α 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,硒酵母片对照血清 IL-6、IL-12 和 TNF-α 水平显著降低 ( $P <$

0.01), IL-10 水平显著增加 ( $P < 0.01$ ), 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组 IL-6 与模型组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 中、高剂量 1, 25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 组 IL-12、IL-10 及 TNF-α 与模型组差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

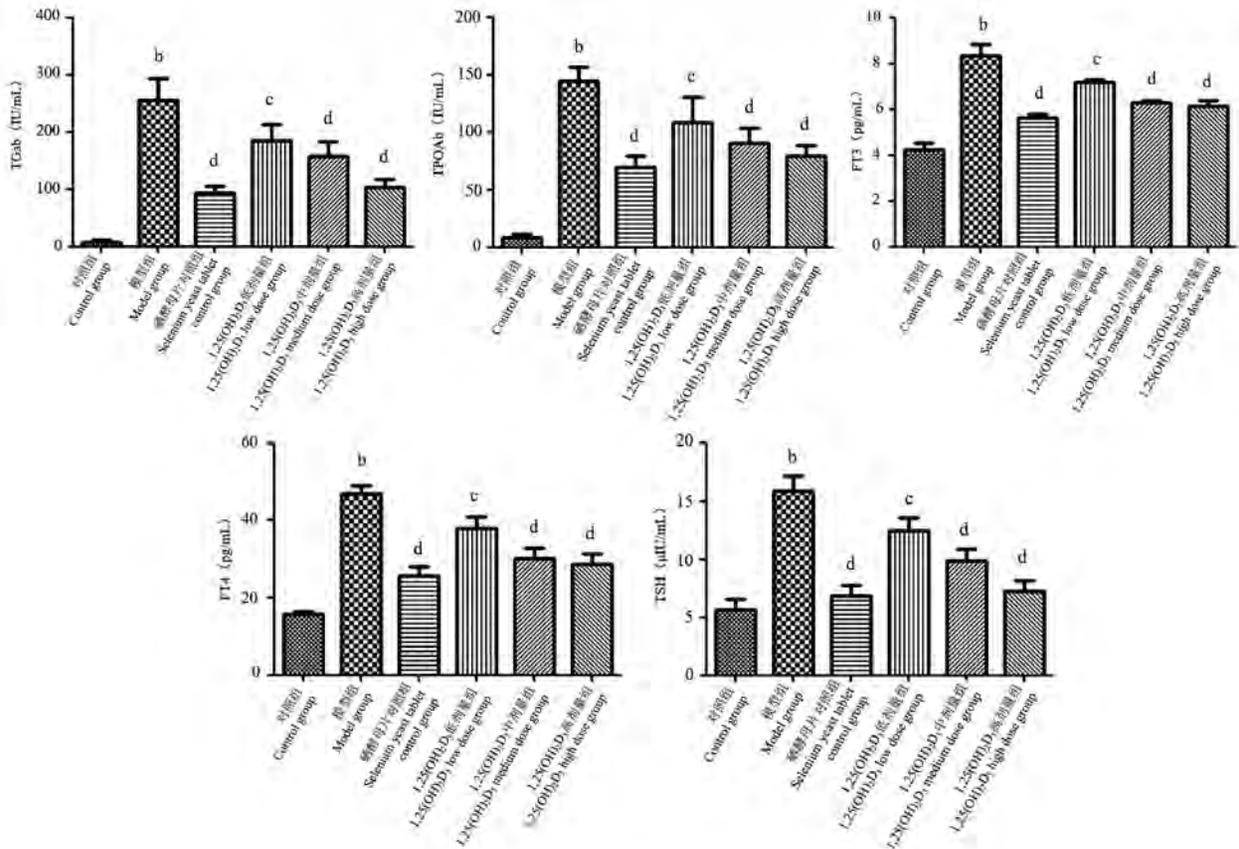
表 2 各组大鼠甲状腺系数、甲状腺细胞和核数及滤泡面积比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Comparison of thyroid coefficient, number of thyroid cells and nuclei and follicular area in each group

组别 Groups	甲状腺系数 Thyroid coefficient	细胞核数 Nucleic number	滤泡面积 (μm <sup>2</sup> ) Follicular area
对照组 Control group	0.009±0.001	976.50±108.57	26306.12±3283.79
模型组 Model group	0.057±0.016 <sup>*</sup>	1692.12±33.45 <sup>*</sup>	5298.54±2038.37 <sup>*</sup>
硒酵母片对照组 Selenium yeast tablet control group	0.030±0.008 <sup>*#</sup>	1238.98±189.43 <sup>#</sup>	15450.74±3634.54 <sup>**</sup>
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 低剂量组 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> low dose group	0.050±0.013 <sup>*</sup>	1554.20±135.80 <sup>*</sup>	7066.32±2752.71 <sup>*</sup>
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 中剂量组 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> medium dose group	0.027±0.008 <sup>*#</sup>	1499.33±226.69 <sup>*</sup>	10950.81±2839.60 <sup>*#</sup>
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> 高剂量组 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> high dose group	0.027±0.006 <sup>*#</sup>	1354.21±290.82	14219.15±5439.87 <sup>*#</sup>

注:与对照组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

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



注:与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠甲状腺抗体和甲状腺功能比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

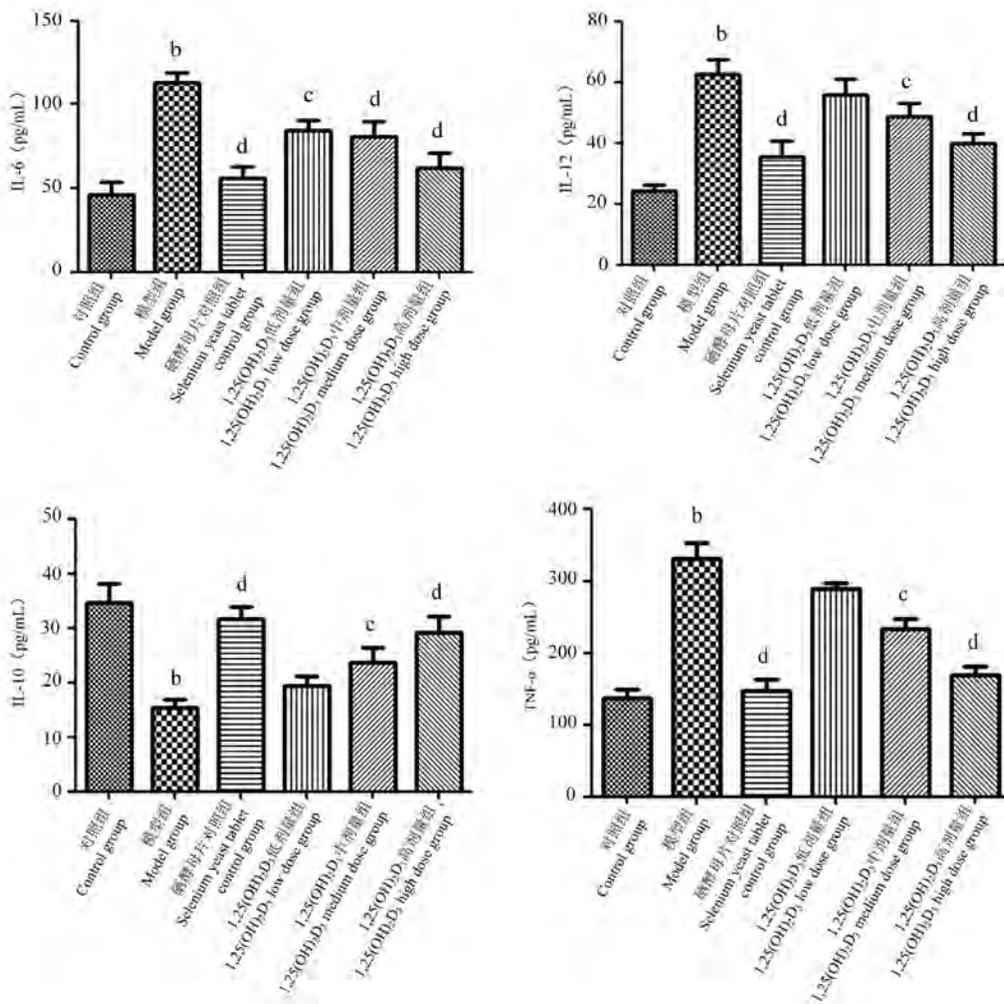
Figure 2 Comparison of thyroid antibody and thyroid function of rats in each group

**2.4 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 表达**

与对照组比较,模型组大鼠甲状腺组织中 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 表达显著均显著增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,硒酵母片对照组及 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组各指标蛋白表达均不同程度降低,硒酵母片对照组各指标蛋白 mRNA 表达水平与模型组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组 TRAF-6 与模型组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),高剂量组 TLR2、中、高剂量组 MyD88、NF-κB 与模型组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4。

**2.5 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB 蛋白表达**

与对照组比较,模型组大鼠甲状腺组织中 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB 蛋白表达显著均显著增加( $P < 0.05$ )。与模型组比较,硒酵母片对照组及 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组各指标蛋白表达均不同程度降低,硒酵母片对照组各指标蛋白表达与模型组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 各剂量组 TRAF-6 蛋白表达与模型组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),高剂量组 TLR2、中、高剂量组 MyD88、NF-κB 蛋白表达与模型组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 5。

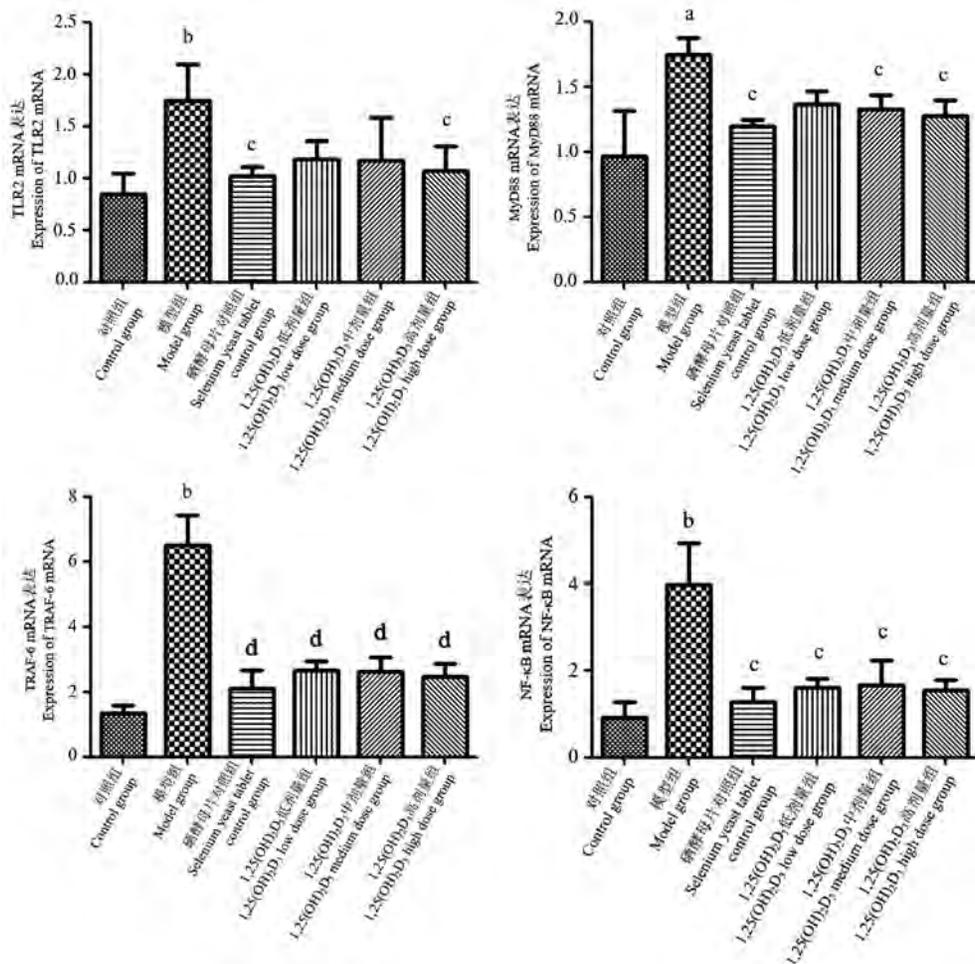


注:与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清 IL-6、IL-12、IL-10 和 TNF-α 比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 3 Comparison of serum IL-6, IL-12, IL-10 and TNF-α in each group

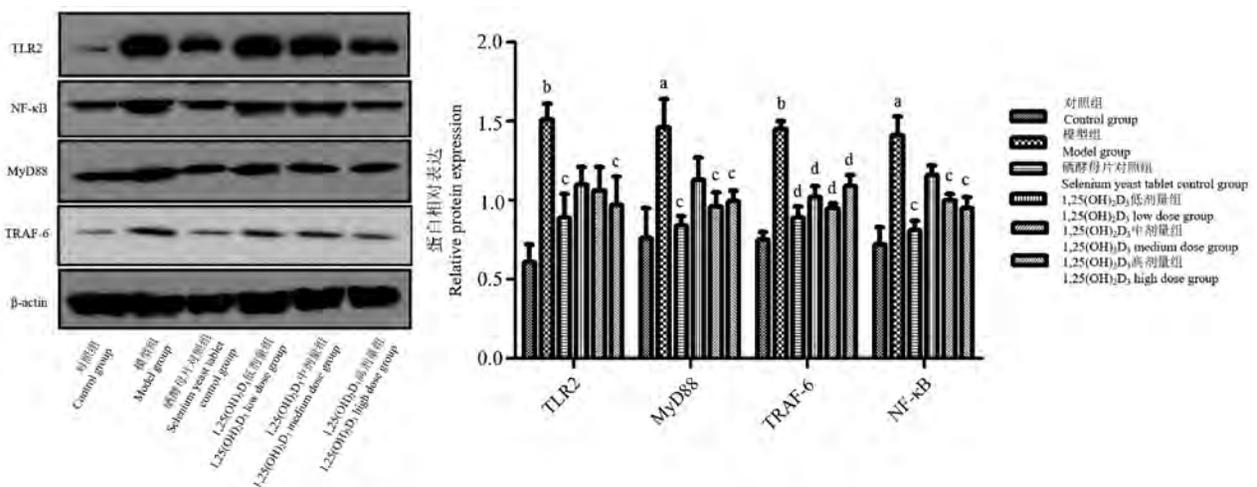


注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 4 mRNA expression of TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF-κB in thyroid tissue of rats in each group



注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠甲状腺组织 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF-κB 蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Note. Compared with the control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the model group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 5 Comparison of TLR2, MyD88, TRAF-6 and NF-κB protein expression in thyroid tissue of rats in each group

### 3 讨论

甲状腺能够调节机体能量代谢速度、机体合成蛋白以及调节机体对多种激素的敏感性。为研究  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  对自身免疫性甲状腺炎大鼠的影响,本研究采用多次注射 mTg+CFA 进行大鼠免疫建立自身免疫性甲状腺炎模型。HE 染色结果显示,模型大鼠甲状腺组织被大量炎性细胞浸润,滤泡腔内胶质减少,形状不规则,提示造模成功。模型大鼠血清水平 FT3、FT4、TSH 及 TGAb、TPOAb 水平显著增加,提示模型大鼠甲状腺功能减退,而  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预后,大鼠甲状腺组织炎性细胞浸润减少,滤泡形状趋于规则,腔内胶质增加,血清水平 FT3、FT4、TSH 及 TGAb、TPOAb 水平不同程度降低,提示  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  可有效改善自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺功能。

自身免疫性甲状腺炎属于免疫性疾病,其发病多与免疫细胞、免疫因子及其免疫相关信号通路相关<sup>[12]</sup>。维生素 D 是一种脂溶性维生素,在包括 T 细胞、B 细胞和抗原呈递细胞上均有表达, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  是其活性形式,可直接导致免疫状态改变<sup>[13-14]</sup>。维生素 D 对自身免疫性疾病的影响主要体现在  $\text{CD4}^+$  T 细胞的功能由 1 类辅助性 T 细胞(helper T cell 1, Th1) 和 2 类辅助性 T 细胞(helper T cell 2, Th2) 两条链相互拮抗保持平衡<sup>[15]</sup>。Th1 型细胞可分泌促炎性细胞因子 IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$ ,从而促进免疫应答<sup>[16]</sup>,Th2 型细胞可分泌抗炎性细胞因子 IL-10,从而抑制免疫应答<sup>[17]</sup>。IL-6 为趋化因子家族成员,具有促进 T 淋巴细胞增殖和活化,促进 B 细胞增殖和分泌抗体等功能<sup>[18]</sup>。IL-12 主要由 B 细胞和巨噬细胞产生,具有促进活性 T 细胞增殖、促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化、诱导细胞毒性 T 淋巴细胞与 NK 细胞的毒性并促进其分泌 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  的作用<sup>[19]</sup>。IL-10 可抑制活化 T 淋巴细胞,减少甲状腺内  $\text{CD4}^+$  和  $\text{CD8}^+$  淋巴细胞数量,抑制甲状腺组织中淋巴细胞浸润<sup>[20]</sup>。TNF- $\alpha$  为促炎因子,参与机体免疫反应和炎症反应。本研究显示,模型组大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  水平较正常对照组显著升高,IL-10 含量则显著降低,而  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  干预后可显著降低大鼠血清 IL-6、IL-12 和 TNF- $\alpha$  水平,增加血清 IL-10 水平(图 3)。在维生素 D 充足的情况下, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  能抑制 Th1 细胞分泌因子,从而降低血清 IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$

水平。王栋钢等<sup>[21]</sup>早期的研究表明, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  可下调 INF- $\gamma$  水平、上调 IL-10 水平,有利于恢复和维持 Th1 和 Th2 平衡。

TLR 是一种跨膜受体蛋白,当机体受到外源分子刺激时,TLR 与 MyD88 结合,IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK-4) 磷酸化后与激活肿瘤坏死因子受体相关基因 6 (TRAF-6) 相互作用,促 I- $\kappa$ B 磷酸化降解,激活 NF- $\kappa$ B,诱导炎症因子表达,最终导致炎症发生<sup>[22-23]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种关键的核转录因子,可促进炎性细胞因子的表达,在免疫和炎症反应中具有重要作用<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,与自身免疫性甲状腺炎模型大鼠比较, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  各剂量组 TLR2、MyD88、TRAF-6 和 NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达均降低。结合炎症因子 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$  的变化,表明  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  能通过 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制炎症因子 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$  的表达,从而减轻自身免疫性甲状腺炎大鼠炎症反应。

综上所述, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  对自身免疫性甲状腺炎大鼠的甲状腺功能有一定的改善作用,并能机体自身免疫抗体水平,其机制可能与  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  抑制 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路活性,从而调控 IL-6、IL-10、IL-12 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子释放有关。

#### 参考文献:

- [1] Wiersinga WM. Clinical relevance of environmental factors in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2016, 31(2): 213-222.
- [2] Ramos-Leví AM, Marazuela M. Pathogenesis of thyroid autoimmune disease: the role of cellular mechanisms [J]. *Endocrinol Nutr*, 2016, 63(8): 421-429.
- [3] 岳枫, 李长峰, 朱长波. EB 病毒 VCA-IgG、IgA 抗体在自身免疫性疾病检测中的应用比较 [J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(8): 1256-1258.
- [4] 李莉华. 维生素 D、调节性 T 细胞与自身免疫性甲状腺疾病的研究进展 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(5): 359-360.
- [5] Gorman S, Zafraou MZ, Lim EM, et al. High-dose intramuscular vitamin D provides long-lasting moderate increases in serum 25-hydroxyvitamin D levels and shorter-term changes in plasma calcium [J]. *J Aoa Int*, 2017, 100(5): 1337-1344.
- [6] 李秀华, 李晓丽, 段瑞生, 等.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导实验性自身免疫性重症肌无力大鼠免疫耐受的机制 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2015, 53(8): 5-10.
- [7] 龙雄, 陈晓铭, 马育林, 等. 血清 25 羟-维生素 D、碘营养状况与自身免疫性甲状腺病的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(17): 4362-4363.
- [8] Ke W, Sun T, Zhang Y, et al. 25-Hydroxyvitamin D serum level in Hashimoto's thyroiditis, but not Graves' disease is relatively

- deficient [J]. *Endocr J*, 2017, 64(6): 581-587.
- [ 9 ] Grove-Laugesen D, Cramon PK, Malmstroem S, et al. Effects of supplemental vitamin D on muscle performance and quality of life in Graves' disease: a randomized clinical trial [J]. *Thyroid*, 2020, 30(5): 661-671.
- [ 10 ] Li X, Wang G, Lu Z, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D predict prognosis in radioiodine therapy of Graves' disease [J]. *J Endocrinol Invest*, 2015, 38(7): 753-759.
- [ 11 ] 余欣然, 向楠, 曾明星, 等. 夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺组织及 Fas、FasL 表达的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(7): 1239-1242.
- [ 12 ] 祁岗, 朱艳媚, 李焱, 等. NF- $\kappa$ B 通路在自身免疫性甲状腺炎发病过程中的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(20): 46-50.
- [ 13 ] 江雪, 史育红, 田蓉. 维生素 D 与自身免疫性甲状腺疾病 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2018, 25(3): 436-440.
- [ 14 ] 李莉华. 维生素 D、调节性 T 细胞与自身免疫性甲状腺疾病的研究进展 [J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(5): 359-360.
- [ 15 ] 王卫芳, 李晓慧, 徐岐山. 血清 25 羟维生素 D3 与甲状腺自身抗体及甲状腺功能的关系 [J]. *福建医科大学学报*, 2018, 52(6): 379-384.
- [ 16 ] Parry HM, Dowell AC, Zuo J, et al. PD-1 is imprinted on cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cells and attenuates Th1 cytokine production whilst maintaining cytotoxicity [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(3): e1009349.
- [ 17 ] Coomes SM, Kannan Y, Pelly VS, et al. CD<sup>4+</sup> Th2 cells are directly regulated by IL-10 during allergic airway inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1): 150-161.
- [ 18 ] 杨雪威, 王思源, 赵佳, 等. 骨化三醇对桥本甲状腺炎大鼠血清炎性细胞因子表达的影响及其意义 [J]. *东南大学学报 (医学版)*, 2018, 37(5): 904-908.
- [ 19 ] Wallington JC, Williams AP, Staples KJ, et al. IL-12 and IL-7 synergize to control mucosal-associated invariant T-cell cytotoxic responses to bacterial infection [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 2182-2195.
- [ 20 ] 李婵, 孙勤国. 益气养阴疏肝合剂通过 Fas/FasL 途径治疗大鼠桥本氏甲状腺炎 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(1): 134-139.
- [ 21 ] 王栋钢, 熊丰, 雷培芸. 维生素 D3 对儿童桥本甲状腺炎 TH1/TH2 型细胞因子的影响 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2006, 21(12): 936-938.
- [ 22 ] 杨春治. 雷公藤内酯醇对大鼠变应性鼻炎 TLR2-NF- $\kappa$ B 信号通路的干预作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(7): 636-640.
- [ 23 ] 冯伟科, 于华芸, 王媛, 等. 小檗碱和大黄酸对 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应及 TLR2/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(42): 24-27.
- [ 24 ] 崔毅佳, 王淑梅, 金志国. 甲氨蝶呤通过抑制 TLR2-NF- $\kappa$ B 信号通路减轻类风湿关节炎大鼠滑膜炎的作用研究 [J]. *新疆医科大学学报*, 2019, 42(2): 211-216.

[收稿日期]2021-02-02

张茜,肖新华. 实验动物伦理教学中翻转课堂模式的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 87-90.

Zhang Q, Xiao XH. Flipper classroom mode taking and teaching of animal ethics [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 87-90.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.012

## 实验动物伦理教学中翻转课堂模式的探讨

张茜,肖新华\*

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 内分泌科,卫生健康委员会内分泌重点实验室,北京 100730)

**【摘要】** 动物实验是医学教育中的重要内容之一。目前,实验动物伦理教学存在地区性差异大、教学方法单一等问题。加强实验动物伦理及3R(reduction、replacement、refinement)理论教学,强化学生实验动物伦理意识势在必行。传统的动物伦理教学通常照搬条文,流于形式。翻转课堂是将课堂主导从教师转移给学生的教学方式。教师在线上平台进行课前知识传递,医学生完成陈述性知识学习。在线下课堂上,教师引导医学生以小组形式对动物伦理真实案例进行讨论分析,使医学生将动物伦理知识内化为能力,从而提高医学生的科研素养。

**【关键词】** 翻转课堂;动物伦理;教学改革

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)03-0087-04

## Flipper classroom mode taking and teaching of animal ethics

ZHANG Qian, XIAO Xinhua\*

(Key Laboratory of Endocrinology, Ministry of Health, Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

**【Abstract】** Animal experiments are a major part of medical education. At present, there are some problems in the laboratory animal ethics teaching mode, such as low popularization and limited teaching method. To resolve these problems, we focused on education of laboratory animal ethics and 3R theory (reduction, replacement, and refinement) to help medical students enhance their laboratory animal ethics knowledge. The flipped classroom design of animal ethics is a student-leading classroom. Before class, a teacher transfers knowledge to students on an online platform. In class, the teacher guides the student groups to discuss and analyze the animal experiment protocol to enhance the research ability of students.

**【Keywords】** flipped classroom; animal ethics; teaching reform

对于当代医学教育来说,实验课和科研训练是必不可少的教学内容。其中,很多实验课和科研训练是以动物作为实验对象。据不完全统计,每年欧盟用于实验的动物有1200万只<sup>[1]</sup>。在我国,这一数字为2000万只<sup>[2]</sup>,美国达到2200万只<sup>[1]</sup>。巨大的实验动物使用量引发了我们对动物实验引发的伦理问题的关注。实验动物伦理也成为医学教育中

不容忽视的重要问题。当今,国外大学纷纷开设动物伦理相关课程,如美国科罗拉多州立学院、佛罗里达州艾克得学院、南缅因州大学等<sup>[3]</sup>。然而,在我国,实验动物伦理教学面临很多挑战,包括课时缺乏、教师资源不足、重视程度不高等。传统的“照本宣科”式教学模式很难达到真正树立医学生动物伦理意识的目的。因此,教学改革势在必行。

**【基金项目】** 国家留学基金公派项目(201308110443);北京市东城区优秀人才培养资助项目(2019DCT-M-05)。

**【作者简介】** 张茜(1979—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:糖尿病及其机制研究。E-mail: rubiacordifolia@sohu.com

**【通信作者】** 肖新华(1963—),男,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:糖尿病及其机制研究。E-mail: xiaoxh2014@vip.163.com

## 1 实验动物伦理与 3R 理论

1822 年,禁止虐待动物议案通过,首次写入法律条文,标志着社会对动物伦理关注的起始。1966 年,美国颁布了实验动物伦理相关法律文件。随后,世界各国纷纷建立了完善的动物伦理法律体系。1988 年,我国颁布了《实验动物管理条例》,标志着我国实验动物工作进入法制化。2006 年,科技部颁布《关于善待实验动物的指导性意见》,对实验动物的饲养管理、运输、应用提出了指导性意见及管理措施。随着对动物伦理的重视和相关立法的实施,如何在医学研究中“尊重生命,科学、合理、人道地使用动物”,避免或减轻动物的疼痛和痛苦,是实验动物伦理研究的主要范畴。1959 年,英国动物学家 Russell 和微生物学家 Burch 在《人道主义实验技术原理》一书中,提出了动物实验替代方法理论,即减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement),简称为 3R 原则<sup>[4]</sup>。3R 原则主旨在于减少实验中的动物使用数量,尽量使用其他方法替代动物实验及优化动物实验操作及流程,减少实验动物的疼痛和痛苦<sup>[5]</sup>。随后,各国开始接受并推进 3R 原则的普及、推广及实施。1997 年,我国第一次完整地将 3R 概念写入多部委联合印发的《关于“九五”期间实验动物发展的若干意见》,并把“实验动物替代研究”列为“实验动物基础性研究”的重要分支,给予重点资助。

## 2 医学实验中存在的常见实验动物伦理问题

实验动物伦理课程能有效提升医学生动物伦理知识及相关法律、法规,树立医学生尊重动物、善待动物的意识,从而提升医学生最优化动物实验方案。然而,一项调查显示,多数医学生认同善待实验动物,减少实验动物使用<sup>[6]</sup>。然而,医学生中普遍存在对实验动物伦理、实验动物使用 3R 原则、动物伦理相关法律和法规不了解、不知晓的情况。甚至出现医学实验中没有让实验动物享受应有的伦理的情况<sup>[7-9]</sup>。对北京 4 所医学高校(北京大学医学部、北京协和医学院、北京中医药大学、首都医科大学)在校学生的问卷显示,40%的医学生认为应做到对生命最基本的尊重<sup>[8]</sup>。然而,针对山东省 3 所大学(潍坊医学院、滨州医学院、青岛大学医学院)临床医学专业本科低年级学生的问卷调查发现,仅有 3%和 5%的学生非常了解《关于善待动物的指导

性意见》和 3R 原则。表示“没听说过”的学生分别占 62%和 57%<sup>[7]</sup>。另外,对湖北省两所高校(湖北科技学院基础医学院、华中师范大学生命科学学院)学生调查显示,只有 8.8%的学生表示接受过动物伦理相关课程教育<sup>[9]</sup>。

## 3 动物实验伦理教学面临巨大挑战

医学院校在实验课和科研训练中,动物实验是不可缺少的内容之一。在医学院的实验课上,专业课教授通常重点讲授动物实验本身的原理、操作,而忽视了实验动物伦理知识的传授。北京协和医院要求所有从事实验动物实验的医学生必须参加实验动物从业人员岗位证书培训课程。医学生培训后,参加相应考试,考试通过取得上岗证,才能开展动物实验。在这一课程中,动物伦理是重要内容之一,通常安排在培训最开始的时间,足以看出各级实验动物管理机构对动物实验伦理教学的重视。然而,由于课时短缺、师资匮乏、教学存在地区差异,实验动物伦理教学效果不佳<sup>[10]</sup>。传统的动物伦理教学通常采取“照本宣科”式教学中,教师为教学主体,不能有效让医学生理解树立实验动物伦理意识,更无法让医学生在动物实验过程中规范操作,真正做到掌握动物伦理及动物权利知识<sup>[11]</sup>。

## 4 翻转课堂的历史及定义

翻转课堂(flipped classroom)是指重新调整课堂内外时间,教师不再占用课堂的时间来讲授知识,而是通过制作视频讲座,利用移动网络与网络教学平台传递给学生等形式,让学生在课前完成自主学习。在自学之后的线下课堂上,以学生为主体,通过案例的深度讨论,让学生自主运用所学知识,解决实际问题。2000 年,Baker 教授在第 11 届大学教学国际会议上发表了论文提出了翻转课堂的概念。2007 年,美国两位中学老师为缺席的学生录制课程幻灯片(ppt)讲解视频,并上传到网络,用于给请假的学生补课。随着互联网技术的普及,当代教学工作者纷纷将翻转课堂应用到教学实践中<sup>[12]</sup>。翻转课堂具有如下几个特点:(1)翻转课堂中所录制的授课视频短小精悍,学生可以随时随地学生,有利于学生自主学习,还可以在线上与其他学生分享心得、讨论,向教师提出疑问;(2)翻转课堂将知识传授过程进行了重新排序,学生在课前通过自主学习教师教学视频的方式接收知识,在课堂

上以学生为主体,通过互动,进行知识内化;(3) 翻转课堂模式有助于学生反复学习、复习和巩固。因此,翻转课堂注重学生自主学习能力和批判性思维的提升,有助于培养学生对实际情况下运用所学知识解决问题的能力<sup>[13]</sup>。

## 5 实验动物伦理翻转课堂的设计目标

实验动物伦理翻转课堂教改设计旨在加强医学生对实验动物伦理知识、法律法规、准则的知晓度、依从性,提升医学生在动物实验课及科研训练中自觉、自发的运用实验动物伦理理论设计动物实验,遵守实验动物伦理相关规定,提升医学生科研素养。在课前视频课阶段,将实验动物伦理知识传递给医学生,并鼓励学生在网上提出问题,教师、学生一起讨论。在线下课堂上,以教师提出实际案例,包括动物实验方案设计、动物实验操作等,组织学生对动物实验中涉及的实验动物伦理问题进行讨论,鼓励学生积极参与,探讨解决办法。从而,通过实验动物伦理课程学习唤醒医学生的动物伦理意识,鼓励学生独立思考,引导学生运用实验动物伦理知识在动物实验课和科研训练中进行伦理思辨、伦理决策和伦理评估的能力,并逐步培养学生的科研素养。因此,翻转课堂同时兼具灵活学习的便利性,有限时间学习更多知识的高效性和以学生主动学习的革新性,从而提供有效的实验动物伦理教学。

## 6 动物伦理教学翻转课堂的实施

### 6.1 课前知识传递阶段

教师制作动物伦理教学网络平台时,通常选择动物伦理知识点,包括 3R 原则、《实验动物管理条例》、《关于善待实验动物的指导性意见》、其他国家的动物平等运动、动物伦理条例、动物伦理发展史、制定符合 3R 原则的实验方案、动物实验过程中遵守动物伦理规定等,每个知识点录制 5~15 min 的讲解或操作视频,避免时间过长,导致学生不能专注课程,也有利于学生利用碎片时间,进行有效学习。同时,也可以将法律法规原文、具体案例、相关文献上传到网络平台,供学生们自主学习。在视频播放过程中,或者视频播放之后,可以放入测试题,以检测学生的理解程度。教师也可以从动物伦理网络平台上随时了解学生学习在线时长,答题完成情况,讨论次数等,以便监督、提醒学生积极完成学

习。学生可以在网络平台上随时提问,所有同学可以参与谈论,发表自己的见解,教师也可以解答学生的疑惑。动物伦理教学网络平台不仅要求学生专注于“听讲”,还鼓励学生开动脑筋思考,时刻处于兴奋状态,积极有效地参与到学习中去,而且更加符合学生主动学习的规律。

### 6.2 课堂知识内化阶段

在动物伦理线下课堂之前,教师可以将拟定的实际案例和讨论话题在线上平台予以发布,鼓励学生在课前积极思考,查找相关资料。在动物伦理线下课堂上,教师在简要梳理网络平台知识点的重难点后,将课堂大部分时间用于基于实际案例的讨论。教师可以选择动物实验中与动物伦理相关的热点事件,在动物实验过程中真实遇到的伦理问题,或者文献资料中具有代表性的科研案例为引导,积极鼓励医学生对实际案例进行分小组讨论。比如,如何设计实验能够满足减少、替代、优化的 3R 原则。在讨论中,鼓励学生各抒己见,应用线上平台所学实验动物伦理知识发表自己的看法。在基于案例的讨论中,锻炼医学生收集信息、批判性阅读、知识理解、分析及自学能力。通过发现问题、解决问题这一过程,激发医学生学习兴趣,主动内化知识,并把动物伦理知识和动物实验实际联系起来。组织学生虚拟模拟动物伦理委员会项目审核,对实验方案的动物伦理审查现场。一部分学生作为实验方案的研究设计者,提交自己设计的项目申请书(animal experiment protocol),用幻灯片进行汇报;另一部分学生模拟动物伦理委员会研究评审者,对提交的实验方案进行审核、点评。审查要点覆盖 3R 原则的体现及麻醉药的使用、手术操作的方式、安乐死的方法等实验设计细节。最后,由研究评审者给出审查意见,审核结果和进一步修改意见。通过双方的答辩,对动物伦理知识进行梳理、提升医学生在实际医学科研工作中对动物伦理知识的主动应用和思辨能力。

### 6.3 线下课堂实践操作阶段

动物实验操作中遵守动物伦理尤为重要。在线上学习阶段,学生已经自主学习了教师录制的动物实验操作的视频。在线下实验模拟中,安排学生真正走进动物实验室,在实际操作中内化动物伦理知识的内容。包括在实验过程中,动作轻缓,减少噪音,避免惊扰动物。以及现场操作抓取动物、动物给药、取血及麻醉后观察动物情况,适当给予热

台等。教育医学生在动物实验全过程中专心致志,时刻保持对生命的敬畏。教师对医学生的实验操作中遇到的问题进行梳理,组织医学生讨论、反思、改正。

#### 6.4 建立与翻转课堂模式相适应的考核方式

以教师为主体的传统教学方式衍生的传统考核方式以考核学生基本知识、原理为主。学生的学习效果由一张试卷的成绩而确定。有些学生虽然在考试中取得很好的分数,但是在实际工作中,不能把所学知识运用到实践中。这种传统教学模式,常会造成“高分低能”现象。翻转课堂教学模式下,实验动物伦理课程考试可以从以下多维度设计:(1)教师通过线上网络平台统计医学生观看教学视频时长,完成测试题正确率,参与讨论情况,评估学生线上学习的情况。(2)在线下课堂上,基于实际案例讨论时,教师对医学生团队协作、查阅文献、提出观点、论证观点等能力进行综合评估。(3)在模拟实验动物伦理审核现场答辩模块,根据医学生的动物实验方案准备是否充分、答辩是否有理有据,研究审核方是否充分履职等情况进行综合打分。(4)线下实验课堂,观察学生在动物实验中的表现,进行评定。(5)课后,教师拟定一个动物实验方向,要求学生制定出实验方案,思考实验具体操作方法,如实验分组方法、每组动物数量、动物手术时的麻醉方式、处死方式等,写出完整的实验设计,教师进行打分评估<sup>[14]</sup>。(6)教师建立基于案例的考核题库,避免死记硬背的题目,增加案例论述题的比重。这些多维度的考核方式能使医学生在模拟的动物实验设计中,加深对基础知识和概念的深入理解,提高学生分析问题、解决问题的能力,将教学与科研实践机密地连接在一起,升华翻转课堂在实验动物伦理教学的效果。

## 7 展望

采用翻转课堂的教学模式开展实验动物伦理

教学,能通过线上课程网络平台与课堂互动讨论,结合开放性考核方式,切实提升医学生实验动物伦理意识,增长医学生实验动物伦理知识,加强医学生批判性思辨能力,提高医学生医学人文素质。

#### 参考文献:

- [1] Ideland M. Different views on ethics: how animal ethics is situated in a committee culture [J]. *J Med Ethics*, 2009, 35(4): 258-261.
- [2] 杨劲松. 实验动物的福利伦理与“3R”原则 [J]. *河南医学研究*, 2015, 24(8): 64-65.
- [3] 宋宇, 张慧, 牛秉轩, 等. 医药院校增强实验动物伦理教育的调查与思考 [J]. *海峡药学*, 2014, 26(7): 159-161.
- [4] Russell W, Burch RL. *The principles of humane experimental technique* [M]. London: Methuen & Co. Limited.; 1959.
- [5] 白晶. 动物实验“3R”原则的伦理论证 [J]. *中国医学伦理学*, 2007, 20(5): 48-50.
- [6] 张晨, 吴鉴今, 李嵩, 等. 从动物实验伦理问题问卷调查看医学伦理教育 [J]. *中国医学伦理学*, 2010, 23(5): 104-105.
- [7] 王胜男, 刘冰, 赵学会, 等. 低年级医学生动物实验伦理认知调查 [J]. *医学与哲学*, 2019, 6(40): 39-42.
- [8] 鲁春丽, 赵丽. 从动物实验看医学院校生命伦理教育——基于北京四所医学院校医学生的问卷调查 [J]. *中国医学伦理学*, 2016, 29(3): 525-528.
- [9] 刘旭东, 谢玲, 张玉超. 高等院校实验动物伦理教育现状调查与思考 [J]. *中国医学伦理学*, 2019, 32(5): 670-673.
- [10] 曹强, 李倩. 生物医学研究生动物实验伦理道德现状审思 [J]. *医学争鸣*, 2016, 7(5): 11-14.
- [11] 李莉, 赵善民, 崔淑芳. 高等院校实验动物管理中面临的问题及对策 [J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(1): 65-68.
- [12] 康淑敏. 信息化背景下的教学方式变革研究 [J]. *教育研究*, 2015, 36(6): 96-102.
- [13] 曲媛媛, 张森, 崔春晓. 线上线下混合式教学模式在组织学与胚胎学中的应用研究 [J]. *智库时代*, 2019, 37: 109, 112.
- [14] 熊礼慧. 翻转课堂、案例分析法与保险学课程教学 [J]. *当代教育实践与教学研究*, 2017, 12: 14-15.

[收稿日期]2021-01-06

杨一言, 高继萍, 续国强, 等. 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 91-97.

Yang YY, Gao JP, Xu GQ, et al. Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 91-97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.013

## 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展

杨一言, 高继萍, 续国强, 王晓堂, 宋国华\*

(山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

**【摘要】** 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全球范围内逐年上升。葡萄糖代谢重编程是肿瘤中最具代表的代谢特征,具有独特能量代谢特点,在氧气充足的情况下,肿瘤细胞仍会优先选择糖酵解,而不是选择能够高效产能的线粒体氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)。当前研究表明在口腔鳞状细胞癌的发生发展过程中非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)可以直接靶向葡萄糖转运蛋白及关键酶来改变葡萄糖代谢,或者通过调节癌症相关信号通路间接改变葡萄糖代谢。本文对 ncRNA 调控口腔鳞状细胞癌有氧糖酵解的有关机制进行综述。

**【关键词】** 非编码 RNA; 口腔鳞状细胞癌; 葡萄糖代谢; 有氧糖酵解

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0091-07

### Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma

YANG Yiyang, GAO Jiping, XU Guoqiang, WANG Xiaotang, SONG Guohua\*

(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

**【Abstract】** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most common malignant tumors of the head and neck, and its incidence is increasing yearly. Glucose metabolism reprogramming is the most representative metabolic feature of tumors, which has unique characteristics of energy metabolism. In the case of sufficient oxygen, tumor cells prefer glycolysis over highly productive mitochondrial oxidative phosphorylation. Current studies have shown that non-coding RNA (ncRNA) directly targets glucose transport protein and key enzyme to change glucose metabolism or indirectly changes glucose metabolism by regulating cancer-related signaling pathways during the occurrence and development of OSCC. This article reviews the mechanism of ncRNA in the regulation of aerobic glycolysis in OSCC.

**【Keywords】** non-coding RNA; oral squamous cell carcinoma; glucose metabolism; aerobic glycolysis

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔癌中最常见的实体肿瘤,占有病例的95%以上<sup>[1-2]</sup>,结合肿瘤的临床T分期、临床N分期、淋巴结外扩展等多个因素,患者术后复发率高,

**【基金项目】** 国家自然科学基金(31772551, 31970513); 山西省自然科学基金项目(20210302124093)。

**【作者简介】** 杨一言(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: winnter9841@163.com

**【通信作者】** 宋国华(1973—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。Email: ykdsgh@163.com

且 5 年生存率无明显提升<sup>[3]</sup>。此外,接受治疗后仍会面临肿瘤复发,预后差等问题,严重影响了患者的生活状态与心理健康。因此,为进一步完善临床治疗方案,我们需要阐明 OSCC 的分子调控机制。

葡萄糖代谢重编程是一种广泛存在肿瘤细胞中的生物学现象,即有氧条件下肿瘤细胞通过有氧糖酵解优先利用葡萄糖这一独特代谢表型。越来越多的证据表明,ncRNA 可以与癌基因或抑癌基因相互作用,调节肿瘤细胞的能量代谢<sup>[4-7]</sup>。因此,本文将对部分 ncRNA 影响调控 OSCC 有氧糖酵解相关的机制进行综述,发掘葡萄糖代谢在临床治疗中的潜在价值。

## 1 肿瘤葡萄糖代谢重编程

代谢重编程是肿瘤的 10 大特征之一,其中最经典、研究最多的是有氧糖酵解(aerobic glycolysis),其特点为即使在氧气足够支持 OXPHOS 的情况下,癌细胞仍倾向于将葡萄糖“发酵”成乳酸,这一现象被称为 Warburg 效应,我们广泛认为这是人类癌症的中心标志,同时也是促进肿瘤细胞增殖转移的重要过程。这种代谢转换通常是原癌基因(如 Myc)、转录因子(如缺氧诱导因子-1, HIF-1)、信号通路(如 PI3K)的激活,以及肿瘤抑制因子(如 p53)失活所致。此外,信号通路、癌基因和抑癌基因等能够直接控制增殖细胞中的代谢途径。经过上述几种途径作用,激活或过表达葡萄糖转运蛋白(GLUT)和糖酵解通路关键酶,增强肿瘤有氧糖酵解<sup>[4]</sup>。

肿瘤发生发展过程中,增殖细胞不仅需要大量 ATP,还允许糖酵解中间产物(“碳源”)穿梭到几个生物合成途径产生核苷酸、NADPH、脂质和非必需氨基酸,为合成大分子物质提供所需底物或中间体。与此同时糖酵解还能够生成有助于细胞增殖的小分子前体或中间体,比如乙酰辅酶 A、非必需氨基酸的中间体、核糖等物质,以此满足 DNA 快速复制的需要<sup>[5-6]</sup>。乳酸是糖酵解的产物,当乳酸堆积在细胞外基质并降低其酸碱度时,酸性的环境将促进肿瘤侵袭和转移<sup>[7]</sup>。综上所述,Warburg 效应是肿瘤细胞茁壮生长的最佳方式,是癌细胞的一种基本变化。糖酵解过程需要 GLUT、己糖激酶 2(HK2)、磷酸果糖激酶 2(PFK2)、乳酸脱氢酶 A(LDHA)和丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1)等多种酶,将葡萄糖转化为乳酸,与此同时也伴随着 PI3K/Akt/mTOR、Wnt/Snail 等信号通路的改变,这些酶、

信号通路的激活或失活会影响肿瘤的葡萄糖代谢。

## 2 OSCC 中葡萄糖代谢重编程调控作用机制

### 2.1 葡萄糖转运

GLUT 家族有 14 个成员, GLUT1 是 GLUT 家族中第一个被鉴定的,其研究最为广泛<sup>[8]</sup>。其功能为将葡萄糖从毛细血管转运到细胞中。正常生理情况下, GLUT 能够快速转运葡萄糖,而恶性肿瘤细胞常通过上调细胞膜 GLUT 表达增加葡萄糖摄取量,满足细胞增殖所需。

研究发现, OSCC 组织中 GLUT1 的表达显著增加<sup>[9]</sup>,提示 GLUT1 可作为 OSCC 患者预后的标志。Eckert 等<sup>[10]</sup>通过对 OSCC 样本进行免疫组织化学染色并与临床病理资料比较,结果证明 GLUT1 的表达水平能够为肿瘤侵袭和预后提供信息,同时也是筛选 OSCC 高危人群的标志物。对患有 OSCC 并发生淋巴结转移的受试者进行免疫组化检测,发现 GLUT1 表达显著升高。同时一项针对舌鳞状细胞癌的研究表明 GLUT1 与淋巴结转移相关,说明可以将 GLUT1 作为淋巴结转移的指标<sup>[11-12]</sup>。非典型 GLUT 表达不一定意味着细胞内葡萄糖摄取增加,也可能是受到癌细胞中转录水平的组织特异性基因表达的调控。最近研究表明, von Hippel-Lindau(VHL)肿瘤抑制基因会下调编码血管内皮生长因子(VEGF)和 GLUT1 的 mRNA 表达水平。在检测的 OSCC 细胞株中 VHL 与 GLUT1 的 mRNA 表达呈负相关, VHL 的降低可能会增强 GLUT1 表达导致葡萄糖摄取增加,在 OSCC 的发病机制中起重要作用<sup>[13]</sup>。

### 2.2 葡萄糖代谢相关酶

调控糖酵解的主要 3 种限速酶,分别是己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶。3 种酶介导不同过程,在糖代谢中发挥着重要的作用。除此之外,乳酸脱氢酶通过电子受体 NAD 的再生在有氧糖酵解中发挥关键作用。

己糖激酶(HK)是调控糖酵解步骤的第一个限速酶,催化葡萄糖磷酸化。在头颈部肿瘤中, HK2 的表达显著升高<sup>[14]</sup>。在缺氧条件下会引起 HK2 上调进而增强糖酵解,研究发现低氧环境中 HIF-1 $\alpha$  表达显著升高,肿瘤微环境内部处于缺氧状态, HIF-1 $\alpha$  促进 HK2 过表达,从而促进舌鳞状细胞癌细胞糖酵解<sup>[15]</sup>。Qu 等<sup>[16]</sup>发现在 OSCC 中,去泛素酶 USP13 对 GLUT1 和 HK2 具有调控作用,从而影响

糖酵解。

磷酸果糖激酶(PFK)是糖酵解过程中第二个限速酶,有 PFK1 和 PFK2 两个亚型。PFK1 能够催化 6-磷酸果糖(F-6-P)转化为果糖-1,6-二磷酸(F-1,6-BP)。果糖-2,6-二磷酸(F-2,6-BP)能够通过与 PFK1 相互作用,拮抗三磷酸腺苷(ATP)的抑制作用并增加葡萄糖摄取。果糖-2,6-二磷酸酶(PFKFB3)作为 PFK1 的变构活化剂,是糖酵解的速率调控酶,能够维持高糖酵解率并在多种人类肿瘤中高度表达。已有研究表明,PFKFB3 可以作为阻断糖酵解的靶点,阻止肿瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[17]</sup>。恶性肿瘤中,PFK2 通过活化 Ras、c-Src 等原癌基因提升其表达,并且诱导丙酮酸激酶(PK)转化为糖酵解酶复合物,促进糖酵解<sup>[9]</sup>。

丙酮酸激酶(PK)是糖酵解通路中另一个限速酶,能够催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)去磷酸化为丙酮酸并产生 ATP。PKM1 和 PKM2 是其中两种异构体,癌变组织中 PKM2 表达升高并在能量代谢中居于主导地位。有研究表明,PKM2 能够通过增加其他蛋白的磷酸化、稳定性和表达来促进肿瘤的侵袭和迁移<sup>[18]</sup>。OSCC 中 PKM2 通过 ETS1 基因依赖方式诱导癌细胞中基质金属蛋白酶 9 的表达,从而增加细胞的侵袭能力<sup>[19]</sup>。此外 PKM2 能够通过诱导上皮细胞向间充质细胞转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的发生促进肿瘤的发生发展。例如 OSCC 中细胞质中的 PKM2 会被转移到细胞核中,与 TGF- $\beta$  诱导同源因子 2(TGF- $\beta$ -induced factor homeobox 2, TGIF2)结合,使其泛素化降解,诱导 EMT 发生,促进 OSCC 的发生发展<sup>[20]</sup>。另外,有些生物合成途径则是通过降低 PK 活性发生,研究发现酪氨酸激酶受体刺激和信号转导以及 HIF-1 $\alpha$  的诱导会诱导丙酮酸激酶二聚体 M2 同种型(PKM2)表达,由此限制 PEP 到丙酮酸的转化,使得上游糖酵解中间体(“葡萄糖碳”)积累,进入其他生物合成途径<sup>[4]</sup>。

LDHA 是乳酸脱氢酶(LDH)的亚型之一,糖酵解过程中,催化丙酮酸转化为乳酸并产生 NAD<sup>+</sup>。乳酸作为一种重要的致癌物质,能够降低肿瘤微环境酸碱度,进而导致肿瘤生长、免疫逃逸等情况发生。有研究表明,OSCC 中 LDHA mRNA 的表达水平显著上调,沉默 LDHA 后细胞的葡萄糖消耗和乳酸产量降低,抑制肿瘤细胞的生长迁移能力<sup>[21]</sup>。LDH5 是催化效率最高的同工酶,有利于恶性肿瘤

发生、迁移和侵袭,研究发现其在癌细胞中与 GLUT1、HIF-1 $\alpha$  具有相关性。在有氧糖酵解过程中,LDH5 还能够提高乳酸产量,通过抑制脯氨酸羟化酶进而维持 HIF-1 $\alpha$  激活。将 LDH5 作为治疗靶点,有助于修改癌症治疗中修改 HIF-1 $\alpha$  调控的基因,达到下调葡萄糖摄取抑制肿瘤增殖的效果<sup>[22]</sup>。因此 LDH 对肿瘤细胞有氧糖酵解的影响能够为 OSCC 临床治疗提供新方向。

### 2.3 肿瘤免疫微环境

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)主要由免疫细胞、成纤维细胞、血管和淋巴管网络等组成。肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TIME)是免疫系统与肿瘤的交锋点,在维持免疫抑制环境中代谢改变起重要作用。研究发现在 OSCC 中肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)浸润可能与免疫逃逸有关,CD68<sup>+</sup> 和 CD163<sup>+</sup> TAMs 浸润与肿瘤中程序性死亡配体 1(PD-L1)高表达显著相关,PD-L1 抑制抗肿瘤免疫,导致 T 细胞凋亡<sup>[23]</sup>。此外 GLUT1 缺乏会损害效应 T 细胞的增殖和功能,削弱 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抗肿瘤效应<sup>[24]</sup>。研究发现 OSCC 细胞侵袭前高 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润的患者,复发所致死亡可能性较小,因此可以将侵袭前 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润作为预后的生物标志物<sup>[25]</sup>。Warburg 效应产生的乳酸堆积会降低 TME 的 pH,分解细胞基质导致肿瘤细胞迁移。乳酸作为糖酵解的终产物,在 TME 中的积累能够阻断 T 细胞内乳酸转运从而破坏 T 细胞代谢,抑制 T 细胞的增殖和活化<sup>[26]</sup>。此外细胞内 pH 降低还会诱导 NK 细胞凋亡,在结直肠癌肝转移中导致自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)耗竭<sup>[27]</sup>。目前有关 OSCC 中 TME 与葡萄糖代谢的研究鲜有报道。

### 2.4 葡萄糖代谢信号通路

葡萄糖代谢受到复杂信号网络通路的调控。其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在癌症的发生发展中起重要的调控作用。磷酸肌醇 3-磷酸(PI3K)可调节下游效应因子 Akt 和哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR),Akt 是驱动肿瘤糖酵解表型的重要因子,一方面可调节 GLUT1 的表达和膜转位进而激活糖酵解,另一方面还能调节 HK2、PKM2 等糖酵解酶的表达和活性影响糖酵解。mTOR 能够诱导许多有氧糖酵解和肿瘤生长相关基因转录,如 HIF-1 $\alpha$ 、核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和 c-Myc 等,通过这种方式调节糖酵解。因此,PI3K/Akt 能够调控有氧糖酵解这一

特性使其成为临床治疗的新靶点。

Wnt/Snail 信号通路是另一条调节通路, Lee 等<sup>[28]</sup>研究表明, Wnt/Snail 信号通路能够通过诱导丙酮酸羧化酶促进糖酵解, 这一过程依赖于 β-连环蛋白/T 细胞因子 4/Snail 信号通路。p53 基因则能够调节糖酵解和 OXPHOS 之间的转换影响 Warburg 效应, 一项研究表明 p53 在口腔癌中低表达<sup>[29]</sup>, 细胞色素 c 氧化酶 2 (SCO2) 是 p53 的转录靶标, 同时也是 COX 复合物的关键调节因子<sup>[30]</sup>, 在氧化应激情况下经 SCO2 介导细胞会在 p53 影响下完成从糖酵解到 OXPHOS 这一转变, 而缺乏功能性 p53 的细胞则继续进行糖酵解。

### 3 非编码 RNA 调控 OSCC 葡萄糖代谢重编程

非编码 RNA 是不能编码蛋白质的 RNA 分子, 包括小分子 RNA (microRNA, miRNA)、长链非编码 RNA (long non-coding RAN, lncRNA) 以及环状 RNA (circular RAN, circRNA) 等。在不同类型的肿瘤细胞中, 他们能够通过不同的机制调节肿瘤的葡萄糖代谢。例如乳腺癌细胞中, miR-155 通过 miR-155-sOCS1-sTAT2-HK2 和 miR-155-C/EBPβ-miR-143-HK2 两条途径级联促进癌细胞葡萄糖代谢<sup>[31]</sup>。lncRNA XIST 通过发挥分子海绵作用吸附 miR-126, 激活 IRS1/

PI3K/Akt 通路并以此增强葡萄糖代谢能力, 最终促进胶质母细胞瘤侵袭、转移, 提高肿瘤抗凋亡能力<sup>[32]</sup>。OSCC 中, 针对 ncRNA 调控葡萄糖代谢重编程进行了研究并获得一些成果(图 1)。

#### 3.1 miRNA 在 OSCC 葡萄糖代谢中的调控作用

miRNA 是长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA, 在调控基因表达中起关键作用。近年来, 越来越多的 miRNAs 被认为是 OSCC 细胞代谢的关键内源性调节因子。

例如, miR-340 能够直接与 GLUT1 的 3' UTR 区域结合, 下调 GLUT1 表达减弱 OSCC 细胞的有氧糖酵解。体外功能研究显示, miR-340 能够显著降低葡萄糖的摄取率, 提示 miR-340 所诱导的糖酵解改变为 OSCC 细胞的生长提供了必须的能量条件<sup>[33]</sup>。Xu 等<sup>[34]</sup>证明 miR-218 过表达能够显著抑制 OSCC 细胞系中 GLUT1 的表达, 同时也降低了细胞系的葡萄糖摄取, 表明 miR-218 通过靶向抑制 GLUT1 表达, 从而削弱糖酵解以抑制 OSCC 细胞生长。miRNA 不仅可以抑制糖酵解, 也能够促进糖酵解。Chen 等<sup>[35]</sup>通过 qRT-PCR 检测发现, 肿瘤组织中 miR-10a 和 GLUT1 表达水平显著增加, 体外细胞实验表明, miR-10a 能够同时促进口腔癌细胞的葡萄糖摄取和增殖。认为 miR-10a 通过作为 GLUT1 的

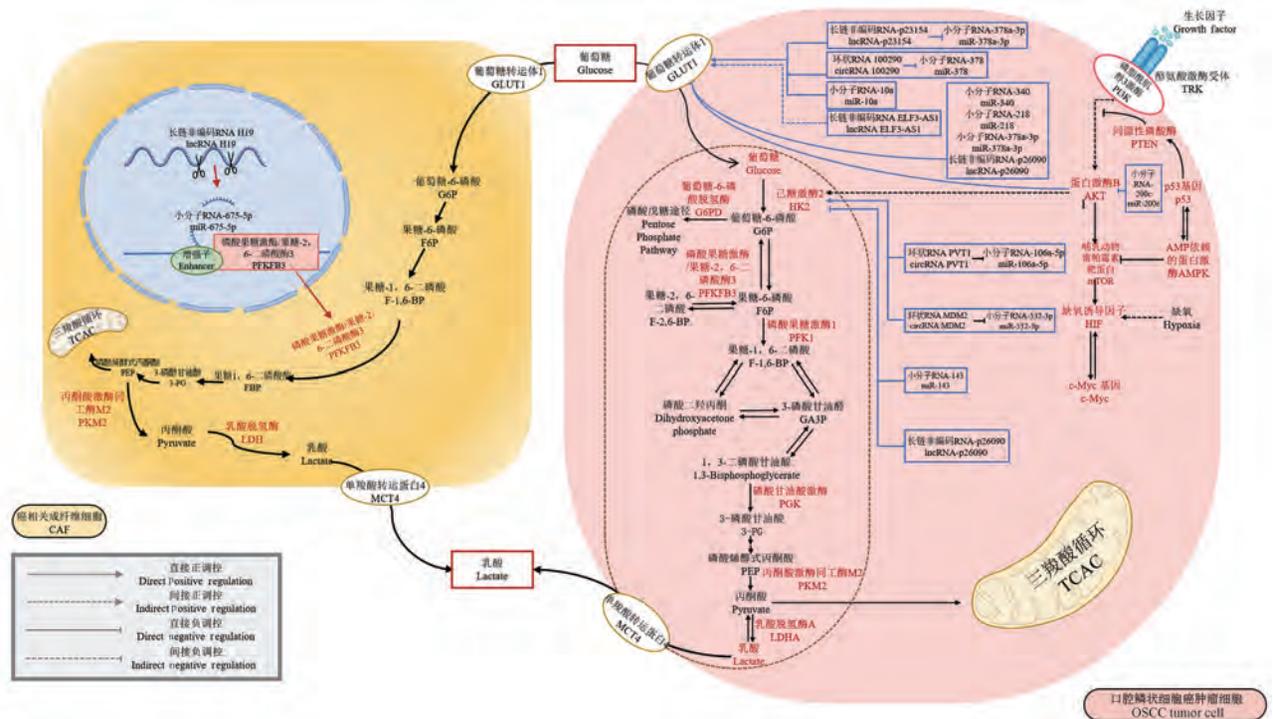


图 1 非编码 RNA 调控 OSCC 肿瘤细胞、成纤维细胞糖酵解示意图

Figure 1 Schematic diagram of non coding RNA regulating glycolysis of OSCC tumor cells and fibroblasts

上游激活剂,增加 GLUT1 的表达,促进 OSCC 细胞的葡萄糖代谢和癌细胞增殖,在 OSCC 中发挥致癌作用。HK2 作为糖酵解的第一个限速酶,诸多研究证明其能够调节肿瘤的发生和迁移。Sun 等<sup>[36]</sup>研究发现,miR-143 可以直接靶向 HK2,抑制其表达,从而抑制细胞葡萄糖代谢,阻止 OSCC 癌细胞的生长和侵袭。miR-532-3p 可靶向 HK2,由于竞争性作用,通过 circRNA MDM2/miR-532-3p/HK2 轴增加 HK2 的表达,促进有氧糖酵解<sup>[37]</sup>。除了直接靶向 GLUT1、HK2,miRNA 还可以通过信号通路调节下游 GLUT1 的表达,影响 OSCC 细胞的增殖。miR-200c 能够抑制 Akt 通路使下游 GLUT1 失活,从而抑制 OSCC 细胞对葡萄糖的摄取,减少能量供应抑制增殖<sup>[38]</sup>。

目前,有关 miRNA 调控肿瘤细胞糖酵解的研究越来越多,很多成果也证实了 miRNA 对肿瘤细胞 Warburg 效应的调控机制。研究 miRNA 在葡萄糖代谢中的调控作用,开发新的治疗靶点将作为 miRNA 在 OSCC 发生、发展、诊断及治疗的进一步研究思路 and 方向。

### 3.2 lncRNA 在 OSCC 葡萄糖代谢中的调控作用

lncRNA,是一类长度超过 200 个核苷酸的转录本,缺乏编码蛋白质的潜力,是参与转录和转录后调控的支架、阻滞剂、激活剂或海绵。近期研究发现,OSCC 中存在大量差异表达的 lncRNA,这些 lncRNA 可以调控多个参与葡萄糖代谢的下游靶点,如 GLUT1 和 GLUT4、酶(丙酮酸羧化酶、G6P)、癌基因(c-Myc)等,此外也可能与一个或多个信号通路相互作用,参与 OSCC 的发生和发展<sup>[39-41]</sup>。Wang 等<sup>[42]</sup>发现了 lncRNA-p23154-miR-378a-3p/GLUT1 轴可调控糖酵解,miR-378a-3P 靶向结合 GLUT1 的 3' 非编码区,抑制 OSCC 细胞中 GLUT1 表达,lncRNA-p23154 与 miR-378a-3p 呈负相关,lncRNA-p23154 通过与 miR-378a-3p 的启动子区域相互作用抑制其转录,使 GLUT1 表达增高,改变葡萄糖代谢。lncRNA-p26090 在 OSCC 细胞系及癌组织中的表达水平显著上调,同时细胞中糖酵解相关基因 GLUT1、HK2、PKM2 等表达显著降低,生成的乳酸减少,提示 lncRNA-p26090 可能通过调节相关基因的表达从而调控 OSCC 细胞糖酵解过程<sup>[43]</sup>。Chu 等<sup>[44]</sup>研究发现在 OSCC 细胞中 lncRNA ELF3-AS1 通过间接调控 GLUT1 表达来影响 OSCC 细胞对葡萄糖的摄取。除肿瘤细胞外,lncRNA 也可以调控癌

相关成纤维细胞(CAFs)的糖酵解,影响肿瘤进展。CAF 作为肿瘤微环境的重要组成部分,能够分泌能量代谢产物,为肿瘤进展提供能量。Yang 等<sup>[45]</sup>发现 lncRNA H19 通过 lncRNA H19/miR-675-5p/PFKFB3 轴促进口腔 CAFs 中的葡萄糖代谢,进而促进细胞增殖和迁移。

然而对于 lncRNA 在 OSCC 糖酵解中的具体作用机制,目前研究相对较少。因此,需要进一步深入研究 lncRNA 调节葡萄糖代谢的途径和机制,推进对癌症代谢复杂调控网络的理解,并为临床诊断和治疗提供更好的理论依据。

### 3.3 circRNA 在 OSCC 葡萄糖代谢中的调控作用

circRNA 呈封闭环状环结构,且高度稳定。常作为竞争性内源 RNA(ceRNA),通过内源性竞争作用“海绵吸附”miRNA,调控下游靶基因的表达水平。

circRNA 可以靶向 miRNA 介导 Warburg 效应进而调节肿瘤进展。例如 circRNA100290 在 OSCC 中充当 ceRNA,抑制 miR-378 表达,从而促进 GLUT1 表达,调节 OSCC 细胞糖酵解<sup>[46]</sup>。此外,circRNA 也可以介导 HK2 表达水平调节 OSCC 的糖酵解。Zhu 等<sup>[47]</sup>发现 miR-106a-5p 能够抑制 HK2 的表达来阻碍 OSCC 进程中的糖酵解,circRNA-PVT1 经海绵吸附作用直接吸附 miR-106a-5p,进而增加 HK2 的表达,促进 OSCC 细胞的糖酵解而发挥致癌作用。

有文献表明 OSCC 患者唾液中 hsa-circ-0001874 与 has-circ-0001971 的含量明显增高,此类在患者唾液样本中显著增高的 circRNA 可以作为诊断 OSCC 的有力证据<sup>[48]</sup>。由于 circRNA 的表达具有阶段特异性和稳定性,因此可以作为诊断靶点对患者进行快速无创的早期筛查、诊断。

## 4 展望

综上所述,有氧糖酵解表型是癌细胞代谢重编程的重要组成部分,一系列错综复杂的分子机制使得肿瘤细胞能够不受控制、持续生长并进行侵袭和转移。OSCC 发病率日渐增高的当下,现有成果表明 ncRNA 可能通过影响葡萄糖代谢的部分环节调控 OSCC 发展方向。目前一个亟待解决的问题是仍需大量研究明确 ncRNA 在 OSCC 细胞葡萄糖代谢中复杂的调控网络及各级调控机制。我们需要再进一步探寻更加全面的分子作用网络的基础上,结合其作用位置找寻新的治疗靶点,为临床 OSCC 诊断和治疗提供更多研究思路。

## 参考文献:

- [ 1 ] Ayaz B, Saleem K, Azim W, et al. A clinico-pathological study of oral cancers [J]. *Biomedica*, 2011, 27(1): 29–32.
- [ 2 ] Sharma BD, Gupta CK, Elhence BR, et al. Immunological status in patients of oral cancers. A clinico-pathological study [J]. *Indian J Cancer*, 1983, 20(3): 161–165.
- [ 3 ] Wang B, Zhang S, Yue K, et al. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(11): 614–618.
- [ 4 ] Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression [J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(7): 912–919.
- [ 5 ] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029–1033.
- [ 6 ] DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104(49): 19345–19350.
- [ 7 ] Shiraiishi T, Verdone JE, Huang J, et al. Glycolysis is the primary bioenergetic pathway for cell motility and cytoskeletal remodeling in human prostate and breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(1): 130–143.
- [ 8 ] Sukanuma N, Segade F, Matsuzaki K, et al. Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues [J]. *BJU Int*, 2007, 99(5): 1143–1149.
- [ 9 ] Grimm M, Cetindis M, Lehmann M, et al. Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis-indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1): 1–21.
- [ 10 ] Eckert AW, Lautner MHW, Taubert H, et al. Expression of Glut-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(6): 1381–1385.
- [ 11 ] Roh JL, Cho KJ, Kwon GY, et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(1): 63–68.
- [ 12 ] Kondo Y, Yoshikawa K, Omura Y, et al. Clinicopathological significance of carbonic anhydrase 9, glucose transporter-1, Ki-67 and p53 expression in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(5): 1227–1233.
- [ 13 ] Fukuzumi M, Hamakawa H, Onishi A, et al. Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2000, 161(2): 133–140.
- [ 14 ] Wang Y, Li Y, Jiang L, et al. Prognostic value of glycolysis markers in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(5): 7284–7299.
- [ 15 ] Chen G, Zhang Y, Liang J, et al. Deregulation of hexokinase II is associated with glycolysis, autophagy, and the epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma under hypoxia [J]. *BioMed Res Int*, 2018, 2018: 8480762.
- [ 16 ] Qu Z, Zhang R, Su M, et al. USP13 serves as a tumor suppressor via the PTEN/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 9175–9183.
- [ 17 ] Li HM, Yang JG, Liu ZJ, et al. Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 7.
- [ 18 ] Zhang Z, Deng X, Liu Y, et al. PKM2, function and expression and regulation [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9(1): 52.
- [ 19 ] Park YJ, Kim JY, Lee DY, et al. PKM2 enhances cancer invasion via ETS-1-dependent induction of matrix metalloproteinase in oral squamous cell carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216661.
- [ 20 ] Tanaka F, Yoshimoto S, Okamura K, et al. Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT and post-translationally repressing TGIF2 [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(73): 33745–33761.
- [ 21 ] Cai H, Li J, Zhang Y, et al. LDHA promotes oral squamous cell carcinoma progression through facilitating glycolysis and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 1446.
- [ 22 ] Grimm M, Alexander D, Munz A, et al. Increased LDH5 expression is associated with lymph node metastasis and outcome in oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(4): 529–540.
- [ 23 ] Suárez-Sánchez FJ, Lequerica-Fernández P, Suárez-Canto J, et al. Macrophages in oral carcinomas: relationship with cancer stem cell markers and PD-L1 expression [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(7): 1764.
- [ 24 ] Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(1): 61–72.
- [ 25 ] Caruntu A, Moraru L, Lupu M, et al. Prognostic potential of tumor-infiltrating immune cells in resectable oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2268.
- [ 26 ] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells [J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3812–3819.
- [ 27 ] Harmon C, Robinson MW, Hand F, et al. Lactate-mediated acidification of tumor microenvironment induces apoptosis of liver-resident NK cells in colorectal liver metastasis [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(2): 335–346.
- [ 28 ] Lee SY, Jeon HM, Ju MK, et al. Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(14): 3607–3617.
- [ 29 ] Ünal ÖF, Ayhan A, Hosal AS. Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue [J]. *J Laryngol Otol*, 1999, 113(5): 446–450.
- [ 30 ] Du W, Amarachintha S, Wilson AF, et al. SCO<sub>2</sub> mediates oxidative stress-induced glycolysis to oxidative phosphorylation

- switch in hematopoietic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(4): 960-971.
- [31] Jiang S, Zhang LF, Zhang HW, et al. A novel miR-155/miR-143 cascade controls glycolysis by regulating hexokinase 2 in breast cancer cells [J]. *EMBO J*, 2012, 31(8): 1985-1998.
- [32] Cheng Z, Luo C, Guo Z. LncRNA-XIST/microRNA-126 sponge mediates cell proliferation and glucose metabolism through the IRS1/PI3K/Akt pathway in glioma [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(3): 2170-2183.
- [33] Xu P, Li Y, Zhang H, et al. MicroRNA-340 mediates metabolic shift in oral squamous cell carcinoma by targeting glucose transporter-1 [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 74(4): 844-850.
- [34] Xu XJ, Yuan J, Sun WJ, et al. Inhibition of microRNA-218 promotes oral squamous cell carcinoma growth by targeting GLUT1 to affect glucose metabolism [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(22): 7726-7734.
- [35] Chen YH, Song Y, Yu YL, et al. MiRNA-10a promotes cancer cell proliferation in oral squamous cell carcinoma by upregulating GLUT1 and promoting glucose metabolism [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6): 5441-5446.
- [36] Sun X, Zhang L. MicroRNA-143 suppresses oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion and glucose metabolism through targeting hexokinase 2 [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(3): BSR20160404.
- [37] Zheng Z, Ma X, Li H. Circular RNA circMDM2 accelerates the glycolysis of oral squamous cell carcinoma by targeting miR-532-3p/HK2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7531-7537.
- [38] Yan Y, Yan F, Huang Q. MiR-200c inhibited the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by targeting Akt pathway and its downstream Glut1 [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 96: 52-57.
- [39] Fan C, Tang Y, Wang J, et al. Role of long non-coding RNAs in glucose metabolism in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 130.
- [40] Pentenero M, Bowers L, Jayasinghe R, et al. World workshop on oral medicine VII: Functional pathways involving differentially expressed lncRNAs in oral squamous cell carcinoma [J]. *Oral Dis*, 2019, 25: 79-87.
- [41] Pentenero M, Bowers LM, Jayasinghe R, et al. World workshop on oral medicine VII: clinical evidence of differential expression of lncRNAs in oral squamous cell carcinoma: a scoping review [J]. *Oral Dis*, 2019, 25: 88-101.
- [42] Wang Y, Zhang X, Wang Z, et al. LncRNA-p23154 promotes the invasion-metastasis potential of oral squamous cell carcinoma by regulating Glut1-mediated glycolysis [J]. *Cancer Lett*, 2018, 434: 172-183.
- [43] 李媛媛, 程斌, 王韵. 长链非编码 RNA lnc-p26090 对口腔鳞状细胞癌细胞糖酵解及增殖的影响 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2018, 45(6): 628-634.
- [44] Chu H, Li Z, Gan Z, et al. LncRNA ELF3-AS1 is involved in the regulation of oral squamous cell carcinoma cell proliferation by reprogramming glucose metabolism [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6857-6863.
- [45] Yang J, Shi X, Yang M, et al. Glycolysis reprogramming in cancer-associated fibroblasts promotes the growth of oral cancer through the lncRNA H19/miR-675-5p/PFKFB3 signaling pathway [J]. *Int J Oral Sci*, 2021, 13(1): 12.
- [46] Chen X, Yu J, Tian H, et al. Circle RNA hsa\_circRNA\_100290 serves as a ceRNA for miR-378a to regulate oral squamous cell carcinoma cells growth via Glucose transporter-1 (GLUT1) and glycolysis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 19130-19140.
- [47] Zhu X, Du J, Gu Z. Circ-PVT1/miR-106a-5p/HK2 axis regulates cell growth, metastasis and glycolytic metabolism of oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 474(1): 147-158.
- [48] Zhao SY, Wang J, Ouyang SB, et al. Salivary circular RNAs hsa\_circ\_0001874 and hsa\_circ\_0001971 as novel biomarkers for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(6): 2511-2521.

[收稿日期]2021-09-08

吕莎, 叶子芯, 陈欢, 等. 白三烯在动脉粥样硬化形成及治疗中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 98-104.

Lyu S, Ye ZX, Chen H, et al. Roles of leukotriene in pathogenesis and treatment of atherosclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 98-104.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.014

## 白三烯在动脉粥样硬化形成及治疗中的作用

吕莎<sup>1,2</sup>, 叶子芯<sup>1,3</sup>, 陈欢<sup>4</sup>, 杨树龙<sup>5\*</sup>, 洪芬芳<sup>1\*</sup>

(1.南昌大学基础医学院病原生物学实验中心,南昌 330000;2.南昌大学第一附属医院呼吸内科,南昌 330000;  
3.南昌大学第一附属医院神经内科,南昌 330000;4.桂林医学院附属医院神经内科,广西 桂林 541000;  
5.南昌大学抚州医学院生理教研室,江西 抚州 344000)

**【摘要】** 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是常见的心血管疾病,能引起严重的并发症,是导致病人死亡最常见的病因之一。炎症反应是动脉粥样硬化的发病机制之一,而白三烯(leukotrienes, LTs)是重要的炎症介质,在炎症信号通路中具有免疫调节和促炎作用。白三烯与动脉粥样硬化密切相关。白三烯的产生主要通过5-脂氧合酶和环氧合酶产生。白三烯B4(leukotrienes B4, LTB4)、半胱氨酸-白三烯(cysteinyl leukotrienes, CysLTs)等通过诱导中性粒细胞聚集,增强内皮细胞通透性,介导血管平滑肌细胞核钙信号转导,促进动脉粥样硬化的形成。一些与动脉粥样硬化有关的疾病,如阻塞性睡眠呼吸暂停的夜间间歇性低氧显著增加了白三烯B4的产生及5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)的表达;糖尿病患者基质金属蛋白酶明显增加,可促进5-脂氧合酶和白三烯B4表达。本文论述了白三烯及其代谢途径中相关物质、产生白三烯相关疾病与动脉粥样硬化的关系,提出了抑制白三烯受体、5-脂氧合酶途径和白三烯A4水解酶等新的治疗动脉粥样硬化的策略。

**【关键词】** 白三烯;炎症;动脉粥样硬化;5-脂氧合酶;白三烯受体拮抗剂

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0098-07

## Roles of leukotriene in pathogenesis and treatment of atherosclerosis

LYU Sha<sup>1,2</sup>, YE Zixin<sup>1,3</sup>, CHEN Huan<sup>4</sup>, YANG Shulong<sup>5\*</sup>, HONG Fenfang<sup>1\*</sup>

(1. Pathogen Biology Experimental Center, College of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330000, China.  
2. Respiratory Medicine Department, First affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000.  
3. Neurology Department, First affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000.  
4. Neurology Department, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541000. 5. Department of Physiology, Fuzhou Medical Couage, Nanchang University, Fuzhou 344000)

**【Abstract】** Atherosclerosis (AS) is a common cardiovascular disease that can cause serious complications and is one of the most common causes of patient death. The inflammatory response is involved in the pathogenesis of atherosclerosis and leukotrienes (LTs) are important inflammatory mediators that play immunomodulatory and proinflammatory roles in the inflammatory signaling pathway. Leukotrienes are closely related to atherosclerosis. Leukotriene B4 (LTB4), cysteinyl leukotrienes, and the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway trigger a plaque formation disorder that promotes AS by inducing neutrophil aggregation, enhancing endothelial cell permeability, and mediating nuclear calcium signal transduction in

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81660751,81660151,82060661);江西省自然科学基金项目(20212BAB206092)。

**【作者简介】** 吕莎(1994—),女,硕士研究生,研究方向:医学研究。E-mail: 527675466@qq.com

**【通信作者】** 洪芬芳(1974—),女,高级实验师,研究方向:炎症药理学。E-mail: hongfenfang@126.com

杨树龙(1966—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:炎症药理学。E-mail: shulongyang@qq.com

\* 共同通信作者

vascular smooth muscle. Additionally, obstructive sleep apnea (OSA) and diabetes that produce LTs are associated with AS. Intermittent hypoxia in patients with OSA increases production of LTB<sub>4</sub> and expression of 5-lipoxygenase. Increased matrix metalloproteinases in diabetic patients promote expression of 5-LOX and LTB<sub>4</sub>. This article discussed the current research on the roles of LTs and related substances in the metabolic pathway in the pathogenesis of atherosclerosis and its treatment. Thus, some new treatment strategies aimed at LTs for anti-AS effects have been proposed, which include inhibition of LT receptors, the 5-LOX pathway and LTA<sub>4</sub> hydrolytic enzyme.

**【Keywords】** leukotrienes; inflammation; atherosclerosis; 5-lipoxygenase; leukotriene receptor antagonist

心血管疾病仍然是全世界死亡的主要原因。动脉粥样硬化性心脏病是最大的原因。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的机制的研究进展仍然是科学的焦点。免疫失调和炎症是导致 AS 斑块的形成及冠状动脉综合征急性进展的重要原因<sup>[1]</sup>。白三烯(leukotrienes, LTs)是具有免疫调节和促进炎症反应的重要脂质介质,在多种慢性炎症性疾病,如哮喘、AS 等疾病中的作用起关键作用<sup>[2]</sup>。LTs 通过介导免疫细胞的招募和激活及平滑肌细胞增值和内皮功能障碍来调节 AS 斑块炎症的免疫反应<sup>[3]</sup>。研究白三烯与 AS 形成中的作用,对 AS 的治疗有重要作用。

## 1 白三烯的合成及生理作用

LTs 是花生四烯酸在白细胞中代谢产物分离得到的具有共轭三烯结构的二十碳不饱和酸。可按取代基性质分为 A、B、C、D、E、F 6 类<sup>[4]</sup>。前体白三烯以花生四烯酸(arachidonic acid, AA)为原料,在 5-脂氧合酶激活蛋白(5-lipoxygenase-activating protein, FLAP)(一种核跨膜蛋白,能有效地将花生四烯酸转移到 5-脂氧合酶)的帮助下,经 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)催化合成了 LTs<sup>[2]</sup>。LTs 通过介导免疫细胞的招募和激活以及平滑肌细胞增殖和内皮功能障碍来调节 AS 斑块炎症的免疫反应。LTs 的生物作用包括趋化性、内皮粘附和白细胞活化、趋化因子的产生以及微循环和呼吸道平滑肌的收缩;当 LTs 过量时,将起到致病作用<sup>[4]</sup>。

白三烯 B<sub>4</sub>(leukotrienes B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>)诱导多种促炎蛋白的过度表达,通过 LTB<sub>4</sub> 受体(BLT1)促进趋化和泡沫细胞形成<sup>[5]</sup>。LTB<sub>4</sub> 能间接引起血管收缩,通过激活主动脉内皮细胞的白三烯受体,刺激收缩因子和一氧化氮的释放,诱导内皮依赖性血管收缩<sup>[6]</sup>,从而促进 AS。此外,LTB<sub>4</sub> 可增加组胺和血栓素的释放,使 BLT-1 受体表达增强,BLT-1 受体 mRNA 表达上调,从而促进 AS<sup>[7]</sup>。LTB<sub>4</sub> 通过 BLT1-TAK1-P38 信号通路抑制 L 型钙通道,这可能

与 AS 等病理过程有关<sup>[8]</sup>。

半胱氨酰白三烯(LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub> 和 LTE<sub>4</sub>)能增强内皮细胞通透性和心肌收缩性,并参与许多其他炎症状态<sup>[9]</sup>。半胱氨酰白三烯通过核周 CysLT-1 受体介导血管平滑肌细胞核钙信号转导和基因表达的改变。在人冠状动脉平滑肌细胞中,脂多糖显著上调 CysLT-1 受体,并显著增强 LTC<sub>4</sub> 诱导的细胞内钙的变化<sup>[10]</sup>。

LTs 在许多炎症过程的信号通路中是具有免疫调节和促炎作用的重要脂质介质<sup>[4]</sup>,本文主要介绍 LTs 对 AS 进程的影响。

## 2 白三烯与动脉粥样硬化

### 2.1 5-脂氧合酶途径与动脉粥样硬化

5-LOX 是 LTs 生物合成的关键酶,含有对亲电修饰敏感的关键亲核氨基酸<sup>[11]</sup>,是一种含有非血红素结合的铁中心离子,与 FLAP 在催化配合物中生成 5-氢过氧化物-二十碳四烯酸<sup>[12]</sup>。已有研究表明 5-LOX/LT 通路能增加白细胞趋化性、血管炎症和增强通透性来促进 AS<sup>[13]</sup>。5-LOX 通路在 AS 和再狭窄的发病机制中起着重要作用。通过激活症状性斑块中的巨噬细胞来表达 5-LOX,导致 LTB<sub>4</sub> 积累,并促进基质金属蛋白酶的合成和释放,从而促进斑块破裂<sup>[14]</sup>。

数据表明,5-LOX 途径来源的 LTs 通过激活 ERK 和 p38 MAPK 通路介导 4-羟基壬醛(4-hydroxynonanal, HNE)诱导的基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)生成,从而导致 AS 斑块不稳定<sup>[15]</sup>。在 AS 病变的巨噬细胞中,HNE 和 5-LOX 水平过高,激活的巨噬细胞产生降解 AS 斑块成分的 MMP-9,从而促进斑块破裂。通过 LTB<sub>4</sub> 的产生,用 HNE 刺激 J774A.1 细胞进而激活 5-LOX。LTB<sub>4</sub> 和 CysLTs 增强了巨噬细胞中 MMP-9 的产生,提示 5-LOX 在 HNE 介导的 MMP-9 产生中起关键作用。在 MAPK 通路中,LTB<sub>4</sub> 和 CysLT 增强了 ERK 和 p38 MAPK 的磷酸化。P38 MAPK 抑

制剂和 ERK 抑制剂共同抑制了由 LT 诱导的 MMP-9 的产生<sup>[15]</sup>。

鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)参与重要细胞的调控过程,包括免疫细胞的运输和增殖。S1P 信号的变异与炎症、癌症进展和动脉粥样硬化有很强关系。S1P 能诱导 S1P 受体介导体外和体内的有效抗炎作用,抑制 5-LO 活性,从而抑制 AS。在 Ca<sup>2+</sup>离子激发人中性粒细胞中,S1P 能有效抑制 LTs 的生物合成<sup>[16]</sup>。

## 2.2 白三烯 B4 与动脉粥样硬化

在培养的单核细胞中,LTB4 通过 BLT1 和 BLT2 诱导有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPKs、ERK1/2 和 JNK1/2)和 PI3K/AKT 的快速磷酸化以及在 MAPK 和活性氧依赖机制中增加核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)DNA 结合活性<sup>[17]</sup>。NF- $\kappa$ B 的激活可使 LTB4 诱导人单核细胞产生单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),增强 MCP-1 的表达<sup>[18]</sup>。MCP-1 激活嗜碱细胞,在嗜碱性粒细胞和单核细胞中引起细胞溶质游离钙水平升高,在低浓度下触发嗜碱性粒细胞脱粒,释放组胺<sup>[19]</sup>,从而促进 AS。LTB4 通过 NF- $\kappa$ B 机制中 BLT1 和 BLT2,诱导白细胞介素-6、单核细胞趋化蛋白-1 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  mRNA 的过度表达,从而促进炎症环境<sup>[17]</sup>。白三烯 B4 还通过 NF- $\kappa$ B 依赖的 BLT1 受体在动脉粥样硬化和内膜增生的血管平滑肌细胞上进行信号传导<sup>[20]</sup>,诱导其趋化和增殖。在血管损伤反应中抑制 LTB4/BLT1 信号,可减少内膜增生,提示 LTB4/BLT1 信号通路可能是治疗 AS 的靶点<sup>[20]</sup>。LTB4 通过趋化单核细胞以及通过增强 CD36 的表达和脂肪酸的积累将单核细胞转化为泡沫细胞,来促进 AS<sup>[21]</sup>。

## 2.3 半胱氨酸-白三烯(cysteinyl leukotrienes, CysLTs)(LTC4、LTD4 和 LTE4)与动脉粥样硬化

CysLTs 是由活化的白细胞或跨细胞代谢产生的,在炎症或 AS 过程中可能在不同程度上作用于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)。在培养大鼠的 VSMC 中 LTC4 和 LTD4 对 VSMC 增殖有调节作用。VSMC 增殖的增加与 LTD4 刺激所伴随的 IL-1 的自分泌有关。这些结果可能为 AS 形成过程中炎症参与的机制提供了新的线索,提示 CysLTs 的控制可能在涉及 IL-1 的炎症过程中起重要作用<sup>[22]</sup>。LTC4 或 LTD4 刺激的内皮细胞合成和保留的血小板活化因子可能诱导以前未受

刺激的 PMNs 粘附。这一过程可能与炎症、血栓形成和血管损伤的机制有关,包括 AS<sup>[23]</sup>。半胱氨酸白三烯受体(CysLT-1 和 CysLT-2)识别 LTC4、LTD4、LTE4 和 LTF4<sup>[24]</sup>。CysLTs 诱导早期生长反应基因 1、2、3 和环氧化酶-2 的 mRNA 和蛋白表达,从而刺激内皮细胞。这种反应由 CysLTR2 与 G(Q/11)的偶联,磷脂酶-C 和肌醇-1,4,5-三磷酸的激活所调解,通过 IFN- $\gamma$  刺激可诱导 CysLTR2 的表达,增强 CysLTs 诱导的炎症反应<sup>[25]</sup>。CysLTs 信号转导可通过 cysLT-1 受体和 IL-4 协同作用促进人单核细胞 CCL 2 的产生而参与炎症反应<sup>[26]</sup>。LTD4 诱导大鼠血管平滑肌细胞 IL-1 $\beta$  表达和释放<sup>[27-28]</sup>。IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子的过量产生可引起 AS<sup>[29]</sup>。

## 2.4 其他影响 LTs 的因素与 AS

### 2.4.1 氧化心磷脂(oxidized cardiolipin)

氧化心磷脂(oxidized cardiolipin, oxCL)具有促炎作用,可通过激活内皮细胞,增加单核细胞/巨噬细胞和中性粒细胞中钙的细胞内浓度,选择性地增强巨噬细胞中 5-LOX 的基因表达,诱导 LTB4 的生物合成,从而促进 AS。此外,oxCL 可提高内皮细胞中粘附分子细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 的水平。膜联蛋白 A5(一种抗血栓和抗炎血浆蛋白,有动脉保护作用)可以通过结合 oxCL 来消除其诱导作用<sup>[30]</sup>。此外,膜联蛋白 A5 还可以通过抑制溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)的促炎作用而发挥抑制 AS 的作用。LPC 是氧化型低密度脂蛋白的主要生物活性脂类成分<sup>[30]</sup>,在炎症细胞和内皮细胞中能产生许多炎症效应<sup>[31]</sup>,能诱导人冠状动脉平滑肌细胞炎症激活,而炎症诱导血管平滑肌细胞从收缩型转化为增殖/分泌型是 AS 形成特征的血管重构的标志。LPC 通过刺激花生四烯酸代谢物 LTB4、6-酮-前列腺素 F1 $\alpha$ 、碱性成纤维细胞生长因子以及刺激细胞因子 GM-CSF、IL-6 和 IL-8 的释放发挥促炎作用<sup>[31]</sup>。膜联蛋白 A5 可通过减少 OxLDL 和 LPC 的促炎作用,以及抑制 OxLDL 的结合和巨噬细胞的摄取在 AS 及其斑块破裂中发挥重要的保护作用<sup>[32]</sup>。

### 2.4.2 $\omega$ -3 脂肪酸(omega-3 fatty acids)

流行病学研究表明, $\omega$ -3 脂肪酸可降低心血管死亡率和冠心病发病率。 $\omega$ -3 脂肪酸在预防 AS 方面有许多有益的作用:降低血压,改善脂蛋白代谢,改善止血(增加出血时间和减少血小板聚集),降低血浆纤维蛋白原,改善花生四烯酸及其衍生物的代

谢降低血栓素和 LTs 的合成,增加前列环素的合成<sup>[33]</sup>。Bäck 等<sup>[34]</sup>通过  $\omega$ -3 脂肪酸二十碳五烯酸 ( $\omega$ -3 fatty acid eicosapentaenoic acid, EPA) 干预实验表明 EPA 的乙酯形式,能显著减少心血管疾病。重要的是,EPA 其能刺激炎症的消退。 $\omega$ -3 脂肪酸能在炎症反应前和 AS 发生前能降低 LTs 的水平,导致有益的炎症平衡。 $\omega$ -3 衍生的促分解介质和促炎症脂质介质已被证明可以预测亚临床 AS<sup>[35]</sup>。

#### 2.4.3 $\alpha$ -生育酚/混合生育酚

低水平的  $\alpha$ -生育酚与 AS 的发生率增加有关,高水平的  $\alpha$ -生育酚能预防 AS。 $\alpha$ -生育酚补充后可减少人单核细胞中白细胞介素-1 和白细胞介素-6 的释放,并且  $\alpha$ -生育酚通过抑制 5-LOX 抑制活化的人单核细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达。Devaraj 等<sup>[36]</sup>发现,添加  $\alpha$ -生育酚后,单核细胞超氧阴离子释放、脂质氧化、IL-1 $\beta$  释放及与内皮的粘附均显著降低。LTB4 是 5-LOX 的主要产物,它能增加 IL-1 $\beta$  的释放。在  $\alpha$ -生育酚存在下,LTB4 和 IL-1 $\beta$  水平明显降低;在环氧化酶抑制剂吲哚美辛存在下, $\alpha$ -生育酚抑制 IL-1 $\beta$  活性, $\alpha$ -生育酚对 IL-1 $\beta$  mRNA 水平和稳定性均无影响。 $\alpha$ -生育酚通过抑制 5-LOX 抑制活化的人单核细胞中 IL-1 $\beta$  的释放。

### 3 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征、糖尿病与动脉粥样硬化

#### 3.1 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSA)

LTB4 是涉及在 AS 形成中的脂质介质。Lefebvre 等<sup>[37]</sup>研究了持续气道正压对 LTB4 产生的影响,实验结果表明持续气道正压显著降低了 50% 的 LTB4,阻塞性睡眠呼吸暂停时 LTB4 的产生与氧饱和度有关,LTB4 可促进中度至重度低氧性阻塞性睡眠呼吸暂停患者早期血管重塑<sup>[38]</sup>。

OSA 患者出现早期 AS 和 LTs 途径的激活。在 OSA 患者中,白三烯的产生与 OSA 的严重程度有关,免疫细胞在间歇性低氧下的体外暴露增加了 LTs 途径转录。此外,LTs 途径相关的转录与早期的血管重塑相关<sup>[39]</sup>。

OSA 患者 LTB4 的产生增加,并与早期血管重构有关,其机制尚不清楚。Stanke-Labesque 等<sup>[39]</sup>通过实验测定多形核细胞中 LTB4 通路激活机制和 OSA 早期血管重构及间歇性低氧的特殊作用。研究表明 OSA 患者的 PMN 中 LTB4 生成增加,5-LOX

激活蛋白的 mRNA 和蛋白显著增加,并与颈动脉管腔直径和内膜中层厚度相关。在 OSA 患者单核细胞中,LTB4 (10 ng/mL) 增加 IL-6 ( $P=0.006$ ) 和 MCP-1 ( $P=0.002$ ) 的产生。在对照组中,体外暴露于间歇性低氧环境中的多形核细胞可增强 FLAP 的 mRNA 水平 ( $P=0.027$ ),与暴露于常氧状态的多形核细胞相比,LTB4 的分泌增加 2.7 倍 ( $P=0.028$ )。综上所述,多形核细胞中对间歇性低氧的上调可能参与 OSA 患者的早期血管重构,提示 FLAP 可能是治疗 OSA 相关的心血管疾病的潜在靶点<sup>[40]</sup>。

#### 3.2 糖尿病

糖尿病患者 AS 病变中,5-LOX/LTB4 途径表达的增加,导致斑块不稳定。5-LOX 在糖尿病患者中的表达高于非糖尿病性斑块,与 MMP-2 和 MMP-9 的表达增加有关。酶谱分析显示,与非糖尿病斑块相比,糖尿病患者 MMP 活性明显升高<sup>[14]</sup>。糖尿病中,5-LOX 和 LTB4 在 AS 斑块中的过度表达可能促进 MMP 诱导的斑块破裂<sup>[14]</sup>。LTS 是与内皮依赖性舒张相关的炎性和血管活性介质,尿白三烯 E4 与 2 型糖尿病患者的肾功能相关,在糖尿病和急性冠状动脉综合征中尿白三烯 E4 也有所增加<sup>[40]</sup>。

### 4 白三烯与动脉粥样硬化的防治

#### 4.1 LTB4 受体 (BLT1 和 BLT2) 拮抗剂

LTB4 是花生四烯酸经 5-LOX 代谢的白细胞趋化因子,也是中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和 T 淋巴细胞的有效趋化因子<sup>[41]</sup>。它通过特定的细胞表面受体 BLT1 和 BLT2 发挥作用<sup>[42]</sup>。BLT1 和 BLT2,分别代表高亲和力受体和低亲和力受体<sup>[43]</sup>在人颈 AS 斑块中实验结果表明,LTB4 激活血管平滑肌细胞上功能性的 BLT1 受体,诱导其趋化和增殖。BLT1 受体通过 I $\kappa$  激酶  $\beta$ /NF- $\kappa$ B 依赖性途径上调。在血管损伤反应中可抑制 LTB4/BLT1 信号来减少内膜增生<sup>[43]</sup>。在不同的小鼠模型中,刺激高亲和力 LTB4 受体 (BLT1) 有利于降低 AS<sup>[44]</sup>。BLT1 在关节炎、AS 和哮喘中的重要作用<sup>[45]</sup>。BLT2 受体可转导促 AS 信号<sup>[44]</sup>。此外,在 Bil284 (3 mg/kg) 治疗 24 周的小鼠中观察到明显较小的主动脉病变。减少的 AS 与病变较少的平滑肌细胞、较低的动脉 MMP 活性和较低的血浆 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平有关<sup>[44]</sup>。同时,LTB4 受体阻断剂通过抑制单核细胞聚集而延缓 AS 进展的假说被验证,LTB4 还是一种有效的趋化剂,通过 LTB4 受体激活单核细胞<sup>[41]</sup>。综上所述,提

示 LTB<sub>4</sub> 受体拮抗剂对 AS 的治疗有重要价值。

#### 4.2 CysLT 受体拮抗剂

CysLTs 是花生四烯酸通过 5-赖氨酸途径产生的强有力的促炎介质。它们通过与 2 种不同受体 (例如 CysLT1 和 CysLT2) 的相互作用发挥重要的药理作用。Hoxha 等<sup>[42]</sup>通过对两种活体动物以及人类研究进行了系统的回顾以确定白三烯受体拮抗剂可阻断 CysLTs 的作用,可能在某些方面减少心血管疾病<sup>[43]</sup>,减轻许多慢性疾病的症状。扎鲁司特, CysLT 受体 (CysLT1R) 选择性拮抗剂,能从 TNF- $\alpha$  诱导的炎症反应和损伤中对内皮细胞起保护作用,并且扎鲁司特通过抑制 MAPK 激酶 p38 和 NF- $\kappa$ B 的激活抑制炎症介质的产生<sup>[43]</sup>。

#### 4.3 白三烯 A4 水解酶 (leukotriene A4 hydrolase, LTA4H) 抑制剂

LTA4H 是一种广泛分布的  $69 \times 10^3$  含锌细胞溶质酶,具有水解酶和氨基肽酶活性<sup>[44]</sup>。LTA4H 催化不稳定的环氧化物 LTA<sub>4</sub> 转化为二醇 LTB<sub>4</sub>, 二醇 LTB<sub>4</sub> 是一种有效的趋化剂和中性粒细胞激活剂,以及嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞和 T 细胞的化学吸引剂。抑制 LTB<sub>4</sub> 的形成有望有助于治疗炎症性疾病和 AS<sup>[44]</sup>。LTA4H 与斑块不稳定性的相关性表明实验中,LTB<sub>4</sub> 生物合成中的 3 种关键蛋白 (5-LOX、FLAP 和 LTA4H) 的 mRNA 水平显著升高。斑块不稳定症状的患者中,LTA4H 的表达增加<sup>[45]</sup>。LTB<sub>4</sub> 积累,并促进 MMP 的合成和释放,从而促进斑块破裂。人体病变组织会将花生四烯酸转化为大量的 LTB<sub>4</sub>,而 LTA4H 抑制剂可以阻断这种活性。LTs 通路的研究表明,LTs 通路可调节 AS 过程<sup>[46]</sup>。

#### 4.4 5-LOX 抑制剂

花生四烯酸的代谢可以由两个酶家族 (环氧合酶或脂氧合酶) 催化。脂氧合酶可分为 5-、12-和 15-脂氧合酶等几个亚类<sup>[47]</sup>。LTs 是由花生四烯酸产生的,通过 FLAP 催化产生,其中 FLAP,作为一种调节蛋白的运作有效地将花生四烯酸转化为 5-LOX<sup>[1]</sup>。VIA-2291 是一种有效的 5-LOX 抑制剂。在一项双盲研究中表明,LTs 生成减少能影响 AS<sup>[48]</sup>。在 S1P 治疗 AS 中,S1P 诱导 S1P 受体 4 介导的体外和体内有效抗炎作用,并抑制 5-LOX 活性<sup>[16]</sup>。抑制 5-LOX 和 COX 对 AS 病变有抗炎作用<sup>[49]</sup>。

#### 4.5 其他 (他汀类药物)

他汀类药物对 AS 患者的免疫和抗炎反应具有

非胆固醇依赖性的多效性<sup>[50]</sup>。他汀类药物最初是为低密度脂蛋白开发,能降胆固醇,但现在被认为通过抗炎作用改善心血管发病率和死亡率,抑制导致 AS<sup>[51]</sup>。在 APOE 基因敲除小鼠的对照实验中,阿托伐他汀通过抑制 5-LOX 通路和下调 APOE<sup>-/-</sup> 小鼠 CCL3 的表达,显著减轻 AS 病变<sup>[50]</sup>。用阿托伐他汀治疗家兔颈动脉球囊扩张伤的实验中也表明,阿托伐他汀通过调节家兔 5-LOX 途径稳定颈动脉 AS 斑块,通过抗炎作用延缓 AS 进程<sup>[52]</sup>。

## 5 问题与展望

AS 病因与发病机制复杂,关于 LTs 与 AS 的形成与进展之间的密切关系,国内外的研究日益增多,LTs 是一种强有力的诱导剂和细胞趋附剂,能与其受体结合发挥趋化作用,诱发炎症反应,参与多种疾病病理过程;与 LTs 有关的炎症通路将成为阻断与 AS 有关的炎症发展一个重要靶靶。白三烯在 AS 发生过程中的作用已经通过一系列研究证实其在 AS 中的作用机制也通过白三烯拮抗剂的研究得到阐述。但这种药物作用与临床治疗心血管疾病的进程,还需要进一步挖掘白三烯拮抗剂对心血管各类疾病的预防和治疗的潜在价值。

#### 参考文献:

- [1] Gur ZT, Caliskan B, Banoglu E. Drug discovery approaches targeting 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) for inhibition of cellular leukotriene biosynthesis [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 153: 34-48.
- [2] Schexnaydre EE, Gerstmeier J, Garscha U, et al. A 5lipoxygenase-specific sequence motif impedes enzyme activity and confers dependence on a partner protein [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(4): 543-551.
- [3] Khambhati J, Engels M, Allard-Ratick M, et al. Immunotherapy for the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: Promise and possibilities [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 1-9.
- [4] Di Gennaro A, Haeggstrom JZ. The leukotrienes: immunomodulating lipid mediators of disease [J]. *Adv Immunol*, 2012, 116: 51-92.
- [5] Hoyer FF, Albrecht L, Nickenig G, et al. Selective inhibition of leukotriene receptor BLT-2 reduces vascular oxidative stress and improves endothelial function in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 359(1-2): 25-31.
- [6] Back M, Sakata K, Qiu H, et al. Endothelium-dependent vascular responses induced by leukotriene B<sub>4</sub> [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007, 83(3): 209-212.
- [7] Back M, Qiu H, Haeggstrom JZ, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> is an

- indirectly acting vasoconstrictor in guinea pig aorta via an inducible type of BLT receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(1): 419–424.
- [ 8 ] Liu X, Yang T, Miao L, et al. Leukotriene B4 inhibits l-type calcium channels via p38 signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(5): 1903–1913.
- [ 9 ] Hoxha M, Rovati GE, Cavanillas AB. The leukotriene receptor antagonist montelukast and its possible role in the cardiovascular field [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2017, 73(7): 799–809.
- [10] Eaton A, Nagy E, Pacault M, et al. Cysteinyl leukotriene signaling through perinuclear CysLT(1) receptors on vascular smooth muscle cells transduces nuclear calcium signaling and alterations of gene expression [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(10): 1223–1231.
- [11] Roos J, Peters M, Maucher IV, et al. Drug-mediated intracellular donation of nitric oxide potently inhibits 5-lipoxygenase; a possible key to future antileukotriene therapy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(14): 1265–1285.
- [12] Peter H, Lydia B. Modulation of leukotriene pathway-potential targets [J]. *Ceska Slov Farm*, 2012, 61(3): 101–106.
- [13] Poeckel D, Funk CD. The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 243–253.
- [14] Zhou YJ, Wang JH, Li L, et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway in atherosclerotic lesions of diabetic patients promotes plaque instability [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(1): 30–36.
- [15] Lee SJ, Kim CE, Yun MR, et al. 4-Hydroxynonenal enhances MMP-9 production in murine macrophages via 5-lipoxygenase-mediated activation of ERK and p38 MAPK [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242(2): 191–198.
- [16] Fettel J, Kuhn B, Guillen NA, et al. Sphingosine-1-phosphate (S1P) induces potent anti-inflammatory effects *in vitro* and *in vivo* by S1P receptor 4-mediated suppression of 5-lipoxygenase activity [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1711–1726.
- [17] Sanchez-Galan E, Gomez-Hernandez A, Vidal C, et al. Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor- $\kappa$ B pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(1): 216–225.
- [18] Huang L, Zhao A, Wong F, et al. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(10): 1783–1788.
- [19] Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, et al. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(5): 1271–1275.
- [20] Back M, Bu DX, Branstrom R, et al. Leukotriene B4 signaling through NF- $\kappa$ B-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(48): 17501–17506.
- [21] Subbarao K, Jala VR, Mathis S, et al. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanisms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 369–375.
- [22] Porreca E, Di Febbo C, Reale M, et al. Modulation of rat vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation by cysteinyl leukotriene D4: a role for mediation of interleukin 1 [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 113(1): 11–18.
- [23] McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(7): 2204–2208.
- [24] Rubin P, Mollison KW. Pharmacotherapy of diseases mediated by 5-lipoxygenase pathway eicosanoids [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007, 83(3): 188–197.
- [25] Woszczek G, Chen LY, Nagineni S, et al. IFN- $\gamma$  induces cysteinyl leukotriene receptor 2 expression and enhances the responsiveness of human endothelial cells to cysteinyl leukotrienes [J]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 5262–5270.
- [26] Woszczek G, Pawliczak R, Qi HY, et al. Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure [J]. *J Immunol*, 2005, 175(8): 5152–5159.
- [27] Porreca E, Conti P, Feliciani C, et al. Cysteinyl-leukotriene D4 induced IL-1 beta expression and release in rat vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 115(2): 181–189.
- [28] Choi JH, Jeon HJ, Park JG, et al. Anti-atherogenic effect of BHB-TZD having inhibitory activities on cyclooxygenase and 5-lipoxygenase in hyperlipidemic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 212(1): 146–152.
- [29] Nazemian F, Karimi G, Moatamedi M, et al. Effect of silymarin administration on TNF- $\alpha$  serum concentration in peritoneal dialysis patients [J]. *Phyther Res*, 2010, 24(11): 1654–1657.
- [30] Wan M, Hua X, Su J, et al. Oxidized but not native cardiolipin has pro-inflammatory effects, which are inhibited by Annexin A5 [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 235(2): 592–598.
- [31] Aiyar N, Disa J, Ao Z, et al. Lysophosphatidylcholine induces inflammatory activation of human coronary artery smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 295(1–2): 113–120.
- [32] Domeij H, Hua X, Su J, et al. Annexin A5 inhibits atherogenic and pro-inflammatory effects of lysophosphatidylcholine [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2013, 106: 72–78.
- [33] d'Ivernois C, Couffignal T, Le Metayer P, et al. Potential value of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of atherosclerosis and cardiovascular diseases [J]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1992, 85(6): 899–904.
- [34] Bäck M, Hansson GK. Omega-3 fatty acids, cardiovascular risk, and the resolution of inflammation [J]. *FASEB J*, 2019, 33(2): 1536–1539.
- [35] Back M. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease [J]. *Future Sci OA*, 2017, 3(4): FSO236.
- [36] Devaraj S, Jialal I. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-

- lipoygenase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(4): 1125-1133.
- [37] Lefebvre B, Pepin JL, Baguet JP, et al. Leukotriene B<sub>4</sub>: early mediator of atherosclerosis in obstructive sleep apnoea? [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(1): 113-120.
- [38] Stanke-Labesque F, Pepin JL, Gautier-Veyret E, et al. Leukotrienes as a molecular link between obstructive sleep apnoea and atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 101(2): 187-193.
- [39] Stanke-Labesque F, Pepin JL, de Jouvencel T, et al. Leukotriene B<sub>4</sub> pathway activation and atherosclerosis in obstructive sleep apnea [J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(9): 1944-1951.
- [40] Rafnsson A, Back M. Urinary leukotriene E<sub>4</sub> is associated with renal function but not with endothelial function in type 2 diabetes [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 475-480.
- [41] Ketelhuth DF, Hermansson A, Hlawaty H, et al. The leukotriene B<sub>4</sub> receptor (BLT) antagonist BIL284 decreases atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015, 121: 105-109.
- [42] Hoxha M, Lewis-Mikhael AM, Bueno-Cavanillas A. Potential role of leukotriene receptor antagonists in reducing cardiovascular and cerebrovascular risk: A systematic review of human clinical trials and *in vivo* animal studies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 956-965.
- [43] Zhou X, Cai J, Liu W, et al. Cysteinyl leukotriene receptor type 1 (CysLT<sub>1</sub>R) antagonist zafirlukast protects against TNF- $\alpha$ -induced endothelial inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 452-459.
- [44] Grice CA, Tays KL, Savall BM, et al. Identification of a potent, selective, and orally active leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase inhibitor with anti-inflammatory activity [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(14): 4150-4169.
- [45] Qiu H, Gabrielsen A, Agardh HE, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(21): 8161-8166.
- [46] Merhi M, Demirdjian S, Hariri E, et al. Impact of inflammation, gene variants, and cigarette smoking on coronary artery disease risk [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(6): 415-422.
- [47] Schneider I, Bucar F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(4): 263-272.
- [48] Tardif JC, L'Allier PL, Ibrahim R, et al. Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(3): 298-307.
- [49] Vidal C, Gómez-Hernández A, Sánchez-Galán E, et al. Licofelone, a balanced inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, reduces inflammation in a rabbit model of atherosclerosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320(1): 108-116.
- [50] Yang LX, Heng XH, Guo RW, et al. Atorvastatin inhibits the 5-lipoxygenase pathway and expression of CCL3 to alleviate atherosclerotic lesions in atherosclerotic ApoE knockout mice [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(2): 205-211.
- [51] Berman JP, Farkouh ME, Rosenson RS. Emerging anti-inflammatory drugs for atherosclerosis [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2013, 18(2): 193-205.
- [52] Zhou G, Ge S, Liu D, et al. Atorvastatin reduces plaque vulnerability in an atherosclerotic rabbit model by altering the 5-lipoxygenase pathway [J]. *Cardiology*, 2010, 115(3): 221-228.

[收稿日期]2021-01-05

陈海洋, 张玮. 外源性诱导原发性胆汁性胆管炎动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 105-111.  
Chen HY, Zhang W. Research progress on animal models of exogenously induced primary biliary cholangitis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 105-111.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.015

## 外源性诱导原发性胆汁性胆管炎动物模型 研究进展

陈海洋, 张 玮\*

(上海中医药大学附属龙华医院 感染科, 上海 200032)

**【摘要】** 原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC), 又称原发性胆汁性肝硬化, 是一种少见的自身免疫性肝病, 发病率低, 发病机制不明确, 无法治愈。研究表明外界环境因素导致发病率逐年升高, 所以构建发病因素相似的动物模型研究 PBC 的发病和治疗都具有重要意义。现通过阅读 20 年来国内外相关文献, 总结各种外源性物质(2-辛酸酸偶联牛血清白蛋白、聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸、新鞘氨醇杆菌、抗线粒体抗体抗原、同源胆管蛋白)诱导 PBC 动物模型的方法, 分析各种造模方式的特点。为研究者选择更合适的动物模型, 探索 PBC 发病机制和研发新药提供参考。

**【关键词】** 原发性胆汁性胆管炎; 动物模型; 抗线粒体抗体; 外源性诱导

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0105-07

## Research progress on animal models of exogenously induced primary biliary cholangitis

CHEN Haiyang, ZHANG Wei\*

(Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Department of Infectious Diseases, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】** Primary biliary cholangitis (PBC) is an incurable rare autoimmune liver disease with low incidence and an unclear pathogenesis. Studies have shown that external environmental factors have led to a yearly increase in incidence. Therefore, it is of great significance to establish an animal model with similar pathogenesis to study the pathogenesis and treatment of PBC. After reading relevant domestic and foreign literature over the past 20 years, we summarized the method to establish PBC animal models induced by various exogenous substances. Various exogenous (2-OA-BSA, polyI:C, *N. aromaticivorans*, AMA antigen and BDP) and analyze the characteristics of various modeling method. Induction method of PBC animal models are summarized and the characteristics of various modeling method were analyzed. We provide a reference for researchers to choose more suitable animal models, explore the pathogenesis of PBC and develop new drugs.

**【Keywords】** primary biliary cholangitis; animal model; antimitochondrial antibody; exogenous induction

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(81673926); 上海市卫计委面上项目(ZYKC201840234); 上海市浦东新区名中医工作室建设项目(PDZYXK-3-2014020)。

**【作者简介】** 陈海洋(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治肝病研究。E-mail: xinglinshiye@163.com

**【通信作者】** 张玮(1963—), 女, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治肝病研究。E-mail: zhangdlm@163.com

原发性胆汁性胆管炎 (primary biliary cholangitis, PBC), 又称原发性胆汁性肝硬化, 是一种慢性肝内胆汁淤积性肝病, 其特征是肝内小胆管破坏, 门脉周围炎症、纤维化, 最终导致肝硬化。PBC 的血清学特征是抗线粒体抗体 (anti-mitochondrial antibody, AMA) 阳性, 这是一种在约 95% 的 PBC 患者中发现的高度疾病特异性抗体<sup>[1]</sup>。多个国家流行病学研究表明 PBC 的总体发病率为 8.55/100 万/年, 患病率为 118.75/100 万/年, 我国目前无论是发病率还是患病率都要高出平均水平<sup>[2]</sup>。国外流行病学显示尿路感染、香烟、有毒废弃物和工业地区等环境污染以及贫困等因素容易诱发本病<sup>[3-5]</sup>。Chen 等<sup>[6]</sup>在对上海部分地区 19012 名居民抗线粒体抗体 M2 亚型 (anti-mitochondrial antibody subtype M2, AMA-M2) 的筛选调查中发现住在垃圾填埋场和高架附近, 吸烟以及使用染发剂等被认为是危险因素。最新流行病学也显示城市工业区, 环境污染和社会贫困地区人群的 PBC 患病率较高<sup>[5]</sup>。Probert 等<sup>[7]</sup>在垃圾填埋场发现了可以抑制线粒体氧化磷酸化和诱导肝祖细胞凋亡的化学物质, 其结构是一种类似硫辛酸的人肝细胞代谢产物, 并且可以通过外源性脂酰化途径在酶催化下与丙酮酸脱氢酶复合物的 E2 成分相结合。多项研究显示外源性化学药物或异物可能通过修饰丙酮酸脱氢酶复合物 E2 亚单位 (pyruvate dehydrogenase complex E2 subunit, PDC-E2) 或其他自身抗原, 导致自身免疫易感个体耐受性丧失从而诱发 PBC 的发病<sup>[8-9]</sup>。外源性诱导动物模型更加类似环境因素对 PBC 发病的影响, 所以有必要对外源性诱导 PBC 动物模型的方法和特点进行系统总结 (见表 1), 以便根据研究目的选择恰当的模式。

## 1 药物诱导模型

### 1.1 2-辛炔酸偶联牛血清白蛋白 (2-octynoic acid BSA conjugate, 2-OA-BSA) 诱导模型

绝大多数 PBC 患者都伴有不同程度的抗线粒体抗体反应, 这些抗体识别的自身抗原是 2-氧酸脱氢酶复合物 (2-oxo-acid dehydrogenase complex, 2-OADC) 的成员, 特别是 PDC-E2。实际上, 这些抗体也会与许多化学修饰过的类似物发生交叉反应<sup>[9,24]</sup>。2-辛炔酸 (2-octynoic acid, 2-OA) 不仅具有在体内修饰 PDC-E2 的潜力, 而且重要的是, 它被广泛应用于环境中, 包括香水、口红等化妆品和许多

常见的食品调味料中<sup>[9]</sup>。

Wakabayashi 等<sup>[10]</sup>首先使用外源性 2-OA 与牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 偶合 (100  $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$ ), 对雌性 C57BL/6 小鼠进行免疫, 成功诱导出类 PBC 动物模型。造模方法: 2-OA-BSA 与完全弗氏佐剂 (Freund's adjuvant complete, CFA) 偶合, 进行首次腹腔注射, 其后将 2-OA-BSA 与不完全弗氏佐剂 (Freund's adjuvant incomplete, IFA) 进行偶合, 每隔 2 周对模型小鼠腹腔注射 1 次, 持续 12~24 周。模型特征: 最早在免疫 4 周后血清中即可检测到 PDC-E2 抗体阳性并显著升高, 8 周即达 100%。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 和干扰素  $\gamma$  (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ) 在免疫 4 周后也显著增高。IL-4、IL-5 和 IL-10 基本没有变化。组织学上免疫 14 周后肝切片显示门管区淋巴细胞浸润, 小胆管损伤或消失, 肝内或见肉芽肿形成。肝内 CD4/CD8T 细胞的比值降低, 而 CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量显著增加。Lleo 等<sup>[11]</sup>发现在 PBC 患者中, 受损胆管周围的门管区也存在典型的 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润。虽然该模型有 PBC 典型胆管周围淋巴细胞浸润, 但是纤维化改变和反映胆汁淤积程度的相关酶测定却仍然存在缺陷。然而, 2-OA 可用于多种小鼠品系和转基因小鼠<sup>[25-26]</sup>, 达到模型的理想病理改变, 也表明 2-OA 诱导模型的广泛应用前景, 值得进一步探索。

Wu 等<sup>[12]</sup>、Chang 等<sup>[13]</sup>发现半乳糖苷基神经酰胺 ( $\alpha$ -GalCer) 激活 iNKT 细胞会加重汇管区炎症反应、胆管损伤、肉芽肿形成和肝纤维化发生的趋势。所以 Chang 等<sup>[14]</sup>修改造模的实验方案, 除以上干预措施外, 另加  $\alpha$ -GalCer 用 0.5% 吐温 20 溶解成 0.2 mg/mL, 取 10  $\mu\text{L}$  分别于第 1、2、3 次免疫接种的前 1 d 静脉注射至小鼠体内。方案修改后造模小鼠在免疫 4 周后即出现更加明显的门脉炎症、胆管损伤。更为欣喜的是修正后 12 周的模型可提高 AMA 产生, 肉芽肿形成和肝纤维化改变征象。Zeng 等<sup>[27]</sup>、Miyake 等<sup>[28]</sup>根据这种免疫小鼠模型还发现 iNKT 细胞和自身抗体的关系也具有一致性。这个发现说明不仅适应性免疫参与 PBC 的发展, 而且先天性免疫在本病的发生发展中也起着重要的作用。

### 1.2 聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, polyI:C) 诱导模型

PolyI:C 是一种干扰素诱导剂, 触发 I 型干扰素 (IFN-1) 的产生和下游 IFN- $\alpha/\beta$  受体依赖信号通

表 1 不同外源性物质诱导 PBC 动物模型总结

Table 1 Summary of animal models of PBC induced by different exogenous substances

造模物质 Inducer	处理方法 Processing method	模型优点 Advantages of model	模型缺点 Model shortcomings	应用 Application	参考文献 Reference
2-辛酸酰偶联牛血清白蛋白 2-OA-BSA	2-OA-BSA 分别与 CFA 和 IFA 耦合, 腹腔注射 C57BL/6 小鼠 2 周/次, 造模 12~24 周。修正方案在前基础上辅用 $\alpha$ -GalCer。 2-OA-BSA was coupled with CFA and IFA, respectively. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected for 2 weeks/time, and the model was established for 12~24 weeks. The modified scheme was supplemented with $\alpha$ -GalCer.	4 周可见 M2 抗体阳性, TNF- $\alpha$ 和 IFN- $\gamma$ 升高; 14 周汇管区淋巴细胞浸润, 胆管损伤或者消失。修正后肝病表现更符合。 At 4 weeks, M2 antibody was positive, TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ levels increased. At week 14, lymphocytes were infiltrated in portal area and bile ducts were damaged or disappeared. The pathological manifestations of the liver were more consistent after modification.	药物昂贵, 造模周期长, 实验成本高; 肝纤维化改变不明显。 Drugs are expensive, the modeling cycle is long, and the experiment cost is high. There was no obvious change of liver fibrosis.	环境无污染与 PBC 发病相关性研究。修正后先天性免疫对 PBC 的发病研究。 Study on the correlation between environmental non-staining and PBC incidence. Study on the pathogenesis of PBC by modified innate immunity.	[10-14]
聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸 PolyI:C	PolyI:C (5 mg/mL) 腹腔注射 C57BL/6 小鼠 2 次/周, 持续 28 周。 PolyI:C (5 mg/mL) was intraperitoneally injected into C57BL/6 mice twice a week for 28 weeks.	实验成本低, 8 周 M2 抗体阳性, IFN- $\alpha$ 高表达, 胆管损伤, 胆管周围淋巴细胞浸润明显, 16 周达到最高。 Experimental cost was low. At 8 weeks, M2 antibody was positive, IFN- $\alpha$ expression was high, the bile duct was damaged, and the infiltration of lymphocytes around the bile duct was obvious, and the peak was reached at 16 weeks.	造模周期长, 唾液腺、胰腺和肾也出现类似 PBC 的肝外炎性病变, 肝特异性弱。 Extrahepatic inflammatory lesions similar to PBC also appeared in salivary glands, pancreas and kidney, and liver specificity was weak.	PBC 治疗药物研究。 Drug research for the treatment of PBC.	[15-16]
2-OA-BSA 联合聚肌苷酸胞嘧啶核苷酸 2-OA-BSA combination polyI:C	依据上述方法联合使用, 造模 8 周。 According to the combination of the above methods, the model was built for 8 weeks.	造模时间短, 淋巴细胞和促炎细胞因子增多和肝病特征。 Model time was shortened, lymphocytes and proinflammatory cytokines were increased and liver pathological features were observed.	实验成本高, 动物死亡率增高。 Cost of the experiment is high, and the mortality rate of animals increases.	PBC 的“二次打击”假说研究。 Study on the “Second Strike” hypothesis of PBC.	[17]
新鞘氨醇杆菌 <i>N. aromaticivorans</i>	<i>N. aromaticivorans</i> 悬液第 1、14 天静脉注射到 NOD 小鼠, 至少 4~8 周。 <i>N. aromaticivorans</i> suspension was intravenously injected into NOD mice on days 1 and 14 for at least 4~8 weeks.	感染后持续高水平的 IgG, 汇管区炎症细胞浸润, 胆管损伤和肉芽肿改变。 After infection, high levels of IgG persist, inflammatory cell infiltration in the portal area, bile duct damage and granuloma changes.	实验繁琐, 实验条件要求高; 肝纤维化改变不明显。 Experiment is cumbersome and requires high experimental conditions; the changes in liver fibrosis are not obvious.	环境微生物导致 PBC 发病的机制研究。 Study on the pathogenesis of PBC caused by environmental microorganism.	[18-19]
抗线粒体抗原 Anti-mitochondrial antigen	C57BL/6 小鼠腹腔注射重组抗原蛋白三联体 100 $\mu$ g/200 $\mu$ L, 造模 66 周。 C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with 100 $\mu$ g/200 $\mu$ L of recombinant antigen protein triplet for 66 weeks.	M2 抗体阳性率高, 碱性磷酸酶升高; 汇管区炎症细胞浸润明显, 肝特异性强。 Positive rate of M2 antibody is high, alkaline phosphatase is elevated. Inflammatory cells in the portal area are infiltrated obviously, and the liver specificity is strong.	实验条件高, 造模周期长, 肝纤维化改变不明显。 Experimental conditions are high, the modeling cycle is long, and the changes in liver fibrosis are not obvious.	PBC 早期诊断研究。 Study on early diagnosis of PBC	[20-22]
胆管蛋白 Bile duct protein	BDP 与 CFA 和 IFA 乳化皮下注射 C57BL/6 小鼠 1 次/周, 造模 4 周。 BDP, CFA and IFA were emulsified subcutaneously into C57BL/6 mice once a week, and the mice were modeled for 4 weeks.	造模周期短; M2 抗体阳性率高, 淋巴细胞活性增强; 汇管区炎症细胞浸润。 Short mold making cycle. The positive rate of M2 antibody was high and the lymphocyte activity was enhanced. Inflammatory cells infiltrate the portal area.	病理上未见胆管损伤和肉芽肿改变。 Pathologically, there were no changes in bile duct damage and granulomas.	PBC 发病的分子拟态研究。 Molecular mimicry for the pathogenesis of PBC.	[23]

路,通过打破人体耐受性促进后续自身免疫反应<sup>[29-31]</sup>。持续产生 IFN-1 会使免疫系统几乎所有成分转向病理功能,导致组织损伤和疾病<sup>[32]</sup>。许多系统性自身免疫性疾病患者有持续产生 IFN-1 的迹象,并显示 IFN- $\alpha$  调控基因表达增加<sup>[33-34]</sup>。此外,多个病例报道在没有自身免疫性疾病的情况下使用干扰素治疗期间患者出现了自身免疫性肝炎的临床和病理特征<sup>[35-37]</sup>。提示 IFN 系统在自身免疫性疾病的发病机制中起关键作用。

Okada 等<sup>[15]</sup>使用 IFN-1 的诱导剂 polyI:C 建立自身免疫性胆管炎动物模型。造模方式:6~8 周的雌性 C57BL/6 小鼠,每周腹腔注射 2 次 polyI:C,以 5 mg/kg 为造模最佳浓度,连续造模 28 周,成功建立 PBC 小鼠模型。模型特点:造模 8 周后组织学可见胆管损伤,胆管周围淋巴细胞浸润明显,门管区淋巴细胞的浸润数量在造模 16 周达到最高,此后基本稳定维持这一水平。模型小鼠血清在 8 周后可以检测到自身抗体,到 24 周后 87% 的模型小鼠可检测 AMA。此外,IFN- $\alpha$  在造模 4 周已经高表达,但到 16 周后开始降低,24 周处于较低的状态。Hanada 等<sup>[38]</sup>认为 IFN- $\beta$  和 IFN- $\alpha$  可以直接破坏胆管细胞紧密连接的屏障功能,通过改变胆管细胞旁途径来增加胆管细胞通透性。然而 Stewart<sup>[16]</sup>认为降低干扰素会减少自身抗体和组织免疫损伤,IFN- $\alpha$  低表达的情况下,IFN- $\beta$  也会出现低表达。奇怪的是这种现象与病理进展相互矛盾,可能是因为其他细胞因子对干扰素的调节所致,至于具体内在联系仍需进一步研究。

### 1.3 2OA-BSA 联合 polyI:C 诱导模型

Ambrosini 等<sup>[17]</sup>认为 2OA-BSA 诱导的 PBC 模型肝纤维化的病理特征不符合后期肝纤维化的病理征象,所以在此基础之上联合 polyI:C,达到了较好的效果。造模方法:在首次 2OA-BSA 联合 CFA 腹腔注射诱导后每 3 d 加用 5 mg/kg 剂量的 polyI:C,干预 8 周后处死小鼠。和 2OA-BSA 诱导模型相比有以下异同。相同:两者肝组织有相同程度的淋巴细胞浸润、肉芽肿形成和胆管损伤。两者产生的抗体和 CD4<sup>+</sup>T 细胞水平相当。不同点:联合 polyI:C 诱导的模型 Th1 细胞因子、IL-12、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  增多,CD8<sup>+</sup>T 细胞和嗜酸粒细胞数量增多,门脉汇管区炎症和纤维化形成明显,此外造模时间只需要 8 周。但是 polyI:C 可有效激活免疫系统,联合使用后促使造成严重的腹腔炎症,提高了动物死亡率。

polyI:C 在 2OA 免疫诱导下进行二次免疫,证实 PBC 如同其他自身免疫性疾病一样,属于多系统协调免疫反应。

## 2 抗原诱导模型

### 2.1 微生物诱导模型

流行病学研究表明 PBC 与复发性尿路感染有关<sup>[39-40]</sup>。Selmi 等<sup>[41]</sup>发现 PBC 患者血清对 (*Novosphingobium aromaticivorans*, *N. aromaticivorans*) 的反应活性比对大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 要高出 100~1000 倍。其后又进一步将 *N. aromaticivorans*、*E. coli* 等多种细菌的 PDC-E2 内结构域氨基酸序列对比发现前者与人类的 PDC-E2 具有最高的同源性,并且在对比几种细菌诱导 PBC 模型特点后,认为 *N. aromaticivorans* 比之前提出的 *E. coli*、螺杆菌 (*Helicobacter species*, Hp) 要更可能诱导 PBC 的发病<sup>[42]</sup>。

Mattner 等<sup>[18]</sup>使用 *N. aromaticivorans* 打破免疫耐受造出具有显著自身免疫特点的 PBC 小鼠模型。造模方法如下:制备 *N. aromaticivorans* 细菌悬液(每 100  $\mu$ L 含有  $5 \times 10^7$  个)。分别于第 1 天和第 14 天将细菌悬液静脉注射到 4~20 周非肥胖型糖尿病 (non-obesity diabetes, NOD) 小鼠体内进行活体感染。模型特点:活体感染 1 个月后小鼠肝脾质量较前增加;主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II 类分子在受损小胆管的表达;可见严重的门脉浸润和胆管损伤,并伴有部分纤维化改变。这种表现在感染 *E. coli* 的小鼠肝组织中未发现。造模 6 个月后门脉炎症、胆管损伤和肉芽肿形成相比 *E. coli* 感染要具有明显差异。血清检测表明感染 2 周后小鼠即出现 PDC-E2 和 AMA 的聚集,伴有 T 淋巴细胞浸润小胆管的现象,并持续长时间高水平的 IgG。尽管如此,这种模型却未出现与人类 PBC 发展进程中相似的肝纤维化表现。但有研究表明这种肝纤维化改变不明显可能是由于 NOD 遗传背景之下 IFN 的高表达<sup>[43]</sup>。这也提示 PBC 疾病的发生可能与某种遗传易感性基因有关。Wang 等<sup>[19]</sup>分别用 *E. coli* 和 *N. aromaticivorans* 感染 NOD 小鼠建立 PBC 模型,发现 *E. coli* 感染小鼠会导致更加明显的胆管炎症损伤并且产生更高浓度的 AMA,然而与 PBC 患者血清相比,*E. coli* 感染小鼠对 PDC-E2 的血清学抗体反应却相对较弱<sup>[44]</sup>,尽管如此 Wang 认为在感染 *E. coli*

的早期足以打破免疫耐受并导致类似于 PBC 的肝病理表现。

## 2.2 抗线粒体抗体抗原 (AMA 抗原) 诱导模型

英国的一项临床研究发现检出 M2 抗体阳性的无症状患者在出现 PBC 症状和体征之前,时间间隔长达 10 余年之久<sup>[45]</sup>。目前依靠常规使用的血清 AMA 检测,其特异性和敏感性还不够,仍有一部分病人出现漏诊<sup>[46]</sup>。所以提高对 PBC 诊断的敏感性显得尤为重要。Kikuchi<sup>[47]</sup> 和 Miyakawa 等<sup>[48]</sup> 将 AMA 反应的主要自身抗原克隆并鉴定为 2-氧代酸脱氢酶复合体家族成员:丙酮酸脱氢酶复合体 E2 (PDC-E2), 支链 2-氧代酸脱氢酶复合体-E2 (BCOADC-E2) 和 2-氧戊二酸脱氢酶复合体-E2 (OGDC-E2)。并且也发现有些患者的血清与 BCOADC-E2 和 OGDC-E2 是可以反应的。多年前 Moteki 等<sup>[49]</sup> 将牛、大鼠和人类线粒体抗原的混合物,即 3 个不同支链结构域杂交克隆,命名为 pML-MIT3,用于 PBC 病人检测发现可以明显提高检出率。

Jiang 等<sup>[20]</sup> 根据基因工程的方法将人源靶抗原连接加工后获得重组抗原蛋白三联体(重组 AMA 抗原),据此成功模拟 PBC 模型<sup>[21]</sup>。造模方法:每只小鼠 (C57BL/6) 一次腹腔注射重组抗原蛋白三联体 100  $\mu\text{g}$ /200  $\mu\text{L}$ 。模型特点:在免疫 66 周后病理显示肝小叶无明显淋巴细胞浸润和肝细胞坏死表现,并且可见汇管区淋巴细胞浸润和小胆管损伤。血清中 AMA-M2 抗体阳性率达 100%,并且谷丙转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBil) 无明显变化,以上特征与早期 PBC 相似。此外具有肝特异性,灵敏度高,已尝试投入临床用于辅助 PBC 疾病的筛查<sup>[22]</sup>。Miyakawa 等<sup>[50]</sup> 通过克隆人源 cDNA 利用新开发的酶联免疫吸附法来表达重组蛋白,用于 PBC 阴性病人的检测,有 90% 与至少 1 个重组蛋白发生免疫印迹反应。

## 2.3 胆管蛋白 (bile duct protein, BDP) 诱导模型

根据 PBC 发病的典型特征, Ma 等<sup>[23]</sup> 通过同源 BDP 免疫诱导方式建立 PBC 小鼠模型。造模方法: 8~12 周龄小鼠 (C57BL/6) 通过门静脉灌注原位胶原酶 IV, 10 min 后剪裁肝,用软牙刷刷去肝细胞,直到可见整个胆管树。将胆管树置于原位胶原酶 IV 中震荡 10 min,分离粘附的肝细胞。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤 3 次后,将胆管树置于 PBS,制备胆管细胞蛋白匀浆,并进行蛋白定量。将 4 mg/mL

的 BDP 与 CFA 等体积乳化,完全乳化后,取 BDP-CFA 乳剂在小鼠背部多点皮下注射,每周 1 次,免疫 3 次。随后将 BDP 与 IFA 乳化, BDP-IFA 乳剂仅在最后一次免疫中使用, BDP-IFA 处理 1 周后处死小鼠,进行分析。模型特点:在病理中发现门静脉汇管区胆管周围严重的肝特异性炎症,肝和脾中 CD4<sup>+</sup> T 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量和激活状态增加。以及由 T 细胞抗原呈递细胞组成的树突状细胞在肝和脾的数量也有所增加。此外,该模型中脾的生发中心反应更强。血清中 AMAs 100% 阳性,并增加了血清中的 AMAs,包括抗 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2。该模型的建立主要依赖于胆管抗原,而在人类中,胆管抗原再次表明分子拟态参与触发或促进 PBC 发病。

## 3 讨论与展望

除了临床样本、环境研究、体外实验和流行病学数据外,动物模型是理解和寻找 PBC 临床方案不可或缺的工具。到目前为止, PBC 的发病机制仍然不够清晰,只是对该疾病发展过程和预后有一定了解。熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 是唯一经 FDA 认证的一线药物<sup>[51]</sup>,但也只能改善患者胆汁淤积的状态,无法根本治愈。在实际临床中有高达 30% 的 PBC 患者对 UDCA 应答欠佳,应答欠佳不仅会提高并发症的发生率,更容易进展为肝硬化,甚至需要肝移植,这类患者是快速发展至晚期肝病的高风险人群<sup>[52-54]</sup>。临床二线贝特类药物联合 UDCA 也仅仅可以改善血清相关指标,与单独使用 UDCA 相比,对症状和死亡率的影响并没有显著差异<sup>[55]</sup>。因此,当务之急在于尽早探明本病的发病机制以研发更适合 PBC 的新药。

目前建立的动物模型只能模拟 PBC 某一病理阶段,还不能完整模拟其病理过程。人体生活在复杂环境中,自身免疫性疾病是环境多因素刺激和遗传因素导致免疫耐受破坏所致。以上构建的小鼠模型各有特点,启示我们单因素造模方法只能拟合出接近 PBC 某一阶段病理特点的动物模型,联合使用比如 20A-BSA 联合 polyI:C 可以较好提高动物模型拟合度。对于这种病理过程复杂的疾病模型应该打破传统单因素造模思路,从多因素(不局限外源性诱导)考虑,或者结合肝纤维化、肝硬化疾病动物模型造模方法,采取复合多因素造模方法,探索出更加符合人类 PBC 发病特点的动物模型。

## 参考文献:

- [ 1 ] Carey EJ, Ali AH, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis [ J ]. Lancet, 2015, 386(10003): 1565-1575.
- [ 2 ] Zeng N, Duan W, Chen S, et al. Epidemiology and clinical course of primary biliary cholangitis in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis [ J ]. Hepatol Int, 2019, 13(6): 788-799.
- [ 3 ] Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients [ J ]. Hepatology, 2005, 42(5): 1194-1202.
- [ 4 ] McNally RJ, Ducker S, James OF. Are transient environmental agents involved in the cause of primary biliary cirrhosis? Evidence from space-time clustering analysis [ J ]. Hepatology, 2010, 50(4): 1169-1174.
- [ 5 ] Dyson JK, Blain A, Foster Shirley MD, et al. Geo-epidemiology and environmental co-variate mapping of primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis [ J ]. JHEP Rep, 2021, 3(1): 100202.
- [ 6 ] Chen BH, Wang QQ, Zhang W, et al. Screening of anti-mitochondrial antibody subtype M2 in residents at least 18 years of age in an urban district of Shanghai, China [ J ]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 2052-2060.
- [ 7 ] Probert PM, Leitch AC, Dunn MP, et al. Identification of a xenobiotic as a potential environmental trigger in primary biliary cholangitis [ J ]. J Hepatol, 2018, 69(5): 1123-1135.
- [ 8 ] Gluud C. Acute, serious drug-induced liver injury [ J ]. J Hepatol, 2002, 37(5): 675-677.
- [ 9 ] Amano K, Leung PS, Rieger R, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid [ J ]. J Immunol, 2005, 174(9): 5874-5883.
- [ 10 ] Wakabayashi K, Lian ZX, Leung PS, et al. Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen PDC-E2 by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease [ J ]. Hepatology, 2008, 48(2): 531.
- [ 11 ] Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, et al. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis [ J ]. World J Gastroenterol, 2008, 14(21): 3328-3337.
- [ 12 ] Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, et al. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis [ J ]. Hepatology, 2011, 53(3): 915-925.
- [ 13 ] Chang CH, Chen YC, Yu YH, et al. Innate immunity drives xenobiotic-induced murine autoimmune cholangitis [ J ]. Clin Exp Immunol, 2014, 177(2): 373-380.
- [ 14 ] Chang CH, Chen YC, Zhang W, et al. Innate Immunity drives the initiation of a murine model of primary biliary cirrhosis [ J ]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121320.
- [ 15 ] Okada C, Akbar SM, Horiike N, et al. Early development of primary biliary cirrhosis in female C57BL/6 mice because of polyI:C administration [ J ]. Liver Int, 2005, 25(3): 595-603.
- [ 16 ] Stewart TA. Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases [ J ]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(2): 139-154.
- [ 17 ] Ambrosini YM, Yang GX, Zhang W, et al. The multi-hit hypothesis of primary biliary cirrhosis: polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C) and murine autoimmune cholangitis [ J ]. Clin Exp Immunol, 2011, 166(1): 110-120.
- [ 18 ] Mattner J, Savage PB, Leung P, et al. Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells [ J ]. Cell Host Microbe, 2008, 3(5): 304-315.
- [ 19 ] Wang JJ, Yang GX, Zhang WC, et al. *Escherichia coli* infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice [ J ]. Clin Exp Immunol, 2014, 175(2): 192-201.
- [ 20 ] Jiang XH, Zhong RQ, Yu SQ, et al. Construction and expression of a humanized M2 autoantigen trimer and its application in the diagnosis of primary biliary cirrhosis [ J ]. World J Gastroenterol, 2003, 9(6): 1352-1355.
- [ 21 ] 姜小华, 仲人前, 方晓云, 等. 抗线粒体抗体 M2 抗原诱导小鼠原发性胆汁性肝硬化模型的建立 [ J ]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(3): 202-204.
- [ 22 ] 姜小华, 仲人前, 屠小卿, 等. 人源 M2 三联体靶抗原检测抗体诊断原发性胆汁性肝硬化 [ J ]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(5): 341-343.
- [ 23 ] Ma WT, Liu QZ, Yang JB, et al. A mouse model of autoimmune cholangitis via syngeneic bile duct protein immunization [ J ]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15246.
- [ 24 ] Rieger R, Leung PS, Jeddleloh MR, et al. Identification of 2-nonynoic acid, a cosmetic component, as a potential trigger of primary biliary cirrhosis [ J ]. J Autoimmun, 2006, 27(1): 7-16.
- [ 25 ] Wakabayashi K, Yoshida K, Leung PS, et al. Induction of autoimmune cholangitis in non-obese diabetic (NOD).1101 mice following a chemical xenobiotic immunization [ J ]. Clin Exp Immunol, 2010, 155(3): 577-586.
- [ 26 ] Hsueh YH, Chen HW, Syu BJ, et al. Endogenous IL-10 maintains immune tolerance but IL-10 gene transfer exacerbates autoimmune cholangitis [ J ]. J Autoimmun, 2018, 95: 159-170.
- [ 27 ] Zeng SG, Ghnewa YG, O'Reilly VP, et al. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells *in vitro* [ J ]. J Immunol, 2013, 191(4): 1666-1676.
- [ 28 ] Miyake T, Kumagai Y, Kato H, et al. PolyI:C-induced activation of NK cells by CD8 $\alpha^+$  dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways [ J ]. J Immunol, 2009, 183(4): 2522-2528.
- [ 29 ] Huang C, Chen S, Zhang T, et al. TLR3 ligand PolyI:C prevents acute pancreatitis through the interferon- $\beta$ /interferon- $\alpha$

- $\beta$  receptor signaling pathway in a caerulein-induced pancreatitis mouse model [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 980.
- [30] Luo S, Wang Y, Zhao M, et al. The important roles of type I interferon and interferon-inducible genes in systemic lupus erythematosus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 542-549.
- [31] Rönnblom L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases [J]. *Ups J Med Sci*, 2011, 116(4): 227-237.
- [32] Crow MK, Olfieriev M, Kirou KA. Type I interferons in autoimmune disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 369-393.
- [33] Braun D, Geraldes P, Demengeot J. Type I Interferon controls the onset and severity of autoimmune manifestations in lpr mice [J]. *J Autoimmun*, 2003, 20(1): 15-25.
- [34] Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, et al. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7): 2202-2210.
- [35] Lörke J, Erhardt A, Häussinger D. Induction of autoimmune hepatitis by pegylated interferon  $\alpha$ -2b in chronic hepatitis C [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2(12): A20.
- [36] Cholongitas E, Samonakis D, Patch D, et al. Induction of autoimmune hepatitis by pegylated interferon in a liver transplant patient with recurrent hepatitis C virus [J]. *Transplantation*, 2006, 81(3): 488-490.
- [37] Rathi C, Pipaliya N, Choksi D, et al. Autoimmune hepatitis triggered by treatment with pegylated interferon  $\alpha$ -2a and ribavirin for chronic hepatitis C [J]. *ACG Case Rep J*, 2015, 2(4): 247-249.
- [38] Hanada S, Harada M, Koga H, et al. Tumor necrosis factor and interferon directly impair epithelial barrier function in cultured mouse cholangiocytes [J]. *Liver Int*, 2003, 23(1): 3-11.
- [39] Van de Water J, Ishibashi H, Coppel RL, et al. Molecular mimicry and primary biliary cirrhosis: Premises not promises [J]. *Hepatology*, 2001, 33(4): 771-775.
- [40] Bogdanos DP, Baum H, Vergani D, et al. The role of *E. coli* infection in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis [J]. *Dis Markers*, 2010, 29(6): 301-311.
- [41] Selmi C, Balkwill DL, Invernizzi P, et al. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium [J]. *Hepatology*, 2003, 38(5): 1250-1257.
- [42] Selmi C, Gershwin ME. Bacteria and human autoimmunity: the case of primary biliary cirrhosis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2004, 16(4): 406-410.
- [43] Mukai T, Nagaki M, Imose M, et al. Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon- $\gamma$  [J]. *Liver Int*, 2010, 26(8): 1006-1014.
- [44] Oertelt S, Rieger R, Selmi C, et al. A sensitive bead assay for antimitochochondrial antibodies; Chipping away at AMA - negative primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2007, 45(3): 659-665.
- [45] Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis [J]. *Lancet*, 1996, 348(9039): 1399-1402.
- [46] Miyakawa H, Kawaguchi N, Kikuchi K, et al. False positive reaction in ELISA for IgM class anti-M2 antibody and its prevention [J]. *Hepatol Res*, 2001, 20(3): 279-287.
- [47] Kikuchi K. Immunoreactivity of recombinant human oxo-glutarate dehydrogenase complex (OGDC)-E2 protein in primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatol Res*, 2000, 16(3): 211-223.
- [48] Miyakawa H, Abe K, Kitazawa E, et al. Detection of anti-branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex (BCOADC)-E2 antibody in primary biliary cirrhosis by ELISA using recombinant fusion protein [J]. *Autoimmunity*, 1999, 30(1): 11-20.
- [49] Moteki S, Leung PS, Coppel RL, et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochochondrial autoantibodies [J]. *Hepatology*, 1996, 24(1): 97-103.
- [50] Miyakawa H, Tanaka A, Kikuchi K, et al. Detection of antimitochochondrial autoantibodies in immunofluorescent AMA-negative patients with primary biliary cirrhosis using recombinant autoantigens [J]. *Hepatology*, 2001, 34(2): 243-248.
- [51] Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8(1): 303-330.
- [52] Pares A, Caballeria L, Rodes J. Excellent long-term survival in patients with primary biliary cirrhosis and biochemical response to ursodeoxycholic acid [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(3): 715-720.
- [53] Corpechot C, Abenavoli L, Rabahi N, et al. Biochemical response to ursodeoxycholic acid and long-term prognosis in primary biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2008, 48(3): 871-877.
- [54] Namisaki T, Fujinaga Y, Moriya K, et al. The association of histological progression with biochemical response to ursodeoxycholic acid in primary biliary cholangitis [J]. *Hepatol Res*, 2021, 51(1): 31-38.
- [55] Zhang Y, Chen K, Dai W, et al. Combination therapy of bezafibrate and ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis: A meta-analysis [J]. *Hepatol Res*, 2015, 45(1): 48-58.

[收稿日期]2021-02-01

王静茹, 曾贵荣, 常露露, 等. 社会挫败动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 112-116.  
Wang JR, Zeng GR, Chang LL, et al. Research progress on animal models of social defeat [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 112-116.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.016

## 社会挫败动物模型研究进展

王静茹<sup>1</sup>, 曾贵荣<sup>2</sup>, 常露露<sup>1</sup>, 姜宁<sup>3</sup>, 朱蓄<sup>1</sup>, 刘顶鼎<sup>1\*</sup>, 林新文<sup>4\*</sup>

(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 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. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所药理毒理研究中心, 北京 100193; 4. 湖南省药品审核查验中心, 长沙 410001)

**【摘要】** 社会挫败应激是以物种间的从属关系为基础的社会应激方式, 它通过同种动物相同或不同品系个体间的挫败行为导致抑郁样及其他行为改变。目前, 抗社会挫败药物研究较少, 现有动物模型存在一定的缺陷, 且无统一标准。本文就近年来社会挫败动物模型应用的研究及其发病机制进行综述, 为开发抗社会挫败药物提供可供参考的动物模型。

**【关键词】** 社会挫败; 动物模型; 抗社会挫败药物; 发病机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0112-05

## Research progress on animal models of social defeat

WANG Jingru<sup>1</sup>, ZENG Guirong<sup>2</sup>, CHANG Lulu<sup>1</sup>, JIANG Ning<sup>3</sup>, ZHU Qiang<sup>1</sup>, LIU Dingding<sup>1\*</sup>, LIN Xinwen<sup>4\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China. 2. Hunan Center of Drug Safety Evaluation and Research of Drugs & Key Laboratory of New Drug Efficacy and Safety Evaluation of Hunan Province, Changsha 410331. 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 4. Hunan Drug Examination and Inspection Center, Changsha 410001)

**【Abstract】** Social defeat stress is a social stress method based on the subordination relationship between species. It leads to depression-like and other behavioral changes through frustrating behaviors between individuals of the same animal or different strains. Currently, few studies examine anti-social defeat drugs and the existing animal models have certain shortcomings and there is no uniform standard. This article reviews recent research on the application of social defeat animal models and their pathogenesis and provides a reference animal model for the development of anti-social defeat drugs.

**【Keywords】** social defeat; animal models; anti-social defeat drugs; pathogenesis

随着生活节奏的加快, 社会压力也随之而来, 社会挫败应激是以物种间的从属关系为基础的社会挫败应激方式, 使挫败动物产生情感和精神压力, 从逐渐出现抑郁、焦虑等因社会挫败而引起的疾病。

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目(81860844); 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1038号); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2016]185); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2016-001); 贵州中医药大学药效物质基础及作用机理研究中心(贵中医党办发[2019]20号)。

**【作者简介】** 王静茹(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理研究。E-mail: 853981753@qq.com

**【通信作者】** 刘顶鼎(1986—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 神经系统疾病药理研究及中药民族药新药研究与开发。E-mail: 249000559@qq.com

林新文(1982—), 男, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 中药药理。E-mail: 1829144878@qq.com

\* 共同通信作者

而引发一系列疾病,这些疾病主要有社交逃避、情绪低落、焦躁、快感缺失、认知功能降低等特征<sup>[1-2]</sup>。社会挫败的发生严重影响患者的工作与生活质量,给家庭及社会带来沉重的负担。通过对社会挫败动物模型文献研究发现,虽造模方式有多种,但无统一标准。其行为检测可使用高架十字迷宫测试,悬尾测试和强迫游泳测试等一系列行为学方法<sup>[3]</sup>。目前,社会挫败发生机制尚不明确,治疗药物研究较少,因此进一步研究社会挫败动物模型及其发病机制,对开发新的治疗途径和方法具有重要意义。本文通过总结社会挫败动物模型及其发病机制的研究现状,为开发抗社会挫败药物提供可供参考的动物模型。

## 1 社会挫败动物模型

### 1.1 慢性社会挫败模型

慢性社会挫败动物模型最初是由 Tornatzky 和 Miczek 在大鼠中建立<sup>[4]</sup>。在此基础上对其改造,过程如下:以小鼠为实验对象,选取一批月龄、体重较大的具有攻击性的小鼠用于造模。社会挫败动物模型刺激主要分为两个阶段:第一阶段,实验鼠 C57BL/6J 进入 CD1 小鼠的领地,被连续攻击 5~10 min;第二阶段对小鼠进行 24 h 的感官接触,慢性应激过程连续应激 10 d。其详细过程为:每天将 C57BL/6J 小鼠放入陌生 CD1 小鼠的饲养笼中,发生攻击行为后,将 C57BL/6J 小鼠继续暴露于 CD1 小鼠 5 min(第一阶段);随后将 C57BL/6J 小鼠与 CD1 小鼠用金属孔板隔开,使 2 只小鼠保持视觉、嗅觉等的接触(第二阶段)<sup>[5]</sup>。

造模完成后对小鼠进行行为学评价,通过对小鼠进行社交回避测试发现应激后小鼠的社交互动行为减少<sup>[6]</sup>。在新颖物体测试、Y 迷宫测试、社会交互测试过程中应激小鼠的学习记忆力降低、焦虑水平显著提高<sup>[7]</sup>。强迫游泳测试中,应激小鼠不运动时间明显增加<sup>[5]</sup>。以上行为学实验表明,慢性社会挫败模型适用于社会挫败的造模。

动物模型所存在的一些问题主要表现在造模成功率以及检验效能上<sup>[4]</sup>。本类模型造模简单,造模周期短,且造模成功率高;同时该模型普遍用于雄性小鼠的造模,所选用的攻击小鼠大多为体重较大具有攻击性的雄性小鼠,雌性小鼠往往不具有较大的攻击性,在使用雌性小鼠造模时会造模成功率下降。有研究发现慢性社会挫败模型在造模

成功后会发生慢性逆转现象<sup>[8]</sup>。

### 1.2 母子分离模型

选择健康的孕鼠为研究对象,仔细照料每只孕鼠直至其生产。将新生幼鼠按照母子分离模型的标准进行造模,在小鼠出生后第 3 天开始,使其与母鼠分笼处理 3 h,直至出生后第 22 天幼鼠断奶。具体步骤如下:每天早上 8:00 起,将每只母鼠从鼠笼中拿出,并将每只母鼠单独放置在另外一个鼠笼,只留幼鼠在原本的鼠笼中,3 h 后(即 11:00)再次将每只母鼠与其各自幼鼠合笼。在幼鼠断奶后,挑选健康雄性幼鼠,将其分笼饲养至 10 周龄<sup>[9-11]</sup>。

对小鼠进行 Morris 水迷宫测试,发现小鼠目标象限停留时间和穿越平台次数减少,表现出小鼠认知功能障碍<sup>[12]</sup>。在强迫游泳测试中,小鼠不运动时间显著增加;高架十字迷宫测试发现应激小鼠焦虑水平明显增加<sup>[13]</sup>。降压回避测试发现应激小鼠出现短期记忆损伤<sup>[14]</sup>。由此推断,该类模型适合社会挫败模型造模。

该模型为生命早期的一种应激反应,常用于神经精神类疾病致病机理的应用研究,如社会挫败<sup>[15]</sup>、精神分裂<sup>[16]</sup>、抑郁症<sup>[17]</sup>等的机制研究。造模过程简单、易于操作,但应用局限,只适用于新生幼年小鼠的造模。

### 1.3 慢性束缚模型

选用 SPF 级的小鼠,将小鼠放置与其身材相近的束缚器中,每天固定时间段应激 2 h,持续应激 14 d<sup>[18]</sup>。

造模结束后对小鼠进行行为学评价,通过对小鼠糖水偏好测试和悬尾测试发现:应激小鼠糖水偏爱分数下降,不动时间延长<sup>[19-20]</sup>;旷场实验测试显示,应激小鼠自发活动路程明显缩短,诱导焦虑样行为<sup>[21]</sup>;明暗箱实验测试发现应激小鼠明箱停留时间减少,明暗箱穿梭次数显著降低<sup>[22]</sup>。综上所述,慢性束缚模型适用于社会挫败的造模。

该模型造模简单、造模周期短,雌性及雄性小鼠均适用。但该模型造模过程较为单一,小鼠易产生适应性<sup>[23]</sup>。

### 1.4 足底电击模型

以小鼠为实验对象,将小鼠放置于电击箱内给予不可预知性的电击刺激 20 min。在造模过程中,小鼠对电击刺激不可逃避,每天相同时间段对小鼠进行刺激,持续 14 d<sup>[15]</sup>。

通过对造模成功后小鼠进行高架十字迷宫测

试行为学评价发现,小鼠焦虑行为明显<sup>[24]</sup>。明暗箱测试发现应激小鼠暴露在光照下的时间减少,表明小鼠焦虑增加<sup>[25]</sup>,在强迫游泳测试和 Morris 水迷宫测试中,应激小鼠静止时间延长,寻找平台的潜伏期和游泳强度显著延长,表现出类似抑郁样行为、空间学习能力损害<sup>[26]</sup>。因此,足底电击模型致抑郁、焦虑样行为,可作为社会挫败模型的一种。

该类模型使用范围较广,主要用于社会挫败等神经精神疾病的造模<sup>[27]</sup>。且造模过程简单。但在应用于社会挫败造模时,应注意造模时长的选择<sup>[28]</sup>,以免其他疾病的发生。

### 1.5 孤养模型

将断奶后的新生小鼠单只单笼隔离饲养于安静的环境中,饲养 4~6 周<sup>[29]</sup>。

造模结束后,采用高架十字迷宫实验、小鼠暗箱实验、小鼠孔板实验、隔离小鼠攻击实验对小鼠的焦虑行为进行行为学评价,发现小鼠具有明显焦虑样行为<sup>[30]</sup>。小鼠造模成功后其行为学主要表现为焦虑不安、恐惧、易激惹、攻击性强等特点<sup>[31]</sup>,根据以上行为学表明该模型适用于社会挫败的造模。

孤养模型用于社会挫败等神经精神类疾病造模时常与其他应激模型配合使用,如:慢性温和不可预见性刺激模型,可使其效果更加显著<sup>[32-34]</sup>。有研究发现,幼年孤养的小鼠再次回归社会后,其社会障碍并没有减轻,说明孤养模型不会产生逆转,会产生永久的行为缺陷<sup>[15]</sup>,且该类模型造模简单,雄性、雌性小鼠均适用。

综上所述,社会挫败动物模型有慢性社会挫败模型、母子分离模型、慢性束缚模型、足底电击模型、孤养模型等。

## 2 发病机制

社会挫败应激会显著影响啮齿动物大脑以及形态学的改变,近几年研究发现主要与海马区 (hippocampus, Hip)、中央杏仁核区 (central amygdala, CeA)、前皮质额叶区 (prefrontal cortex, PFC) 等脑区中的蛋白质、神经因子及神经通路等有关<sup>[35]</sup>。

组蛋白是真核生物体细胞染色质与原核细胞中的碱性蛋白质,具有基因调控作用。有研究发现,组蛋白的表观遗传修饰在脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic, BDNF) 的转录中起着至关重要的作用<sup>[36]</sup>。研究者通过表观遗传调控 N-甲

基-D 天冬氨酸 (N-Methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体亚基的表达进行蛋氨酸介导抵御慢性社会挫败压力的能力研究时发现:蛋氨酸通过一种涉及组蛋白甲基化的表观遗传机制而发挥抗抑郁样作用<sup>[37]</sup>。由此,表明组蛋白甲基化与社会挫败有关。同时,研究发现社会挫败还与色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF)<sup>[38]</sup>、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)<sup>[39]</sup> 等有关。

小鼠海马区 BDNF 对社会挫败长期神经和行为可塑性方面有着重要的作用<sup>[40]</sup>,且 BDNF 在中脑边缘多巴胺通路中是社会挫败产生的一个关键中介<sup>[41]</sup>。研究表明,应激后小鼠海马区 BDNF 水平显著降低<sup>[42]</sup>。给予小鼠抗抑郁药物,使 BDNF 的水平提高,降低了应激小鼠的敏感性<sup>[43]</sup>。同时,有研究者发现应激后小鼠 BDNF 下调的原因主要与 BDNF 启动子位点抑制性组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸甲基化有关<sup>[41]</sup>,具体改变机制还有待研究。

神经通路在调节蛋白质以及神经因子方面具有重要作用。慢性社会挫败应激影响  $\gamma$ -氨基丁酸 B 型受体 ( $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptor, GABA<sub>B</sub>R) 通路的表达,导致 GB<sub>2</sub> 蛋白上调<sup>[44]</sup>。同时,研究表明 Wnt 信号通路异常会导致抑郁样行为,调节 Wnt 信号通路会使小鼠抑郁样行为减轻<sup>[40]</sup>。此外,研究者发现社会挫败与蛋白激酶/cAMP 反应原件结合蛋白<sup>[45]</sup>、糖原合成激酶 3 $\beta$ <sup>[46]</sup> 等信号通路有关。

综上所述,研究表明社会挫败与组蛋白甲基化、BDNF 调控以及 GABA<sub>B</sub>R 通路的表达等有关。此外,研究发现肠脑轴<sup>[47]</sup>、小胶质细胞<sup>[48]</sup> 等在社会挫败中也发挥了不可忽视的作用。

## 3 问题与展望

目前,神经精神类疾病已成为一大研究热点,但对社会挫败动物模型、发病机制及抗社会挫败药物的研究国内外相对较少。通过对近年来社会挫败动物模型及发病机制文献研究发现,主要存在以下问题:社会挫败的病因复杂、发病机制尚未完全阐明,因此,模型不能完全根据其发病因素造模;社会挫败动物模型类型较多,但目前尚无公认的社会挫败动物模型。因此,在未来的研究中,一方面要注重对社会挫败动物模型的研究;另一方面要进一步深入探讨社会挫败的发病机制,为抗社会挫败药物的研究提供理论依据。

## 参考文献:

- [ 1 ] 刘艺响. 社会挫败与人源化抑郁模型的系统生物学研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [ 2 ] 师培霞, 戴琴, 任辉. 社交挫败模型中应激量的确定以及奖赏在不同应激量下的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(20): 2023-2029.
- [ 3 ] 牛晨旭, 丁杰, 郝瀚, 等. 社交挫败应激对小鼠探索和绝望行为的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36(9): 993-995, 999.
- [ 4 ] Blanchard RJ, Blanchard DC. Aggressive behavior in the rat [J]. Behav Biol, 1977, 21(2): 197-224.
- [ 5 ] 李明星. Caspase-1 在慢性应激诱导的小鼠抑郁样行为中的作用及机制 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [ 6 ] 牛伟盼, 张月, 王瀚, 等. 慢性社会挫败应激对小鼠海马兴奋-抑制平衡和认知功能的影响 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2020, 46(5): 275-280.
- [ 7 ] 王乐, 李碧蓉, 肖志勇, 等. 二氢杨梅素改善慢性社会挫败应激小鼠认知与情感障碍 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(6): 496-500.
- [ 8 ] Golden SA, Covington HE, Berton O, et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice [J]. Nat Protoc, 2011, 6(8): 1183-1191.
- [ 9 ] 李丹丹. 母子分离对大鼠认知功能的影响及机制 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [ 10 ] 张传领, 邸桐, 王文婧, 等. 母婴分离应激对 rd 新生小鼠行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4): 89-93.
- [ 11 ] 赵莉, 覃媛, 蔡轶, 等. 新生期母子分离对大鼠 2 型糖尿病进程的影响 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(1): 69-74.
- [ 12 ] Gutiérrez-Menéndez A, Banqueri M, Méndez M, et al. How does maternal separation affect the cerebellum? assessment of the oxidative metabolic activity and expression of the c-Fos protein in male and female rats [J]. Cerebellum, 2020, 19(1): 68-77.
- [ 13 ] Lorigooini Z, Sadeghi Dehsahraei K, Bijad E, et al. Trigonelline through the attenuation of oxidative stress exerts antidepressant- and anxiolytic-like effects in a mouse model of maternal separation stress [J]. Pharmacology, 2020, 105(5-6): 289-299.
- [ 14 ] Park SS, Kim TW, Park HS, et al. Effects of treadmill exercise on activity, short-term memory, vascular dysfunction in maternal separation rats [J]. J Exerc Rehabil, 2020, 16(2): 118-123.
- [ 15 ] 吕文婷, 吴华丽, 裴思然, 等. 应激动物模型的研究进展 [J]. 湖北畜牧兽医, 2016, 37(6): 12-14.
- [ 16 ] 姜广宇, 董航, 杨福义, 等. 母子分离应激对 Complexin II 基因敲除鼠感觉门控的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(23): 3840-3841.
- [ 17 ] 林雪蛟. 哺乳期母子分离对 C57BL/6 雌性小鼠成年后抑郁样行为的影响及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [ 18 ] Ai H, Fang WQ, Hu HY, et al. Antidiabetic drug metformin ameliorates depressive-like behavior in mice with chronic restraint stress via activation of AMP-activated protein kinase [J]. Aging Dis, 2020, 11(1): 31-43.
- [ 19 ] Choi JH, Lee MJ, Cho IH. *Valeriana fauriei* exerts antidepressant-like effects through anti-inflammatory and antioxidant activities by inhibiting brain-derived neurotrophic factor associated in chronic restrained stress [J]. IBRO Reports, 2020, 23(3): 245-255.
- [ 20 ] Jangra A, Rajput P, Dwivedi DK, et al. Amelioration of repeated restraint stress-Induced behavioral deficits and hippocampal anomalies with taurine treatment in mice [J]. Neurochem Res, 2020, 45(4): 731-740.
- [ 21 ] Li ZH, Gao C, Peng J, et al. Multi-omics analysis of pathological changes in the amygdala of rats subjected to chronic restraint stress [J]. Behav Brain Res, 2020, 392: 112735.
- [ 22 ] 李世英, 谢云亮. 香附挥发油对慢性束缚应激小鼠焦虑行为的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(10): 2140-2143.
- [ 23 ] 王嘉南, 杨晶金. 小鼠应激抑郁模型建立研究进展 [J]. 台州学院学报, 2018, 40(6): 64-68, 74.
- [ 24 ] 耿婷婷, 汪婷婷, 姜劲峰, 等. 足底电击应激时程对大鼠焦虑样行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 69-72.
- [ 25 ] Lovelock DF, Deak T. Acute stress imposed during adolescence yields heightened anxiety in Sprague Dawley rats that persists into adulthood: sex differences and potential involvement of the medial amygdala [J]. Brain Res, 2019, 1723: 146392.
- [ 26 ] Zhang Q, Hu DX, He F, et al. Locus coeruleus-CA1 projections are involved in chronic depressive stress-induced hippocampal vulnerability to transient global ischaemia [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2942.
- [ 27 ] Burke AR, Watt MJ, Forster GL. Adolescent social defeat increases adult amphetamine conditioned place preference and alters D2 dopamine receptor expression [J]. Neuroscience, 2011, 197: 269-279.
- [ 28 ] 金玉祥, 陈嘉峰. 应激性防御反应过程中脑内一氧化氮合酶阳性神经元分布的变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2000, 16(1): 29-32.
- [ 29 ] 魏秀岩. 油酰胺对孤养模型小鼠行为学改变的影响及机制探讨 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [ 30 ] Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, et al. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 105: 1205-1222.
- [ 31 ] 魏秀岩, 杨静玉, 吴春福. 黄芩苷对孤养小鼠的抗焦虑作用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(2): 142-146.
- [ 32 ] 王振龙, 刘宗超, 付至江, 等. 杜仲提取物改善抑郁小鼠的

- 骨代谢机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(1): 50-53.
- [33] 刘佳琳. 肠道菌群介导的槲皮素抗抑郁作用及配伍机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [34] 陈宁, 黄燕. 艾氯胺酮对抑郁大鼠的作用效果及对 cAMP-PKA-CREB 信号通路的 [J]. 四川医学, 2019, 40(8): 785-789.
- [35] 郑慧玲.  $\alpha$ -DG 糖基化及其调节在慢性社会挫败应激所致小鼠抑郁样行为中的作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [36] Fang W, Zhang J, Hong LY, et al. Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation [J]. *J Affect Disord*, 2020, 260: 302-313.
- [37] Bilen M, Ibrahim P, Barmo N, et al. Methionine mediates resilience to chronic social defeat stress by epigenetic regulation of NMDA receptor subunit expression [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2020, 237(10): 3007-3020.
- [38] Tian T, Yang YT, Xu B, et al. Pigment epithelium-derived factor alleviates depressive-like behaviors in mice by modulating adult hippocampal synaptic growth and Wnt pathway [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2020, 98: 109792.
- [39] Wang CN, Gong SN, Guan W, et al. Hippocampal overexpression of chordin protects against the chronic social defeat stress-induced depressive-like effects in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 158: 31-39.
- [40] Hyman SE. How mice cope with stressful social situations [J]. *Cell*, 2007, 131(2): 232-234.
- [41] Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864-868.
- [42] Khalifeh M, Hobeika R, El Hayek L, et al. Nicotine induces resilience to chronic social defeat stress in a mouse model of water pipe tobacco exposure by activating BDNF signaling [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 382: 112499.
- [43] Jiang N, Lv JW, Wang HX, et al. Dammarane saponins alleviates depression-like behaviours induced by chronic social defeat stress in mice through the promotion of the BDNF signalling pathway and neurogenesis in the hippocampus [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 153: 239-249.
- [44] 毛莉. KCTD12 在慢性社会挫败应激诱导的小鼠抑郁样行为中的作用及机制 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [45] Wang W, Wang T, Bai SJ, et al. DI-3-n-butylphthalide attenuates mouse behavioral deficits to chronic social defeat stress by regulating energy metabolism via AKT/CREB signaling pathway [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 49.
- [46] 邓志芳. miR-214-3p 对慢性社会挫败应激所致小鼠抑郁样行为的作用及机制 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [47] Wang SM, Qu YG, Chang LJ, et al. Antibiotic-induced microbiome depletion is associated with resilience in mice after chronic social defeat stress [J]. *J Affect Disord*, 2020, 260: 448-457.
- [48] Nozaki K, Ito H, Ohgidani M, et al. Antidepressant effect of the translocator protein antagonist ONO-2952 on mouse behaviors under chronic social defeat stress [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 162: 107835.

[收稿日期]2020-12-12

李雪, 范俊芬, 王雨晴, 等. 中性粒细胞离子通道及其功能的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 117-122.  
Li X, Fan JF, Wang YQ, et al. Research progress on ion channels and their functions in neutrophils [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 117-122.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.017

## 中性粒细胞离子通道及其功能的研究进展

李 雪<sup>1</sup>, 范俊芬<sup>1</sup>, 王雨晴<sup>2</sup>, 罗玉敏<sup>1</sup>, 赵海莘<sup>1\*</sup>

(1.首都医科大学宣武医院, 脑血管病研究室, 北京 100053;  
2.北京中医药大学东方医院, 脑病一科, 北京 100078)

**【摘要】** 中性粒细胞作为免疫吞噬细胞, 参与许多生理及病理过程, 如炎症反应, 吞噬病原体, 清除肿瘤细胞, 清除坏死组织碎片等, 这些生理功能与中性粒细胞的离子通道密切相关。本文综述了中性粒细胞上存在的不同类型的离子通道及其在中性粒细胞中的作用, 包括电压门控质子通道、钾通道、ATP 门控 P2X<sub>1</sub> 通道以及氯通道等。着重阐述中性粒细胞离子通道介导的离子电导, 并总结了每个通道所介导和参与的中性粒细胞中的病理过程。从功能的角度讨论最近的发现, 以期待对疾病治疗靶点的选择有所帮助。

**【关键词】** 中性粒细胞; 离子通道; Hv1 通道; 瞬时受体电位通道; 氯通道; 活性氧; 趋化反应

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0117-06

### Research progress on ion channels and their functions in neutrophils

LI Xue<sup>1</sup>, FAN Junfen<sup>1</sup>, WANG Yuqing<sup>2</sup>, LUO Yumin<sup>1</sup>, ZHAO Haiping<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Cerebrovascular Diseases Research, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China.  
2. Department one of encephalopathy, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

**【Abstract】** As a major type of phagocyte, neutrophils are involved in many physiological and pathological processes that include inflammation, phagocytosis of pathogens, elimination of tumor cells, and removal of necrotic tissue debris, which are closely related to the ion channels in neutrophils. This review discusses various types of ion channels and their roles in neutrophils, which include voltage-gated proton channels, potassium channels, ATP-gated P2X<sub>1</sub> channels and chloride channels. With a focus on the ionic conductance mediated by partial ion channels in neutrophils, the pathological processes of neutrophils mediated by each channel are summarized. Recent findings are discussed from a functional perspective to contribute to selecting therapeutic targets.

**【Keywords】** neutrophils; ion channels; Hv1 channels; transient receptor potential channels; chloride channels; reactive oxygen species; chemotaxis

中性粒细胞是细胞免疫系统的主要组成部分, 以抵御病原体入侵。在炎症或损伤发生时, 中性粒细胞从血液中被募集, 从血管内游出并趋化到病灶, 吞噬杀伤病原微生物或变异细胞, 中性粒细胞发挥定向迁移、吞噬、产生活性氧等功能, 这一系列

过程需要精细调控, 中性粒细胞膜离子通道在其中发挥了至关重要的作用。中性粒细胞膜离子通道包括电压门控质子通道 (voltage-gated proton channel/voltage-sensing domain only protein, Hv1/V SOP)、钾通道、ATP 门控 P2X<sub>1</sub> 通道以及氯通道。

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (82071314, 82171301); 2021 北京市科技新星计划交叉学科合作课题 (Z211100002121017)。

**【作者简介】** 李雪 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 脑血管病的免疫机制。E-mail: lixue7976@163.com

**【通信作者】** 赵海莘 (1979—), 研究员, 研究方向: 脑血管病的免疫机制。E-mail: zhaohaiping1980@163.com

## 1 中性粒细胞的生理功能

中性粒细胞来自于骨髓造血系统,在炎症发生时,成熟的中性粒细胞从骨髓释放到血液,再从血液中被招募到感染或者炎症的部位。病原体或炎症病灶导致组织巨噬细胞和肥大细胞产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 或白介素等细胞因子,诱导内皮细胞活化和细胞表面粘附因子的表达,从血液中招募中性粒细胞。这一级联反应包括招募、滚动、粘附、血管内迁移、游出,许多综述详细地阐述了这一过程<sup>[1-2]</sup>。

迁移能力是中性粒细胞的重要特征之一。迁移在血管内爬行时起作用,使中性粒细胞越过内皮到达适当的位置,比如迁移到炎症部位,对抗病原体。最近的证据表明,反向迁移有助于消除炎症,即中性粒细胞从严重病灶处迁移走<sup>[3-4]</sup>。内皮细胞中的选择素和细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 以及粒细胞中的 P-选择素糖蛋白配体 1 (p-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL1) 和  $\beta$  整合素是这些过程的重要粘附受体。中性粒细胞被内皮表面的趋化物激活,触发整合素的构象变化,从而加强中性粒细胞与内皮细胞的粘附,这对于随后的中性粒细胞游出非常重要<sup>[5]</sup>。 $\alpha\beta$  整合素的缺失,会导致明显的迁移延迟<sup>[6]</sup>。另一方面,正确的迁移需要罗盘机制和引擎机制双重调控,才能使中性粒细胞准确迁移至病灶部位。

中性粒细胞,类似于巨噬细胞和树突状细胞,是专门的吞噬细胞,以受体介导的方式将病原颗粒或细胞碎片潜在吞噬并内化。作为血液中最多的吞噬细胞,中性粒细胞在防止病原体传播方面发挥着不可或缺的作用。中性粒细胞的杀菌作用,也与细胞膜电位的平衡有关。中性粒细胞吞噬并夹带这些颗粒进入吞噬体。在“吞噬体成熟”过程中,它们与提供酶和酸性(在巨噬细胞中)或初始碱性(在中性粒细胞中)环境的其他囊泡融合,用以进行颗粒消化<sup>[7-8]</sup>。

中性粒细胞主要在其吞噬体内产生活性氧,在 NADPH 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2) 驱动的“氧爆发”过程中,活化的中性粒细胞氧耗增加。NOX2 由膜结合成分和胞质成分组成。Gp91<sub>phox</sub> 和 p22<sub>phox</sub> (NADPH 氧化酶亚基) 主要 (85%) 存在于特定颗粒的膜中。剩下的 15% 在分泌囊泡和质膜中表达<sup>[9]</sup>。膜结合的 NOX2 复合物介导 NADPH 的电

子释放,并将其转运到吞噬体外或细胞外。NOX2 有生电作用,并且其活性受膜电位的调节,因此需要电荷平衡<sup>[7,10]</sup>,即需要平衡细胞膜内外的电荷,以保证 NOX2 保持其活性。源于 NADPH 氧化的电子将分子氧还原为超氧化物 ( $O_2^-$ ),通过超氧化物歧化酶 (superoxide dismutases, SOD) 转化为  $H_2O_2$ ,随后髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 介导过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 和氯分子 ( $Cl_2$ ) 的反应,形成具有强氧化性的分子次氯酸 (HOCl) 分子,产生强杀菌作用。

本文主要关注的中性粒细胞膜离子通道包括电压门控质子通道 (Hv1/VSOP)、钾通道、ATP 门控  $P2X_1$  通道以及氯通道。下面将分别介绍这些离子通道及其功能。

## 2 电压门控质子通道 (voltage-gated proton channel/voltage-sensing domain only protein, Hv1/VSOP)

电压门控质子通道是调节中性粒细胞和其他免疫细胞免疫反应的关键分子之一,其主要功能是在细胞呼吸爆发时维持细胞内外 pH 平衡和电荷补偿,并参与活性氧的产生。

Hv1 由氢离子电压门控通道蛋白 1 (hydrogen voltage gated channel protein 1, HVCN1) 基因编码,是介导质子 ( $H^+$ ) 在细胞膜上快速运动的膜蛋白<sup>[10-11]</sup>。当中性粒细胞发挥吞噬作用时,细胞内 pH 值 ( $pH_i$ ) 急剧下降,随后迅速恢复。这种酸化反应是由于 NADPH 氧化酶产生的  $H^+$  引起的<sup>[12]</sup>,  $Zn^{2+}$  作为 Hv1 的抑制剂,在  $Zn^{2+}$  存在或 HVCN1 缺陷的细胞中细胞液酸化会更快<sup>[12]</sup>,与野生型小鼠的中性粒细胞相比,  $Hv1^{-/-}$  中性粒细胞的胞浆酸性更强<sup>[13]</sup>。与之相反则细胞液酸化很快被调节,是 Hv1 的作用使  $pH_i$  迅速恢复。由此可知, Hv1 执行维持中性粒细胞 pH 平衡这个重要任务。

另外观察到 Hv1 缺乏的小鼠中性粒细胞去极化程度更高<sup>[13]</sup>,这说明质子通道的另一个重要作用是为去极化电子流提供补偿电荷<sup>[14]</sup>,这对呼吸爆发期间维持 NADPH 氧化酶的活性至关重要。中性粒细胞 NADPH 氧化酶产生的电子电流,使膜去极化,如果没有补偿机制,跨膜电子传输强度高到足以产生无法承受的膜去极化和细胞内酸化,最终会阻断氧化酶本身的活性。中性粒细胞 NADPH 氧化酶产生的去极化必须通过离子转运来抵消,恰好 Hv1 发挥了电荷补偿的功能。所以,质子流的主要功能是维持细胞呼吸爆发时的 pH 平衡和电荷补偿<sup>[15]</sup>。

此外,在中性粒细胞的离子通道中同样发挥电荷补偿作用的还有氯通道。

此外,许多研究都支持这样一个概念——HVCN1 是活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生所必需的最佳选择<sup>[16]</sup>。VSOP/Hv1 支持中性粒细胞吞噬活动中 ROS 的产生<sup>[17]</sup>,在 HVCN1<sup>-/-</sup>斑马鱼模型中观察到,HVCN1 缺乏显著降低了中性粒细胞的 ROS 生成<sup>[18]</sup>。在体外培养的 HVCN1 缺陷的斑马鱼幼体中性粒细胞中,NADPH 氧化依赖性细菌杀伤显著降低<sup>[19]</sup>,Hv1<sup>-/-</sup>小鼠中性粒细胞产生的超氧化物和过氧化氢减少<sup>[13]</sup>。除上文提到的 Zn<sup>2+</sup> 作为 Hv1 的抑制剂外,钴离子(Co<sup>2+</sup>)对 Hv1 似乎也有抑制作用。研究表明,在最大浓度为 100 μmol/L Co<sup>2+</sup> 时,Co<sup>2+</sup> 可使人中性粒细胞杀伤两株表皮葡萄球菌的能力降低 7 倍<sup>[20]</sup>。有趣的是 Hv1 存在一种新的未预料到的活性,有研究部分提示 Hv1 抑制嗜天青颗粒酶(包括 MPO)的胞吐,导致的杀伤微生物的次氯酸 HOCl 生成减少<sup>[21]</sup>,这形成一个有趣的悖论,即 Hv1 维持中性粒细胞 NOX2 活性且促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,但抑制次氯酸 HOCl 的形成,其详细机制仍待进一步研究。

### 3 K<sup>+</sup>通道

中性粒细胞表面的钾离子通道包括钙激活 K 通道、内向整流钾通道和 ATP 敏感性钾通道,在中性粒细胞不同的病理生理过程中分别发挥作用。

#### 3.1 钙激活钾电流(calcium-activated potassium channel, KCa<sub>3.1</sub>)

钙激活钾电流 KCa<sub>3.1</sub> 通道是钙激活钾通道家族的一员。电生理记录表明,在人类中性粒细胞中存在钙活性钾电流<sup>[22]</sup>,Henriquez 等<sup>[23]</sup> 首次证明 KCa<sub>3.1</sub> 在哺乳动物中性粒细胞中表达。KCa<sub>3.1</sub> 参与中性粒细胞的容积调节,当 KCa<sub>3.1</sub> 被阻断时,离子霉素诱导的中性粒细胞更易肿胀。KCa<sub>3.1</sub> 还影响中性粒细胞的趋化性,KCa<sub>3.1</sub> 抑制剂 TRAM-34 培养中性粒细胞时,显著降低白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)和 fMLP 诱导的趋化反应,并且中性粒细胞 KCa<sub>3.1</sub> 的活性是细胞迁移“引擎机制”的重要组成部分,但是抑制 KCa<sub>3.1</sub> 不影响细胞内钙稳态或呼吸爆发<sup>[23]</sup>。这提示 KCa<sub>3.1</sub> 对中性粒细胞趋化迁移有作用,但对其杀伤功能的作用还有待发掘。

#### 3.2 内向整流钾电流 K<sub>2.1</sub>

通过 RT-PCR 研究显示,小鼠骨髓和肝的静息

中性粒细胞表达内向整流钾电流 Kir<sub>2</sub> 亚基 Kir<sub>2.1</sub> 的 mRNA,但不表达其他亚基(Kir<sub>2.2</sub>、Kir<sub>2.3</sub> 和 Kir<sub>2.4</sub>)的 mRNA,并呈现具有同型 Kir<sub>2.1</sub> 通道电流特征的电流。在缺乏对中性粒细胞增殖重要的生长因子[粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)]的情况下,骨髓中性粒细胞短期培养的电流密度降低。该研究表明小鼠中性粒细胞表达功能性 Kir<sub>2.1</sub> 通道,并提示这些通道可能对中性粒细胞的功能很重要,可能以生长因子依赖的方式发挥作用<sup>[24]</sup>。但是,该内向整流钾电流是否在人类中性粒细胞中表达,至今尚未有文献报道。

#### 3.3 ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive potassium channel, K<sub>ATP</sub>)

ATP 敏感性钾通道是一类耦联细胞代谢和电活动、以细胞内的 ATP/ADP 水平为门控因素、非电压依赖性的特殊钾离子通道,与中性粒细胞的趋化性相关。硫化氢(H<sub>2</sub>S)通过 K-ATP 通道依赖机制抑制 G 蛋白耦联受体激酶 2(G protein-coupled receptor kinase 2, GRK<sub>2</sub>)的表达来阻止 CXC 趋化因子受体(CXC chemokine receptor 2, CXCR2)的内化,增强中性粒细胞趋化反应,因此,体外实验与对照组相比,骨髓中性粒细胞与 NaHS(硫化氢钠, 300 μmol/L, NaHS 试剂能够在体外以浓度依赖的方式释放硫化氢)在 37℃ 孵育 1 h 后,巨噬细胞炎性蛋白-2(neutralization of macrophage inflammatory protein 2, MIP-2)诱导的中性粒细胞趋化性显著增加;体内实验显示 H<sub>2</sub>S 通过激活 K-ATP 通道抑制严重脓毒症诱导的细胞间黏附分子(ICAM-1)下调,这提示 H<sub>2</sub>S 有利于中性粒细胞募集到感染病灶,防止中性粒细胞迁移失败,减少细菌扩散,防止低血压,并将小鼠存活率从大约 12% 提高到约 80%<sup>[25]</sup>。

临床上,有一个常用的 ATP 敏感钾通道抑制剂——格列本脲,格列本脲可抑制中性粒细胞的迁移和趋化,并在急性炎症反应期间影响血浆渗出,其影响可能与其 ATP 敏感钾(K<sub>ATP</sub>)通道活性被阻断有关<sup>[26]</sup>。Pompermayer 等<sup>[27]</sup> 的实验验证了这一猜想,格列本脲显著抑制了再灌注诱导的中性粒细胞聚集与升高的肾血管通透性,对大鼠肾缺血再灌注损伤有保护作用。此外,格列本脲可减轻顺铂所致肾损害<sup>[28-29]</sup>,但具体机制是否与阻断 ATP 敏感钾通道有关,仍需进一步研究。

#### 4 ATP 门控离子通道 P2X<sub>1</sub>

P2X<sub>1</sub> 受体(P2RX<sub>1</sub>)表达于参与血管内稳态和/或免疫的多种细胞类型上,即动脉平滑肌细胞(SMCs)、中性粒细胞、巨噬细胞和血小板<sup>[30]</sup>。P2RX<sub>1</sub> 在中性粒细胞上的功能,主要可以降低中性粒细胞活化和迁移。人中性粒细胞表达功能性 P2X<sub>1</sub> 离子通道,全细胞膜片钳显示,两种 P2X<sub>1</sub> 激动剂—— $\beta$ , $\gamma$ -methylene ATP ( $\beta$ , $\gamma$ -MeATP) 和  $\alpha$ , $\beta$ -MeATP ( $\alpha$ , $\beta$ -methylene ATP) 可诱发快速脱敏内向电流,这些电流通过激活 RhoA-ROCK 通路促进中性粒细胞趋化性;反之,在 P2X<sub>1</sub><sup>-/-</sup> 小鼠腹膜分离的中性粒细胞中静态粘附受损,速度降低,后缘回缩时间延长<sup>[31]</sup>。另外发现 P2X<sub>1</sub><sup>-/-</sup> 中性粒细胞产生更多的活性氧。LPS 处理的 P2X<sub>1</sub><sup>-/-</sup> 小鼠血液中髓过氧化物酶的释放量增加,循环中性粒细胞和单核细胞表达更高水平的整合素  $\alpha$ M (CD11b),小鼠对感染性休克的易感性增加,说明 P2X<sub>1</sub> 离子通道的抑制或缺失导致中性粒细胞过度活化和氧化反应,也就是说 P2X<sub>1</sub> 离子通道通过负性调节全身中性粒细胞活化和趋化性,从而限制氧化反应和器官损伤,在内毒素血症中起保护作用<sup>[32]</sup>。

#### 5 氯通道

氯通道在中性粒细胞中的主要作用是平衡细胞呼吸爆发所致的膜过度去极化,即电荷补偿。中性粒细胞 NADPH 氧化酶产生的电子电流( $I_e$ )是生电性的<sup>[33]</sup>,它能迅速地使膜电位去极化。为了保证 NADPH 氧化酶功能的持续, $I_e$  必须保持平衡以保持电中性,否则过分的去极化将阻止电子离开细胞,中性粒细胞将失去功能。中性粒细胞 NADPH 氧化酶产生的去极化必须通过离子转运来抵消<sup>[34]</sup>。在中性粒细胞中,膨胀激活的氯离子通道和电压门控质子通道都可以抵消吞噬细胞 NADPH 氧化酶诱导的去极化<sup>[35]</sup>。中性粒细胞与其他细胞不同,静息细胞内的 Cl<sup>-</sup> 浓度很高<sup>[36]</sup>,在中性粒细胞中氯离子通道抑制剂抑制呼吸爆发已有报道<sup>[37]</sup>,正常中性粒细胞氧化功能需要阴离子通道 CIC-3<sup>[37]</sup>。活化的中性粒细胞体积膨胀<sup>[38]</sup>,在中性粒细胞中观察到肿胀活化氯电流 (swelling-activated chloride currents, ICl<sub>swell</sub>),膨胀激活的氯离子通道可以抵消 NADPH 氧化酶所致的膜的去极化<sup>[34-35]</sup>。Ahluwalia<sup>[35]</sup> 首次在中性粒细胞中证明,在质膜水平上,暴露于生理

相关的细胞内和细胞外氯离子浓度下,膨胀激活的氯离子通道激活可以抵消吞噬细胞 NADPH 氧化酶所致的细胞膜去极化。由此推测 ICl<sub>swell</sub> 和电压门控氯通道家族蛋白成员 3 (voltage-gated chloride channel family protein 3, CIC-3) 在活化的中性粒细胞中可能具有相似的特性。

此前,CIC-3 被认为是 ICl<sub>swell</sub> 的候选分子<sup>[39]</sup>。那么,中性粒细胞中 CIC-3 产生的电流是否与 ICl<sub>swell</sub> 相同呢? 值得注意的是,CIC-3 产生的电流具有许多特性,与在 ICl<sub>swell</sub> 中观察到的电流相似<sup>[39]</sup>,如果 ICl<sub>swell</sub> 通道以杂多聚体的形式存在,则可能与 CIC-3 形成复合物,它们一起可能抵消 NADPH 氧化酶产生的去极化<sup>[34]</sup>。至于中性粒细胞中 CIC-3 产生的电流是否与 ICl<sub>swell</sub> 相同仍需要进一步的实验来解决争议。

在膜片钳实验中,人和小鼠中性粒细胞在传统的全细胞模式下透析,观察到一个氯离子电流在细胞透析后被激活,这种电流主要由细胞质离子强度调节。这种电流类似于经典的、普遍存在的体积敏感型外向整流电流的特点:强烈的外向整流、艾森曼 Eisenman1 型的选择性序列、对外界 pH 值不敏感以及三苯氧胺、DCPIB(一种体积敏感阴离子通道阻滞剂和 ICl<sub>swell</sub> 阻滞剂) 和 WW781 的强烈抑制。Behe 等<sup>[40]</sup> 发现这种电流基本上是由富含亮氨酸的 8A 重复序列 (leucine-rich repeat-containing 8A, LRRC8A) 支持的。在 LRRC8A 外显子 3 中具有移码突变的 ebo/ebo 小鼠,其自然发生的 LRRC8A 截短突变,突变不影响蛋白表达,但会显著降低 VRAC (volume regulated anion channel, 体积调控性阴离子通道) 活性,这种突变大大降低了中性粒细胞的 Cl<sup>-</sup> 电导。这些 ebo/ebo 中性粒细胞是有吞噬能力的细胞,pH 值的升高保持不变,其吞噬和呼吸爆发能力保持不变,空泡大小正常,与野生型的同类细胞没有区别,这表明中性粒细胞基于 LRRC8A 的 Cl<sup>-</sup> 电导对空泡的吞噬和内稳态不是必需的。因此,中性粒细胞的 LRRC8A 依赖性电导在很大程度上解释了其“膨胀激活”Cl<sup>-</sup> 电流,但并不是吞噬体杀伤室的稳态所必需<sup>[40]</sup>。另外,最近发现的 LRRC8A 蛋白介导的氯电流<sup>[41]</sup> 参与调节使细胞体积减小,可部分影响人类中性粒细胞的迁移<sup>[42]</sup>,可见氯电流在细胞迁移方面也存在潜在作用。

#### 6 总结与展望

本文概述了中性粒细胞中离子通道功能的当

前研究结果,包括 Hv1 通道、钾通道、ATP 门控的 P2X<sub>1</sub> 通道和氯通道几个部分,涉及中性粒细胞 pH 平衡、电荷补偿、趋化性、粘附性、侵袭力、ROS 产生等功能。将各离子通道按其相关的中性粒细胞功能分类大致如下:(1)pH 平衡:Hv1/VOSP;(2)电荷补偿:Hv1/VOSP、膨胀激活氯通道、LRRC8A 依赖性氯电流;(3)促活性氧产生:Hv1/VOSP;(4)负性调节活性氧产生:ATP 门控 P2X<sub>1</sub> 通道;(5)趋化性:KCa<sub>3.1</sub>(引擎机制),K-ATP;(6)负性调节趋化性:ATP 门控 P2X<sub>1</sub> 通道。如 Hv1/VOSP 促进活性氧产生提高杀伤作用、P2X<sub>1</sub> 对内毒素血症的保护作用,可见中性粒细胞离子通道的功能对某些疾病的发生发展和治疗有预测和指导作用,离子通道阻断或增强可作为一种潜在的治疗选择。然而,我们对已知的中性粒细胞离子通道的电生理特性的了解仍然相当初级,离子通道在中性粒细胞功能中的作用还未被完全理解,对其他通道是否在中性粒细胞中表达及其功能还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Marki A, Esko JD, Pries AR, et al. Role of the endothelial surface layer in neutrophil recruitment [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 98(4): 503-515.
- [ 2 ] Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(3): 159-175.
- [ 3 ] Powell D, Tauzin S, Hind LE, et al. Chemokine signaling and the regulation of bidirectional leukocyte migration in interstitial tissues [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(8): 1572-1585.
- [ 4 ] Colom B, Bodkin JV, Beyrau M, et al. Leukotriene B<sub>4</sub>-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration *in vivo* [J]. *Immunity*, 2015, 42(6): 1075-1086.
- [ 5 ] Herter J, Zarbock A. Integrin regulation during leukocyte recruitment [J]. *J Immunol*, 2013, 190(9): 4451-4457.
- [ 6 ] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(12): 2569-2575.
- [ 7 ] Wang GS. Chloride flux in phagocytes [J]. *Immunol Rev*, 2016, 273(1): 219-231.
- [ 8 ] Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils [J]. *Microbes Infect*, 2003, 5(14): 1299-1306.
- [ 9 ] Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2013, 18(6): 642-660.
- [ 10 ] Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, et al. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain [J]. *Nature*, 2006, 440(7088): 1213-1216.
- [ 11 ] Sasaki M, Takagi M, Okamura Y. A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel [J]. *Science*, 2006, 312(5773): 589-592.
- [ 12 ] Morgan D, Capasso M, Musset B, et al. Voltage-gated proton channels maintain pH in human neutrophils during phagocytosis [J]. *P Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(42): 18022-18027.
- [ 13 ] El Chemaly A, Okochi Y, Sasaki M, et al. VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(1): 129-139.
- [ 14 ] Decoursey TE. Voltage-gated proton channels: what's next? [J]. *J Physiol*, 2008, 586(22): 5305-5324.
- [ 15 ] Murphy R, Decoursey TE. Charge compensation during the phagocyte respiratory burst [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(8): 996-1011.
- [ 16 ] Capasso M, Decoursey TE, Dyer MJ. pH regulation and beyond: unanticipated functions for the voltage-gated proton channel, HVCN1 [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(1): 20-28.
- [ 17 ] Kawai T, Okochi Y, Ozaki T, et al. Unconventional role of voltage-gated proton channels (VSOP/Hv1) in regulation of microglial ROS production [J]. *J neurochem*, 2017, 142(5): 686-699.
- [ 18 ] Ratanayotha A, Kawai T, Okamura Y. Real-time functional analysis of Hv1 channel in neutrophils: a new approach from zebrafish model [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2019, 316(6): R819-R831.
- [ 19 ] Ramsey IS, Ruchti E, Kaczmarek JS, et al. Hv1 proton channels are required for high-level NADPH oxidase-dependent superoxide production during the phagocyte respiratory burst [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(18): 7642-7647.
- [ 20 ] Daou S, El Chemaly A, Christofilopoulos P, et al. The potential role of cobalt ions released from metal prosthesis on the inhibition of Hv1 proton channels and the decrease in *Staphylococcus epidermidis* killing by human neutrophils [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(7): 1769-1777.
- [ 21 ] Clark RA. Editorial; Proton pathway paradox: Hv1 H<sup>+</sup> channel sustains neutrophil Nox2 activity, yet suppresses HOCl formation [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 1-4.
- [ 22 ] Von Tscharner V, Prod'homme B, Baggolini M, et al. Ion channels in human neutrophils activated by a rise in free cytosolic calcium concentration [J]. *Nature*, 1986, 324(6095): 369-372.
- [ 23 ] Henriquez C, Riquelme TT, Vera D, et al. The calcium-activated potassium channel KCa<sub>3.1</sub> plays a central role in the chemotactic response of mammalian neutrophils [J]. *Acta Physiol*, 2016, 216(1): 132-145.
- [ 24 ] Masia R, Krause DS, Yellen G. The inward rectifier potassium channel Kir<sub>2.1</sub> is expressed in mouse neutrophils from bone marrow and liver [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(3): C264-C276.
- [ 25 ] Spiller F, Orrico MI, Nascimento DC, et al. Hydrogen sulfide

- improves neutrophil migration and survival in sepsis via  $K^+$  ATP channel activation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(3): 360–368.
- [26] Da Silva-Santos JE, Santos-Silva MC, Cunha Fde Q, et al. The role of ATP-sensitive potassium channels in neutrophil migration and plasma exudation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300(3): 946–951.
- [27] Pompermayer K, Souza DG, Lara GG, et al. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Kidney Int*, 2005, 67(5): 1785–1796.
- [28] Namazi H. ATP-sensitive potassium channel blockage attenuates cisplatin-induced renal damage: a novel molecular mechanism [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(3): 163.
- [29] Flavio AG, Cunha FQ, Francescato HD, et al. ATP-sensitive potassium channel blockage attenuates cisplatin-induced renal damage [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2007, 30(5): 289–298.
- [30] El Mdawar MB, Maitre B, Magnenat S, et al. The ATP-gated  $P2X_1$  ion channel contributes to the severity of antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5159.
- [31] Lecut C, Frederix K, Johnson DM, et al.  $P2X_1$  ion channels promote neutrophil chemotaxis through Rho kinase activation [J]. *J Immunol*, 2009, 183(4): 2801–2809.
- [32] Lecut C, Faccineto C, Delierneux C, et al. ATP-gated  $P2X_1$  ion channels protect against endotoxemia by dampening neutrophil activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(3): 453–465.
- [33] Henderson LM, Chappell JB, Jones OT. The superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils is electrogenic and associated with an  $H^+$  channel [J]. *J Biochem*, 1987, 246(2): 325–329.
- [34] Salmon MD, Ahluwalia J. Swell activated chloride channel function in human neutrophils [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 462–465.
- [35] Ahluwalia J. Chloride channels activated by swell can regulate the NADPH oxidase generated membrane depolarisation in activated human neutrophils [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2): 328–333.
- [36] Simchowit L, De Weer P. Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange, and active transport [J]. *J Gen Physiol*, 1986, 88(2): 167–194.
- [37] Moreland JG, Davis AP, Bailey G, et al. Anion channels, including  $ClC-3$ , are required for normal neutrophil oxidative function, phagocytosis, and transendothelial migration [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(18): 12277–12288.
- [38] Grinstein S, Furuya W, Cragoe EJ Jr. Volume changes in activated human neutrophils: the role of  $Na^+/H^+$  exchange [J]. *J Cell Physiol*, 1986, 128(1): 33–40.
- [39] Duan D, Winter C, Cowley S, et al. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 417–421.
- [40] Behe P, Foote JR, Levine AP, et al. The LRRC8A mediated “Swell Activated” chloride conductance is dispensable for vacuolar homeostasis in neutrophils [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 262.
- [41] Pedersen SF, Klausen TK, Nilius B. The identification of a volume-regulated anion channel: an amazing odyssey [J]. *Acta Physiol*, 2015, 213(4): 868–881.
- [42] Volk AP, Heise CK, Hougen JL, et al.  $ClC-3$  and  $ICl_{swell}$  are required for normal neutrophil chemotaxis and shape change [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(49): 34315–34326.

[收稿日期]2021-01-20

柳森森, 毛玉宁, 张彩勤, 等. MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 123-128.  
Liu SS, Mao YN, Zhang CQ, et al. The role of MMP2 in tumor invasion and metastasis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 123-128.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.018

## MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究

柳森森<sup>1#</sup>, 毛玉宁<sup>1,2#</sup>, 张彩勤<sup>1</sup>, 师长宏<sup>1\*</sup>

(1.空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 2.延安大学医学院, 陕西 延安 716000)

**【摘要】** 肿瘤的侵袭和转移与诸多因素相关, 是造成癌症病人不良预后的重要原因。肿瘤发生转移的前提条件是突破细胞外基质 (ECM) 这一天然屏障。基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 具有独特的酶活性, 有突破 ECM 的能力, 可促进肿瘤转移的发生。在多种恶性肿瘤中, MMP2 通过调节多种通路影响着肿瘤的浸润、转移及预后, 很可能成为一种癌症转移预测的标志物。本文就 MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制进行综述, 以期为恶性淋巴瘤的诊断和治疗提供新的靶点。

**【关键词】** MMP2; 转移; 侵袭

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0123-06

### The role of MMP2 in tumor invasion and metastasis

LIU Sensen<sup>1#</sup>, MAO Yuning<sup>1,2#</sup>, ZHANG Caiqin<sup>1</sup>, SHI Changhong<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032, China.

2. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000)

**【Abstract】** A poor prognosis in cancer patients is closely related to tumor invasion and metastasis, which is affected by many factors. A prerequisite for tumor metastasis is the breakdown of the extracellular matrix (ECM), which is a natural cellular barrier. Matrix metalloproteinase-2 (MMP2) has a unique enzymatic activity with the ability to break through the ECM, which may promote tumor metastasis. MMP2 influences tumor invasion, metastasis and patient prognosis through various regulatory pathways in different malignant tumors and may be a marker for predicting cancer metastasis. This review demonstrates the role of MMP2 in tumor invasion and metastasis and proposes MMP2 as a new target for the diagnosis and treatment of malignant tumors.

**【Keywords】** MMP2; metastasis; invasion

侵袭和转移是肿瘤预后不良的重要原因, 其发生涉及多个因素, 如肿瘤细胞之间的粘附力减弱, 细胞外基质降解等, 都会促进肿瘤的转移。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 作为肿瘤侵袭和转移的天然屏障, 有效的阻止了肿瘤的转移。但是许

多的恶性肿瘤往往是发生转移的, 转移的肿瘤需要有降解 ECM 的能力, 而 ECM 的降解需要特异性蛋白酶发挥作用。发挥主要作用的有四种酶, 基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶和天门冬氨酸蛋白酶, 它们基本能降解 ECM 中大多成分,

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (31772546)。

**【作者简介】** 柳森森 (1999—), 男, 本科生, 研究方向: 肿瘤动物模型的制备与评价。E-mail: 2371913480@qq.com

毛玉宁 (1998—), 女, 硕士生, 研究方向: 肿瘤分子病理与药物研究。E-mail: yuningmao98@163.com

#共同第一作者

**【通信作者】** 师长宏 (1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

其中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 发挥了重要作用。MMPs 是锌依赖性内切蛋白酶家族, 在机体的生理过程中起着重要的作用, 包括组织重塑、器官发育<sup>[1]</sup>、炎症过程的调节<sup>[2]</sup> 以及癌症等疾病<sup>[3]</sup>。现已报道的 MMPs 有 20 多种, 根据其结构特点以及对作用底物的敏感性不同将 MMPs 分为五类: 间质胶原酶 (MMP1、MMP8、MMP13); 明胶酶 (MMP2、MMP9); 间质溶解素 (MMP3、MMP7、MMP10); 膜型基质金属蛋白酶 (MMP14、MMP15、MMP16、MMP17); 其他类 (MMP11 等)<sup>[4]</sup>。明胶酶因其独特的酶活性可以降解 IV 型胶原蛋白, 使基底膜形成缺损, 导致癌细胞的转移, 因此在肿瘤研究中格外引起人们的关注。

虽然 MMP2 和 MMP9 降解底物中存在大量的相同成分, 但 MMP9 无直接水解胶原蛋白的能力<sup>[5]</sup>。MMP2 因其独特的作用机制, 可介导细胞外基质降解, 最终导致肿瘤细胞侵袭和转移<sup>[6]</sup>。本文就 MMP2 在肿瘤侵袭和转移中发挥作用的调控机制研究进行综述, 以期为恶性肿瘤的诊断和治疗提供新靶点。

## 1 MMP2 的结构与功能

典型的 MMP 由前肽、催化金属蛋白酶的结构域、连接肽 (铰链区) 以及血凝素结构域组成。前肽具有半胱氨酸开关 PRCGXPD, 其中半胱氨酸巯基 (-sH) 基团与活性位点锌离子螯合, 使 MMP 保持潜在的 MMP2 前体 (Pro MMP) 酶原形式<sup>[7]</sup>。催化结构域包括锌离子结合基序序列 HEXXHXXGXXH, 2 个 Zn<sup>2+</sup> 离子 (1 个起催化作用, 1 个维持结构作用)。其特异性的 S1, S2, …Sn 和 S1', S2', …Sn' 口袋 (赋予特异性) 与 2 个或 3 个 Ca<sup>2+</sup> 结合和保持稳定<sup>[7]</sup>。

明胶酶包括明胶酶 A (MMP2) 和明胶酶 B (MMP9), 它们在结构上与 MMP 家族中的其他蛋白酶类似, 但不同之处在于它们有 1 个独特的胶原结合结构域, 该结构域由催化结构域 N 端 3 个 II 型纤维连接蛋白串联重复序列组成, 这是与明胶结合所必须的<sup>[8]</sup>。已证实, MMP2 和 MMP9 主要参与 ECM 蛋白水解, 但 MMP9 无直接水解胶原蛋白的能力<sup>[5]</sup>, 因此 MMP2 在肿瘤研究中更加广泛。

MMP2 也被称为明胶酶 A 或 IV 型胶原酶, 在染色体 16q13-q21 上有 1 个基因座。MMP2 切割胶原分为两个阶段, 第一个阶段类似于间质胶原酶可降解间质胶原, 第二个阶段是纤维连接蛋白结构域促

进的明胶溶解<sup>[9-10]</sup>。pro-MMP2 被募集到细胞表面, 在膜型基质金属蛋白酶 (membrane type matrix metalloproteinase, MT-MMP) 复合物的支持下, 在细胞表面进行自催化裂解, 从而在细胞内积累并引起明显的局部胶原溶解活性的提升, 发挥降解细胞外基质的作用, 从而促进肿瘤转移的发生。已证实, 胃癌的发生与幽门螺杆菌 (HP) 的感染密切相关。HP 可上调 MMPs 的活性<sup>[11]</sup>, 其作用的机制为促进 MMPs 分泌以及其他多种因素共同作用促进胃癌的侵袭与转移。

MMPs 的调控因素错综复杂但又相互关联, 这种复杂的调控机制维持着机体内生理状态下 ECM 的正常状态, 但是在病理状态下, MMPs 功能的异常, 常常成为肿瘤侵袭和转移的主要原因。肿瘤细胞分泌或诱导间质细胞产生蛋白酶, 溶解细胞外基质成分, 使基底膜形成缺损, 更有利于肿瘤细胞的通过, 造成肿瘤的转移。

## 2 调控 MMP2 发挥作用的信号分子

### 2.1 GLUT1 调控 MMP2 在肿瘤细胞中的表达

肿瘤细胞在增殖和侵袭方面需要消耗更多的能量, 通过线粒体有氧呼吸获取能量已不能满足需求, 于是这些恶性增殖的细胞通过糖酵解获得能量。葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 是糖酵解的限速酶, 肿瘤细胞的增殖和侵袭所需的大量能量来自于糖酵解, 因此可通过对 GLUT1 的调控来影响肿瘤的发生发展。研究表明, GLUT1 与 MT1-MMP 有关, MT-MMP 可锚定于细胞膜表面, 以水溶性酶形式存在, MT1-MMP 是首个被发现的 MT-MMP, 在肿瘤的侵袭、转移等方面发挥重要作用。MMP2 的生成过程中, MT1-MMP 与 TIMP2 形成复合物, 使 pro-MMP2 连接到细胞膜表面受体, 随后 pro-MMP2 通过蛋白水解机制转化为活化的 MMP2。MT1-MMP 作为 MMP2 的上游分子, 在 MMP2 的激活中发挥重要的作用, 因此被称为 MMP2 的诱导剂<sup>[12]</sup>。Liao 等<sup>[13]</sup> 研究表明, 细胞中过表达 GLUT1, 可以使 MT1-MMP 和 MMP2 的表达升高, 提示 GLUT1/MT1-MMP2/MMP2 在肿瘤侵袭和转移中起重要作用。

因为 MMP2 在降解 IV 型胶原蛋白中具有酶促活性, 现在人们普遍认为 MMP2 可作为一种肿瘤侵袭和转移的生物标志物<sup>[14]</sup>。MMP2 可降解 IV 型胶原蛋白, 从而使恶性肿瘤细胞通过受损的基底膜侵

入淋巴和血管,使肿瘤细胞迁移到邻近的组织器官中<sup>[15]</sup>。GLUT1 通过影响 MT1-MMP/MMP2 的表达促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[16]</sup>,这为肿瘤研究提供了一种新思路,从糖酵解和细胞供能方面继续探索,可能会寻找到影响肿瘤转移新通路及分子机制。

## 2.2 TGF- $\beta$ 调控 MMP2 在肿瘤细胞中的表达

肿瘤发生转移是由于肿瘤细胞驱动上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),从而使其具有了突破基底膜和跨血管转移的能力,促进肿瘤的转移<sup>[17-18]</sup>。转化生长因子(TGF- $\beta$ )是最重要的诱导方式<sup>[19]</sup>,可激活与 EMT 相关信号通路的下游蛋白,增强肿瘤细胞转移的能力<sup>[20-21]</sup>。TGF- $\beta$  可诱导或抑制 microRNA 的表达,影响蛋白质的转录和翻译。已证实,TGF- $\beta$  可通过调节 MMP2 的 microRNA,导致 MMP2 的表达降低,使得肿瘤的侵袭和转移受到抑制<sup>[22]</sup>。Tang 等<sup>[23]</sup>构建 miR-429 高表达的肿瘤细胞系,移植裸鼠后发现 miR-429 可显著诱导 MMP2 的表达,促进肝癌的转移和侵袭。Yang 等<sup>[24]</sup>的研究发现 miR-101/TGF- $\beta$ /SDF1-VE-cadherin/MMP2/LAMC2 网络可以调控肿瘤的血管生成,抑制肝癌的转移,从而提示 MMP2 是一个值得探究的癌症治疗靶点。

随着研究继续深入,探究 TGF- $\beta$  与外泌体中非编码 RNA(noncoding RNA)的关系成为热点研究。许多证据表明长链非编码 RNA 对转录和转录后起着监管作用,包括转录因子募集、组蛋白修饰、以及癌症的发生和各种恶性肿瘤的侵袭<sup>[25-27]</sup>。Kim 等<sup>[28]</sup>研究表明 TGF- $\beta$  可影响外泌体中的 microRNA 表达,进一步研究发现外泌体中长链非编码 RNA 也可促进 MMP2 的表达来加快肿瘤的转移。Wu 等<sup>[29]</sup>研究表明被 TGF- $\beta$  处理的 A549 细胞与肺癌细胞及肺微血管内皮细胞的外泌体中 lnc-MMP2-2 含量较高,揭示了 lnc-MMP2-2 在 TGF- $\beta$  处理后的外泌体中显著富集。生物信息学分析表明,lnc-MMP2-2 可增加 MMP2 表达,MMP2 表达可调节肺癌细胞的侵袭和转移,提示该 lncRNA 可能是肺癌的新型治疗靶点和预测标志物。

## 2.3 MAPKs 通路调控 MMP2 在肿瘤细胞中的表达

MAPKs 是一种细胞内的苏氨酸蛋白激酶,可使细胞产生各种肿瘤生物学功能。有研究表明,MAPKs 通路通过激活 MMP2 和 MMP9 使得细胞外基质发生降解<sup>[30]</sup>,进而影响肿瘤的转移。Li 等<sup>[31]</sup>

研究发现,MAPKs 信号通路的激活可增加丝裂原活化蛋白激酶 4(MLK4)的表达,MLK4 的敲低使 MMP2 的表达减弱,进而减少了肝癌细胞增殖和转移。在胃癌中,MAPKs 通路可直接激活 MMP2 的表达,引发肿瘤的转移。李佳等<sup>[32]</sup>研究显示,胃肠安作为一种中药,调控 MAPKs 通路来影响 MMP2、MMP9、VEGF 的表达,进而影响肿瘤的转移。李春杰等<sup>[33]</sup>研究发现消痰散结方也能降低胃癌中 MMP2 的表达。上述实验研究表明一些中药通过 MAPKs 通路调控 MMP2 可控制癌前病变,抑制细胞的不正常增殖,抑制肿瘤的侵袭和转移,以及提升人体免疫力等多种方面都有显著的作用<sup>[34]</sup>。

## 3 基质金属蛋白酶抑制剂类药物的作用

基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPS)是基质金属蛋白酶的天然抑制剂,与 MMPs 的催化部位相结合,这种结合是稳定且不可逆的,进而使 MMPs 不能发挥正常作用,影响水解 ECM 的能力,从而抑制了癌症的转移<sup>[35]</sup>。MMP2 与其抑制剂在肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用,MMP2 / TIMPs 的失衡会影响肿瘤的进展。MMP2 活性与淋巴结转移,淋巴管和血管浸润相关,MMP2 在食管癌侵袭中有明确报道<sup>[36]</sup>,同样,MMP2 水平升高也可促进乳腺癌细胞的浸润性,导致存活率显著下降<sup>[37]</sup>。在正常的生理条件下,基质金属蛋白酶抑制剂可以抑制 MMPs 在任何阶段下的蛋白水解活性,包括 DNA 转录、基质金属蛋白酶酶原的活化以及对 MMPs 活性抑制。MMPs 对体内生理状态下 ECM 具有精确的调控作用,保证了体内生理状态下的稳定。但是在病理状态下,这种调控失衡使得 MMPs 的活性增加,从而使组织发生癌变的可能性增高。近三十年来,MMPs 被认为是值得探究的癌症靶点,人工合成的 MMPs 抑制剂作为一类药物在细胞抑制和抗血管生成中发挥重要的作用<sup>[38]</sup>。卵巢癌作为妇科恶性肿瘤中致死率最高的一种癌症,易发生转移。为了探究抑制卵巢癌发生转移的方式,Chien 等<sup>[39]</sup>通过研究发现,EZH2 作为一种表观遗传的修饰剂,通过 H3K27me3 的高甲基化使 TIMP2 沉默,从而诱导了 MMP2 和 MMP9 的活化,促进了卵巢癌的侵袭和转移。

近年来,随着科学技术的不断发展,第三代基质金属蛋白酶抑制剂类药物已经开始了研究。如新型苯并咪唑辛基吡咯烷烃化基质金属蛋白酶抑制剂,对 MMP2 的活性和肿瘤细胞的增殖有较强的抑

制作用<sup>[40]</sup>。如何筛选出高选择性抗肿瘤新药,是目前面临的主要难题。现在普遍使用的筛选方法包括整体动物水平、组织器官水平、细胞水平和分子水平。其中在分子水平上的筛选更加高效,操作性更强。因此分子水平的筛选方法成为通用的基质金属蛋白酶抑制剂类药物的选择方法。

#### 4 MMP2 有望成为新的肿瘤转移与侵袭的标志物

肿瘤在人体各个组织和器官中的发生具有不可预测性,若早期发现不及时,可导致侵袭和转移的发生。胃癌通过两种途径发生转移,血行转移与淋巴结转移。在我国,由于早期筛查并不普及,胃癌被确诊时大部分已是晚期,且多有转移,往往预后不佳。目前研究发现的与胃癌相关的生物标志物数量较少,因其敏感度和特异性都较低,不足以作为临床诊断的相应指标,因此需要敏感度和特异性更高的生物标志物,在这种迫切的需求下,MMP2 吸引了许多研究者的目光。如表 1 所示,王洁等<sup>[41]</sup>

将临床新鲜的胃癌组织标本通过原位移植到裸鼠背部皮下,建立异种移植模型后肿瘤发生转移,连续传三代之后,瘤组织切片染色观察,发现与原发瘤相比转移瘤中 MMP2 的表达显著上调。董磊等<sup>[42]</sup>的研究表明,胃癌组术前的 VEGF、MMP2、MMP9 水平高于对照组血清,术后 VEGF、MMP2、MMP9 的水平显著低于术前,并且其表达与患者的生存密切相关,对于 MMP2 表达程度的判定一定程度上有利于胃癌患者预后判断,为治疗提供指导。不仅仅在胃癌中,Araújo 等<sup>[43]</sup>在结肠癌研究中也发现,MMP2 在肿瘤的发生,进展和转移中起到一定的作用,与患者的预后密切相关。罗俊波等<sup>[44]</sup>的研究指出,乳腺癌患者血清中 MMP2 高表达,与侵袭和转移有密切的关系。血清中 MMP2 的表达水平可作为一项重要的指标去检测肿瘤的发生以及对肿瘤转移概率的预估。Xie 等<sup>[45]</sup>的研究表明,胰腺癌作为一种恶性肿瘤,五年生存率不足 9%,唯一有效的治疗方式是早期手术切除,但是早期检出率并不

表 1 MMP2 在各类肿瘤中的作用  
Table 1 Role of MMP2 in various tumors

癌症名称 Name of the cancer	方法 Method	结论 Conclusion	参考文献 References
胃癌 Gastric cancer	异种移植模型 Xenotransplantation model	MMP2 的高表达促进肿瘤的转移 High expression of MMP2 promotes tumor metastasis	[41]
胃癌 Gastric cancer	胃癌患者与正常患者血清比较 Comparison of serum between patients with gastric cancer and normal patients	MMP2 在胃癌术后患者血清中明显减少 MMP2 was significantly decreased in serum of patients with gastric cancer after operation	[42]
结肠癌 Colon cancer	免疫组织化学染色 Immunohistochemical staining	MMP2 的高表达使得结肠癌的转移性和侵袭性更高 High expression of MMP2 makes colon cancer more metastatic and aggressive	[43]
乳腺癌 Breast cancer	收集患者数据进行分析 Collect patient data for analysis	MMP2 治疗后的升高提示乳腺癌的不良预后 Elevation of MMP2 after treatment suggests a poor prognosis for breast cancer	[44]
乳腺癌 Breast cancer	收集患者数据进行分析 Collect patient data for analysis	MMP2 可促进乳腺癌的转移,也可作为监测乳腺癌预后的一项重要指标 MMP2 can promote the metastasis of breast cancer and can also be used as an important indicator to monitor the prognosis of breast cancer	[46]
胰腺癌 Pancreatic cancer	基因表达分析交互分析 Gene expression profiling interactive analysis, GEPIA	MMP2 可以作为胰腺癌预后检测的一项指标 MMP2 can be used as a prognostic indicator of pancreatic cancer	[45]
肝癌 Liver cancer	异种转移模型 Xenotransplantation model	MMP2 随着使用 COX-2 抑制剂的表达降低,抑制癌症的转移 Expression of MMP2 decreased with the use of COX-2 inhibitors, inhibiting cancer metastasis	[47]
肺癌 Lung cancer	收集患者数据进行分析 Collect patient data for analysis	MMP2 在肺癌手术后高表达提示有着不良预后 High expression of MMP2 after lung cancer surgery suggests a poor prognosis	[48]

高,因此寻找早期标志物及早进行手术治疗可有效提高生存率,而 MMP2 在胰腺癌发生转移的患者中高表达,可作为早期诊断胰腺癌是否转移的重要标志物。Huang 等<sup>[46]</sup>的研究表明,在乳腺癌的转移中,MMP2 作为下游分子接受糖蛋白非转移性 B (Glycoprotein non-metastatic B, GPNMB) 的调控,可促进乳腺癌的转移,也可作为监测乳腺癌预后的一项重要指标。Yang 等<sup>[47]</sup>的研究表明,COX-2 作为 MHCC-97 H 细胞中 Mir-30a-3p 直接调节靶标,使用 COX-2 抑制剂可抑制肝癌细胞的转移,同时 MMP2 的表达也相应降低。Han 等<sup>[48]</sup>的研究表明,肺癌手术后的患者,MMP2 的表达过高提示着不良预后,平均生存周期远低于 MMP2 低表达的患者,并且在肺癌患者中,MMP2 表达过高提示肿瘤已经达到了非常恶性的程度,TNM 分期也不良,发生转移的风险大大提高。当然仅仅依靠 MMP2 的表达程度来检测肿瘤转移概率是远远不够的,需要与多种指标及患者临床症状相结合,为患者提供更加科学且有效的治疗。

## 5 展望

综上所述,MMP2 与癌症的侵袭和转移密切相关,多种机制通过调控 MMP2 的活性来影响肿瘤的转移,因此 MMP2 可作为癌症转移的预测标志物。通过对 MMP2 调控机制继续深入研究,如何抑制 MMP2 的活性,从而得到一种有效抑制肿瘤转移的方式,成为临床上有效治疗肿瘤的一种手段。虽然影响 MMP2 的机制较多,涉及诸多上游分子,但恶性肿瘤的转移仅仅依靠基质金属蛋白酶去解决是远远不够的。我们需要更加深入的研究,将 MMP2 与影响癌症转移的其他机制相结合,再加以临床经验,最终找出一种真正可行且有效的治疗方式。

## 参考文献:

- [ 1 ] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(3): 221-233.
- [ 2 ] Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(8): 617-629.
- [ 3 ] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.
- [ 4 ] Chakraborti T, Das S, Mandal M, et al. Role of Ca<sup>2+</sup>-dependent metalloproteinase-2 in stimulating Ca<sup>2+</sup> ATPase activity under peroxynitrite treatment in bovine pulmonary artery smooth muscle membrane [J]. *IUBMB Life*, 2010, 53(3): 167-173.
- [ 5 ] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases [J]. *Amino Acids*, 2011, 41(2): 271-290.
- [ 6 ] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, et al. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen [J]. *Nature*, 1980, 284(5751): 67-68.
- [ 7 ] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 147: 1-73.
- [ 8 ] Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, et al. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(8): 4335-4341.
- [ 9 ] Patterson ML, Atkinson SJ, Knäuper V, et al. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain [J]. *FEBS Lett*, 2001, 503(2-3): 158-162.
- [ 10 ] Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 5872-5876.
- [ 11 ] 潘小炎, 李翔. 幽门螺旋杆菌诱导基质金属蛋白酶-9 表达的研究 [J]. *中国医师杂志*, 2004, 6(8): 1061-1063.
- [ 12 ] Borrirukwanit K, Lafleur MA, Mercuri FA, et al. The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by αVβ3 integrin in human breast cancer cells [J]. *Matrix Biol*, 2007, 26(4): 291-305.
- [ 13 ] Liao H, Wang Z, Deng Z, et al. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1 - MMP/MMP2 pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 8948-8957.
- [ 14 ] Noh S, Jung JJ, Jung M. Body fluid MMP-2 as a putative biomarker in metastatic breast cancer [J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(3): 699-703.
- [ 15 ] Kenny HA, Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(5): 683-688.
- [ 16 ] Xu YY, Bao YY, Zhou SH, et al. Effect on the expression of MMP-2, MT-MMP in laryngeal carcinoma Hep-2 cell line by antisense glucose transporter-1 [J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(5): 395-401.
- [ 17 ] Chen L, Muñoz-Antonia T, Douglas CW, et al. Trim28 contributes to EMT via regulation of E-Cadherin and N-cadherin in lung cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101040.
- [ 18 ] Yang Z, Wang H, Xia L, et al. Overexpression of PAK1 correlates with aberrant expression of EMT markers and poor prognosis in non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer*, 2017, 8(8): 1484-1491.
- [ 19 ] Elmansuri AZ, Tanino MA, Mahabir R, et al. Novel signaling collaboration between TGF-β and adaptor protein Crk facilitates EMT in human lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(19): 27094-27107.

- [20] Gal A, Sjöblom T, Fedorova L, et al. Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(9): 1218–1230.
- [21] Voloshenyuk TG, Landesman ES, Khoutorova E, et al. Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- $\beta$ 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling [J]. *Cytokine*, 2011, 55(1): 90–97.
- [22] Derynck R, Turley SJ, Akhurst RJ. TGF $\beta$  biology in cancer progression and immunotherapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(1): 9–34.
- [23] Tang J, Li L, Huang W, et al. MiR-429 increases the metastatic capability of HCC via regulating classic Wnt pathway rather than epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Lett*, 2015, 364(1): 33–43.
- [24] Yang J, Lu Y, Lin YY, et al. Vascular mimicry formation is promoted by paracrine TGF- $\beta$  and SDF1 of cancer-associated fibroblasts and inhibited by miR-101 in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(1): 18–27.
- [25] Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, et al. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8577.
- [26] Wan G, Zhou W, Hu Y, et al. Transcriptional regulation of lncRNA genes by histone modification in Alzheimer's disease [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 3164238.
- [27] Zhao L, Kong H, Sun H, et al. LncRNA-PVT1 promotes pancreatic cancer cells proliferation and migration through acting as a molecular sponge to regulate miR-448 [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 4044–4055.
- [28] Kim J, Kim TY, Lee MS, et al. Exosome cargo reflects TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) status in A549 human lung adenocarcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 643–648.
- [29] Wu DM, Deng SH, Liu T, et al. TGF- $\beta$ -mediated exosomal lnc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(10): 5118–5129.
- [30] Tai KY, Shieh YS, Lee CS, et al. Axl promotes cell invasion by inducing MMP-9 activity through activation of NF- $\kappa$ B and Brg-1 [J]. *Oncogene*, 2008, 27(29): 4044–4055.
- [31] Li Y, Zuo H, Wang H, et al. Decrease of MLK4 prevents hepatocellular carcinoma (HCC) through reducing metastasis and inducing apoptosis regulated by ROS/MAPKs signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 108749.
- [32] 李佳, 陈伟霞, 李朝燕, 等. 胃肠安对人胃癌细胞侵袭转移及 RUFY3、MAPKs 通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(7): 592–596.
- [33] 李春杰, 魏品康, 余柏林. 裸鼠人胃癌 MKN-45 细胞核转录因子 NF- $\kappa$ B<sup>65</sup> 蛋白与增殖细胞核抗原表达的相关性 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(10): 2070–2072.
- [34] 刘威, 沈克平, 胡兵, 等. 夏龙方对人胃癌 SGC-7901 细胞黏附和侵袭的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(2): 192–195.
- [35] Zhang X, Wang Y, Yamamoto G, et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas [J]. *Histopathology*, 2009, 55(3): 250–260.
- [36] Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and-9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(16): 2164–2170.
- [37] Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(7): 1270–1275.
- [38] 汪丽琼, 张琍. MMP-9 在胃癌预后预测及治疗中的应用 [J]. *中国现代医药杂志*, 2013, 15(11): 114–117.
- [39] Chien YC, Liu LC, Ye HY, et al. EZH2 promotes migration and invasion of triple-negative breast cancer cells via regulating TIMP2-MMP-2/-9 pathway [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 422–434.
- [40] Zhang H, Wang X, Mao J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel benzofuroxan-based pyrrolidine hydroxamates as matrix metalloproteinase inhibitors with nitric oxide releasing activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(15): 4363–4374.
- [41] 王洁, 赵宁宁, 张彩勤, 等. 基于临床肿瘤标本的胃癌转移模型建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 7–12.
- [42] 董磊, 夏猛, 尚康兴, 等. 胃癌患者手术前后血清 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平变化及其临床意义 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(9): 1221–1225.
- [43] Araújo RF, Lira GA, Vilaça JA, et al. Prognostic and diagnostic implications of MMP-2, MMP-9, and VEGF- $\alpha$  expressions in colorectal cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(1): 71–77.
- [44] 罗俊波, 郑瑞锋, 王彦威, 等. 血清 MMP-2、MMP-9 和 CA15-3 水平在乳腺癌中的临床病理学意义及预后价值 [J]. *实用癌症杂志*, 2019, 34(2): 195–199.
- [45] Xie J, Zhou X, Wang R, et al. Identification of potential diagnostic biomarkers in MMPs for pancreatic carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(23): e26135.
- [46] Huang YH, Chu PY, Chen JL, et al. Expression pattern and prognostic impact of glycoprotein non-metastatic B (GPNMB) in triple-negative breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 12171.
- [47] Yang X, Sun J, Sun H, et al. MicroRNA-30a-3p acts as a tumor suppressor in MHCC-97H hepatocellular carcinoma cells by targeting COX-2 [J]. *J Cancer*, 2021, 12(13): 3945–3957.
- [48] Han L, Sheng B, Zeng Q, et al. Correlation between MMP2 expression in lung cancer tissues and clinical parameters: a retrospective clinical analysis [J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 283.

[收稿日期]2021-03-09

杨净松, 吕梁, 宋巍, 等. 脑缺血性卒中血脑屏障破坏模型建立与功能障碍的定量检测方法及进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 129-135.

Yang JS, Lyu L, Song W, et al. Establishment of blood-brain barrier damage model for cerebral ischemic stroke and the quantitative detection methods and progress of its dysfunction [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 129-135.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.019

# 脑缺血性卒中血脑屏障破坏模型建立与功能障碍的定量检测方法及进展

杨净松, 吕梁\*, 宋巍, 刘兴利

(云南省第一人民医院放射科, 昆明 650000)

**【摘要】** 回顾缺血性脑卒中过程总血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的动态病理改变与关于 BBB 在脑缺血性卒中过程中的破坏过程以及当前实验方法在 BBB 的破坏评估量化过程中的新进展。

**【关键词】** 脑缺血性卒中; 动物模型; 定量分析; 血脑屏障

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0129-07

## Establishment of blood-brain barrier damage model for cerebral ischemic stroke and the quantitative detection methods and progress of its dysfunction

YANG Jingsong, LYU Liang\*, SONG Wei, LIU Xingli

(Department of Radiology, Yunnan First People's Hospital, Kunming 650000, China)

**【Abstract】** This article reviews dynamic pathological changes of the total blood-brain barrier (BBB) in the process of ischemic stroke as well as the destruction process of BBB in the process of ischemic stroke and the progress of current experimental method in the quantification of BBB destruction.

**【Keywords】** ischemic stroke; animal model; quantitative analysis; BBB

脑卒中(stroke)尤其是占大部分的脑缺血性卒中(ischemic stroke, IS)是当前威胁人类的尤其是发展中国家人民健康的首要因素<sup>[1-2]</sup>, IS 主要是由突然流向大脑的局部脑血流量减少引起的, 脑缺血性卒中后不久, 代谢紊乱和能量失衡在细胞和亚细胞水平传播到继发性损伤机制中如炎症、神经胶质细胞增生和氧化应激等, 继而导致神经元, 神经胶质细胞和血管内皮细胞死亡。

血脑屏障(BBB)是中枢神经系统的独特而重

要的特异性结构, 早期认为 BBB 可以调控脑组织血流供应, 在控制物质交换功能上也具有重要的调节的作用<sup>[3]</sup>, 参与维持脑组织液中水和电解质的平衡, 并且必须保护神经元免受血液中潜在有害物质的侵害<sup>[4]</sup>, BBB 损伤和功能障碍是脑缺血后卒中的突出病理特征, 缺血卒中后的脑细胞水肿、凋亡到坏死过程 BBB 的破坏程度与发病的严重程度有着密切的关联, 但既往的实验仅仅关注 BBB 的破坏与否, 既 0 或 1, 对于 BBB 破坏程度的量化仍是实验中

**【基金项目】** 吴阶平医学基金(320.6759.2020-08-12); 2020SKY 影像科研基金(Z-2014-07-2003-21)。

**【作者简介】** 杨净松(1991—), 男, 硕士, 研究方向: 神经影像。E-mail: yangjingsonggo@163.com

**【通信作者】** 吕梁(1961—), 男, 硕士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 脑卒中影像诊断。E-mail: lyuliang0720@hotmail.com

的一项难题,本文将针对各种动物模型及相关 BBB 影像学评估手段的最近进展进行阐述及回顾。

## 1 与 BBB 构成结构破坏的相关检测敏感标记物

BBB 内侧为血管内皮细胞以及其周围的紧密连接(tight junction, TJ)构成的,参与构成 TJ 主要结构蛋白包括 ZO-1、occludin 与 claudin-5 等,在脑缺血卒中发生后可以通过免疫组化与蛋白质印迹实验评估连接蛋白的表达,继而反映血脑屏障的破坏情况(BBB 破坏时连接蛋白表达、分布减低)<sup>[5]</sup>,实验证实,缺血 2 h 后, BBB 在体外和体内均受到破坏,在体外细胞实验中, BBB 的破坏主要由 caveolin1 介导的 claudin-5 重新分布和 MMP 介导的闭合蛋白降解导致快速内皮屏障破坏引起的氧葡萄糖剥夺<sup>[6]</sup>,因此 ZO-1、occludin 与 claudin-5 的表达改变提示了血脑屏障破坏与重建, BBB 内皮细胞较周围毛细血管内皮细胞较为明显的特点是丰富的线粒体量,有实验发现在梗塞后 30 min,约 60% 受缺血影响的血管显示出了内皮水肿,并伴有水肿星形细胞,证实在缺血性脑卒中发生后血管内皮水肿早于 BBB 破坏<sup>[7]</sup>,同时也暗示 BBB 的破坏是一系列级联反应引起的,是一个动态变化的过程。

周细胞除了血脑屏障(BBB)的发育和维持,跨 BBB 的白细胞运输和血管生成外,调节神经组织血流以配给相应的神经代谢也起到了重要作用<sup>[8]</sup>。周细胞对于缺血较敏感且容易受损而产生大量的过氧化酶如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、氧化酶 4(NOX4)等<sup>[9-10]</sup>,这种酶会在梗塞周围区域的微血管周细胞中表达上调,这有助于激活金属蛋白酶 9(MMP-9)加剧 BBB 分解<sup>[11]</sup>,发生 IS 后,血浆基质金属蛋白酶(MMP)首先升高, MMP 是一种蛋白水解酶,可以降解细胞外的大多数成分并重塑细胞外空间,其中如 MMP-9 异常升高与脑卒中的加剧存在关联<sup>[12]</sup>,实验证实血脑屏障的破坏与 MMP-9 表达增加呈明显相关<sup>[13]</sup>,这些机制会加重缺血卒中后的组织损伤和脑水肿<sup>[14]</sup>,因此,预防周细胞功能障碍可通过促进微循环再灌注并预防出血和水肿来改善再通疗法的疗效。在梗塞周围组织中,周细胞与微血管分离并促进血管生成和神经发生,对中风预后产生积极影响,有研究证实血小板衍生生长因子- $\beta$ (PDGFR- $\beta$ ) 在周细胞中表达上调<sup>[15-16]</sup>,其数量增加并开始从微血管壁迁移至新形成的脉管芽以促进缺血性损伤后的成熟。

## 2 脑缺血卒中 BBB 破坏的模型建立与 BBB 破坏的实验检测方法进展

### 2.1 体外 BBB 细胞培养模型及其局限性

体外 BBB 模型的构建主要是基于原代细胞或永久脑内皮细胞系(BCE)的细胞培养模型,目前主要应用于研究 BBB 的渗透性筛查、各种药物向脑内转运的模式检验与脑血管毛细血管内皮细胞物质转运机制及病理生理研究<sup>[17]</sup>。与基于动物的 IS 体内模型相比,体外模型具有多种优势:(1)研究缺氧/葡萄糖糖减低对细胞死亡的影响更为直接和容易;(2)可以在血脑屏障内的细胞水平上进行代谢研究,而不会使其他器官的其他细胞复杂化;(3)可以容易地研究培养细胞之间复杂的细胞内信号传导途径及其在疾病过程中的潜在作用<sup>[18]</sup>。

不同物种的 BBB 体外模型构建采用以进行各方面的研究工作,其中小鼠或大鼠来源的脑内皮细胞培养物的优势在于其来源已充足,并且经常被用作临床前研究的首选<sup>[18]</sup>,在脑缺血性卒中的 BBB 研究主要聚焦于氧气葡萄糖剥夺(OGD)条件下脑血管内皮细胞的病理改变与各种蛋白、水解酶、核酸等物质的表达检测及 BBB 其他细胞如周细胞在缺血缺氧状态下的功能改变与保护/破坏作用机制研究<sup>[19-22]</sup>,尽管大/小鼠的脑容易获得,但这些物种中内皮细胞的普遍产量较低,实验的可重复性也受到各种因素影响。其他动物如牛、猪等动物细胞的体外模型也应用于 BBB 的相关研究当中,但是鉴于不可避免的物种差异,一种可靠的人源性体外 BBB 模型将对高通量筛选以识别脑穿透分子或研究 BBB 的发育,调节和疾病途径显然具有更高的实验价值。

采用完全分化的表型的人脑内皮细胞的原代培养对于药物开发和临床前研究是一种理想的建模工具<sup>[23]</sup>,但新鲜的人脑组织很难保证持续的获取。人类干细胞模型目前正在完善<sup>[24]</sup>,有学者通过模拟类似于胚胎脑体外的微环境使得人多功能干细胞(hPSC)成功向脑内皮细胞分化<sup>[25]</sup>,所得的内皮细胞具有许多 BBB 属性,包括组织良好的紧密连接,营养转运蛋白的适当表达和极化的外转运蛋白活性,成功检测到葡萄糖转运蛋白 GLUT-1、连接蛋白 occludin-5、claudin-5 以及 p-糖蛋白在内皮细胞中共表达<sup>[26]</sup>,如果证明这种体外建模方法易于处理并具有良好的可重复性,将为该领域的研究人员提供巨大的机会。

虽然体外的细胞培养技术逐渐进步,体外的 BBB 结构及功能也越来越接近实验动物(人)体内,但 BBB 是一个复杂的结构,其病理生理改变有多重复杂的细胞间相互作用,且研究过程中关注的仅仅是与 BBB 功能有紧密关系的相关蛋白,并没有将体外的 BBB 结构作为一个有机动态的整体进行研究。新鲜的原代细胞获取一直是限制体外 BBB 研究的瓶颈,已经有将星形细胞及周细胞与内皮细胞共同培养以模拟体内环境以提高内皮细胞相关功能高表达的方法<sup>[27]</sup>,但始终无法达到内环境的复杂调节,有学者通过评估永生化的 hCMEC/D3 和原代 hpBEC 细胞系的总体基因表达谱,发现脑微血管内皮细胞(BEC)中重要的功能相关基因的表达出现了明显的减低<sup>[28]</sup>,证明 BEC 中高表达并被描述转录 BBB 功能的特异性蛋白的相关基因表达受到分离培养细胞的影响,这可能与天然内环境的剥夺密切相关,故体外研究在相关的病理生理研究中仍然有较明显的局限性。

## 2.2 脑缺血卒中动物模型建立与 BBB 的破坏检测

多种动物(小鼠、大鼠、兔、犬、山羊、猪、灵长动物)等用于脑卒中后 BBB 功能观察及脑缺血在再灌注的神经病理生理及显微解剖相关的研究。在各类文献中,占大多数的是鼠(约 80%),这是因为鼠(小鼠/大鼠)的缺血性脑卒中模型的建立具有简单方便、具有较高的可重复性与成功率。目前使用的缺血性脑卒中建模方法最常用的是 MCAO(线栓法大脑中动脉局灶性脑缺血模型),闭塞时间一般为 60~120 min 不等,具体实验步骤不再赘述<sup>[29-30]</sup>,需要注意的是在 MCAO 处理后可能由于丘脑受损而导致体温过低,故需要一定的保温措施,使其体温保持在约 37℃。

目前对于脑卒中动物模型与 BBB 功能的相关研究主要集中在 BBB 在 IS 后的动态变化,既 BBB 在 IS 后的各个时间段的显微结构、功能与相关蛋白表达的变化研究,与之相关的各种神经保护药物的应用及药物对 BBB 的功能保护机制研究等方面。对于 BBB 的功能失调的定量研究主要包括染色剂的定量检测既伊文斯蓝(EB)的定量检测与异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-Dextran)免疫荧光检测,下面主要针对两种检测方法进行探讨。

## 2.3 伊文斯蓝(EB)进行 BBB 渗漏定量检测

EB 染料具有很强的结合血清白蛋白的能力,可作为示踪剂检测血管渗漏并定量 BBB 分解,EB

的定量检测是一种公认且敏感的技术,已被用于评估包括缺血性中风在内的神经疾病中的血脑屏障完整性和功能<sup>[31-33]</sup>。该方法经济简便、高效,具有较高的可重复性,并且可以适用于任何实验室,目前广泛应用于各种相关 BBB 的功能紊乱研究中<sup>[34]</sup>。具体方法为:在 MCAO 建模成功后,采用静脉注射法(鼠尾静脉/颈静脉/股静脉)缓慢注射 EB 染色剂(5 min 注射完成),按照期望的时间(缺血后指定时间或再灌注指定时间等)处死,取出大脑,解剖大脑半球,锐器分离左右半球并分别称重,在磷酸盐缓冲盐水中制匀浆,然后使用涡旋仪将其与 2.5 mL 三氯乙酸(60%)混合之后进行离心 15~30 min,随后静置于并低温保存约 10 min,吸取上清液,使用分光光度计在 610 nm 处估计 EB 吸收<sup>[33,35]</sup>,根据 EB 的标准曲线估计 EB 渗漏的量,并将结果表示为 ug/g。

EB 染色剂的定量评估主要用于以下方面:(1) BBB 相关研究如各种疾病模型的 BBB 功能变化,使用 EB 染色剂渗漏量衡量 BBB 的破坏程度,结合同金属激酶 MMP 等 BBB 破坏相关联的水解酶<sup>[36]</sup>,继而分析 BBB 破坏程度的动态变化及与相关疾病病理变化的相关性<sup>[37-38]</sup>,通过 BBB 结构蛋白(ZO-1、occludin-5、claudin-5)等相关功能蛋白的表达检测以了解 BBB 破坏的机制<sup>[36]</sup>;(2)在药物研究中用于评估某种药物(刺激因素)对疾病模型的治疗/缓解效果<sup>[38-41]</sup>,将染色剂的定量分析作为评估 BBB 破坏情况的客观指标,继而了解实验/对照组在进行干预后的 BBB 功能差异,并对药物效果进行评估;(3)用于验证 BBB 诱导破坏模型建模是否成功<sup>[42]</sup>。

虽然 EB 定量检测法简单易行,但是 EB 染色在检测过程中需要进行血管内的冲洗灌注然后再进行脑实质内的染料提取,这一过程中可能造成脑内小血管再破裂导致脑实质内染色剂增多<sup>[43-45]</sup>,且操作的人员个体及技术差异可能导致结果的差异,对于定量检测来说其客观性会受到质疑。分光光度计测量的 EB 染料浓度,在大体上无法进行 EB 染色区域的定量(BBB 破坏范围),Reeson 等<sup>[46]</sup>在研究抑制 VEGF 信号转导对脑卒中的保护作用中应用免疫荧光图像定量分析的方法,将梗死区域内荧光体积减去血管官腔内荧光面积,之后将周围皮层的染料荧光面积减小鼠相对应深度的对侧染料荧光以量化 EB 的渗漏,在将来的研究当中值得进一步应用。

## 2.4 异硫氰酸荧光素-标记物荧光(FITC-)进行定量检测

使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记不同分子量的物质(白蛋白、高/低分子量右旋糖酐、葡萄糖等),尤其是 FITC-Dextrans 是用于检测 BBB 渗漏常用试剂<sup>[44,47-49]</sup>,该物质具有不同的分子量,一般为了使 BBB 渗漏实验效果明显,常选用分子量相对小的试剂用以标记 BBB 渗漏的感兴趣区<sup>[50-51]</sup>,高分子量( $2000 \times 10^3$ )的 FITC-Dextrans 可以很好地吸附于血管壁内,继而作为标记血管管腔的高亮荧光标志而被识别,且在 BBB 出现明显破坏渗漏时,大分子 FITC-Dextrans 也可以在管腔外被识别,故也可以用于 BBB 渗漏的定量研究中,Chen 等<sup>[52]</sup>在使用大鼠进行脑缺血卒中 BBB 破坏对周围脑组织研究中通过半自动测量 FITC-Dextrans 标记的荧光总面积,再根据高亮区域(既血管管腔内的 FITC-Dextrans 富集)调整亮度阈值,计算血管面积,继而计算出渗漏的荧光面积值,证明了 BBB 破坏程度(高分子 FITC-Dextrans 周围渗漏面积)与脑组织损伤的体积密切相关;Michalski 等<sup>[47]</sup>利用高分辨率扫描仪结合图像后处理工具对 FITC-白蛋白( $70 \times 10^3$ )的连续切片进行荧光面积计算,并逐层累计( $\times$ 层厚)最后得出 BBB 渗漏组织的体积;Jin 等<sup>[53]</sup>将大鼠前囟作为基点作冠状切片,将前囟至后方 2 mm 的切片作为观察切片,使用图像处理软件进行多层面荧光定量检测(显微镜下 FITC-Dextrans 亮度最高、面积最大)荧光面积总和,并得到平均渗漏面积作为定量指标继而验证不同分子大小的 FITC-Dextrans 在大鼠 IS 不同时间点的渗漏,继而反映 BBB 在 IS 后的动态变化与相关机制;Bankstahl 等<sup>[51]</sup>在其进行大鼠癫痫发病后 BBB 功能变化研究时应用半定量分析法(每只动物分析了 4 个冠状脑切片,根据 FITC-白蛋白的细胞外分布进行评分,无=0 分,靠近血管的极小的细胞外分布=1 分;局灶性的细胞外聚集=2 分;大量的弥散分布的聚集=3 分,计算平均值)进行 BBB 渗漏情况的评价以了解 BBB 在癫痫发作后的动态改变;上述实验由于重复性及样本量等因素影响,目前尚未形成一种公认的、标准的定量评估方法。

Xu 等<sup>[48]</sup>利用 EB 的荧光染色与大分子量( $2000 \times 10^3$ ) FITC-Dextrans 免疫荧光染色特性,由于大分子 FITC-Dextrans 会聚集在血管管腔内,故可以利用这一特性计算 FITC-Dextrans 覆盖面积以估算血管面积,使用显微图像处理软件对切片进行分析并得

到 EB 荧光染色的集合光密度(integrated optical density, IOD)与 FITC-dextrans 渗漏面积,计算两者的比值( $IOD/ \text{AreaFITC-Dextran}$ ),这种做法可以降低血管荧光对于 BBB 渗漏量化的影响,但是这种方法目前仅应用于诱导的 BBB 渗漏,并未用于 IS 引起的 BBB 渗漏中,根据既往研究,当 IS 发生后发生 BBB 渗漏严重程度更重,故血管内外均可见 FITC-Dextrans 分布,如果可以结合 Chen 等<sup>[52]</sup>的研究策略,分析 EB 荧光的 IOD 值与 FITC-Dextrans 荧光的面积渗漏面积(总面积-血管面积)的关系以发现更好的 BBB 渗漏评估手段,值得进一步探讨。

## 3 影像学方法对于血脑屏障破坏的相关检测技术进展

在正常生理条件下,CT 增强检查中所应用到的对比剂如碘对比剂与 MRI 增强所用到的对比剂如钆类对比剂均为大分子物质,无法通过功能正常的 BBB 进入脑组织微环境中,故在正常增强造影时脑实质不会强化,如果 BBB 功能发生破坏,则会发生对比剂通过 BBB 进入脑实质,使得脑实质异常强化,故对于 BBB 的破坏评估实际上是对原本不能通过 BBB 的物质(对比剂)进行量化以反映 BBB 破坏程度。

已经有研究通过检测脑实质中大分子对比剂来反映相关疾病如脑退行性疾病等对于血脑屏障功能的影响,如应用 Patlak 模型的 CT 灌注成像中的渗透系数-渗透性-表面积乘积(permeability-surface area product, PS)<sup>[54]</sup>,使用这种参数来反映肿瘤、脑缺血卒中等病变对于 BBB 破坏的检测,也有应用这种模型进行动态增强磁共振(dynamic contrast enhanced MRI, DCE-MRI),产生类似的参数如容积转移常数  $K^{\text{trans}}$ (transfer constant),目前这种技术主要在中枢神经系统疾病主要应用,进行脑内小血管渗透性定量评估和脑小血管疾病器质性评价<sup>[55]</sup>,但是以上技术方法都是基于数学模型的模拟计算,对于脑组织内真实的对比剂渗漏情况无法切实反映。

目前已经有对于脑实质内对比剂定量分析的技术,主要为 CT 双能量碘分析技术与磁共振检查的高强度急性再灌注标记物(HARM)检测技术。对于碘对比剂,双源双能量 CT 于图像重建后在图像空间域使用三物质解析算法,应用碘图可对特定区域组织内的碘含量进行定量,目前双能量扫描可以将水平在 0.3~0.5 mg/mL 的极低量碘进行精确的

定量评估<sup>[56]</sup>;高强度急性再灌注标记物(hyperintense acute reperfusion marker, HARM),被定义为急性卒中患者对比后 FLAIR 图像上蛛网膜下腔或蛛网膜下腔的延迟增强,并被认为与 BBB 的通透性变化有关,已经有文献对于脑梗死后对比剂的外渗与出血的 HARM 改变与 CT 进行对照及脑短暂性缺血后的在今后的研究领域中<sup>[57-58]</sup>,HARM 与双能量 CT 在对比剂外渗的相关性与脑缺血卒中的研究潜力。

#### 4 总结与展望

综前文所述,对于脑缺血性卒中后 BBB 的相关研究目前主要在脑缺血后的 BBB 功能变化与相关机制,各种干预因素(药物)在脑缺血后对 BBB 功能的保护机制与疗效评估,根据新近文献对卒中后 BBB 破坏的探讨,随着无创检查技术的进步(MRI、CT 功能成像),虽然相关技术已经有报道,但目前尚无相关实验发现明确的与 BBB 实验定量相关性或衡量手段,如果可以在无创检查与活体 BBB 破坏之间寻找到相关的实验数据可以支撑其高相关性,使得 BBB 的破坏检测可以通过影像学检测发现,继而应用于高级动物模型中,在今后的 BBB 相关实验中将是飞跃性的进展。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the american heart association [J]. *Circulation*, 2015, 131(4): e29-e322.
- [ 2 ] Krishnamurthi RV, Moran AE, Feigin VL, et al. Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in adults aged 20-64 years in 1990-2013: data from the global burden of disease 2013 study [J]. *Neuroepidemiology*, 2015, 45(3): 190-202.
- [ 3 ] Schoknecht K, David Y, Heinemann U. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 38: 35-42.
- [ 4 ] Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(5): 862-890.
- [ 5 ] Jiao H, Wang Z, Liu Y, et al. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult [J]. *Mol Neurosci*, 2011, 44(2): 130-139.
- [ 6 ] Liu J, Jin X, Liu KJ, et al. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage [J]. *Neurosci*, 2012, 32(9): 3044-3057.
- [ 7 ] Krueger M, Mages B, Hobusch C, et al. Endothelial edema precedes blood-brain barrier breakdown in early time points after experimental focal cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2019, 7(1): 17.
- [ 8 ] Arimura K, Ago T, Kamouchi M, et al. PDGF receptor  $\beta$  signaling in pericytes following ischemic brain injury [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2012, 9(1): 1-9.
- [ 9 ] Manea A, Raicu M, Simionescu M. Expression of functionally phagocyte-type NAD (P) H oxidase in pericytes: effect of angiotensin II and high glucose [J]. *Bio Cell*, 2005, 97(9): 723-734.
- [ 10 ] Kuroda J, Ago T, Nishimura A, et al. Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes [J]. *Vasc Res*, 2014, 51(6): 429-438.
- [ 11 ] Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, et al. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR $\beta$  in pericytes after ischemic stroke [J]. *Brain Res*, 2015, 1630: 98-108.
- [ 12 ] Ma F, Rodriguez S, Buxo X, et al. Plasma matrix metalloproteinases in stroke patients during intensive rehabilitation therapy [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2016, 97(11): 1832-1840.
- [ 13 ] Shi Y, Zhang L, Pu H, et al. Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury [J]. *Nat Commun*, 2016, 27(7): 10523.
- [ 14 ] Zhang L, Zhang ZG, Chopp M. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(8): 415-422.
- [ 15 ] Fernandez-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, et al. Pericytes in capillaries are contractile *in vivo*, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(51): 22290-22295.
- [ 16 ] Yang Y, Thompson JF, Taheri S, et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(7): 1104-1114.
- [ 17 ] Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(5): 862-890.
- [ 18 ] Lundquist S, Renftel M, Brillault J, et al. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier *in vivo*: a comparison between two *in vitro* cell models [J]. *Pharm Res*, 2002, 19(7): 976-981.
- [ 19 ] Haseloff RF, Krause E, Bigl M, et al. Differential protein expression in brain capillary endothelial cells induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation [J]. *Proteomics*, 2006, 6(6): 1803-1809.
- [ 20 ] Nakagawa S, Mária A Deli, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells,

- pericytes and astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2009, 54(3-4): 253-263.
- [21] Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(8): 650-661.
- [22] Neuhaus W, Burek M, Djuzenova CS, et al. Addition of NMDA-receptor antagonist MK801 during oxygen/glucose deprivation moderately attenuates the upregulation of glucose uptake after subsequent reoxygenation in brain endothelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 506(1): 44-49.
- [23] Cucullo L, Couraud P, Weksler B, et al. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(2): 312-328.
- [24] Yazawa T, Imamichi Y, Miyamoto K, et al. Induction of steroidogenic cells from adult stem cells and pluripotent stem cells [J]. *Endocr J*, 2016, 63(11): 943-951.
- [25] Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(8): 783-791.
- [26] Wang YI, Abaci HE, Shuler ML, et al. Microfluidic blood-brain barrier model provides *in vivo*-like barrier properties for drug permeability screening [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017 114(1): 184-194.
- [27] Boveri M, Berezowski V, Price A, et al. Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line [J]. *Glia*, 2005, 51(3): 187-198.
- [28] Urich E, Lazic SE, Molnos J, et al. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive *in vitro* blood-brain barrier models [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38149.
- [29] 陈佳俊, 石岩殊, 韩雪梅. 线栓法大鼠局灶性脑缺血模型 (PMCAO) 的实验研究 [J]. *吉林医学*, 2004, 25(5): 16-17.
- [30] Dirnagl U. Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. *Nature Precedings*, 2010, 8: 1-14.
- [31] Pasban E, Panahpour H, Vahdati A, et al. Early oxygen therapy does not protect the brain from vasogenic edema following acute ischemic stroke in adult male rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-7.
- [32] Azar AH, Oryan S, Bohlooli S, et al. Alpha-tocopherol reduces brain edema and protects blood-brain barrier integrity following focal cerebral ischemia in rats [J]. *Med Princ Pract*, 2017, 26(1): 17-22.
- [33] Panahpour H, Farhoudi M, Omid Y, et al. An *in vivo* assessment of blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke [J]. *J Vis Exp*, 2018, 133: 57156.
- [34] Panahpour H, Dehghani GA, Bohlooli S, et al. Enalapril attenuates ischaemic brain oedema and protects the blood-brain barrier in rats via an anti-oxidant action [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(3): 220-226.
- [35] 赵庭鉴, 张培林, 周勇, 等. 冰片和麝香酮对神经生长因子血脑屏障通透性的影响研究 [J]. *中国临床新医学*, 2015, 8(8): 728-731.
- [36] Qi J, Liu Y, Yang P, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin protects blood-brain barrier integrity in cerebral ischemic stroke [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(10): 1826-1837.
- [37] Jiao YQ, Huang P, Yan L, et al. Yangxueqingnao wan, a compound chinese medicine, attenuates cerebrovascular hyperpermeability and neuron injury in spontaneously hypertensive rat: effect and mechanism [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1246.
- [38] Wang F, Liang W, Lei C, et al. Combination of HBO and memantine in focal cerebral ischemia: is there a synergistic effect? [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1458-1466.
- [39] Feng S, Zou L, Wang H, et al. RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2371.
- [40] Gao W, Li F, Liu L, et al. Endothelial colony-forming cell-derived exosomes restore blood-brain barrier continuity in mice subjected to traumatic brain injury [J]. *Exp Neurol*, 2018, 307: 99-108.
- [41] Ni P, Dong H, Wang Y, et al. IL-17A contributes to perioperative neurocognitive disorders through blood-brain barrier disruption in aged mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 1-13.
- [42] Orhan N, Yilmaz CU, Ekizoglu O, et al. Effects of  $\beta$ -hydroxybutyrate on brain vascular permeability in rats with traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2016, 1631: 113-126.
- [43] Wang X, Kang K, Wang S, et al. Focal cerebral ischemic tolerance and change in blood-brain barrier permeability after repetitive pure oxygen exposure preconditioning in a rodent model [J]. *J Neurosurg*, 2016, 125(4): 943-952.
- [44] Saunders NR, Dziegielewska KM, Kjeld M, et al. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 385.
- [45] Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, et al. Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1064-1078.
- [46] Reeson P, Tennant KA, Gerrow K, et al. Delayed inhibition of VEGF signaling after stroke attenuates blood-brain barrier breakdown and improves functional recovery in a comorbidity-dependent manner [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(13): 5128-5143.
- [47] Michalski D, Grosche J, Pelz JO, et al. A novel quantification of blood-brain barrier damage and histochemical typing after embolic stroke in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1359: 186-200.
- [48] Xu Y, He Q, Wang M, Wang X, et al. Quantifying blood-brain-barrier leakage using a combination of evans blue and high molecular weight FITC-Dextran [J]. *J Neurosci Methods*, 2019,

- 325; 108349.
- [49] Nagaraja TN, Keenan KA, Fenstermacher JD, et al. Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier [J]. *Microcirculation*, 2008, 15(1): 1-14.
- [50] Krueger M, Bechmann I, Immig K, et al. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(2): 292-303.
- [51] Bankstahl M, Breuer H, Leiter I, et al. Blood-brain barrier leakage during early epileptogenesis is associated with rapid remodeling of the neurovascular unit [J]. *eNeuro*, 2018, 5(3): ENEURO.0123-18. 2018.
- [52] Chen B, Friedman B, Cheng Q, et al. Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury [J]. *Stroke*, 2009, 40(12): e666-e674.
- [53] Jin X, Liu J, Yang Y, et al. Spatiotemporal evolution of blood brain barrier damage and tissue infarction within the first 3 h after ischemia onset [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48(3): 309-316.
- [54] Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, et al. Transport studies using blood-brain barrier in vitro models: a critical review and guidelines [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2020, 11: 1-18.
- [55] Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, et al. Vascular dysfunction-the disregarded partner of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(1): 158-167.
- [56] Jacobsen MC, Cressman ENK, Tamm EP, et al. Dual-energy CT: lower limits of iodine detection and quantification [J]. *Radiology*, 2019, 292(2): 414-419.
- [57] De Prey J, Yu C, Echevarria FD, et al. Iodinated contrast extravasation on post-revascularization computed tomography mimics magnetic resonance hyperintense acute reperfusion marker: a case study [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(12): 105294.
- [58] Kang J, Kwon H, Jung CK, et al. Usefulness of hyperintense acute reperfusion marker sign in patients with transient neurologic symptom [J]. *Medicine*, 2019, 98(19): e15494.

[收稿日期]2021-01-06

## (上接第 77 页)

- [18] Gómez GI, Velarde V, Sáez JC. Role of a RhoA/ROCK-dependent pathway on renal connexin43 regulation in the angiotensin II-induced renal damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4408.
- [19] 张志强. SOX9 在肾小管上皮细胞纤维化中作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [20] Zhu F, Chong Lee Shin O, Pei G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70707-70726.
- [21] Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 27-40.
- [22] 陈健文, 黄梦杰, 陈香美. 转录因子 SOX9 在肾病中作用的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(6): 634-637.
- [23] Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, et al. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e136994.

[收稿日期]2021-02-04

石桂英, 黄艺滢, 雷雪裴, 等. 不同物种端粒结合蛋白和端粒酶的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 136-142.  
Shi GY, Huang YY, Lei XP, et al. Research progress of telomere-binding protein and telomerase in different species [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 136-142.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.020

## 不同物种端粒结合蛋白和端粒酶的研究进展

石桂英, 黄艺滢, 雷雪裴, 李欣悦, 白琳\*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

**【摘要】** 端粒位于真核生物染色体末端, 在复制过程中保护染色体的完整性。端粒随着细胞的有丝分裂而缩短, 端粒酶在胚胎干细胞等细胞中起到了延长端粒的作用。端粒结合蛋白包括 shelterin 复合体和 CST 复合体, 端粒酶以自身 RNA 组分为模板逆转录合成端粒, 端粒结合蛋白和端粒酶在保持端粒长度和稳定中都有重要作用。尽管不同物种中端粒序列类似, 但是端粒及端粒酶在生理和/或病理状态下的功能却不尽相关。本文对不同物种的端粒结合蛋白和端粒酶的组成、功能等进行综述, 以深入了解端粒生物学功能, 为端粒功能障碍相关疾病的治疗提供科学基础。

**【关键词】** 端粒; shelterin; CST; 端粒酶

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0136-07

## Research progress of telomere-binding protein and telomerase in different species

SHI Guiying, HUANG Yiying, LEI Xuepei, LI Xinyue, BAI Lin\*

(Institute of Laboratory Key Laboratory of Human Disease Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of the People's Republic of China; Key Laboratory of Human Disease Key Laboratory of Human Disease Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**【Abstract】** Telomeres are at the ends of eukaryotes chromosomes, protect chromosomes integrity in replication. Telomeres shorten with mitosis, telomerase prolong telomeres in cells, such as embryonic stem cell. There are two protein complexes binding on telomeres: shelterin complex and CST complex. Telomerase synthesize telomeres use its RNA components. Both the telomere binding proteins and the telomerase play great role in maintaining telomere length and stability. Although telomere sequences are similar in different species, telomere and telomerase functions are not related in physiological and/or pathological conditions. Here we review the composition and function of telomere binding protein and telomerase, to understand the biological function of telomere and provide scientific basis for the treatment of telomere dysfunction.

**【Keywords】** telomere; shelterin; CST; telomerase

端粒是位于真核生物染色体末端的蛋白质-DNA 复合物, 在复制过程中保护染色体末端的完整性, 防止染色体融合、重组、降解等<sup>[1-3]</sup>。端粒 DNA 由 TTAGGG 重复序列组成, 不同物种的端粒长度不

**【基金项目】** 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332020051); 国家重点研发计划 (2017YFA0105200); 北京自然科学基金面上项目 (5202024)。

**【作者简介】** 石桂英 (1977—), 女, 副主任技师, 研究方向: 干细胞临床转化。E-mail: guiying\_shi77@163.com

**【通信作者】** 白琳 (1984—), 女, 副研究员, 研究方向: 干细胞临床转化。E-mail: bailin49@163.com

同,人出生时端粒长度约为 8~20 kb,猕猴的端粒长度约为 15~18 kb,而实验动物大小鼠的端粒长度约为 25~500 kb(表 1)<sup>[4]</sup>。端粒 DNA 的 3' 末端有一段>12 核苷酸的单链序列,此单链序列插入端粒双链序列形成 T 环结构<sup>[5]</sup>。端粒长度会随细胞复制而缩短,端粒长度的维持通过两个复合体来完成即 shelterin 和 CST。哺乳动物 shelterin 复合体由 6 个蛋白组成,即端粒重复结合因子 1 和 2(telomeric repeat binding factor 1 and 2,TRF1、TRF2)、端粒保护蛋白 1 (protection of telomeres 1,POT1)、TRF1 和 TRF2 相互作用核蛋白 2(the TRF2- and TRF1-interacting nuclear protein 2,TIN2)、抑制/激活蛋白 1(repressor/activator protein 1,RAP1)、POT1-TIN2 组织蛋白(the POT1-TIN2 organizing protein,TPP1,又称为 ACD、TINT1、PTOP、PIP1)。CST 包括 3 个蛋白即 CTC1(conserved telomere maintenance component 1)、STN1(suppressor of CDC thirteen homolog)和 TEN1(telomere length regulation protein TEN1 homolog)。shelterin 保护端粒避免 DNA 损伤应答,通过端粒酶调节端粒长度;而 CST 控制端粒酶对端粒的延伸和 C 链插入序列的合成<sup>[6]</sup>(表 1、图 1)。

1 shelterin

端粒 DNA 重复序列与 shelterin 结合,可以区分染色体正常末端和损伤断裂部位,抑制 DNA 修复反应,调控端粒酶维持端粒长度。裂殖酵母中 shelterin 由 6 种蛋白组成,即 TAZ1、RAP1、POZ1、TPZ1、CCQ1 和 POT1。TAZ1 结合端粒双链 DNA,Pot1 结合端粒单链 DNA<sup>[7]</sup>。哺乳动物 shelterin 由 TRF1、TRF2、POT1、TIN2、RAP1 和 TPP1 组成。其中哺乳动物端粒蛋白 TRF1 和 TRF2,与酵母 TAZ1 同源<sup>[8]</sup>,结合双链

端粒 DNA,RAP1 单独与 TRF2 相互作用,提高 TRF2 对端粒重复序列的特异性<sup>[9]</sup>。POT1 结合单链端粒 DNA,POT1-TPP1 复合体对单链端粒 DNA 有高度特异性<sup>[10]</sup>。TIN2 是复合体的关键蛋白,位于 shelterin 的中心位置,同时与 TRF1、TRF2 和 TPP1 相互作用,保证复合体的稳定<sup>[10-11]</sup>(表 2)。

表 1 不同物种端粒生物学特点  
Table 1 Telomere biology of different species

物种 Species	端粒长度(kb) Telomere length	端粒酶活性 Telomerase activity	年龄相关的端粒损耗 Age related telomere attrition
人 Human	8~20	无 No	有 Yes
猕猴 Macaque monkeys	15~18	无 No	有 Yes
小鼠 Mouse	25~500	有 Yes	/
兔 Rabbit	20~50	无 No	有 Yes
犬 Domestic dog	10~23	无 No	有 Yes
猫 Domestic cat	5~26	无 No	有 Yes
绵羊 Sheep	9~23	无 No	有 Yes
猪 Pig	10~30	不明 Unclear	有 Yes
驴 Donkey	7~21	无 No	有 Yes
鸡 Chicken	0.5~4000	无 No	有 Yes
斑马鱼 Zebra fish	2~10	有 Yes	/

注:端粒酶活性。有:大多数成体组织中可检测到端粒酶活性;无:多个成体组织中未检测到端粒酶活性。

Note. Telomerase activity. Yes, Telomerase activity is detected in the majority of somatic tissues. No, Telomerase activity is undetectable in multiple somatic tissues.

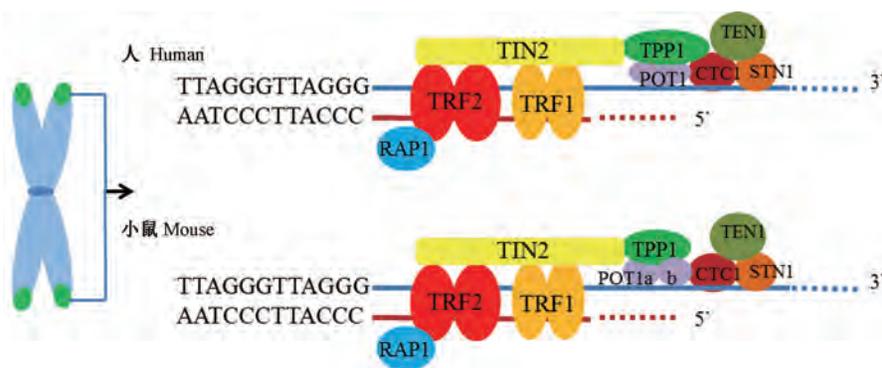


图 1 人和小鼠 shelterin 复合体和 CST 复合体示意图

Figure 1 Schematic of human and mouse shelterin complex and CST complex

**表 2** 不同物种 shelterin 复合体的组成  
**Table 2** Shelterin complex of different species

物种 Species	Shelterin 复合体 Shelterin complex
人 Human	TRF1、TRF2、POT1、TIN2、RAP1、TPP1
小鼠 <sup>[12]</sup> Mouse	TRF1、TRF2、POT1a、POT1b、TIN2、RAP1、TPP1
裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TAZ1、RAP1、POZ1、TPZ1、CCQ1、POT1
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RIF1、RIF2、RAP1、STN1/TEN1、CDC13
纤毛虫 Ciliates	TEBP $\alpha$ 、TEBP $\beta$

### 1.1 TRF1 和 TRF2

二者有 TRF 同源结构域 (TRF homology domain, TRFH) 和 C 末端 SANT/Myb DNA 结合域。TRF1 可以使端粒 DNA 成环状配对伸展, TRF2 可以使端粒 DNA 形成 T 环结构。TRF 同源结构域可以结合其它蛋白。TRF1 和 TRF2 蛋白表达丰富, 可以覆盖每个端粒。二者都可以被磷酸化、磺酰化、对羟基化、泛素化等<sup>[13-14]</sup>。

已有研究发现, 二者可通过多种方式维持端粒稳定。在人和小鼠中随年龄增长, TRF1 水平降低。提高 TRF1 的表达, 可延缓衰老相关生理变化的发生。在小鼠不同组织中 TRF1 缺失可影响干细胞功能, 从而导致组织稳态失衡<sup>[15]</sup>。当小鼠端粒缺失 TRF1 时, DNA 损伤修复和染色质重塑相关的蛋白会发生重组。小鼠 TRF1 可抑制早幼粒细胞白血病蛋白 (promyelocytic leukemia, PML)、breast cancer 1 (BRCA1)、染色质结构维持 (structural maintenance of chromosomes, SMC) 5/6 复合体的累积, 这些蛋白可促进同源重组和端粒模板 RNA 的翻译<sup>[16]</sup>。

在细胞周期中, 周期依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinases 2, CDK2) 调控 TRF2 的磷酸化, 控制 T 环的形成, 从而保护端粒, 并避免不必要的 DNA 损伤应答<sup>[17]</sup>。TRF2 的 TRFH 可以抑制 ATM (ataxia-telangiectasia mutated) 的活性, 同时也参与调节 T 环的形成<sup>[18]</sup>。TRF2 通过主动招募起始点识别复合物 2 (origin recognition complex, ORC2) 到端粒, 介导端粒的复制启动, 以防止端粒功能障碍, 而蔗糖非发酵蛋白 2 同源物 (sucrose non-fermenting protein 2 homologous, SNF2H) 敲除会减少 ORC2 的募集和端粒的复制启动<sup>[19]</sup>。TRF2 还招募核仁蛋白 TCOF1 协调端粒的转录复制<sup>[20]</sup>。

但是, 在小鼠胚胎干细胞 (embryonic stem cell,

ESCs, 简称 ES) 和上皮干细胞的研究中发现, TRF2 在端粒保护中可有可无。ES 细胞中 T 环的形成不依赖于 TRF2<sup>[21]</sup>。TRF2 敲除 ES 并未出现端粒融合现象, 仍可以无限扩增<sup>[22]</sup>。

### 1.2 RAP1

RAP1 是酵母和哺乳动物中唯一保守的 shelterin 蛋白。在甲基营养型耐热多形汉逊酵母 DL-1 中, RAP1 有 2 个基因即 HpRAP1 A 和 HpRAP1 B。HpRAP1 B 可识别保护端粒 DNA, HpRAP1 A 与亚端粒区域相关。在核糖体蛋白基因的启动子中, 有 HpRAP1 A 和 HpRAP1 B 的特有结合位点<sup>[23]</sup>。裂殖酵母中酪蛋白激酶 2 可以使 RAP1 多个位点磷酸化, 从而促进 RAP1 与 BQT4 和 POZ1 的相互作用, 进而维持端粒与核被膜的距离, 促使染色质沉默结构的形成<sup>[7]</sup>。酿酒酵母 RAP1 在代谢、炎症、氧化应激等反应中都有重要作用<sup>[24]</sup>。

哺乳动物中 RAP1 是 TRF2 结合伴侣, 与 TRF2 形成复合体, 其在端粒中的位置和稳定性依赖于 TRF2, 敲除 TRF2 时, RAP1 也会消失。在端粒酶缺失的情况下, RAP1 对端粒的维持和保护具有重要作用。与端粒酶缺失小鼠相比, 同时缺失 RAP1 和端粒酶的小鼠, 其生存能力随传代进行性降低<sup>[25]</sup>。在仍有增殖能力的人老化细胞中, 下调 RAP1 会导致端粒丢失融合; 在端粒酶阳性细胞系中, 当端粒酶被抑制时, 敲除 RAP1 会增加端粒的融合<sup>[26]</sup>。在人老化细胞中, RAP1 与组蛋白异四聚体结合, 参与核小体位移, 从而调节基因表达, 但不影响细胞衰老进程<sup>[27]</sup>。

在人间充质干细胞和神经干细胞中, RAP1 负调节端粒长度, 同时作为转录调节因子, 调节基因启动子的甲基化状态。RAP1 缺失可以促进人间充质干细胞的自我更新, 延缓其衰老; 在人神经干细胞中未见类似作用<sup>[28]</sup>。成纤维细胞自然老化过程中 TRF2 和 RAP1 水平降低, 相较于 TRF2, RAP1 更稳定。在老化细胞中, 细胞核和细胞质中的 RAP1 含量相似, 过氧化氢处理的细胞, 其细胞核中的 RAP1 减少, 而细胞质中的没有改变<sup>[29]</sup>。

### 1.3 TIN2

TIN2 位于 shelterin 的中心位置, 可以结合 TRF1、TRF2 和 TPP1, 还介导端粒酶与端粒的结合<sup>[30]</sup>, TIN2 与 TPP1/POT1 协作可以刺激端粒酶活性<sup>[11]</sup>。TIN2 有 3 种异构体, 即 TIN2L、TIN2M、TIN2S, 三者都位于端粒中, TIN2 异构体在生化特性

和功能上完全不同, TIN2 编码基因突变的病人其 shelterin 功能发生改变<sup>[31]</sup>。在先天性角化不良症中 TIN2 发生突变,在端粒酶阴性成体细胞中会出现端粒功能失调表型,在端粒酶阳性干细胞中则加重端粒的维持问题<sup>[32]</sup>。人抗原 R (human antigen R, HuR) 结合 TIN2 mRNA 3' 非翻译区。HuR 耗竭时,可以促进 TIN2 表达,导致线粒体 TIN2 增加,使 ROS 增加,从而诱导生长停滞,但不影响细胞核 TIN2<sup>[33]</sup>。Siah2 (seven-in-absentia homolog 2) 蛋白具有 E3 泛素连接酶的活性,可调节一些蛋白的泛素化和降解, TIN2 是其中之一。在体内, TIN2 与 Siah2 结合后被泛素化, Siah2 过表达可以导致 TIN2 蛋白降解,从而使端粒中的 TIN2 缺失;而敲除 Siah2 后, TIN2 稳定性增加<sup>[34]</sup>。

#### 1.4 POT1

POT1 是存在于多种生物的一种单链 DNA 结合蛋白,与富含鸟嘌呤的单链 DNA 3' 悬浮端结合<sup>[35]</sup>。人 POT1 是一个管家基因,有 22 个外显子,在人的各种组织细胞中广泛表达。POT1 启动子活性与 POT1 表达和端粒长度正相关,与人端粒酶表达呈负相关<sup>[36]</sup>。POT1 与 TPP1 结合形成复合体,此复合体对单链端粒 DNA 有高度特异性<sup>[12]</sup>。POT1-TPP1 复合体可以解开端粒二级结构,提高端粒酶活性<sup>[37]</sup>。在真核细胞多种活动中, microRNAs (miRNAs) 可以调节基因表达, miR-185 可直接作用于 POT1 3' 非翻译区。在人肿瘤细胞和原代成体细胞中, miR-185 过表达都可导致端粒功能失调。在原代细胞中, miR-185 过表达可加速衰老进程<sup>[38]</sup>。

啮齿类动物有 2 个 POT1 蛋白,即 POT1a 和 POT1b,二者密切相关, POT1a 抑制 ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase) 介导的 DNA 损伤修复机制,避免端粒末端被识别为 DNA 断端, POT1b 调控端粒 3' 悬浮端长度。人 POT1 同时具有这两种功能。在人细胞中, CST 复合体结合 POT1 和 TPP1,在小鼠中只结合 POT1b。POT1 与单链 DNA 结合,伸展 G4 DNA 结构,抑制同源重组介导的修复反应,从而稳定和 protect 端粒单链 DNA; 抑制 ATR 介导的 DNA 反应。在黑色素瘤、慢性淋巴细胞白血病等多种肿瘤中,发现 POT1 突变<sup>[39]</sup>。

#### 1.5 TPP1

TPP1 的 N 末端有 7 个寡核苷酸/寡糖结合结构域 (oligonucleotide/oligosaccharide binding, OB), 与端粒酶密切相关;人 TPP1 N 末端 OB 结构域突变

可降低其对端粒酶的刺激作用,影响端粒酶与端粒的结合,导致端粒缩短<sup>[40]</sup>。TPP1 C 末端结构域介导其与 TIN2 的相互作用<sup>[41]</sup>。敲降小鼠 TPP1 会诱导 p53 依赖性生长停滞和 ATM 依赖性 DNA 损伤应答。在小鼠胚胎成纤维细胞中, TPP1 基因缺失增加姐妹染色体端粒融合,减少端粒酶与端粒的结合<sup>[42]</sup>。

在哺乳动物细胞中 TPP1 与细胞周期调控因子激酶 NEK6 相互作用,在 G2/M 期 NEK6 介导 TPP1 Ser255 的磷酸化,从而调节端粒酶活性及其与 TPP1 的相互作用。而 POT1 负调控 TPP1 Ser255 的磷酸化<sup>[43]</sup>。在人肺癌细胞中, TPP1 OB 结构域蛋白抑制端粒酶募集到端粒上,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡<sup>[44]</sup>。人多能干细胞端粒长度设定点的调控主要依赖于 TPP1, TPP1L104A 突变可改变人干细胞端粒长度设定点<sup>[45]</sup>。

## 2 CST

CST 复合体由 3 个亚单位组成,即 CTC1、STN1 和 TEN1。酵母 CDC13 是哺乳动物 CTC1 的同源物。CST 复合体位于单链端粒 DNA,限制端粒酶作用,以防悬浮端过度延伸。TEN1 有助于稳定 CTC1-STN1 与端粒 DNA 的相互作用。CTC1 可以刺激 DNA 聚合酶  $\alpha$  (Pol $\alpha$ ),在端粒复制中起关键作用。STN1-TEN1 的作用类似复制蛋白 A,在复制压力下使细胞正常复制。

小鼠 CTC1 基因缺失导致 C 链端粒 DNA 的迅速丢失,从而导致端粒的灾难性丢失和过早死亡。CTC1 在 CST 复合体中起关键作用,其突变对细胞环境具有致死性。已知 CTC1 的多个自发性突变与 Coats plus disease (CP) 和先天性角化不良 (dyskeratosis congenita, DC) 相关。STN1 有 2 个结构域, N 末端 OB 区和 C 末端 STN1 结构域, TEN1 只有 1 个 OB 结构域。人 TEN1 不与单链端粒 DNA 相互作用。而人 STN1 与单链端粒 DNA 亲和力高,但缺乏特异性。STN1-TEN1 复合物的形成对于正常发挥 CST 复合物的功能至关重要。STN1 突变与 CP 相关<sup>[6]</sup>。

尽管在纤毛虫、酵母、植物和哺乳动物中都存在 CST 复合体,序列同源性较低,物种间差异显著。酵母和人的 CST 复合体中, STN1 和 TEN1 在结构上高度保守,而 CST 复合体的重要组分 CDC13 和 CTC1,没有序列同源性,在长度和功能上差异显著。

酵母 CDC13 与端粒酶全酶中的 EST1 相互作用,从而募集端粒酶到端粒上。人 CTC1 则抑制端粒酶到端粒的募集。近期研究发现嗜热四膜虫的 p75-p45-p19 与 CST 序列没有同源性,但其功能类似纤毛虫 CST 复合物,协调 G 链和 C 链的合成<sup>[46]</sup>。

### 3 端粒酶

端粒酶是一种核蛋白,人端粒酶核蛋白由端粒酶 RNA (telomerase RNA component, TERC)、端粒酶反转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT),以及附属蛋白 dyskerin、端粒酶卡哈尔体蛋白 (telomerase Cajal Body protein 1 homolog, TCAB1)、核糖核蛋白 NOP10、NHP2、GAR1 组成<sup>[47]</sup>。不同物种间,TERC 的大小和序列差异显著,hTERC 有 451 个核苷酸 (nucleotides, nt),纤毛虫 ~150 nt,酿酒酵母 ~1150 nt,粉色面包霉菌 >2000 nt。TERC 的大小和序列并非高度保守,所有 TERC 有 4 个功能特性:反转录模板、假结结构域、与 TERT 相互作用的干环 (stem-loop)、RNA 稳定所需的 3' 元素。hTERC 由 RNA 聚合酶 II 从其自身启动子转录而来。多数生物中,TERT 蛋白含有 4 个功能结构域:端粒酶 N 末端结构域 (telomerase essential N-terminal domain, TEN)、TERC 结合结构域 (telomerase RNA binding domain, TRBD)、反转录酶结构域、C 端扩展区 (C-terminal extension, CTE)。hTERT 中 TEN 在端粒酶募集至端粒的过程中起关键作用,参与催化端粒重复序列的合成<sup>[9,13,48]</sup>。

各组织中端粒酶活性,恒河猴、日本猕猴、食蟹猴与人相似;在多数成体组织中端粒酶活性受到抑制,在脾、胸腺、消化道中有弱活性,睾丸中活性较高。在牛、羊、马、鹿的成纤维细胞和各种绵羊或马的成体组织中均未检测到端粒酶活性。猪的多个成体组织,如淋巴结、肺、肾和小肠等具有显著水平的端粒酶活性<sup>[49]</sup>。提高端粒酶活性可以促进大鼠和人颗粒细胞、小鼠卵巢中类固醇激素基因的表达和激素生成<sup>[50]</sup>。

端粒酶附属蛋白同样具有重要作用。dyskerin 的编码基因是 DKC1,位于 X 染色体。dyskerin 可以稳定 hTR,增强 hTERT 活性。dyskerin 过多或过少都会导致癌症,乳腺癌和前列腺癌中 dyskerin 水平较高,dyskerin 水平降低与脑垂体癌变有关,DC 中 dyskerin 水平较低。DKC1 基因突变小鼠可发生多种恶性肿瘤<sup>[51]</sup>。NHP2 敲除可以抑制 TERT 表达,

破坏端粒酶复合体的稳定,从而抑制细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[52]</sup>;NHP2 的致病性突变减少小核仁 RNA (small nucleolar RNAs, snoRNAs) 的累积,影响核糖体 RNA (ribosome RNA, rRNA) 的加工处理,NHP2 缺失可减少 rRNA 生成,导致肺纤维化和 Høyeraal-Hreidarsson 综合征<sup>[53]</sup>。NOP10 可预测肺癌的预后,其相关 snoRNAs 可以促进肺癌细胞的生长、增殖、迁移和侵袭<sup>[54]</sup>。在乳腺癌中 NOP10 高表达也预示预后不良<sup>[55]</sup>。DKC1 和 NOP10 突变导致肾病综合征,包括白内障、听力障碍、小肠结肠炎等<sup>[56]</sup>。在癌细胞中,抑制 TCAB1 表达,可减少 p21 蛋白降解,从而诱导细胞衰老<sup>[57]</sup>。

### 4 总结与展望

端粒结合蛋白、端粒酶,以及端粒酶附属蛋白,在维持端粒长度和稳定中起重要作用,这些蛋白基因突变或表达量改变,可导致多种疾病,如以短端粒为特点的端粒病,包括先天性角化不良、肺纤维化、再生障碍性贫血等<sup>[58]</sup>;在多种肿瘤中也发现端粒结合蛋白的突变,如在乳腺、胃、甲状旁腺等肿瘤中都有 POT1 突变<sup>[12]</sup>。与端粒功能障碍相关的疾病,在治疗时,可以将端粒结合蛋白、端粒酶、端粒酶附属蛋白等作为治疗靶点。

已有研究表明,哺乳动物端粒的长度与寿命呈负相关,端粒酶活性与体重呈负相关。小鼠的寿命较短,体重较小,其端粒较长,各组织有不同程度端粒酶活性;而人的寿命较长,体重较大,端粒较短,多数组织无端粒酶活性,因此人有复制性衰老现象<sup>[59]</sup>。端粒酶敲除的啮齿类动物模型是研究端粒和端粒酶基本生物特性的良好模型,但很难用于深入研究人类衰老和疾病中端粒和端粒酶的作用。要深入研究端粒和端粒酶在人类疾病中的作用,还需寻找合适的模型。

#### 参考文献:

- [1] Schmid M, Steinlein C. Chromosome banding in amphibia. XXXIV. intrachromosomal telomeric DNA sequences in anura [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2016, 148(2-3): 211-226.
- [2] Korandova M, Krucek T, Szakosova K, et al. Chronic low-dose pro-oxidant treatment stimulates transcriptional activity of telomeric retroelements and increases telomere length in *Drosophila* [J]. *J Insect Physiol*, 2018, 104: 1-8.
- [3] Ji G, Liu K, Chen C, et al. Conservation and characterization of unique porcine interstitial telomeric sequences [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2012, 55(12): 1029-1037.

- [ 4 ] Bateson M. Cumulative stress in research animals: Telomere attrition as a biomarker in a welfare context [J]. *Bioessays*, 2016, 38(2): 201–212.
- [ 5 ] Zhao Y, Hoshiyama H, Shay JW, et al. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(3): e14.
- [ 6 ] Amir M, Khan P, Queen A, et al. Structural features of nucleoprotein CST/shelterin complex involved in the telomere maintenance and its association with disease mutations [J]. *Cells*, 2020, 9(2): 359.
- [ 7 ] Inoue H, Horiguchi M, Ono K, et al. Casein kinase 2 regulates telomere protein complex formation through Rap1 phosphorylation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(13): 6871–6884.
- [ 8 ] Bonetti D, Rinaldi C, Vertemara J, et al. DNA binding modes influence Rap1 activity in the regulation of telomere length and MRX functions at DNA ends [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(5): 2424–2441.
- [ 9 ] Veverka P, Janovic T, Hofr C. Quantitative biology of human shelterin and telomerase; searching for the weakest point [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 2020(13): 3186.
- [ 10 ] Hu C, Rai R, Huang C, et al. Structural and functional analyses of the mammalian TIN2-TPP1-TRF2 telomeric complex [J]. *Cell Res*, 2017, 27(12): 1485–1502.
- [ 11 ] Pike AM, Strong MA, Ouyang JPT, et al. TIN2 functions with TPP1/POT1 to stimulate telomerase processivity [J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39(21): e00593–e00618.
- [ 12 ] Aramburu T, Plucinsky S, Skordalakes E. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 1939–1946.
- [ 13 ] Smith EM, Pendlebury DF, Nandakumar J. Structural biology of telomeres and telomerase [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(1): 61–79.
- [ 14 ] Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres [J]. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 301–334.
- [ 15 ] Derevyanko A, Whittemore K, Schneider RP, et al. Gene therapy with the TRF1 telomere gene rescues decreased TRF1 levels with aging and prolongs mouse health span [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(6): 1353–1368.
- [ 16 ] Porreca RM, Herrera-Moyano E, Skourti E, et al. TRF1 averts chromatin remodelling, recombination and replication dependent-break induced replication at mouse telomeres [J]. *Elife*, 2020, 9: e49817.
- [ 17 ] Sarek G, Kotsantis P, Ruis P, et al. CDK phosphorylation of TRF2 controls t-loop dynamics during the cell cycle [J]. *Nature*, 2019, 575(7783): 523–527.
- [ 18 ] Van Ly D, Low RRRJ, Frolich S, et al. Telomere loop dynamics in chromosome end protection [J]. *Mol Cell*, 2018, 71(4): 510–525, e516.
- [ 19 ] Drosopoulos WC, Deng Z, Twayana S, et al. TRF2 mediates replication initiation within human telomeres to prevent telomere dysfunction [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(6): 108379.
- [ 20 ] Nie X, Xiao D, Ge Y, et al. TRF2 recruits nucleolar protein TCOF1 to coordinate telomere transcription and replication [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(3): 1062–1075.
- [ 21 ] Ruis P, Van Ly D, Borel V, et al. TRF2-independent chromosome end protection during pluripotency [J]. *Nature*, 2021, 589(7840): 103–109.
- [ 22 ] Markiewicz-Potoczny M, Lobanova A, Loeb AM, et al. TRF2-mediated telomere protection is dispensable in pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2021, 589(7840): 110–115.
- [ 23 ] Malyavko AN, Petrova OA, Zvereva MI, et al. Functional duplication of Rap1 in methylotrophic yeasts [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7196.
- [ 24 ] Cai Y, Kandula V, Kosuru R, et al. Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(19): 1765–1773.
- [ 25 ] Martinez P, Gomez-Lopez G, Pisano DG, et al. A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance [J]. *Aging Cell*, 2016, 15(6): 1113–1125.
- [ 26 ] Lototska L, Yue JX, Li J, et al. Human RAP1 specifically protects telomeres of senescent cells from DNA damage [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(4): e49076.
- [ 27 ] Song S, Perez JV, Svitko W, et al. Rap1-mediated nucleosome displacement can regulate gene expression in senescent cells without impacting the pace of senescence [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(1): e13061.
- [ 28 ] Zhang X, Liu Z, Liu X, et al. Telomere-dependent and telomere-independent roles of RAP1 in regulating human stem cell homeostasis [J]. *Protein Cell*, 2019, 10(9): 649–667.
- [ 29 ] Swanson MJ, Baribault ME, Israel JN, et al. Telomere protein RAP1 levels are affected by cellular aging and oxidative stress [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(2): 181–187.
- [ 30 ] Frank AK, Tran DC, Qu RW, et al. The shelterin TIN2 subunit mediates recruitment of telomerase to telomeres [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(7): e1005410.
- [ 31 ] Nelson ND, Dodson LM, Escudero L, et al. The C-terminal extension unique to the long isoform of the shelterin component TIN2 enhances its interaction with TRF2 in a phosphorylation- and dyskeratosis congenita cluster-dependent fashion [J]. *Mol Cell Biol*, 2018, 38(12): e00025–e00043.
- [ 32 ] Frescas D, de Lange T. A TIN2 dyskeratosis congenita mutation causes telomerase-independent telomere shortening in mice [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(2): 153–166.
- [ 33 ] Li J, Chang J, Tian J, et al. A rare variant P507L in TPP1 interrupts TPP1-TIN2 interaction, Influences telomere length, and confers colorectal cancer risk in chinese population [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2018, 27(9): 1029–1035.
- [ 34 ] Bhanot M, Smith S. TIN2 stability is regulated by the E3 ligase Siah2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 376–384.
- [ 35 ] Chaires JB, Gray RD, Dean WL, et al. Human POT1 unfolds G-quadruplexes by conformational selection [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(9): 4976–4991.

- [36] Zeng L, Wang YL, Wang F, et al. Construction of the POT1 promoter report gene vector, and the effect and underlying mechanism of the POT1 promoter in regulating telomerase and telomere length [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7232–7240.
- [37] Mullins MR, Rajavel M, Hernandez-Sanchez W, et al. POT1-TPP1 binding and unfolding of telomere DNA discriminates against structural polymorphism [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(13): 2695–2708.
- [38] Li T, Luo Z, Lin S, et al. MiR-185 targets POT1 to induce telomere dysfunction and cellular senescence [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(14): 14791–14807.
- [39] Wu Y, Poulos RC, Reddel RR. Role of POT1 in human cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): 2739.
- [40] Grill S, Tesmer VM, Nandakumar J. The N terminus of the OB domain of telomere protein TPP1 is critical for telomerase action [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(5): 1132–1140.
- [41] Sandhu R, Wei D, Sharma M, et al. An N-terminal flag-tag impairs TPP1 regulation of telomerase function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(2): 230–235.
- [42] Rajavel M, Mullins MR, Taylor DJ. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(9): 1550–1559.
- [43] Hirai Y, Tamura M, Otani J, et al. NEK6-mediated phosphorylation of human TPP1 regulates telomere length through telomerase recruitment [J]. *Genes Cells*, 2016, 21(8): 874–889.
- [44] Zhu J, Liu W, Chen C, et al. TPP1 OB-fold domain protein suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis by inhibiting telomerase recruitment to telomeres in human lung cancer cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(6): 1509–1519.
- [45] Boyle JM, Hennick KM, Regalado SG, et al. Telomere length set point regulation in human pluripotent stem cells critically depends on the shelterin protein TPP1 [J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(23): 2583–2596.
- [46] Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016, 14: 161–167.
- [47] Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(1): 1401–1411.
- [48] Schmidt JC, Cech TR. Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(11): 1095–1105.
- [49] Gorbunova V, Seluanov A. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: from mice to beavers [J]. *Mech Ageing Dev*, 2009, 130(1–2): 3–9.
- [50] Mordechai A, Wasserman M, Abramov M, et al. Increasing telomerase enhanced steroidogenic genes expression and steroid hormones production in rat and human granulosa cells and in mouse ovary [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 197: 105551.
- [51] Alnafakh R, Saretzki G, Midgley A, et al. Aberrant dyskerin expression is related to proliferation and poor survival in endometrial cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(2): 273.
- [52] Tang S, Wu W, Wan H, et al. Knockdown of NHP2 inhibits hepatitis B virus X protein-induced hepatocarcinogenesis via repressing TERT expression and disrupting the stability of telomerase complex [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(19): 19365–19374.
- [53] Benyelles M, O’Donohue MF, Kermasson L, et al. NHP2 deficiency impairs rRNA biogenesis and causes pulmonary fibrosis and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(6): 907–922.
- [54] Cui C, Liu Y, Gerloff D, et al. NOP10 predicts lung cancer prognosis and its associated small nucleolar RNAs drive proliferation and migration [J]. *Oncogene*, 2021, 40(5): 909–921.
- [55] Elsharawy KA, Althobiti M, Mohammed OJ, et al. Nucleolar protein 10 (NOP10) predicts poor prognosis in invasive breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2021, 185(3): 615–627.
- [56] Balogh E, Chandler JC, Varga M, et al. Pseudouridylation defect due to DKC1 and NOP10 mutations causes nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment, and enterocolitis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(26): 15137–15147.
- [57] Niu J, Gao RQ, Cui MT, et al. Suppression of TCAB1 expression induced cellular senescence by lessening proteasomal degradation of p21 in cancer cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 26.
- [58] Grill S, Nandakumar J. Molecular mechanisms of telomere biology disorders [J]. *J Biol Chem*, 2020, 296: 100064.
- [59] Calado RT, Dumitriu B. Telomere dynamics in mice and humans [J]. *Semin Hematol*, 2013, 50(2): 165–174.

[收稿日期]2021-05-12

王笑冉, 郑攀. 发作性睡病动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 143-148.

Wang XR, Zheng P. Research progress on animal models of paroxysmal narcolepsy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 143-148.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.021

## 发作性睡病动物模型研究进展

王笑冉, 郑攀\*

(河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046)

**【摘要】** 发作性睡病(narcolepsy, NRL)是一种觉醒-睡眠紊乱的慢性神经系统疾病,其具体病因及发病机制尚未明确,中、西医治疗存在困难。动物模型是研究发作性睡病的神经病理学机制,挖掘潜在治疗靶点及方法的重要手段。本文对目前已有的发作性睡病动物模型的制备方法、模型评价及适用范围等进行总结,旨在为该病的基础实验研究提供造模参考,并对优化发作性睡病动物模型的制备方向提供思路。

**【关键词】** 发作性睡病;动物模型;研究进展

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0143-06

### Research progress on animal models of paroxysmal narcolepsy

WANG Xiaoran, ZHENG Pan\*

(Basic Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**【Abstract】** Narcolepsy is a chronic nervous system disease with arousal sleep disorder. Its specific pathogenesis is unclear and it is difficult to treat by traditional Chinese and western medicines. Animal models are important to study the neuropathological mechanism and potential treatment of paroxysmal narcolepsy. This article summarizes the preparation method, evaluation, and application scope of existing animal models of paroxysmal narcolepsy to provide a reference for basic experimental research of the disease. It also provides ideas to optimize the preparation of paroxysmal narcolepsy animal models.

**【Keywords】** narcolepsy; animal model; research progress

发作性睡病一词,由 Gelineau 于 1880 年首次提出,本病是一种原因不明的中枢性睡眠障碍,以白天不可抗拒的短期嗜睡发作和异常的快速动眼睡眠(猝倒、睡眠幻觉和睡眠瘫痪)为典型特征,多于儿童或青年期起病<sup>[1]</sup>。由于对此病缺乏认识,常出现漏诊而延误治疗,严重影响患者的工作学习生活,甚至造成意外事故危及生命。选择合适的动物模型用于研究该病发病机制,发掘潜在的治疗靶点显得尤为重要。本文对目前已有的发作性睡病模型进行综述,总结其诱发机制、模型应用的优缺点等,以便研究者可以据此选择更贴合实验目的的造

模方法,获得更准确的研究结果。

#### 1 自发性动物模型

自发性动物模型指实验动物未经任何人工干预,在自然状态下发生的、或由基因突变的异常表现通过遗传育种保留下来的动物疾病模型<sup>[2]</sup>。目前,已证实的 NRL 自发性模型为犬类动物模型。早在上世纪八十年代,人们在犬身上发现与人类发作性睡病极为相似的症状<sup>[3-4]</sup>。1999 年, Lin 等<sup>[5]</sup>揭示了犬发作性睡病是由于食欲素受体 2 (orexin receptor 2, OX2R) 的基因突变。家族性发作性睡病

**【基金项目】** 河南省科技厅科技攻关项目(182102310299);河南省中医药科学研究专项(20-21ZY2021);河南中医药大学研究生创新基金(YJS2018B06)。

**【作者简介】** 王笑冉(1995—),女,硕士,研究方向:方剂作用机理与配伍规律研究。E-mail: wxr18300671729@163.com

**【通信作者】** 郑攀(1977—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:方剂作用机理与配伍规律研究及儿科神经疾病研究。E-mail: wwwzp2020@126.com

呈常染色体隐性遗传存在于杜宾犬和拉布拉多猎犬的品系中,由 OX2R 基因的外显子跳跃突变引起,而散发性犬发作性睡病与脑脊液中食欲素多肽显著降低有关。其表现为突然的肌张力丧失和快速动眼睡眠(rapid eye movement sleep, REM)发作,首次出现在青春期前,成年后症状相对减轻<sup>[6-7]</sup>。自此各种基于下丘脑泌素/食欲素系统(hypocretin, Hcrt)的动物模型根据不同的研究目的被建立。

## 2 基因工程模型

### 2.1 基因敲除模型

#### 2.1.1 Hcrt/Orexin 基因敲除小鼠

食欲素(orexin),又称下丘脑泌素,是下丘脑外侧区食欲素能神经元合成和分泌的小分子神经多肽(Hcrt-1、Hcrt-2 或称 Orexin-A、Orexin-B),其来源于同一种前体多肽并通过蛋白水解产生<sup>[8-9]</sup>。人类食欲素原基因(prepro-orexin)由两个外显子和一个内含子组成,通过克隆 prepro-orexin-nlacZ 融合基因替换小鼠 prepro-orexin 基因的第一个外显子获得重组基因并导入 C57BL/6J 小鼠胚胎干细胞,借助杂交建立纯合子 Orexin 基因敲除小鼠。经免疫组化、原位杂交及放射免疫分析方法均证实,该小鼠 Hcrt 神经阳性表达丧失,出现与人类 NRL 相似的嗜睡、睡眠周期缩短及次数增加等症状。表现为 REM 潜伏期缩短,觉醒时间略有减少,觉醒-REM 转换加快,但有正常的非快速动眼睡眠(non-rapid eye movements, NREM)<sup>[10-11]</sup>。Mochizuki 等<sup>[12]</sup>对 Orexin 基因敲除小鼠进行深入研究,证实其具有正常睡眠-觉醒行为的昼夜节律控制,且受 Orexin 高度刺激的促觉醒单胺类神经递质如去甲肾上腺素和组胺等未见异常。Orexin 基因敲除小鼠证明了 Hcrt 神经元是内源性睡眠/觉醒调节系统的重要组成部分,但代偿表达增强的下丘脑外侧黑色素浓缩激素神经元仍可调节睡眠-觉醒回路,明显干扰了研究对 Orexin 基因本身表达产生嗜睡的解释<sup>[13-15]</sup>。

#### 2.1.2 OX2R/OX1R 基因敲除小鼠

Orexin 通过与 G 蛋白偶联受体(OX1R 和 OX2R)结合,参与调节多种生理反应。在大脑皮层,OX1R 和 OX2R 的 mRNA 表达有明显的昼夜节律<sup>[16-17]</sup>。Willie 等<sup>[18]</sup>通过线性化载体的同源重组,在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)中用  $\beta$  半乳糖苷酶(LacZ)和新霉素抗性(NEO)表达盒替换 OX2R 基因第一个外显子。正确定向的 ES 细胞克隆被分离并注射到 C57BL/6J 囊胚中。纯合型小鼠

无法检测 OX2R mRNA 表达,在睡眠结构上表现出轻度的 REM 睡眠增加和猝倒发作,并出现清醒状态下的 NREM 睡眠侵入。Kalogiannis 等<sup>[19]</sup>基于纯合单受体基因敲除杂合子 OX2R/OX1R 构建双重 Orexin 受体基因敲除小鼠,表现出了较 OX2R 基因敲除小鼠更强烈的发作性睡病表型,特征为频繁发作的觉醒-睡眠转换;REM 睡眠潜伏期缩短,时间延长;觉醒时间显著减少并出现猝倒发作,其与 Orexin 基因敲除小鼠行为学相似。对 Hcrt 受体的遗传操作是构建发作性睡病模型的另一种方法。

### 2.2 转基因模型

#### 2.2.1 Orexin/Ataxin-3 转基因小鼠

Ataxin-3 是脊髓小脑性共济失调 3 型的疾病蛋白,多选用 SD 大鼠或 Wistar 小鼠建模。Beuckmann 研究小组首次构建 Orexin/Ataxin-3 mice,通过在 prepro-orexin 启动子后连接一段在 N 端表达含有多聚谷氨酸片断的 ataxin-3 蛋白,在 C 端连接用于组织学检查的 Myc 癌基因序列,对尾部活检组织的基因组 DNA 进行 PCR 扩增并注射到 Wistar 小鼠受精卵原核中,产成 Orexin/Ataxin-3 转基因系<sup>[20-21]</sup>。由于 Hcrt 启动子驱动的细胞毒基因产物 PolyQ-ataxin-33 积累,Hcrt 神经元逐渐选择性地丢失。17 周龄,用 Myc 标记免疫组织化学染色法检测显示转基因小鼠下丘脑外侧区出现 Hcrt 阳性神经元丧失,在乳头核、中央灰质、穹隆周围核、弓状核等同样缺乏 Hcrt 投射。在睡眠结构上,模型小鼠表现出亮期 REM 潜伏期缩短,暗期觉醒时间减少、REM 睡眠时间延长,觉醒-REM 转换加快,但在 24 h 的清醒和 NREM 睡眠时间保持不变。此模型中 Hcrt 神经元消融是渐进性的,减轻了结构性食欲素原基因敲除的代偿作用,更能代表人类发作性睡病的病理改变。

#### 2.2.2 OX2R 转录干扰小鼠

OX2R 对 Orexin-A 和 Orexin-B 表现出同等的亲和力和,在大脑皮层、隔核、海马、丘脑内侧核、中缝核和许多下丘脑核(包括组胺能结节乳头核)中的表达显著<sup>[22-23]</sup>。基于 Cre-loxP 重组<sup>[24]</sup>,采用了转录干扰策略在 EL250 细菌细胞中构建靶向载体,使用 loxP 侧翼的基因盒来干扰 OX2R 的产生,利用下丘脑结节乳头核(tuberomammillary nucleus, TMN)神经元 orexin-A 细胞电生理反应的缺失验证该菌株中 OX2R 信号的缺失。进一步将编码 Cre 重组酶的腺相关病毒载体(AAV-Cre)注射到 C57BL/6J 小鼠双侧颞下颌核区,以确定局部恢复 OX2R 表达;并通过 OX2R 转录干扰小鼠与雌性胚系中表达 Cre 重组酶的 Zp3-Cre 小鼠(jackson laboratory)杂交,完全恢复

OX2R 信号<sup>[25]</sup>。模型小鼠维持清醒的能力降低,表现为嗜睡和睡眠碎片化;与 Orexin 敲除小鼠不同,OX2R 转录干扰小鼠只有罕见的猝倒发作。用 AAV-Cre 局部恢复 TMN 神经元和邻近下丘脑后部的 OX2R 后嗜睡症状有所减轻,但仍存在睡眠破碎。该模型制备过程是可逆的,可作为自身观察对照,为 NRL 的靶向治疗提供思路,且为开发食欲素受体拮抗剂用于失眠的治疗提供了科学依据。

### 2.2.3 O/E3 转录因子缺失小鼠

O/E3 属于碱性螺旋-环状转录因子家族,通过控制必需的下丘脑神经递质的表达及下丘脑神经纤维的正常发育,在功能性 Hcrt 能回路的建立过程中起着核心作用<sup>[26]</sup>。研究发现 O/E3 在 NRL 和 Hcrt 能群体退化的模型中表达下调<sup>[27]</sup>。De La Herrán-Arita 等<sup>[28]</sup>使用 pRVKI 载体来构建 O/E3 靶向构建体,并用可选择标记 PGK-neo 取代 O/E3 基因的前 5 个外显子。克隆一个 3.2 kb 的 O/E3 启动子区域的 Xho IBamH I 片段,作为单纯疱疹病毒酪氨酸激酶与 pRVKI 的 PGK-neo 选择标记之间的 5' 同源臂。从 O/E3 基因下游至第 5 外显子的 5.3 kb 的 Spe I-Sal I 片段被克隆为 pRVKI 载体 pGK-neo 选择标记下游的 3' 同源臂。再将 PCR 和 Southern 杂交检测呈阳性,并携带正确的靶向插入的 ES 细胞注射到 C57BL/6Ncr1 小鼠囊胚中,获得 O/E3 缺失的纯合子小鼠。其表现出 REM、NREM 睡眠时间延长,REM 潜伏期缩短,暗期觉醒时间减少,出现睡眠幻觉及厌食症状。免疫组化染色发现,O/E3 缺失导致下丘脑 Hcrt 细胞数量显著减少,局限于后部及穹隆周围区域。脑桥食欲素能神经支配受损,通过静脉注射 Hcrt-1 可逆转发作性睡病表型<sup>[29]</sup>。此模型突出了转录因子在控制睡眠-觉醒周期的神经亚群调节中的重要性,为理解复杂的食欲素神经元电路开辟了新的选择。

## 3 化学诱导动物模型

### 3.1 白喉毒素 A (diphtheria toxin chain A, DTA) 诱导模型

白喉毒素是一种具有高度免疫原性的蛋白质,可导致生物神经脱髓鞘。基于 Tet-off 调控系统控制转基因表达的技术,将白喉毒素受体基因特定表达于小鼠 Hcrt 启动子上,构建 Teto DTA 小鼠。用哺乳动物四环素控制的转录激活因子 (tetracycline-controlled transactivator, TTA) 片段取代 Hcrt/nLacZ 转基因构建体的 nLacZ 基因,并注射到 Teto DTA 小鼠受精卵 (C57BL/6 小鼠) 的原核中,通过 C57BL/

6J 小鼠培育出稳定的 Hcrt-TTA 转基因品系<sup>[30]</sup>。Hcrt 神经元变性由四环素反式激活因子 Tet-off (Teto) 系统控制的,膳食多西环素 (doxycycline, DOX) 与 TTA 结合,通过 Tet-off 调节蛋白阻止 DTA 的合成。由于 TTA 被连接到 Hcrt 启动子上,从饮食中去除 DOX 会启动 DTA 的合成,仅在 Hcrt 神经元中产生神经毒性<sup>[31-32]</sup>。配对的 Hcrt-TTA 小鼠和 Teto DTA 小鼠进行交配产生 Hcrt-TTA/Teto DTA 小鼠,将 10% DOX 粉添加入正常饲料,在产前和出生后 12 周内使用含 DOX 饲料喂养,后换成普通饲料喂养至 14 周,再重复用 DOX 饲料喂养至 25 周。在睡眠结构上,在去除 DOX 饮食后 14 d, Hcrt-TTA/Teto DTA 小鼠出现频繁猝倒发作,主要发生在暗期及亮期的觉醒前期;REM 潜伏期缩短、睡眠时间延长;睡眠-觉醒转换次数增加。行为学上,表现为进食量无改变,但运动减少,体重增加。DAT 诱导模型可通过比较同一个体动物在 Hcrt 神经元消融之前、期间和之后的行为和生理学,来研究 Hcrt 神经元消融过程中 NRL 的症状进展;且 Hcrt 神经退行性病变在青春期前后诱导,更符合人类 NRL 的发病进程。模型小鼠体重增加,但食物摄入量未改变,这与人类 NRL 代谢表现类似。实验者可自行控制 Hcrt 神经元消融时间和持续时间,可用于猝倒的药理学研究,在 Hcrt 神经输入受限时的网络重组研究。

### 3.2 核糖体失活蛋白 (saporin, SAP) 诱导模型

将内源性配体 Hcrt2 与 SAP 偶联,构建 Hcrt2-sAP 神经毒素。研究证实 Hcrt2-sAP 可与含有 HcrtR2 受体特异性结合,向大鼠下丘脑外侧核注射 Hcrt2-sAP 可破坏 Hcrt 神经元,从而减少脑脊液中 Hcrt 含量,诱导大鼠的发作性睡病行为<sup>[33]</sup>。Blanco-Centurion 等<sup>[34]</sup>利用 Hcrt2-sAP,将其分别注入大鼠下丘脑外侧和腹侧 0.5 mm 处,当 Hcrt2-sAP 应用于下丘脑外侧时,受损大鼠出现 NRL 表型;而损伤内侧隔区 Hcrt 受体神经元并未观察到 NRL 症状。嗜睡大鼠表现出 REM/NREM 睡眠时间延长;肌张力增加且出现广泛的肢体运动。Arias-Carrión 等<sup>[35]</sup>对此模型大鼠进一步研究发现,当 73% Hcrt 受体神经元被成功损毁时,脑脊液中 Hcrt 水平降低 50%。并利用睡眠剥夺法检测下丘脑增食欲素表达,来测试睡眠调节的动态平衡机制,结果显示在损伤后 6 h,增食欲素水平未见增加。Hcrt2-sAP 诱导模型可通过靶向损伤受体神经元,阐明特定的 Hcrt 神经支配在睡眠-觉醒行为中的作用,为探索移植作为 NRL 的治疗手段提供了思路。但由于 Hcrt2-sAP 可消融

其他表达食欲素受体的 LH 细胞群体,包括黑色素浓缩激素神经元和含腺苷脱氨酶的神经元等<sup>[36-37]</sup>,所以此类模型与人类 NRL 的发病机制存在差异。

### 3.3 硝基还原酶-甲硝唑诱导的斑马鱼模型

Hcrt 能神经元在斑马鱼中表现出调节睡眠和清醒行为的双重功能<sup>[38]</sup>。Elbaz 等<sup>[39]</sup>将大肠杆菌的硝基还原酶 B(nitroreductase B, nfsB)转基因特异性表达于 Hcrt 能神经元中,构建了时空可控的 Hcrt 能神经元消融的转基因斑马鱼模型。硝基还原酶通过将无害的前体药物甲硝唑(metronidazole, MET)转变为具有毒性的产物,对 Hcrt 神经元进行消融<sup>[40-41]</sup>。模型表现出白天 REM 睡眠时间延长,睡眠-觉醒转换次数增加,对外部刺激反应性降低。由于斑马鱼 Hcrt 神经元网络只由 20~60 个脑神经元组成,因此造模简单,易于操作<sup>[42]</sup>,但与人类在解剖结构、生理反应上均存在较大差异。

## 4 光遗传学模型

Williams 等<sup>[43]</sup>在食欲素原启动子下游插入修饰的 Arch-3 gene,用 1.5 kb 的 Arch 片段替换 Hcrt/nLacZ 构建体的 LacZ 基因,将其表达为与增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluoresce protein, EGFP)的融合蛋白,从而获得转基因载体。将转基因显微注射到 BDF1 小鼠受精卵的原核中并培育出稳定的 Hcrt/Arch 转基因品系,黄色光敏 Arch-3 质子泵在 Hcrt 神经元中发挥特异性抑制作用。利用抗 EGFP 抗体进行免疫组织化学双标,证实 Arch 在 Hcrt 神经元中的表达。通过对该模型小鼠进行光照可以诱导潜伏期较短的睡眠,但诱导效果与转基因表达程度有关。高水平 Arch 表达影响了 Hcrt 神经元兴奋性,模型小鼠表现出 REM/NREM 潜伏期缩短,REM 睡眠延长,觉醒时间减少。Hcrt/Arch 小鼠允许对 Hcrt 神经元进行短期、可逆的操作,便于评估 Hcrt 神经回路的特定方面及 Hcrt 激活或抑制的后果。

## 5 免疫介导模型

### 5.1 脂多糖诱导的 CCR3 基因敲除模型

趋化因子受体 3(chemokine receptor 3, CCR3)是与发作性睡病相关的易感基因,其在发作性睡病患者外周血中的表达水平降低<sup>[44]</sup>。CCR3 作为一种 G 蛋白偶联受体,调节免疫细胞的定位及炎症细胞分泌的趋化因子梯度,在中枢神经系统中作为炎症介质发挥作用<sup>[45]</sup>。Toyoda 等<sup>[46]</sup>发现与 WT 小鼠相

比,CCR3 基因敲除小鼠的 Hcrt 神经元数量减少约 10%,未产生发作性睡病的表现。进一步使用革兰氏阴性菌外膜的主要结构成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为免疫系统刺激物,腹腔注射入 CCR3 基因敲除小鼠,小鼠出现 REM 睡眠时间延长,NREM 睡眠时间缩短而发作次数增加。多项研究证实,LPS 能在给药后 24 h 内改变啮齿动物的睡眠-觉醒模式<sup>[47-49]</sup>。LPS 诱导的 CCR3 基因敲除小鼠适用于研究由环境触发因素引起免疫介导的 Hcrt 神经元退化,来理解发作性睡病的免疫发病背景。

### 5.2 CD8<sup>+</sup>T 介导的 Hcrt 神经元损伤模型

发作性睡病与人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)等位基因 *HLA-DQB1\*06:02* 密切相关,98.4% 的患者携带该基因,在发作性睡病患者的血清和脑脊液中已发现识别中枢神经系统表达不同抗原靶点的自身抗体<sup>[50-52]</sup>。Bernard-Valnet 等<sup>[53]</sup>培育了在 Hcrt 能神经元(称为 Orex-HA)中特异性表达血凝素(hemagglutinin, HA)作为“新自身抗原”的小鼠,将 Rosa26tm(HA)1lib 小鼠与 Orex-Cre 小鼠杂交,在人食欲素启动子的控制下表达 Cre,通过定量 RT-PCR 方法检测评估 HA 在 Orex-HA 小鼠大脑不同部位的转录情况。然后将自身抗原特异性的 CD8<sup>+</sup>T(CTL)细胞注射到 Orex-HA 小鼠体内,组织学分析显示 Orex-HA 小鼠下丘脑有密集的 T 细胞浸润,在移植后第 5~8 天达到高峰。15 d 后再次接受 CTL,迅速出现明显的发作性睡病表型,包括猝倒发作,REM 潜伏期缩短、时间延长,觉醒次数减少。CTL 与表达 MHC-I 类 Hcrt 神经元直接相互作用,导致细胞溶解颗粒极化,反复注射 CTL 后,这种表型进一步加重<sup>[54]</sup>。该模型适用于发作性睡病的自身免疫发病机制研究,且为探究免疫疗法提供了理论基础。

## 6 总结

NRL 是一种具有遗传易感性、受环境因素影响或触发的疾病,发病机制复杂。动物模型是研发和测试新的 NRL 疗法的基础。目前已开发的动物模型主要通过基因工程或化学诱导等方法,造成下丘脑外侧区 Hcrt 神经元特异性丧失,以模拟人类 NRL 的病理表现和临床特征,但由于实验动物与人类在基因调控、器官结构与细胞类型等存在一定差别,这些模型对 NRL 治疗靶点的预测能力有限,仍需进一步验证。如在 O/E3 转录因子缺失模型中,通过静脉注射 Hcrt-1 可逆转 NRL 表型,但对于人类 NRL

患者使用 Hcrt 神经肽并不可行,因其很难穿越血脑屏障<sup>[55]</sup>。NRL 治疗发展的最终目标应是研发出一种针对该病病因,即自身免疫介导的下丘脑外侧区 Hcrt 神经元退化。因此,可进一步构建由自身免疫介导的 NRL 动物模型,更准确地了解免疫系统对 NRL 患者 Hcrt 系统毁损的病理机制,从而为预防、治疗或阻止 NRL 的发作提供相应的治疗靶点。

综上,虽然目前的动物模型不能完全概括人类发作性睡病的所有特征,但在揭示发作性睡病复杂病理机制及潜在治疗策略等方面,动物模型发挥了关键作用。需要强调的是,动物模型应是人体复杂系统的简单表示,模拟疾病的特定方面,而决不是试图复制人类疾病的所有复杂性。每个模型的优势很大程度上取决于该模型的评估目的,未来仍需基于研究目的继续探索更合适的动物模型。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Barker EC, Flygare J, Paruthi S, et al. Living with narcolepsy: current management strategies, future prospects, and overlooked real-life concerns [J]. *Nat Sci Sleep*, 2020, 16(12): 453-466.
- [ 2 ] 周光兴, 高诚, 徐平, 等. 人类疾病动物模型复制方法学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2008.
- [ 3 ] Lucas EA, Foutz AS, Dement WC, et al. Sleep cycle organization in narcoleptic and normal dogs [J]. *Physiol Behav*, 1979, 23(4): 737-743.
- [ 4 ] Mitler MM, Dement WC. Sleep studies on canine narcolepsy: pattern and cycle comparisons between affected and normal dogs [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1977, 43(5): 691-699.
- [ 5 ] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 365-376.
- [ 6 ] Hungs M, Fan J, Lin L, et al. Identification and functional analysis of mutations in the hypocretin (orexin) genes of narcoleptic canines [J]. *Genome Res*, 2001, 11(4): 531-539.
- [ 7 ] Baker TL, Foutz AS, McNeerney V, et al. Canine model of narcolepsy: genetic and developmental determinants [J]. *Exp Neurol*, 1982, 75(3): 729-742.
- [ 8 ] Nepovimova E, Janockova J, Misik J, et al. Orexin supplementation in narcolepsy treatment: A review [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(3): 961-975.
- [ 9 ] Han F. Sleepiness that cannot be overcome: narcolepsy and cataplexy [J]. *Respirology*, 2012, 17(8): 1157-1165.
- [ 10 ] Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, et al. Structure and function of human prepro-orexin gene [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(25): 17771-17776.
- [ 11 ] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation [J]. *Cell*, 1999, 98(4): 437-451.
- [ 12 ] Mochizuki T, Crocker A, McCormack S, et al. Behavioral state instability in orexin knock-out mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(28): 6291-6300.
- [ 13 ] Mickelsen LE, Bolisetty M, Chimileski BR, et al. Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(4): 642-656.
- [ 14 ] Matsuki T, Sakurai T. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2008, 46: 27-55.
- [ 15 ] Reti IM, Reddy R, Worley PF, et al. Selective expression of narpl, a secreted neuronal pentraxin, in orexin neurons [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(6): 1561-1565.
- [ 16 ] Sakurai T. Orexin deficiency and narcolepsy [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(5): 760-766.
- [ 17 ] Eggermann E, Serafin M, Bayer L, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurons [J]. *Neuroscience*, 2001, 108(2): 177-181.
- [ 18 ] Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes [J]. *Neuron*, 2003, 38(5): 715-730.
- [ 19 ] Kalogiannis M, Grupke SL, Potter PE, et al. Narcoleptic orexin receptor knockout mice express enhanced cholinergic properties in laterodorsal tegmental neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(1): 130-142.
- [ 20 ] Beuckmann CT, Sinton CM, Williams SC, et al. Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(18): 4469-4477.
- [ 21 ] Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity [J]. *Neuron*, 2001, 30(2): 345-354.
- [ 22 ] Lee MG, Hassani OK, Jones BE. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(28): 6716-6720.
- [ 23 ] Smart D, Jerman JC. The physiology and pharmacology of the orexins [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 94(1): 51-61.
- [ 24 ] Sun R, Cao YQ, Ma JX, et al. Construction and identification of mouse model with conditional knockout of p75 neurotrophin receptor gene in epidermal cells by Cre-loxP system [J]. *Chin J Burns*, 2019, 35(10): 740-745.
- [ 25 ] Mochizuki T, Arrigoni E, Marcus JN, et al. Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(11): 4471-4476.
- [ 26 ] Honda M, Eriksson KS, Zhang S, et al. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin (orexin) [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4254.
- [ 27 ] Kieslinger M, Folberth S, Dobrev G, et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 757-767.
- [ 28 ] De La Herrán-Arita AK, Zomosa-Signoret VC, Millán-Aldaco DA, et al. Aspects of the narcolepsy-cataplexy syndrome in O/

- E3-null mutant mice [J]. *Neuroscience*, 2011, 2(183): 134–143.
- [29] Corradi A, Croci L, Broccoli V, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in *Ebf2*-null mice [J]. *Development*, 2003, 130(2): 401–410.
- [30] Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, et al. Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: a new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(19): 6495–6509.
- [31] Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, et al. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system [J]. *Cell Rep*, 2012, 2(2): 397–406.
- [32] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells [J]. *Science*, 1995, 268(5218): 1766–1769.
- [33] Gerashchenko D, Kohls MD, Greco M, et al. Hypocretin-2-saporin lesions of the lateral hypothalamus produce narcoleptic-like sleep behavior in the rat [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(18): 7273–7283.
- [34] Blanco-Centurion C, Gerashchenko D, Salin-Pascual RJ, et al. Effects of hypocretin2-saporin and antidopamine-beta-hydroxylase-saporin neurotoxic lesions of the dorsolateral pons on sleep and muscle tone [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(10): 2741–2752.
- [35] Arias-Carrión O, Murillo-Rodríguez E. Cell transplantation: a future therapy for narcolepsy? [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8(4): 309–314.
- [36] Li Y, Gao X, Sakurai T, et al. Hypocretin/orexin excites hypocretin neurons via a local glutamate neuron-A potential mechanism for orchestrating the hypothalamic arousal system [J]. *Neuron*, 2002, 36(6): 1169–1181.
- [37] Lecea LD, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus specific peptides with neuroexcitatory activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(1): 322–327.
- [38] Prober DA, Rihel J, Onah AA, et al. Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(51): 13400–13410.
- [39] Elbaz I, Yelin-Bekerman L, Nicenboim J, et al. Genetic ablation of hypocretin neurons alters behavioral state transitions in zebrafish [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(37): 12961–12972.
- [40] Curado S, Stainier DY, Anderson RM. Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 948–954.
- [41] Pisharath H, Rhee JM, Swanson MA, et al. Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase [J]. *Mech Dev*, 2007, 124(3): 218–229.
- [42] 杜久林, 杜旭飞. 斑马鱼 hypocretin/orexin 能神经系统的研究进展 [J]. *生命科学*, 2015, 27(7): 827–836.
- [43] Williams RH, Tsunematsu T, Thomas AM, et al. Transgenic archaerhodopsin-3 expression in hypocretin/orexin neurons engenders cellular dysfunction and features of type 2 narcolepsy [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(47): 9435–9452.
- [44] Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, et al. A polymorphism in *CCR1/CCR3* is associated with narcolepsy [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 49: 148–155.
- [45] Kothur K, Wienholt L, Brilot F, et al. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 227–237.
- [46] Toyoda H, Honda Y, Tanaka S, et al. Narcolepsy susceptibility gene *CCR3* modulates sleep-wake patterns in mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187888.
- [47] Szentirmai É, Krueger JM. Sickness behaviour after lipopolysaccharide treatment in ghrelin deficient mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 36: 200–206.
- [48] Opp MR, Toth LA. Somnogenic and pyrogenic effects of interleukin-1 $\beta$  and lipopolysaccharide in intact and vagotomized rats [J]. *Life Sci*, 1998, 62(10): 923–936.
- [49] Lancel M, Crönlein J, Müller-Preuss P, et al. Lipopolysaccharide increases EEG delta activity within non-REM sleep and disrupts sleep continuity in rats [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268: R1310–R1318.
- [50] Ahmed SS, Volkmuth W, Duca J, et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2 [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(294): 105r–294r.
- [51] Bergman P, Adori C, Vas S, et al. Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(35): E3735–E3744.
- [52] Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, et al. Elevated tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(3): 713–719.
- [53] Bernard-Valnet R, Yshii L, Querault C, et al. CD8 T cell-mediated killing of orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(39): 10956–10961.
- [54] Pedersen NW, Holm A, Kristensen NP, et al. CD8<sup>+</sup> T cells from patients with narcolepsy and healthy controls recognize hypocretin neuron-specific antigens [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 837.
- [55] Mieda M, Willie JT, Hara J, et al. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(13): 4649–4654.

[收稿日期]2021-03-18