

刘子馨,贾飞凡,孟红旭,等. 四物合剂对缩宫素所致原发性痛经模型小鼠的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 1-6.

Liu ZX, Jia FF, Meng HX, et al. Effect of Siwu mixture on primary dysmenorrhea model mice induced by oxytocin [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 1-6.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 001

四物合剂对缩宫素所致原发性痛经模型小鼠的影响研究

刘子馨^{1,2,3}, 贾飞凡⁴, 孟红旭^{1,2,3}, 韩 笑^{1,2,3}, 李玲美^{1,2,3}, 尤 越^{1,2,3}, 王奥奥^{1,2,3},
王紫艳^{1,2,3}, 杨 斌⁵, 李 磊^{1,2,3*}, 付建华^{1,2,3*}, 刘建勋^{1,2,3}

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091; 2. 国家中医心血管病临床医学中心, 北京 100091;
3. 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091; 4. 解放军总医院第六医学中心, 北京 100048;
5. 中国中医科学院西苑医院病理科, 北京 100091)

【摘要】 目的 研究四物合剂对原发性痛经小鼠模型的影响, 探讨其可能的作用机制。**方法** 健康 SPF 级 KM 雌性小鼠 60 只, 随机分为 4 组, 分别为正常组、模型组、痛经宝颗粒组、四物合剂组。采用雌激素联合缩宫素诱导的原发性痛经小鼠模型, 适应性喂养 3 d 后, 小鼠皮下注射苯甲酸雌二醇 2 mg/kg, 连续给药 10 d。第 4 天开始, 正常组和模型组给予等剂量蒸馏水, 阳性药痛经宝颗粒组按 4 g/kg 给药, 四物合剂组按 8 mL/kg 给药, 连续给药 7 d。以注射缩宫素后 30 min 内扭体次数和扭体潜伏期为主要观测指标, 考察四物合剂的镇痛作用, 测定血清中的超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA); 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测子宫组织前列腺素 F_{2α}(PGF_{2α})、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)含量; 制备子宫病理切片观察腺体增生、炎性细胞浸润情况, 免疫组化检测环氧合酶 2(COX-2)表达。**结果** 与正常组相比, 模型组 30 min 内扭体次数明显增加、扭体潜伏期显著缩短($P<0.01$), 血清 MDA 水平显著增加($P<0.01$), 子宫组织 PGF_{2α}、TNF-α 水平明显增加($P<0.01$), IL-6 含量增加($P<0.05$); 子宫内腺体扩张呈乳头状增生, 间质水肿, 炎性细胞增生、浸润, COX-2 表达增强。与模型组相比, 阳性药组、四物合剂组 30 min 内扭体次数降低($P<0.05$, $P<0.01$), 四物合剂组扭体潜伏期增加($P<0.05$), 阳性药组、四物合剂组血清 MDA 水平降低($P<0.01$), 子宫组织 PGF_{2α} 水平降低($P<0.01$, $P<0.05$), IL-6、TNF-α 含量降低($P<0.05$), 腺体增生减少, 间质紧密, 炎性细胞浸润减少, COX-2 表达降低。**结论** 四物合剂能显著减少原发性痛经小鼠 30 min 扭体次数, 延长扭体潜伏期, 其作用机制可能与降低血清 MDA 含量、子宫组织中 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平以及 COX-2 表达, 改善组织病理学变化有关, 值得进一步深入研究。

【关键词】 四物合剂; 原发性痛经; 中药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0001-06

Effect of Siwu mixture on primary dysmenorrhea model mice induced by oxytocin

LIU Zixin^{1,2,3}, JIA Feifan⁴, MENG Hongxu^{1,2,3}, HAN Xiao^{1,2,3}, LI Lingmei^{1,2,3}, YOU Yue^{1,2,3},
WANG Aoao^{1,2,3}, WANG Ziyang^{1,2,3}, YANG Bin⁵, LI Lei^{1,2,3*}, FU Jianhua^{1,2,3*}, LIU Jianxun^{1,2,3}

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(82174219); 北京市中医药科技发展基金项目(JJ-2020-78); 中国中医科学院科技创新工程项目资助(CI2021A00912)。

【作者简介】 刘子馨(1995—), 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管中药药理。E-mail: 641758689@qq.com

【通信作者】 李磊(1982—), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 心血管中药药理。E-mail: lilei0502@126.com

付建华(1970—), 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 心血管中药药理。E-mail: jianhuaaffcn@263.net * 共同通信作者

- (1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China. 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Cardiology, Beijing 100091. 3. Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091. 4. the Sixth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048. 5. Department of Pathology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091)

【Abstract】 Objective Siwu mixture is derived from Siwu decoction, a classical Chinese medicine prescription, which is widely used in a variety of gynecological diseases. However, There are few studies on the therapeutic effect of Siwu mixture on primary dysmenorrhea. This study aims to further explain its therapeutic effect. **Methods** Sixty healthy animals were divided into four groups: the control group, model group, Siwu mixture group and Tongjingbao granule group. The primary dysmenorrhea mice model was induced by estrogen combined with oxytocin. After 3 days of adaptive feeding, mice were subcutaneously injected with estradiol benzoate 2 mg/kg for 10 days. The normal and the model group received the same dosage of distilled water from the 4th day. The Tongjingbao granule group was given 4 g/kg for 7 days. The Siwu mixture group was given 8 mL/kg for 7 days. The analgesic effect of Siwu mixture was studied by writhing and the latency of writhing within 30 min after oxytocin injection. The serum contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined. Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured in tissue homogenates by ELISA method. Uterine pathological sections were prepared to observe glandular hyperplasia and inflammatory cell infiltration, and the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with result in the control group, the body twisting in the model group increased ($P<0.01$) and serum MDA increased ($P<0.01$). Uterine tissue PGF_{2α}, TNF-α and IL-6 increased. In the model group, endometrial glands were dilated and papillary hyperplasia, interstitial edema, inflammatory cell proliferation and infiltration were observed; COX-2 expression was enhanced. The number of writhing events within 30 min in Tongjingbao granule group and Siwu mixture group decreased compared with controls ($P<0.05$, $P<0.01$); the writhing latency in the Siwu mixture group increased ($P<0.05$) and the level of serum MDA in the positive drug group and Siwu mixture group decreased ($P<0.01$). **Conclusions** Siwu mixture could significantly reduced the 30 min writhing times and prolonged the writhing latency of primary dysmenorrhea mice. The mechanism may be related to reducing the content of serum MDA and PGF_{2α}, TNF-α and IL-6 in uterine tissue and COX-2 expression are related to the improvement of histopathological changes.

【Keywords】 Siwu mixture; primary dysmenorrhea; traditional Chinese medicine

原发性痛经(primary dysmenorrhea, PD)是指伴随月经周期出现以下腹部疼痛为主要症状且无其他生殖器官器质性病变的疾病,是最常见的妇科疼痛性疾病,占痛经的 90% 以上^[1],在不同年龄、国籍的女性人群中发病率占 45%~97% 不等,可以占到学校与工作缺勤原因的 1%~3%^[2]。原发性痛经属于中医“经行腹痛”的范围。清代陈莲舫所著《女科秘诀大全》中将经行腹痛称为“痛经”,后世医者沿用此名。针对原发性痛经的治疗,西医临床常使用非甾体抗炎药和避孕药^[3],此类药物主要作用靶点为前列腺素,通过抑制前列腺素缓解疼痛^[4]。然而长期使用非甾体抗炎药和口服避孕药对肝、肾、胃肠功能甚至心脏系统都有许多副作用^[5]。中医临床常使用四物汤及其类方或佐以针灸、穴位贴敷、耳穴、熏蒸、灌肠等方法,疗效显著且副作用少^[6-8]。四物合剂始载于 2000 年版《中国药典》一部^[9],源于中医经典方剂“四物汤”其组成成分为:当归、熟地黄、白芍、川芎。四物汤最早记载于唐代蔺道人

所著的《仙授理伤续断秘方》,后世应用较为广泛的药方则取自宋代《太平惠民和剂局方》中,具有调经止痛、补血活血的功效,主治冲任虚损、月水不调……经行腹痛等妇人诸疾^[10]。方中当归补血养肝,和血调经,熟地黄补血滋阴,佐以白芍和营柔肝,川芎活血行滞,通畅气血,被称为“妇科第一方”是治疗妇科疾患的基础方。通过网络药理学研究分析得出四物汤治疗 PD 的关键作用机制为舒张子宫、调节激素、抗炎镇痛等^[3]。基于此,本研究旨在探究四物合剂治疗原发性痛经的作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

KM 雌性小鼠 60 只,SPF 级,体重 18~22 g,由维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2021-0006]。动物饲养、实验操作均在中国中医科学院西苑医院实验动物中心[SYXK(京)2018-

0018]进行。实验动物处置严格遵循“减少、替代、优化”的 3R 原则,给予人道主义关怀。本研究获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准(2022XLC001)。

1.2 主要试剂与仪器

四物合剂,神威药业(四川)有限公司提供,每瓶 10 mL,批号 2001141,有效期至 2022 年 1 月,根据 2020 年版《中国药典》一部计算,每 1 mL 四物合剂相当于 1 g 生药;缩宫素注射液,上海禾丰制药有限公司,1 mL:10 单位,批号:09201009,有效期至 2022 年 10 月;苯甲酸雌二醇注射液,宁波第二激素厂,2 mL:4 mg,批号:2011051,有效期至:2022 年 10 月;痛经宝颗粒,仲景宛西制药股份有限公司,每袋 10 g,批号:200704。

丙二醛(SOD)测定试剂盒:南京建成生物工程有限公司,货号:A001-3-2;超氧化歧化酶(MDA)测定试剂盒:南京建成生物工程有限公司,货号:A003-1-2;前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ELISA 试剂盒:上海江莱生物科技有限公司,货号:JL13273;白介素 6(IL-6) ELISA 检测试剂盒:上海酶联生物科技有限公司,货号:ml002293-C;肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒:上海酶联生物科技有限公司,货号:ml002095-C;环氧合酶-2 抗体(COX-2):proteintech,货号:66351-1-1g。多功能酶标仪:BioTek 公司(美国)SYNERGY44 型;低温冷冻离心机:Thermo Fisher Scientific 公司(美国)MP-150 型。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

正常雌性小鼠 60 只,随机均分成 4 组,即空白组、模型组、阳性药痛经宝颗粒组(4 g/kg)、四物合剂组(8 mL/kg),按照药品说明书给药方式设置给药剂量,适应性饲养 3 d 后各组给予相应药物灌胃给药。

1.3.2 造模与给药

小鼠皮下注射苯甲酸雌二醇(2 mg/kg),每日 1 次,连续 10 d。第 4 天开始,空白组与模型组给予等剂量蒸馏水,痛经宝组按 4 g/kg 给药,四物合剂组每日按 8 mL/kg 给药,每日给药 1 次,连续给药 7 d。

1.3.3 扭体次数、潜伏期测定

末次注射苯甲酸雌二醇后 1 h,按 10 U/kg 腹腔注射缩宫素,制备小鼠原发性痛经模型。小鼠腹腔注射 10 U/kg 缩宫素后,即刻放入透明的观察箱中,观察记录小鼠首次出现扭体时的潜伏期以及小鼠

30 min 内所有扭体次数,计算出药物扭体反应抑制率。观察标准:小鼠腹腔出现内凹,以及躯干与后肢伸展,臀部与一侧肢体内旋。抑制率(%)=(模型组扭体反应均数-给药组扭体反应均数)/模型组扭体反应均数 $\times 100\%$ 。

1.3.4 血清 MDA、SOD 检测

观察出现扭体反应 30 min 后,进行小鼠麻醉。小鼠眼底静脉丛取血放至不含抗凝剂试管中,室温下静置 1 h 后,3500 r/min 离心,离心 10 min 后取上清。用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)检测血清 SOD 活性,硫代巴比妥酸(TBA)法测定血清 MDA 含量。

1.3.5 ELISA 法检测子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α

小鼠眼底静脉丛取血后,冰上迅速摘取小鼠新鲜的子宫组织,预冷的 PBS 冲洗子宫组织,去除残留血液,称重后将组织剪碎。将剪碎的组织与对应体积的 PBS 按 1:9 加入匀浆器中,充分研磨,将匀浆液于 7300 r/min,离心 10 min,取上清检测。ELISA 检测子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 的含量。以上均严格按照说明书要求操作。

1.3.6 子宫 HE 染色与免疫组化

取出子宫组织后用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,制备子宫组织切片,HE 染色后显微镜下观察子宫组织。石蜡切片常规脱蜡至水,0.3% H_2O_2 氧化 15 min, PBS 洗 3 遍,每遍 5 min,滴加一抗 COX-2(1:200 稀释)4℃过夜, PBS 洗 3 遍,每遍 5 min,滴加 EnVision II 抗,室温 60 min, PBS 洗 3 遍,每遍 5 min。每张切片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3 min,阳性显色为棕色。蒸馏水洗终止染色,苏木素复染,0.1%盐酸分化,自来水冲洗, PBS 冲洗返蓝,梯度乙醇脱水,透明,封片。采用 Image J 统计数据进行分析。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析,计量资料结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)示,将测定数据进行正态性、方差齐性检验,组间比较采用 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠扭体反应及潜伏期检测

与正常组相比较,模型组 30 min 内小鼠扭体反应次数显著增多($P<0.01$),潜伏期显著缩短($P<0.01$)。与模型组比较,阳性药组 30 min 扭体次数

增加($P<0.05$)四物合剂组 30 min 内扭体次数显著减少,潜伏期明显增加($P<0.01, P<0.05$),见表 1。

2.2 小鼠血清 SOD、MDA 含量测定

与正常组相比,模型组、阳性药组、四物合剂组小鼠血清中 SOD 无显著性差异;与正常组相比,模型组血清 MDA 显著增加($P<0.01$);与模型组相比,阳性药组、四物合剂组血清 MDA 显著降低($P<0.01$),见表 2。

2.3 小鼠子宫匀浆 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α 测定

与正常组相比,模型组子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 显著增高($P<0.01$);与模型组相比,阳性药组 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 显著降低($P<0.01$),四物合剂组 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 降低($P<0.05$);与正常组相比,模型组子宫组织 IL-6、TNF- α 增加($P<0.05$),与模型组相比,阳性药组、四物合剂组子宫组织 IL-6、TNF- α 降低($P<0.05$),见

表 3。

2.4 小鼠子宫组织病理观察

小鼠子宫组织病理分析见图 1。正常组小鼠子宫腺体多,腔大饱满,间质疏密均匀,血管丰富,内膜上皮固有层结构紧密,间质细胞丰富,未见明显异常。

模型组子宫内膜腺体扩张,呈乳头状增生,间质水肿血管扩张,炎性细胞浸润,说明模型制备成功。与模型组相比,阳性药组小鼠子宫水肿和炎性细胞浸润明显减轻,四物合剂组小鼠子宫腺腔见少量炎症细胞浸润。

2.5 小鼠子宫组织 COX-2 表达

与正常组相比,模型组子宫组织 COX-2 表达增加($P<0.05$);与模型组相比,阳性药组、四物合剂组子宫组织 COX-2 表达降低($P<0.05$),见图 2、图 3。

表 1 各组原发性痛经小鼠模型潜伏期、扭体次数($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 1 Comparison of latency and body twisting times of primary dysmenorrhea model mice in each group

组别 Groups	剂量 Dose	潜伏期(min) Incubation period	30 min 扭体次数 30 min twisting times	抑制率(%) Inhibition rate
正常组 Normal group	/	30.0 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	100
模型组 Model group	/	3.07 $\pm$ 0.96 ^{##}	22.73 $\pm$ 10.35 ^{##}	0
阳性药组 Positive drug group	4 g/kg	3.25 $\pm$ 1.65	14.00 $\pm$ 8.21 [*]	38.42
四物合剂组 Siwu mixture group	8 mL/kg	7.33 $\pm$ 9.39 [*]	12.88 $\pm$ 11.25 ^{**}	43.33

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

表 2 各组原发性痛经模型小鼠血清 SOD、MDA($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 2 Serum SOD and MDA of primary dysmenorrhea model mice in each group

组别 Groups	剂量 Dose	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
正常组 Normal group	/	21.778 $\pm$ 0.473	3.046 $\pm$ 0.427
模型组 Model group	/	21.686 $\pm$ 1.595	4.680 $\pm$ 0.546 ^{##}
阳性药组 Positive drug group	4 g/kg	21.439 $\pm$ 0.884	3.629 $\pm$ 0.516 ^{**}
四物合剂组 Siwu mixture group	8 mL/kg	21.319 $\pm$ 1.027	3.492 $\pm$ 0.331 ^{**}

注:与正常组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

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

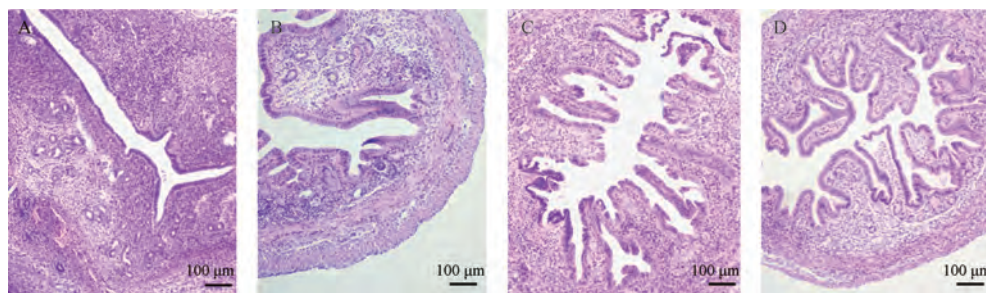
表 3 各组原发性痛经模型小鼠子宫组织 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、IL-6、TNF- α ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 3 Uterine tissue of primary dysmenorrhea model mice in each group $\text{PGF}_{2\alpha}$, IL-6, TNF- α

组别 Groups	剂量 Dose	$\text{PGF}_{2\alpha}$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常组 Normal group	/	31.378 $\pm$ 16.922	16.488 $\pm$ 3.489	88.087 $\pm$ 16.276
模型组 Model group	/	193.205 $\pm$ 19.338 ^{##}	20.955 $\pm$ 1.973 [#]	107.426 $\pm$ 7.664 [#]
阳性药组 Positive drug group	4 g/kg	117.012 $\pm$ 36.872 ^{**}	18.626 $\pm$ 2.813 [*]	100.051 $\pm$ 7.981 [*]
四物合剂组 Siwu mixture group	8 mL/kg	158.536 $\pm$ 37.652 [*]	18.564 $\pm$ 2.394 [*]	97.982 $\pm$ 6.759 [*]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the normal group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

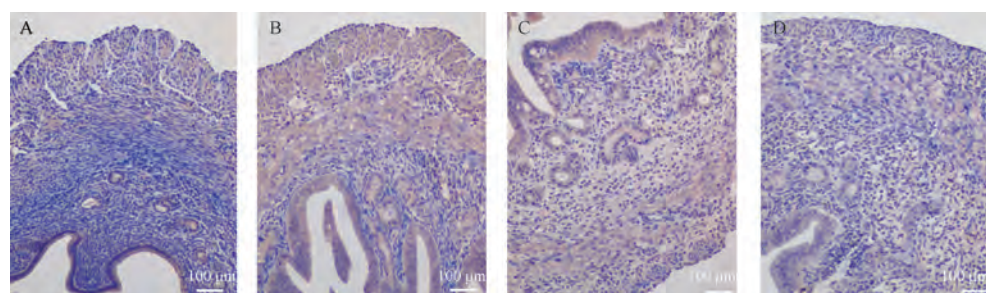


注:A:正常组;B:模型组;C:阳性药组;D:四物合剂组。

图1 原发性痛经模型小鼠 HE 染色切片

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Positive drug group. D, Siwu mixture group.

Figure 1 HE staining sections of primary dysmenorrhea model mice

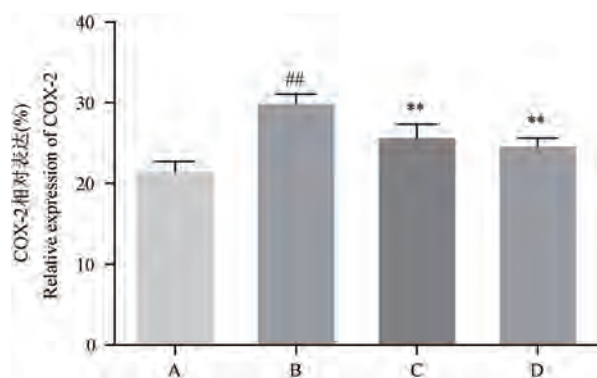


注:A:正常组;B:模型组;C:阳性药组;D:四物合剂组。

图2 原发性痛经模型小鼠 COX-2 免疫组化切片

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Positive drug group. D, Siwu mixture group.

Figure 2 COX-2 immunohistochemical section of primary dysmenorrhea model mice



注:A:正常组;B:模型组;C:阳性药组;D:四物合剂组。与正常组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图3 COX-2 在小鼠子宫组织中的表达

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Positive drug group. D, Siwu mixture group. Compared with the normal group, ## $P<0.01$. Compared with the model group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Expression of COX-2 in mice uterus

3 讨论

原发性痛经病位在子宫,变化在气血主要病机为“不荣则痛、不通则痛”^[4]。清代《傅青主女科》的“舒则通畅,郁则不扬,经欲行而肝不应,则抑拂其

气而疼生”进一步阐明原发性痛经形成原因为体虚、寒、气郁、血结等。四物合剂组成成分为:当归、熟地黄、白芍、川芎,具有益气活血、补血养血功效,为临床治疗原发性痛经常用药物。

缩宫素诱发的小鼠原发性痛经模型是被广泛认可的痛经药效学实验模型,常应用于原发性痛经的研究^[11]。原发性痛经的主要临床症状是剧烈的急性腹痛,因此采用扭体反应为主要指标用来评价实验药物的疗效^[12-13]。本研究发现,与正常组相比,模型组小鼠 30 min 内扭体次数显著增加,潜伏期缩短,阳性药组、四物合剂组有效降低了 PD 模型小鼠 30 min 内扭体反应次数,延长疼痛潜伏期,说明四物合剂可拮抗缩宫素诱发的小鼠急性腹痛。

现代研究发现,原发性痛经与子宫内膜平滑肌阵发性收缩所导致的肌间血管受压而引起的子宫肌层及内膜暂时性缺血,产生过多自由基有关^[14]。MDA 是脂质过氧化代谢的重要产物,可引起细胞损伤,其含量可间接反映子宫细胞受自由基损伤的严重程度^[15]。研究发现,与正常组相比,模型组小鼠血清 MDA 水平显著增加,阳性药组、四物合剂组血清 MDA 水平较模型组降低说明四物合剂组小鼠子

宫组织内脂质过氧化程度低,提示四物合剂在一定程度上减少子宫氧化应激水平。

子宫内膜是合成前列腺素的重要部位,研究表明,PD 的病因是子宫前列腺素(PGs)的过多分泌使子宫过度收缩^[5],前列腺素的生物合成在疼痛模型的疼痛机制中有重要作用^[16]。特别是 PGF_{2α}刺激子宫收缩、缺血,导致月经痛^[5]。与正常组相比,模型组小鼠子宫组织中的 PGF_{2α} 水平显著增高,阳性药组、四物合剂组小鼠子宫组织 PGF_{2α} 水平较模型组降低。炎症与痛经息息相关,研究发现原发性痛经的主要机制与前列腺素、白细胞介素的增高密切相关^[17]。TNF-α 具有调控免疫应答、促进细胞生长分化等多种生物学功能,参与了多种炎症反应和神经相关慢性疼痛^[17]。白介素 6 是一种多效性细胞因子,在免疫调节、再生过程、骨稳态调节、心血管系统保护等方面发挥多种生物学作用^[18]。研究表明子宫内膜异位症患者血清 TNF-α、IL-6 水平显著升高且严重痛经患者较无痛经患者血清 TNF-α、IL-6 显著升高^[19]。本研究中,模型组子宫组织 TNF-α、IL-6 含量增高,阳性药组、四物合剂组子宫组织 TNF-α、IL-6 含量降低,表明四物合剂可能通过降低 TNF-α、IL-6 减轻痛经症状。

环氧化酶(COX)是参与 PGs 的生物合成限速酶,临床常用非甾体类抗炎药治疗原发性痛经,其机制主要是通过抑制 COX 减少 PGs 的生成,COX-2 高表达使 PGF_{2α} 升高加重痛经^[20]。本研究表明,四物合剂可降低 COX-2 表达,其治疗痛经机制可能与降低 COX-2 表达从而抑制 PGF_{2α} 治疗小鼠原发性痛经有关。

综上所述,四物合剂能显著减少原发性痛经小鼠 30 min 扭体次数,延长扭体潜伏期,其作用机制可能与降低血清 MDA 含量、子宫组织中 PGF_{2α}、IL-6、TNF-α 水平以及 COX-2 表达,改善组织病理学变化有关,其机制值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2018.
- [2] Sharghi M, Mansurkhani SM, Larky DA, et al. An update and systematic review on the treatment of primary dysmenorrhea[J]. JBRA Assist Reprod, 2019, 23(1): 51-57.
- [3] 李杰,石金凤,聂欣,等. 基于网络药理学的四物汤治疗原发性痛经的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(3): 559-565.
- [4] 聂文佳,徐帅师,张咏梅. 原发性痛经治疗方法的研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(7): 683-689.
- [5] 徐珊,刘鹏宇,何全中. 白芷总香豆素对痛经模型小鼠的影响[J]. 中医药信息, 2020, 37(5): 5-10.
- [6] 吴红斌. 桂枝四物汤配合熏蒸治疗原发性痛经临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(8): 141-142.
- [7] 王巧英,赵兴国,李兆艾. 香附四物汤对原发性痛经患者凝血功能的影响[J]. 中药材, 2016, 39(7): 1670-1672.
- [8] 张丽君,李杰. 妇产科病中医经验集成[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2012.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000.
- [10] 陈庆平,陈冰鸥. 太平惠民和剂局方[M]. 北京:中国中医药出版社,1996.
- [11] 陈景伟,全瑞晓,孙晓换,等. 补佳乐联合缩宫素建立小鼠原发性痛经模型[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(5): 78-81.
- [12] 孙兰,李家春,刘莉娜,等. 散结镇痛胶囊对缩宫素诱导小鼠痛经的作用机制[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2030-2035.
- [13] 中华中医药学会,中药实验药理专业委员会. 痛经动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 20-24.
- [14] Chung D, Caruso RL. Potential role for oxidative stress in 2,2'-dichlorobiphenyl-induced inhibition of uterine contractions but not myometrial gap junctions[J]. Toxicol Sci, 2006, 93(1): 172-179.
- [15] 邵田娣,钱燕娜,吕品秋,等. 红花注射液对痛经模型小鼠血清 NO、Ca²⁺、MDA、SOD 的影响[J]. 新中医, 2020, 52(12): 1-4.
- [16] Franzotti EM, Santos CV, Rodrigues HM, et al. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca)[J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72(1-2): 273-277.
- [17] 邓霁辉. 血清炎性生物标记物在子宫内膜异位症患者血清中的表达及意义[J]. 河北医药, 2016, 38(24): 3685-3689, 3694.
- [18] 姜少杰,梁仕睿,张雪芹,等. IL-6/IL-6 受体轴及其靶向抑制剂研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(6): 569-574.
- [19] 王健,杨海燕,李振国,等. 艾附暖宫软胶囊镇痛抗炎作用研究及对雌性小鼠和催产素所致小鼠痛经模型的影响[J]. 中医学报, 2019, 47(2): 37-41.
- [20] 叶宇齐,王佩娟. 少腹逐瘀汤治疗原发性痛经的机制研究[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(3): 551-553.

[收稿日期]2021-12-13

朱旭超, 窦长松, 张钰, 等. 黑质 LAMP2A 过表达改善帕金森病恒河猴模型的运动功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 7-13.

Zhu XC, Dou CS, Zhang Y, et al. Overexpression of LAMP2A in substantia nigra improves motor function in rhesus monkey models of Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 7-13.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.002

黑质 LAMP2A 过表达改善帕金森病恒河猴模型的运动功能

朱旭超, 窦长松, 张钰, 秦川, 张玲*

(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动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 在帕金森病(Parkinson's disease, PD)恒河猴模型上观察黑质过表达溶酶体相关膜蛋白 2A (lysosome associated membrane protein 2A, LAMP2A) 上调分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA) 对实验猴运动行为的影响。**方法** 应用立体定位注射仪向 7 只恒河猴的右脑纹状体区注射 PD 患者死亡后脑组织(自愿捐献)的路易小体(Lewy bodies, LBs)提取物, 同时在左脑纹状体区注射非 PD 病人死亡患者的脑组织(自愿捐献)提取物来构建 PD 恒河猴模型。模型动物随机分为两组, LAMP2A 过表达组(4 只)在其黑质区双侧注射过表达 LAMP2A 的腺相关病毒载体; 对照组(3 只)在黑质区双侧注射对照病毒载体。通过阶梯实验、平板取食实验评价 PD 恒河猴模型运动能力和 LAMP2A 对该 PD 模型运动功能的影响。利用 ELISA 法对实验猴脑脊液、血清的总 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)及磷酸化 α -syn 水平进行测定。**结果** 阶梯实验和平板取食实验中对对照组恒河猴的左侧上肢的精细动作水平相较于其右侧出现下降; LAMP2A 过表达组恒河猴的左右两侧上肢的精细运动水平没有出现明显差异; ELISA 测定对照组术后 12 月脑脊液、血清的总 α -syn 水平及磷酸化 α -syn 水平显著增高; LAMP2A 过表达组脑脊液磷酸化 α -syn 水平和血清磷酸化 α -syn 水平在 8 月之后均低于同期的对照组。**结论** 过表达 LAMP2A 可能通过增加 α -syn 的 CMA 清除改善 PD 恒河猴模型精细运动能力。

【关键词】 LAMP2A; 帕金森病; 行为学; 恒河猴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0007-07

Overexpression of LAMP2A in substantia nigra improves motor function in rhesus monkey models of Parkinson's disease

ZHU Xuchao, DOU Changsong, ZHANG Yu, QIN Chuan, ZHANG Ling*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Center of Comparative Medicine, Peking Union Medical College; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of overexpression of lysosome associated membrane protein 2A (LAMP2A) up-regulating chaperone-mediated autophagy (CMA) in the substantia nigra on the locomotor behavior of a

【基金项目】 国家自然科学基金专项项目(81941012); 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(82161138027); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-034)。

【作者简介】 朱旭超(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 神经退行性疾病非人灵长类动物模型的行为表型。

E-mail: zhuxuchao1996@126.com

【通信作者】 张玲(1986—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 神经系统疾病的比较医学研究。E-mail: zhangling@cnilas.org

Parkinson's disease (PD) rhesus monkey model. **Methods** We established a rhesus monkey model of PD. A stereotactic injection device was used to inject Lewy bodies (LBs) extracts from the brain tissues donated by PD patients into the right striatum of seven rhesus monkeys. At the same time, extracts of brain tissue donated by control (non-PD) patients were injected into the striatum of the left brain. The animals were randomly divided into two groups. The LAMP2A overexpression group ($n=4$) was bilaterally injected with an adeno-associated virus vector overexpressing LAMP2A; the control group ($n=3$) was injected with a control virus vector in both sides of the substantia nigra. The motor function of monkeys was evaluated by the hill and valley staircase experiment and the pick-up test. The levels of total α -synuclein (α -syn) and phosphorylated α -syn in the cerebrospinal fluid and serum of experimental monkeys were determined by ELISA. **Results** In the valley staircase task and the outside board pick up test, the fine motor level of the left upper limb of the control group of rhesus monkeys was lower than that of the right side. There was no significant difference in the fine motor level of the upper limbs on the left and right sides of the rhesus monkeys in the LAMP2A overexpression group. Cerebrospinal fluid and serum total α -syn levels and phosphorylated α -syn levels of the control group increased significantly at 12 months after operation. The levels of phosphorylated α -syn in cerebrospinal fluid and serum phosphorylated α -syn in the LAMP2A overexpression group were lower than those in the control group at the same time after 8 months. **Conclusions** Overexpression of LAMP2A improved the fine motor ability of experimental monkeys in the rhesus monkey model of PD through up-regulating CMA-mediated α -syn elimination.

【Keywords】 LAMP2A; Parkinson's disease; behavior; rhesus monkey

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是以静止性震颤、运动迟缓、肌强直等运动功能障碍为主要临床表现的神经退行性疾病,主要病理机制是中脑黑质致密部多巴胺能神经元变性丢失、纹状体多巴胺水平显著降低,以残存神经元胞体中出现的 LBs 为特征性标志物,目前无有效治疗手段。如何清除形成 LBs 的错误折叠 α -syn 是 PD 的重要研究方向^[1]。分子伴侣介导的细胞自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)是降解 α -syn 的重要途径^[2]。LAMP2A 是 CMA 的限速步骤,在 PD 病人黑质致密部和杏仁核中的表达水平降低导致 CMA 水平下降^[3-4]。 α -syn 因清除能力不足而出现异常聚积和错误折叠,形成具有神经毒性作用的 α -syn 寡聚体^[5],导致多巴胺能神经元变性坏死。PD 大鼠模型中已经证实过表达 LAMP2A 可以改善 α -syn 病理和运动能力^[6]。为进一步探究 LAMP2A 上调对 PD 是否有潜在的治疗价值,本研究利用恒河猴构建 PD 模型^[7],给予腺相关病毒载体过表达 LAMP2A^[8-9]。通过行为学方法对接受 LAMP2A 过表达干预的 PD 恒河猴模型进行精细运动能力检测,为进一步研究 PD 的发病机制和治疗提供了参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级 4~5 岁雄性恒河猴 7 只,体重(5.28 ± 0.6)kg,均购自于中国医学科学院医学实验动物研究所北方中心[SCXK(京)2021-0004],并饲养于中

国医学科学院医学实验动物研究所北方中心[SYXK(京)2017-0027]。普通环境条件为 12 h/12 h 昼夜周期,温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 45%~60%。每天饲喂特制猴饲料 3 次,中间 1 次给予适量水果。在本研究中所涉及的动物实验均经过中国医学科学院医学实验动物研究所动物实验伦理委员会审核批准(IACUC-QC19025),并遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

人 α 突触核蛋白 ELISA 试剂盒(生工, D71156-0096); Human p- α -SYN ELISA Kit(茁彩, ZC-54871)。主要的手术装置有大动物脑立体定位注射仪(瑞沃德, 中国);高周波 X 射线机(Mikasa, 日本);山和谷阶梯实验装置、平板取食实验装置自制。

1.3 实验方法

1.3.1 帕金森病恒河猴模型的制备与分组

利用大动物立体定位注射仪并参考 Yu 等^[10]的方法。以前连合为三维坐标系原点,纹状体坐标为:前后值(antero-posterior, AP) = -4 mm,距中缝值(media-lateral, ML) = ± 14 mm,平面值(dorso-ventral, DV) = -3 mm;黑质区坐标为 AP = -7 mm, ML = ± 3 mm, DV = -4 mm^[7,11]。向所有 7 只恒河猴的右脑纹状体区注射帕金森病患者死后脑组织的 LBs 提取物(100 μL , 3 $\mu\text{L}/\text{min}$),而在左脑纹状体注射非帕金森病人死后的脑组织提取物(100 μL , 3 $\mu\text{L}/\text{min}$),以此作为自身对照来构建帕金森病模型(图 1A)。LAMP2A 过表达组在其黑质区双侧注射

了过表达 LAMP2A 的腺相关病毒载体 (10 μ L 每侧, 1 μ L/min); 对照组在其双侧黑质区注射对照病毒载体 (10 μ L 每侧, 3 μ L/min) (图 1B)。人脑组织样本来自荷兰脑库, 脑组织提取物和病毒载体均来自法国波尔多大学 Erwan Bezard 教授实验室^[7]。

1.3.2 阶梯实验

术后第 14 月, 在实验人员能够通过食物引诱与实验猴进行互动时, 对动物进行行为学测试, 将 1 cm^3 苹果块作为食物奖励, 每次正式实验开始前对实验猴禁食 1 餐。

分为山阶梯实验和谷阶梯实验, 根据先前的研究^[12-13]设计制作而来 (图 2A、2D)。在动物适应阶段 (正式实验前 1 周, 每天 1 次) 训练动物穿过挡板从阶梯模具上获得食物奖励, 随后开始正式实验。实验前在每层的阶梯模具上放置食物, 摄像机记录动物伸手穿越孔洞、取到食物后缩回孔洞的时间, 连续测试 10 d。对动物每侧肢体每次抓取食物的时间进行统计分析, 用错误上肢取食的时间将不被记录。装置中透明挡板的孔道直径为 8 cm; 阶梯模具每个阶梯长 8 cm, 宽 3 cm, 高 4 cm; 山阶梯中两模具距离 2 cm, 谷阶梯中两模具距离 12.5 cm, 模具距挡板前方 10 cm。

1.3.3 平板取食实验

分为两端平板取食和中央平板取食实验, 依据文献^[14]由亚克力板制作改进而来 (图 3A、3D)。学习适应阶段和正式实验阶段类似于阶梯实验。使用两个 2 $\times$ 4 排列的圆形孔槽亚克力板供实验猴取食, 实验时长和统计指标同阶梯实验。每个平板模

具长 20 cm, 宽 10 cm, 厚 2 cm, 上有 8 个直径 3 cm, 深 0.5 cm 的孔槽, 相邻两孔槽之间的距离为 2 cm; 中央平板取食实验中两模具并齐, 两端平板取食实验中两模具距离 15 cm, 模具距挡板前方 10 cm。

1.3.4 酶联免疫吸附测定

在手术前和手术后的第 4、8、12 月, 分别采集动物血清和脑脊液。以 10 mg/kg 剂量的盐酸氯胺酮肌肉注射麻醉动物后^[15], 局部去毛暴露下肢皮下静脉, 酒精棉球消毒, 使用 5 mL 含肝素钠采血管取血。血液在采血管内室温静置 30 min 后随即以 3000 r/min 的转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清。恒河猴麻醉后取立位坐姿, 利用腰穿穿刺针在 L5 与 L6 椎间隙穿刺。有落空感时停止, 旋转针头, 引出脑脊液, 从第 2 滴开始收集, 每只动物每次取 1~1.5 mL^[16]。按照试剂盒内提供的操作手册分别对猴血清和猴脑脊液进行总 α -syn 水平和磷酸化 α -syn 水平的测定并进行数据分析。

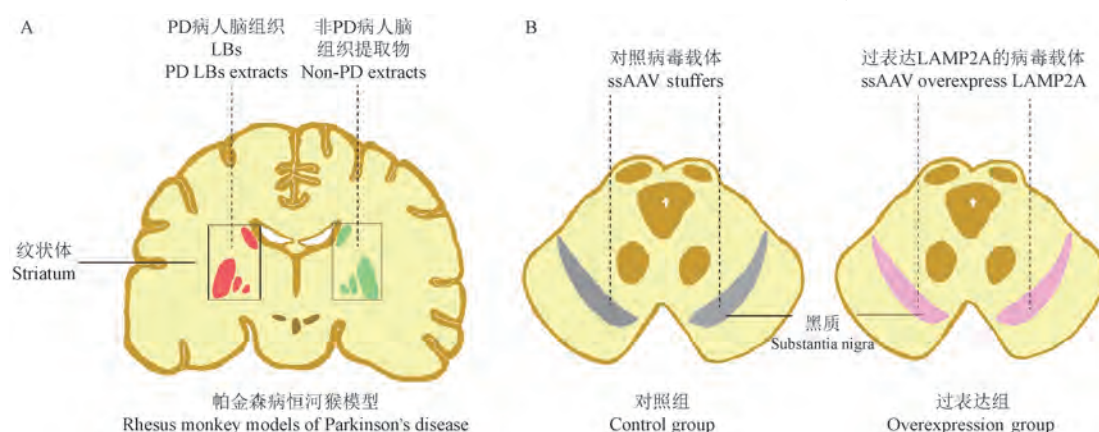
1.4 统计学方法

实验数据采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析和绘图, 以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用双因素方差分析, 两两比较应用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMP2A 过表达改善 PD 恒河猴模型垂直方向精细运动能力

本实验中帕金森病恒河猴模型采取右侧纹状体区 LBs 注射的方式, 因此研究中重点检测术后第



注: A: 构建帕金森病恒河猴模型; B: 对照组、LAMP2A 过表达组的靶点脑区和注射物。

图 1 本研究中实验猴造模及分组示意图

Note. A, Construction of rhesus monkey models of Parkinson's disease. B, Target brain area and injection in control group and LAMP2A overexpression group.

Figure 1 Experimental monkey modeling and grouping schematic diagram in this study

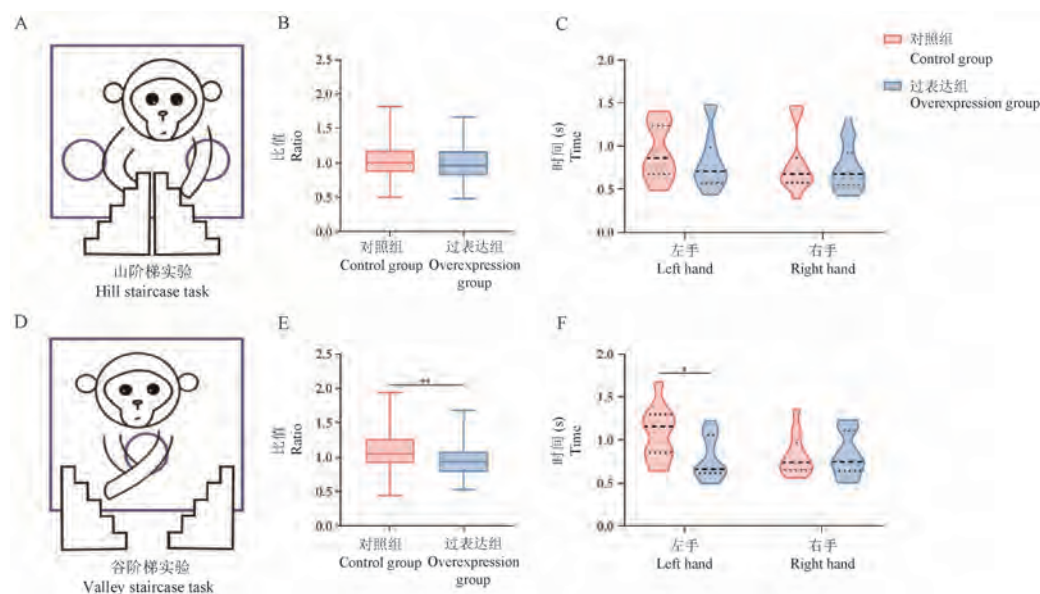
12 月实验猴注射脑区对侧^[17],即左侧上肢抓取食物的精细运动能力。将对照组和 LAMP2A 过表达组的左右上肢取食时间分别统计分析,为了消除个体差异,研究中采用该动物左手取食时间和其右手取食时间的比值作为衡量指标。由于山阶梯实验(图 2A)中一侧上肢抓取同侧目标的运动路径较短,因此山阶梯测试中没有显示出两组比值上的差异(图 2B)。为进一步探究 LAMP2A 对过表达组动物抓取运动的影响,研究发现在山阶梯中 LAMP2A 过表达组动物的两侧肢体运动没有明显的变化(图 2C);但谷阶梯(图 2D)中对照组恒河猴的差异表明对照组动物自身左手取食时间高于右手, $P<0.01$ (图 2E),同时说明对照组左手精细运动的差异是由注射物 LBs 引起而非注射本身的机械损伤。在相对困难的谷阶梯实验中也明显提高了 LAMP2A 过表达组实验猴左手抓取的成绩,抓取时间缩短 $P<0.05$ (图 2F),左手的取食效率提升。阶梯实验提示术后第 12 月的 PD 恒河猴模型,肉眼没有观察到明显的肢体运动障碍,但精细运动能力下降;同时黑质区 LAMP2A 的过表达可以改善其精细运动表现。

2.2 LAMP2A 过表达改善 PD 恒河猴模型水平方向精细运动能力

和阶梯实验类似,平板取食实验旨在测试实验猴水平方向上的精细运动能力。中央平板取食实验(图 3A)因其运动路径短,相对简单,两组动物上肢抓取时间的比值没有出现明显变化(图 3B),LAMP2A 过表达组上肢抓取时间的缩短也并不明显(图 3C);在相对困难的两端平板取食实验(图 3D)中,对照组动物上肢抓取时间的比值出现差异, $P<0.05$ (图 3E),LAMP2A 过表达组动物左手抓取的效率明显提高,抓取时间下降, $P<0.05$ (图 3F)。

2.3 LAMP2A 过表达组 PD 恒河猴模型磷酸化 α -syn 水平降低

为了探究 LAMP2A 改善实验猴精细运动能力的机制,我们对对照组和过表达组的猴血清、脑脊液的总 α -syn 以及磷酸化 α -syn 水平进行检测。结果表明,对照组恒河猴脑脊液的总 α -syn 水平在术后第 12 月显著增高($P<0.001$)(图 4A);LAMP2A 过表达组恒河猴脑脊液总 α -syn 水平在各时间点相对平稳,但术后第 4 月的血清总 α -syn 浓度与术前相比出现上升($P<0.05$),而后随时间趋于平稳,在术后第 12 月低于同期对照组(图 4B);LAMP2A 过

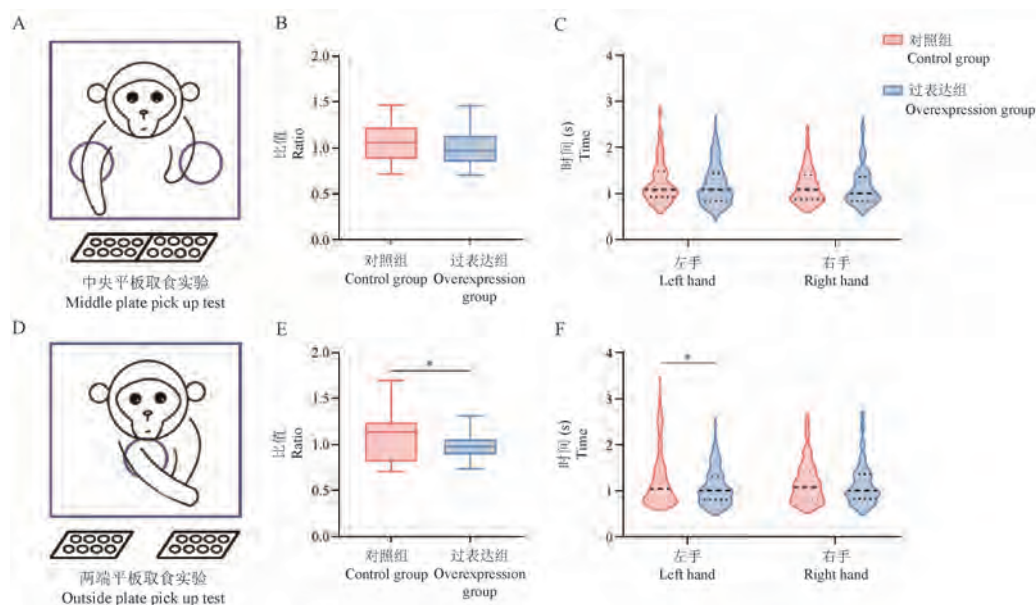


注:A:山阶梯实验装置;B:山阶梯实验中左右手取食时间的比值;C:山阶梯实验中左、右手分别取食的时间;D:谷阶梯实验装置;E:谷阶梯实验中左右手取食时间的比值;F:谷阶梯实验中左右手分别取食的时间。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 阶梯实验装置及结果($\bar{x}\pm s$)

Note. A, Hill staircase task equipment. B, Ratio of time spent on the left hand to the right hand in hill staircase task. C, Time to get food from left and right hands in hill staircase task. D, Valley staircase task equipment. E, Ratio of time spent on the left hand to the right hand in valley staircase task. F, Time to get food from left and right hands in valley staircase task. Compared to the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Staircase task equipment and results

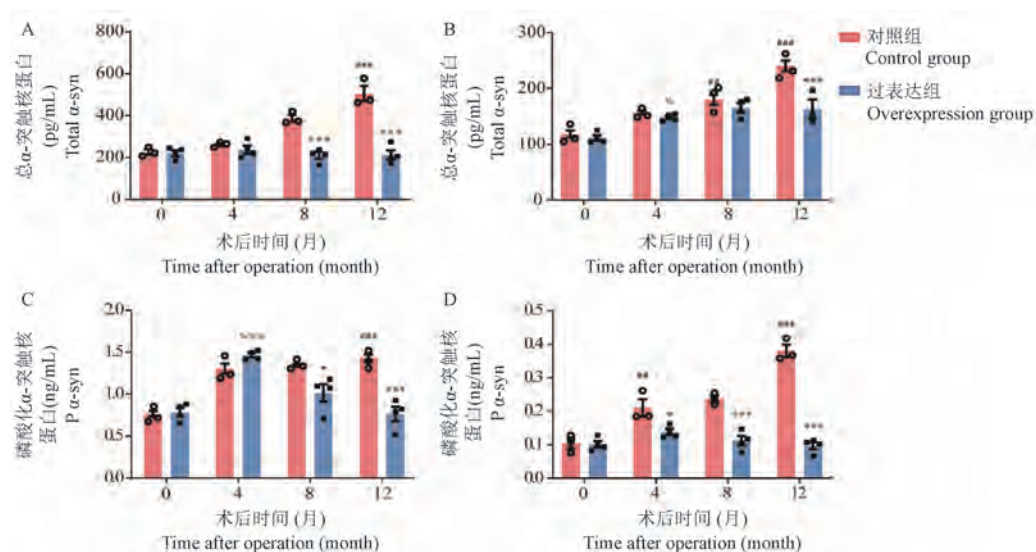


注:A:中央平板取食实验装置;B:中央平板取食实验中左右手取食时间的比值;C:中央平板取食实验中左、右手分别取食的时间;D:两端平板取食实验装置;E:两端平板取食实验中左右手取食时间的比值;F:两端平板取食实验中左右手分别取食的时间。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图3 平板取食实验装置及结果 ($\bar{x}\pm s$)

Note. A, Middle plate pick up test equipment. B, Ratio of time spent on the left hand to the right hand in middle plate pick up test. C, Time to get food from left and right hands in middle plate pick up test. D, Outside plate pick up test equipment. E, Ratio of time spent on the left hand to the right hand in outside plate pick up test. F, Time to get food from left and right hands in outside plate pick up test. Compared to the control group, * $P<0.05$.

Figure 3 Pick-up test equipment and results



注:A:实验猴脑脊液总 α -syn 水平;B:实验猴血清总 α -syn 水平;C:实验猴脑脊液磷酸化 α -syn 水平;D:实验猴血清磷酸化 α -syn 水平。与同时期对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.01$;与对照组 0 月相比, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$;与 LAMP2A 过表达组 0 月相比, % $P<0.05$, %%% $P<0.001$ 。

图4 实验猴脑脊液和血清总 α -syn 水平和磷酸化 α -syn 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Note. A, Total α -syn level of experimental monkey cerebrospinal fluid. B, Total α -syn level of experimental monkey serum. C, Phosphorylated α -syn level of experimental monkey cerebrospinal fluid. D, Phosphorylated α -syn level of experimental monkey serum. Compared with the control group in the same period, * $P<0.05$, *** $P<0.01$. Compared to the control group at 0 months, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared to the LAMP2A overexpression group at 0 months, % $P<0.05$, %%% $P<0.001$.

Figure 4 Comparison of total α -syn levels and phosphorylated α -syn levels in the cerebrospinal fluid and serum of experimental monkeys

表达组脑脊液磷酸化 α -syn 浓度在术后第 4 月显著增加 ($P < 0.001$), 而在术后第 8 月出现下降并于第 12 月恢复至术前水平, 表明 LAMP2A 在第 8 月作用凸显 (图 4C); 对照组恒河猴血清磷酸化 α -syn 水平在术后第 4 月开始, 也均高于同期的过表达组 (图 4D)。ELISA 结果说明 LAMP2A 降低了过表达组恒河猴血清、脑脊液的总 α -syn 和磷酸化 α -syn 水平, 同时生物学证据也支撑了 LAMP2A 过表达组恒河猴的较好的行为学表现, 提示 LAMP2A 在帕金森病理进程中潜在的治疗作用。

3 讨论

本研究行为学实验表明, 过表达 LAMP2A 可以改善 PD 恒河猴模型的精细运动能力, 避免潜在的肢体运动障碍。我们在研究中并没有加入野生型恒河猴和 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的 PD 恒河猴模型进行比较分析。但 Recasens 等^[7]在研究中证实单侧纹状体注射 LBs 构建的 PD 恒河猴模型具备 α -syn 病理和黑质纹状体变性表现, 术后第 9 月开始出现纹状体多巴胺能神经元减少, 并发现同侧颞叶皮层的中央前回、额叶上回和内嗅皮层的 α -syn 免疫组化信号增加。这可能是由于纹状体在解剖上的高度联接性导致 LBs 在同侧脑区的扩散, 在 PD 恒河猴模型和 PD 小鼠模型中尚未有 LBs 单侧注射向对侧扩散的报告。因此, 本研究中对对照组实验猴左手抓取效率的下降是由于其右侧纹状体 LBs 的注射引起。

Shimozawa 等^[18]将人工合成的 α -syn 原纤维注射入野生型猴纹状体 3 月后便能够检测到磷酸化 α -syn 免疫反应阳性, 但没有观察到明显的行为障碍。本研究也未发现恒河猴明显的肢体运动障碍, 这与先前的研究一致。人类黑质多巴胺神经元数量减少 50% 以上、纹状体多巴胺含量降低 80% 以上才会出现明显的 PD 运动障碍症状^[19]。本研究中术后第 14 月出现精细运动能力下降的实验猴在病理阶段可能已经达到多巴胺能神经元损伤并出现行为异常的阈值^[20]。不同于 MPTP 注射诱导的急性 PD 恒河猴模型, 早期即出现明显肢体运动障碍^[21], 本文中 PD 恒河猴模型模拟慢性病理进程^[22], 早期肢体运动障碍不明显, 故对照组实验猴肢体精细运动能力的下降是 α -syn 病理进程的反映。

LAMP2A 是 CMA 的限速步骤, 前期的 PD 大鼠

模型中已经证实, LAMP2A 可以显著提高 CMA 活性, 减少了黑质区酪氨酸酶阳性神经元的丢失, 总 α -syn 也接近于对照组水平^[6]。我们分析恒河猴精细运动能力下降是因为 α -syn 寡聚体可以抑制核心蛋白复合体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE) 的组成, 抑制囊泡内神经递质的释放^[23], 造成纹状体多巴胺含量的降低, 引起运动症状。此外, α -syn 寡聚体可以损伤线粒体复合体 I, 造成线粒体脂质过氧化, 导致多巴胺能神经元死亡^[24]。因此, 当 α -syn 的产生和清除之间的平衡被打破时, α -syn 单体便会错误折叠成 α -syn 寡聚体, 引发神经毒性^[25]。而 α -syn 被热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 识别后, LAMP2A 能够将 α -syn—HSP70 复合物募集到溶酶体表面, 随后进入溶酶体降解^[23-24], 因此 LAMP2A 过表达通过直接增加溶酶体膜表面的 LAMP2A 受体, 提高了 CMA 清除 α -syn 的效率。更为重要的是, 磷酸化 α -syn 可以阻止高尔基体或者内质网形成自噬体膜, 以减少自噬溶酶体途径对自身的降解^[26]。但磷酸化 α -syn 是否也抑制了溶酶体膜的形成, 尚未有更多的报道。而且, LAMP2A 过表达可以激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)^[27], 同时 PKC 可以诱导转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 入核激活, 促进溶酶体的产生^[28]。因此, LAMP2A 不仅可以直接提高 CMA 活性增加 α -syn 的清除, 可能同时也促进了溶酶体的产生。

最近的一项研究显示, 研究人员靶向小鼠神经元线粒体, 小鼠初期表现出精细运动能力障碍^[29], 这与我们的研究结论不谋而合。但小鼠的研究中没有进行 α -syn 病理分析, 因此本研究也尚需进一步的病理探究。另外, 一项前瞻性研究表明确诊帕金森病 10 年后 28% 的患者出现痴呆, 确诊 17 年后有 78% 进展为帕金森病痴呆^[30]。而本研究中动物接受手术时间较短, 实验猴在由透明挡板和模具构成的立体空间中并没有表现出视觉空间认知^[31]的差异, 因此有必要对其进行长期的观察研究以确定 LAMP2A 对认知功能的影响。

综上所述, 本研究在帕金森病恒河猴模型上初次验证了过表达 LAMP2A 可能通过增加 α -syn 的 CMA 途径清除、促进溶酶体的产生和减少磷酸化 α -syn 对溶酶体膜形成的抑制改善了 PD 恒河猴模型的精细运动能力, 为进一步研究其中的机制以及为 PD 的治疗提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Chatterjee D, Bhatt M, Butler D, et al. Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α -synuclein-based Parkinson's disease model [J]. NPJ Parkinson Dis, 2018, 4: 25.
- [2] Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, et al. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy [J]. Science, 2004, 305(5688): 1292-1295.
- [3] Xilouri M, Brekk OR, Polissidis A, et al. Impairment of chaperone-mediated autophagy induces dopaminergic neurodegeneration in rats [J]. Autophagy, 2016, 12(11): 2230-2247.
- [4] Alvarez-Erviti L, Rodriguez-Oroz MC, Cooper JM, et al. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson's disease brains [J]. Arch Neurol, 2010, 67(12): 1464-1472.
- [5] Du XY, Xie XX, Liu RT. The role of α -synuclein oligomers in Parkinson's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22): 8645.
- [6] Xilouri M, Brekk OR, Landeck N, et al. Boosting chaperone-mediated autophagy *in vivo* mitigates α -synuclein-induced neurodegeneration [J]. Brain, 2013, 136(7): 2130-2146.
- [7] Recasens A, Dehay B, Bové J, et al. Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger α -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys [J]. Ann Neurol, 2014, 75(3): 351-362.
- [8] Banerjee R, Rai A, Lyer SM, et al. Animal models in the study of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: A historical perspective [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(1): 27-37.
- [9] Chansel-Debordeaux L, Bezard E. Local transgene expression and whole-body transgenesis to model brain diseases in nonhuman primate [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(1): 9-17.
- [10] Yu X, Persillet M, Zhang L, et al. Evaluation of blood flow as a route for propagation in experimental synucleinopathy [J]. Neurobiol Dis, 2021, 150: 105255.
- [11] François C, Yelnik J, Percheron G. A stereotaxic atlas of the basal ganglia in macaques [J]. Brain Res Bull, 1996, 41(3): 151-158.
- [12] Le Gal R, Bernaudin M, Toutain J, et al. Assessment of behavioural deficits following ischaemic stroke in the marmoset [J]. Behav Brain Res, 2018, 352: 151-160.
- [13] 黄忠强, 刘书华, 关雅伦, 等. 非人灵长类单侧脑损伤模型运动感知行为的评价研究 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(5): 577-582.
- [14] 胡亚松. MPTP 诱导的食蟹猴慢性偏侧帕金森病模型行为学评价研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [15] 田肇隆, 马艳辉, 李丽, 等. 恒河猴大脑中动脉 M1 段栓塞建模中麻醉方案的选择 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(6): 53-55, 62.
- [16] 陈霆, 丛喆, 魏强. 实验用猴脑脊液采集技术创新 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(2): 49-50, 79.
- [17] Asakawa T, Fang H, Sugiyama K, et al. Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2016, 65: 63-94.
- [18] Shimozaawa A, Ono M, Takahara D, et al. Propagation of pathological α -synuclein in marmoset brain [J]. Acta Neuropathol Commun, 2017, 5(1): 12.
- [19] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. Lancet, 2015, 386(9996): 896-912.
- [20] Bezard E, Dovero S, Prunier C, et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease [J]. J Neurosci, 2001, 21(17): 6853-6861.
- [21] Vezoli J, Fifel K, Levie V, et al. Early presymptomatic and long-term changes of rest activity cycles and cognitive behavior in a MPTP-monkey model of Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23952.
- [22] 刘永芳, 吴正存, 马开利. 非人灵长类帕金森模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 134-142.
- [23] Moloney TC, Hyland R, O'Toole D, et al. Heat shock protein 70 reduces α -synuclein-induced predegenerative neuronal dystrophy in the α -synuclein viral gene transfer rat model of Parkinson's disease [J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(1): 50-58.
- [24] Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and α -synuclein: relevance to Parkinson's disease and related synucleopathies [J]. Mov Disord, 2016, 31(2): 178-192.
- [25] Burré J, Sharma M, Südhof TC. Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity [J]. J Neurosci, 2015, 35(13): 5221-5232.
- [26] Rostami J, Holmqvist S, Lindström V, et al. Human astrocytes transfer aggregated α -synuclein via tunneling nanotubes [J]. J Neurosci, 2017, 37(49): 11835-11853.
- [27] Onofre TS, Rodrigues JPF, Shio MT, et al. Interaction of trypanosoma cruzi Gp82 with host cell LAMP2 induces protein kinase C activation and promotes invasion [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 627888.
- [28] Li Y, Xu M, Ding X, et al. Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1 [J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(10): 1065-1077.
- [29] González-Rodríguez P, Zampese E, Stout KA, et al. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism [J]. Nature. 2021, 599(7886): 650-656.
- [30] Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, et al. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson's disease: an 8-year prospective study [J]. Arch Neurol, 2003, 60(3): 387-392.
- [31] Karádi K, Lucza T, Aschermann Z, et al. Visuospatial impairment in Parkinson's disease: the role of laterality [J]. Laterality, 2015, 20(1): 112-127.

[收稿日期] 2021-12-15

金翠柳,柴钰,凌望,等. 多柔比星致小鼠慢性心脏毒性模型的构建及评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 14-21.

Jin CL, Chai Y, Ling W, et al. Construction and evaluation of a doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 14-21.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 003

多柔比星致小鼠慢性心脏毒性模型的构建及评估

金翠柳¹,柴钰¹,凌望¹,吴美平¹,金素安^{2*}

(1.上海中医药大学附属市中医医院,上海 200071;2.上海中医药大学,上海 201203)

【摘要】 目的 基于病理变化评估不同浓度多柔比星致小鼠心脏毒性模型的成模效果。**方法** 采用 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,随机分为生理盐水组(NS 组)、3 mg/kg 多柔比星组、4 mg/kg 多柔比星组、5 mg/kg 多柔比星组、6 mg/kg 多柔比星组、7 mg/kg 多柔比星组,每组 6 只。采用腹腔注射的给药方式,每 3 d 1 次,共 10 次,观察小鼠的状态,对小鼠心重、体重、心重比、心腔比、生存情况进行统计,并检测心脏组织中凋亡蛋白的表达情况以及心肌纤维化程度,心脏中段横截面积与单个心肌细胞横截面积大小等来评价多柔比星诱导的小鼠慢性心脏毒性模型。**结果** 统计整个实验周期中小鼠的生存情况,3~5 mg/kg 各给药组小鼠均存活 6 只,生存率为 100%,6 mg/kg 给药组小鼠存活 5 只,生存率为 83.3%,7 mg/kg 给药组小鼠存活 1 只,生存率约达 16.7%。与 NS 组相比,给药组小鼠的生存率呈下降趋势,且与多柔比星给药浓度呈负相关,而小鼠的心重、体重、心腔比则呈剂量依赖性下降。当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 时,相较 NS 组,模型组小鼠心肌细胞凋亡比例增加,心肌纤维化面积增多,且发现心脏整体缩小,心肌细胞横截面积相应缩小,有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 小鼠心脏纤维化、心肌细胞凋亡、萎缩及生存率等指标随着体内多柔比星蓄积量增加而恶化,造模时选用 4~6 mg/kg 浓度的多柔比星构建小鼠慢性心脏毒性模型较为合适,超过该剂量则小鼠死亡率较高,不利于后期实验。

【关键词】 多柔比星;动物模型;小鼠;慢性心脏毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0014-08

Construction and evaluation of a doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity mouse model

JIN Cuiliu¹, CHAI Yu¹, LING Wang¹, WU Meiping¹, JIN Suan^{2*}

(1. Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China. 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of different levels of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by examining pathological changes. **Methods** In total, 36 male C57BL/6J mice (8 weeks old, SPF grade) were randomly assigned to the normal saline group (NS group), 3 mg/kg doxorubicin group, 4 mg/kg doxorubicin group, 5 mg/kg doxorubicin group, 6 mg/kg doxorubicin group and 7 mg/kg doxorubicin group (6 mice in each group). Mice received intraperitoneal injection of saline or different concentrations of doxorubicin, 3 days/times, 10 times in total. We monitored heart weight, body weight, ratio of body weight with heart weight, tibia to heart weight ratio, survival rate and evaluated cardiomyocyte apoptosis and cardiac fibrosis, simultaneously measured the cross-sectional area of heart and single myocyte cross-sectional area size. **Results** All six mice in each of the 3~5 mg/kg groups survived, with a survival rate of 100%.

【基金项目】 国家自然科学基金(81973826);国家自然科学基金青年科学基金项目(81904167)。

【作者简介】 金翠柳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:从事心血管领域研究。E-mail:954700668@qq.com

【通信作者】 金素安(1976—),女,副教授,博士,研究方向:从事中药学研究。E-mail:zhongyaojin@126.com

Five mice in the 6 mg/kg group survived, the survival rate was approximately 83.3%. One mouse in the 7 mg/kg group survived, the survival rate was approximately 16.7%. The survival rate of mice in the treatment groups decreased and was negatively correlated with doxorubicin concentration. The heart weight, body weight and heart to tibia ratio of mice in the treatment groups decreased in a dose-dependent manner. When the concentration of doxorubicin reached 4 mg/kg, the proportion of cardiomyocyte apoptosis increased, the area of myocardial fibrosis increased, and the cross-sectional area of the whole heart and cardiomyocyte decreased in the model groups compared with the NS group, and these differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The indexes of cardiac fibrosis, cardiomyocyte apoptosis, atrophy and survival rate of mice worsen with the increase of doxorubicin accumulation *in vivo*. A concentration of 4 ~ 6 mg/kg doxorubicin is appropriate to build the model of chronic cardiotoxicity in mice, if doxorubicin exceeds this dose, the death rate of mice will be high, which is not conducive to the later experiment.

【Keywords】 doxorubicin; animal model; mouse; chronic cardiac toxicity

肿瘤心脏病是临床影响肿瘤患者生存率的一类重要疾病,尤其是放疗或化疗药物诱发的心脏毒性最为常见,其中化疗药物诱发心脏毒性在抗癌治疗中发病率高,常常影响肿瘤患者的预后,是妨碍肿瘤幸存者生命健康的一大挑战^[1-4]。目前针对化疗药物诱发的心脏毒性尚无明确的治疗措施,建立可靠的心脏毒性模型是进行药物研究的前提。构建心脏毒性模型多采用放疗或化疗药物进行干预,化疗药物干预常以多柔比星药物腹腔注射构建心脏毒性模型较为常见^[5-6]。且采用药物注射操作技术简便、易于大量重复,是目前探索肿瘤心脏病治疗方法的合适动物模型。

构建多柔比星诱导小鼠心脏毒性模型是心血管基础研究常用的动物模型之一^[7-8],也是探索肿瘤心脏病的病理发生、发展以及治疗方法的前提,然而通过查阅国内外相关文献发现,构建心脏毒性模型采用的多柔比星药物浓度差异较大,给药策略和评价指标不规范,给药浓度从 3 ~ 10 mg/kg 均有涉及,其中有采用多柔比星给药浓度 3 mg/kg,隔天给药 1 次,给药 2 周来构建该模型,以小鼠心超指标:左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)下降为建模成功指标^[9]。也有采用 4 mg/kg 多柔比星药物浓度连续注射 4 周,以血清中肌钙蛋白 T(cTnT)、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶-同工酶(CK-MB)等指标上升视为建模成功指标^[10]。更甚者提出在第 1、3、5 天给予多柔比星 10 mg/kg 腹腔注射,1 周后也可检测到小鼠心功能下降,心肌细胞凋亡^[11],综合上述发现该模型对于造模用药剂量、时间差异极大,且目前国内外研究对多柔比星构建心脏毒性模型以何种浓度诱导,以及诱导的时间长短均无定论^[12-14]。本研究通过参考临床多柔比星

化疗方案^[15-16],并结合多柔比星药代动力学特征,多柔比星血浆浓度呈多相衰减,终末相半衰期为 50 h^[17],探讨在同等的造模时长(4 周)、给药周期(每 3 d 1 次)下系统地探讨不同浓度多柔比星对小鼠心脏损伤、心脏组织结构变化的影响,以期构建出成模率高且死亡率低的多柔比星慢性心脏损伤模型,为后续开展多柔比星相关实验的广大研究者提供造模参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级别实验雄性小鼠 C57BL/6J, 36 只, 20 ~ 22 g, 6 ~ 8 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005], 在上海同济大学实验动物中心[SYXK(沪)2018-0034] SPF 屏障环境(室温 20℃ ~ 25℃, 湿度 60% ~ 70%)下饲养。实验经上海同济大学生物医学伦理委员会审批(TJHBLAC-2019-057)。实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂

盐酸多柔比星(Med Chem Express, 美国; 批号: HY-15142); 活化后的半胱氨酸蛋白 3 (Cleaved-caspase-3) (CST, 美国; 批号: 9664S); 促凋亡蛋白(Bax) (CST, 美国; 批号: ab182734); 抑凋亡蛋白(Bcl2) (CST, 美国; 批号: ab182858); 抗-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) (CST, 美国; 批号: 5174S); 山羊抗兔 IgG (H + L) (Yeasten, 中国; 批号: 33101ES60); 天狼猩红染色试剂盒(索莱宝科技有限公司, 中国; 批号: S8060); 麦胚凝集素染色试剂盒(Thermo, 美国; 批号: L2785)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模

8 周龄 SPF 级别雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 将

其随机分为 NS 组、3 mg/kg 多柔比星剂量组、4 mg/kg 多柔比星剂量组、5 mg/kg 多柔比星剂量组、6 mg/kg 多柔比星剂量组、7 mg/kg 多柔比星剂量组, 每组各 6 只。实验小鼠根据分组腹腔注射不同浓度多柔比星和生理盐水, 每 3 d 1 次, 共 10 次。30 d 后, 处死小鼠, 取出心脏, 用于后续实验。

1.3.2 检测指标及方法

(1) HE 染色

参考文献^[18], 常规脱蜡至水后, 按说明书使用伊红-苏木素染料进行染色, 心脏组织常规脱水透明后进行封片处理, 在显微镜下观察组织显色效果并采集图像。

(2) 天狼猩红染色

参考文献^[19], 常规脱蜡至水后, 准备湿盒, 用免疫组化笔在组织周围画圈, 按说明书使用天狼猩红染料进行染色, 心脏组织常规脱水透明后进行封片处理, 在显微镜下观察组织显色效果并采集图像。

(3) 麦胚凝集素染色

参考文献^[20], 烤片, 脱蜡至水, 使用微波炉将组织用柠檬酸钠修复液进行抗原热修复, 甘氨酸室温孵育 20 min, 用 PBS 洗 1 次。准备湿盒, 用免疫组化笔在组织周围画圈, 按说明书要求进行麦胚凝集素染色, 染色完成后使用荧光显微镜观察组织显色效果并采集图像, 后续使用 Image J 软件统计心肌细胞横截面积。

(4) 蛋白免疫印迹 (Western blot)

称取并研磨相同重量的心脏组织, 裂解并提取蛋白, 测定蛋白浓度。蛋白样品进行电泳、转膜、封闭, 后续加入一抗 GAPDH、Bax、Bcl2、Cleaved-caspase3 和相应二抗孵育, Bio-Rad 凝胶成像分析仪曝光, Image J 统计各组灰度值。

1.4 统计学方法

采用 Graph Pad Prism 6.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对各项指标数据进行正态性检验, 其中多组间比较用 One-Way ANOVA 分析法, 多组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, 两组间均值差异采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度多柔比星对小鼠一般情况及生存率的影响

与 NS 组相比, 6 mg/kg 多柔比星模型组小鼠存

活 5 只, 7 mg/kg 多柔比星模型组小鼠存活 1 只, 其余浓度模型组小鼠均存活, 提示小鼠生存率随着多柔比星的浓度增加而同步下降, 见图 1A。取材后对各组小鼠心脏拍照观察, 发现随着多柔比星浓度的上升, 小鼠心脏呈剂量依赖性的缩小, 见图 1B。同时对小鼠心脏中段横截面进行 HE 染色, 从图 1C 可见, 与生理盐水组相比, 多柔比星组小鼠心脏整体缩小, 心室内径扩大, 与肉眼观察相符。后期对小鼠的体重、心脏重量、心重比及其心腔比进行统计, 发现与 NS 组相比, 多柔比星组小鼠的体重、心脏重量、心腔比均下降, 且随着多柔比星浓度的增加而同步下降 ($P < 0.05$), 但在小鼠心重比参数上无统计学差异 ($P > 0.05$), 可能与多柔比星注射后体重同步下降有关, 见图 1D~1G。

2.2 不同浓度多柔比星对心肌细胞凋亡的影响

心肌细胞凋亡是多柔比星诱导心肌细胞死亡的方式之一, 同时也是多柔比星诱导慢性心脏损伤的病理表现之一^[21]。实验结果显示, 与 NS 组相比, 多柔比星药物浓度为 3 mg/kg 时心脏组织中凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达量未见明显增高, Bax/Bcl2 比值也无明显上升 ($P > 0.05$)。而当药物浓度达到 4 mg/kg 后, 与 NS 组相比, Bax/Bcl2 比值明显增加, 有统计学差异, Cleaved-caspase3 的表达量增加, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。当给药浓度为 5~6 mg/kg 时, Bax/Bcl2 比值与 Cleaved-caspase3 表达均明显增加, 见图 2A~2F。

2.3 不同浓度多柔比星对小鼠心肌纤维化的影响

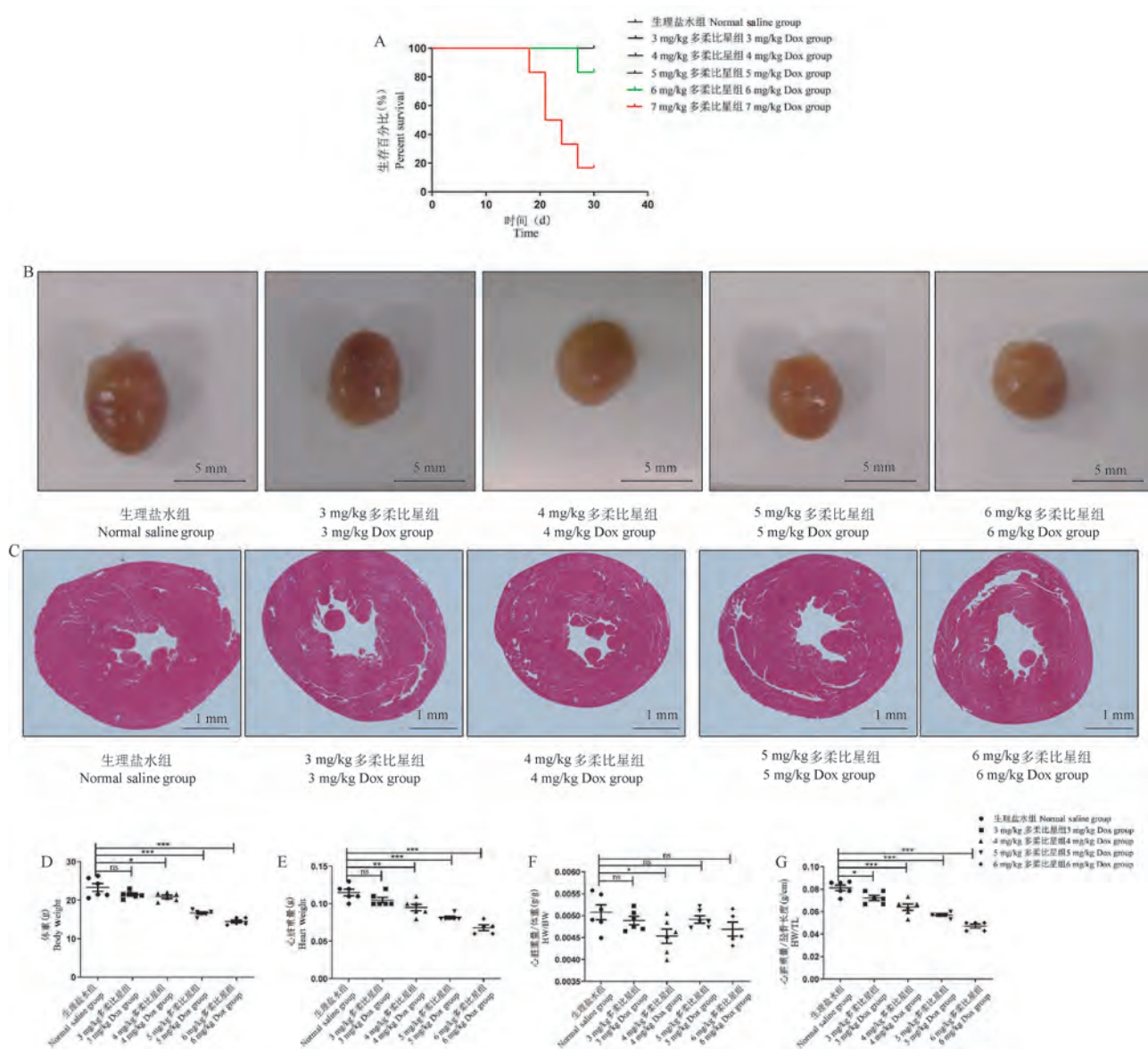
通过对心脏组织进行天狼猩红染色, 结果显示: 3 mg/kg 多柔比星组与 NS 组相比, 胶原纤维沉积较少, 心肌纤维化程度不明显, 无统计学差异 ($P > 0.05$), 见图 3A、3B。当多柔比星剂量达到 4 mg/kg 以上时, 与 NS 组相比, 心脏组织中可见明显的胶原纤维沉积, 心肌纤维化程度加重, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 图 3A、3B。横向比较不同浓度多柔比星给药组间差异发现, 小鼠心脏心肌纤维化程度并未随着多柔比星给药浓度的增加而上升, 可能是小鼠心脏纤维化程度不具备明显的剂量依赖性特征, 或者是给药后观察时长不够导致。

2.4 不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞萎缩的影响

前期通过对小鼠的一般情况进行统计, 发现

多柔比星呈剂量依赖性降低小鼠的心脏重量,说明多柔比星可能导致心脏萎缩。通过对小鼠心脏组织进行 WGA 染色发现,3 mg/kg 浓度造模组与 NS 组相比,小鼠单个心肌细胞大小未见明显

缩小,无统计学差异($P>0.05$)。而当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 以上时,小鼠单个心肌细胞可见明显缩小,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

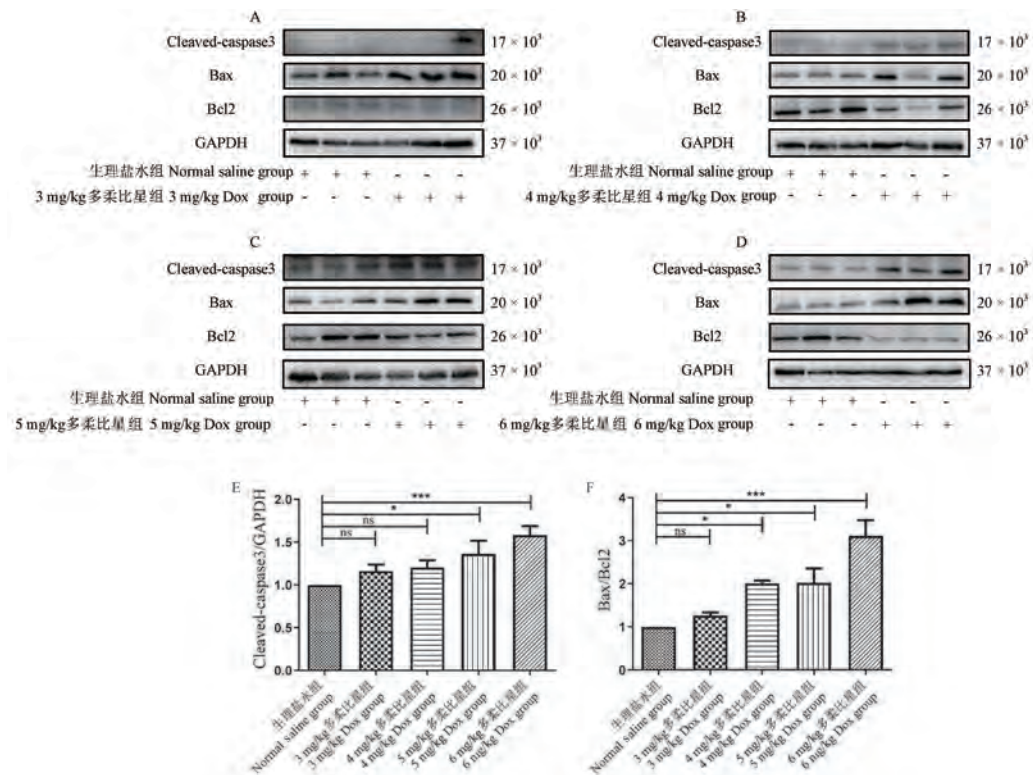


注:A:小鼠生存曲线;B:各组小鼠具有代表性的心脏图片;C:各组小鼠 HE 染色示意图;D:各组小鼠体重统计;E:各组小鼠心脏重量统计;F:各组小鼠心重比统计;G:各组小鼠心腔比统计。与生理盐水组比,*** $P<0.001$,** $P<0.01$,* $P<0.05$,^{ns} $P>0.05$ 。

图 1 不同浓度多柔比星对小鼠一般情况及生存率的影响($n=6$)

Note. A, Mouse survival curve. B, Pictures of representative hearts of mice in each group. C, Schematic diagram of HE staining of mice in each group. D, Body weight statistics of mice in each group. E, Heart weight statistics of mice in each group. F, Statistics of the ratio of heart to body weight in each group. G, Statistics of the tibia heart weight ratio of mice in each group. Compared with normal saline group, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, ^{ns} $P>0.05$.

Figure 1 Effects of different concentrations of doxorubicin on general condition and survival rate of mice

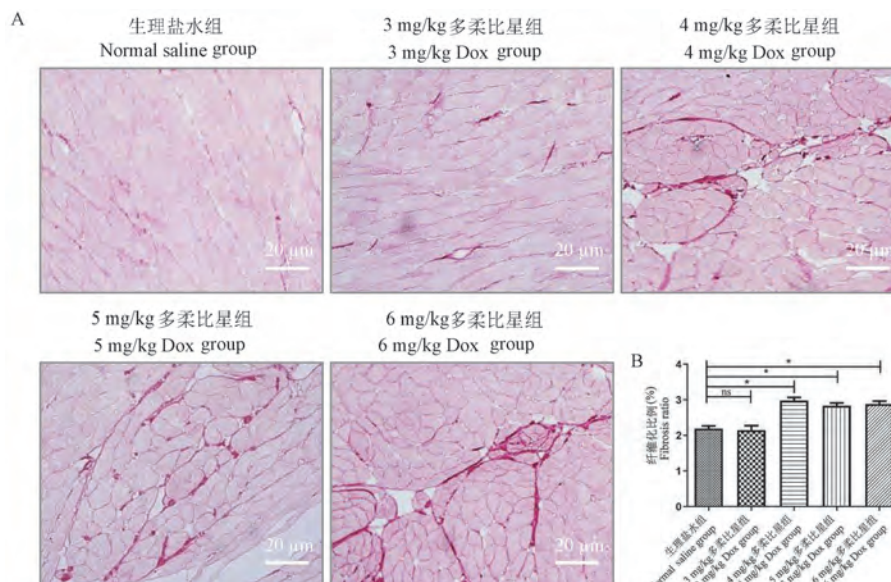


注: A~D: 蛋白免疫印迹检测 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl2、GAPDH 的表达; E: Cleaved-caspase3 蛋白相对表达水平的统计图; F: Bax 蛋白相对水平表达与 Bcl2 蛋白相对表达的比值统计图。与生理盐水组比, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图 2 不同浓度多柔比星对心肌细胞凋亡的影响 ($n = 6$)

Note. A~D, Representative Western blot of Cleaved-caspase3, Bax, Bcl2 and GAPDH protein expression. E, A statistical chart of Cleaved-caspase3 relative expression levels. F, Statistical diagram of the ratio of Bax protein relative level expression to Bcl2 protein relative level expression. Compared with normal saline group, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$.

Figure 2 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial apoptosis

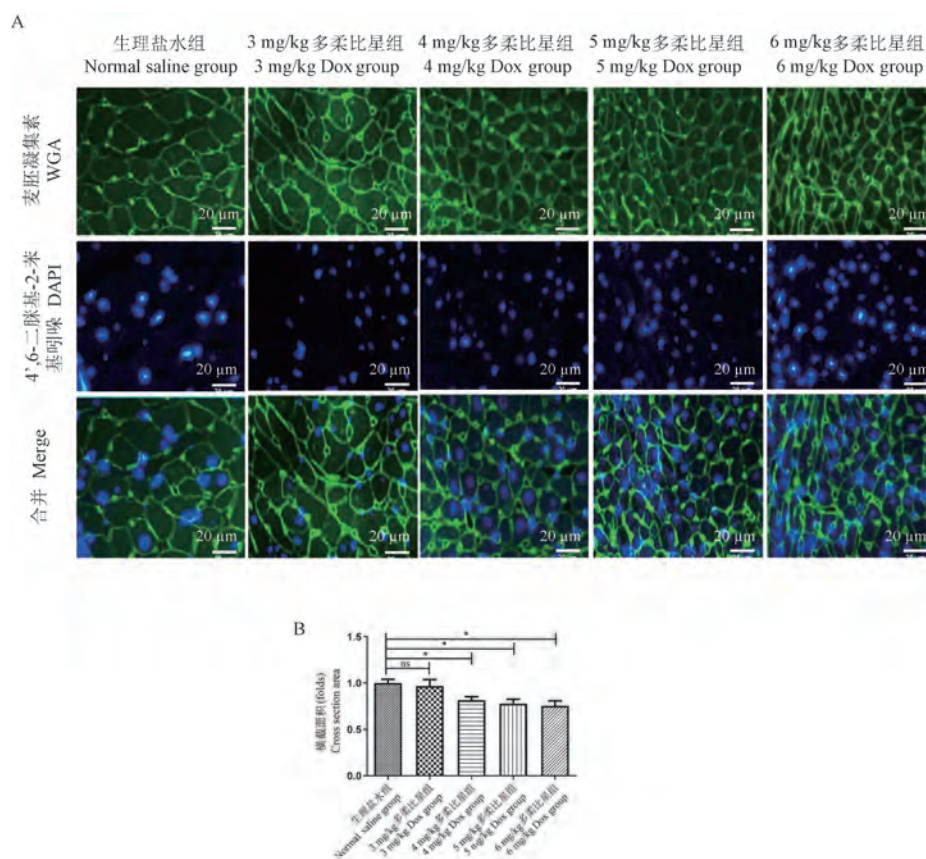


注: A: 小鼠心肌细胞天狼猩红染色; B: 小鼠心脏纤维化比例统计图。与生理盐水组比, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图 3 不同浓度多柔比星对小鼠心肌纤维化的影响 ($n = 6$)

Note. A, Mice cardiomyocytes Sirius scarlet dye. B, Statistical map of the proportion of cardiac fibrosis in mice. Compared with normal saline group, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$.

Figure 3 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial fibrosis in mice



注:A:小鼠心肌细胞麦胚凝集素染色;B:不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞横截面积影响的统计图。与生理盐水组比, * $P < 0.05$, ns $P > 0.05$ 。

图4 不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞萎缩的影响($n=6$)

Note. A, Mice cardiomyocytes wheat germ lectin staining. B, Statistical diagram of the effect of doxorubicin at different concentrations on the cross-sectional area of myocardial cells in mice. Compared with normal saline group, * $P < 0.05$, ns $P > 0.05$.

Figure 4 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial cell atrophy in mice

3 讨论

多柔比星为临床上治疗实体肿瘤的经典药物,临床研究发现长期使用多柔比星会增加肿瘤病人患心血管疾病的风险,以心律失常、左室功能障碍、充血性心力衰竭等为主,其原因多数认为是多柔比星随剂量及时间累积对心肌细胞损伤导致的凋亡、萎缩以及对心肌纤维化的促进作用共同导致的心室重构^[3],在基础病理生理学以及药理学研究中,小鼠腹腔注射多柔比星是常用的体内模型^[5],可以很好地模拟临床患者化疗后诱发的心脏毒性。

多柔比星除了急性大剂量心脏损伤外,小剂量随时间和剂量蓄积是目前模型使用非常多的造模方式,但因为国内外文献中对多柔比星诱导心脏模型的给药浓度与给药时长不同,且未有统一定论^[13,22],前期课题组研究发现多柔比星损伤剂量与致死量窗口非常窄,导致模型难以重复,本研究观

察不同剂量多柔比星在一定时间(4周)内蓄积后体重、心脏重量、生存率及病理学指标如凋亡、萎缩、纤维化等指标,寻找比较合适的造模剂量。从实验结果可以看出,随着多柔比星药物浓度增加,小鼠体重和心脏重量下降,生存率下降,但给药浓度低于4 mg/kg则指标恶化不明显,高于6 mg/kg后小鼠大量死亡,提示4~6 mg/kg的给药浓度是较合适的造模方法。

多柔比星导致心室重构的主流观点是引起心脏萎缩^[23-24],在本研究中,我们使用了不同剂量的多柔比星对小鼠心肌质量的影响进行评估。研究发现当多柔比星给药浓度达4 mg/kg,且体内药物累积剂量达40 mg/kg时,小鼠的心脏指数显著下降,与目前的临床给药方案范围接近,且与临床实验中发现的当人体内多柔比星的累积剂量接近为30 mg/m²,会发生亚急性心肌萎缩的结论一致^[25]。对心肌细胞横截面积统计,进一步发现当多柔比星

药物浓度达 4 mg/kg 是心肌细胞萎缩的开始,显微镜下可见心脏中段横截面积与心肌细胞横截面积明显缩小。既往有观点认为心肌细胞凋亡亦可能导致了心脏萎缩^[26-27],本次课题组对心肌组织的凋亡标志蛋白 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl2 的观察佐证了此观点:3 mg/kg 浓度的多柔比星组凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 表达及 Bax/Bcl2 比值相较 NS 组未见明显上升,而当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 后,心脏中凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达及 Bax/Bcl2 的比值均明显上升。在 4~6 mg/kg 给药浓度范围内可见凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达及 Bax/Bcl2 的比值呈剂量依赖性上升,课题组不同剂量多柔比星对乳鼠心肌细胞凋亡的体外研究(数据未发布)亦佐证了体内的趋势。

除了心肌细胞萎缩、凋亡外,心肌纤维化也是导致心室重构的另一中病理表现^[28]。为了探讨不同浓度多柔比星对小鼠心脏纤维化程度的影响,课题组对不同剂量多柔比星处理后小鼠的心脏石蜡切片采用天狼猩红染色,结果显示 3 mg/kg 多柔比星组小鼠相较 NS 组心肌纤维化比例未见明显增加,当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 时,可见明显的胶原沉积在心脏间质中,心肌纤维化加重,4~6 mg/kg 模型组小鼠心肌纤维化程度明显比 3 mg/kg 模型组严重,但 3 组模型组组间两两比较发现,小鼠心肌纤维化程度大约一致,并未随着多柔比星浓度与剂量的进一步增多而加重,可能是由于多柔比星剂量累积到一定程度后,小鼠心脏纤维化程度不具备明显的剂量依赖性特征,或者是给药后观察时长不够导致。

本研究尚存一些不足之处,未对小鼠心功能、血流动力学等指标进行检测,但是本研究通过心脏重量、心腔比、心重比、心脏组织 HE 染色、WGA 染色、天狼猩红染色及凋亡蛋白检测等指标从侧面反映了多柔比星可诱导小鼠心室重构,相较心超更具说服力。本研究也未从药物时间依赖性角度对多柔比星诱导小鼠心脏损伤进行研究,有待后续更进一步深入探讨。

综上所述,当多柔比星给药浓度达到 4 mg/kg 时,小鼠心脏结构发生改变,可见心脏缩小,心肌细胞萎缩,心肌细胞凋亡及心肌纤维化等,当给药浓度达到 7 mg/kg 时,小鼠多数死亡,反应出多柔比星造模小鼠心脏损伤窗口比较窄,4~6 mg/kg 可作为多柔比星诱导小鼠慢性心脏损伤模型的参考浓度。

本实验从整体上对不同浓度给药剂量的多柔比星模型组的诱导的心脏损伤加以全面地评价、分析并提供安全、可靠的给药剂量。

参考文献:

- [1] Lipshultz SE, Franco VI, Miller TL, et al. Cardiovascular disease in adult survivors of childhood cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 161-176.
- [2] Fornaro A, Olivetto I, Rigacci L, et al. Comparison of long-term outcome in anthracycline-related versus idiopathic dilated cardiomyopathy: a single centre experience [J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(5): 898-906.
- [3] Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC committee for practice guidelines: the task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(36): 2768-2801.
- [4] Moke DJ, Schubert LE, Sun HY, et al. Utility of echocardiography as screening for late-onset anthracycline-induced cardiotoxicity in pediatric cancer survivors: observations from the first decade after end of therapy [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40(5): e283-e288.
- [5] Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(13): 1838-1849.
- [6] 张颖, 马玉奎, 戴晓莉. 多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液大鼠重复给药毒性的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(6): 23-27.
- [7] Qi W, Boliang W, Xiaoxi T, et al. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109547.
- [8] Hole LD, Larsen TH, Fossan KO, et al. A short-time model to study relevant indices of cardiotoxicity of doxorubicin in the rat [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2013, 23(6): 412-418.
- [9] Ma Y, Yang L, Ma J, et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1904-1911.
- [10] Hu C, Zhang X, Wei W, et al. Matrine attenuates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via maintaining AMPK α /UCP2 pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 690-701.
- [11] Yu X, Ruan Y, Huang X, et al. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523(1): 140-146.
- [12] Yi X, Bekerjian R, DeFilippis NJ, et al. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(3): H1098-H1102.
- [13] Pugazhendhi A, Edison T, Velmurugan BK, et al. Toxicity of

- Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. Life Sci, 2018, 200: 26–30.
- [14] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(25): 3267–3285.
- [15] 王海江, 乔丽莉, 乔恩奇. 含脂质体多柔比星的联合化疗方案治疗晚期乳腺癌的临床观察 [J]. 中国高等医学教育, 2020, 1: 140–145.
- [16] 张松. 多柔比星脂质体、吡柔比星相关化疗后不良反应的临床观察 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.
- [17] 方罗, 林能明. 多柔比星药动学研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(5): 424–429.
- [18] Borucki R, Perry DM, Lopez-Garcia DR, et al. Fluorescence microscopy for the evaluation of elastic tissue patterns within fibrous proliferations of the skin on hematoxylin-eosin-stained slides [J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 85(2): 419–422.
- [19] Favero G, Paini A, De Ciuceis C, et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with essential hypertension [J]. Blood Press, 2018, 27(4): 231–239.
- [20] Weissenbacher A, Oberhuber R, Hermann M, et al. Live confocal tissue assessment with SYTO16/PI and WGA staining visualizes acute organ damage and predicts delayed graft function in kidney transplantation [J]. Ann Surg, 2019, 270(5): 915–922.
- [21] Renu K, Abilash VG, Pichiah PT, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 818: 241–253.
- [22] 牛欢, 陈曼丽, 杨波, 等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 63–70.
- [23] Kazemi-Bajestani SMR, Becher H, Butts C, et al. Rapid atrophy of cardiac left ventricular mass in patients with non-small cell carcinoma of the lung [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(5): 1070–1082.
- [24] Willis MS, Parry TL, Brown DI, et al. Doxorubicin exposure causes subacute cardiac atrophy dependent on the striated muscle-specific ubiquitin ligase MuRF1 [J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(3): e005234.
- [25] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7(2): 27–31.
- [26] Campbell TL, Quadrilatero J. Data on skeletal muscle apoptosis, autophagy, and morphology in mice treated with doxorubicin [J]. Data Brief, 2016, 7: 786–793.
- [27] Xia P, Chen J, Liu Y, et al. Doxorubicin induces cardiomyocyte apoptosis and atrophy through cyclin-dependent kinase 2-mediated activation of forkhead box O1 [J]. J Biol Chem, 2020, 295(13): 4265–4276.
- [28] Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, et al. Doxorubicin-induced myocardial fibrosis involves the neurokinin-1 receptor and direct effects on cardiac fibroblasts [J]. Heart Lung Circ, 2019, 28(10): 1598–1605.

[收稿日期]2021-03-06

严琳,李亚萍,王冬,等. 基于自噬探讨芬太尼复合丙泊酚对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 22-28.

Yan L, Li YP, Wang D, et al. The effects of fentanyl combined with propofol on heart ischemia-reperfusion injury in rats via autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 22-28.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 004

基于自噬探讨芬太尼复合丙泊酚对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响

严琳,李亚萍,王冬,贾文琴,阎文军*

(甘肃省人民医院麻醉手术科,兰州 730000)

【摘要】 目的 基于自噬探讨芬太尼复合丙泊酚对大鼠心脏缺血再灌注(I/R)损伤的影响。**方法** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,随机分为 5 组:假手术组、模型组、芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组。除假手术组外,其余大鼠均建立心肌缺血再灌注损伤模型,芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组在造模前分别用 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼、50 mg/kg 丙泊酚以及 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼复合 50 mg/kg 丙泊酚预处理。实验结束后 30 min 处死大鼠,取心脏组织做后续检测。通过 HE 和 TUNEL 染色观察大鼠心脏组织病理损伤,TTC 染色观察大鼠心肌梗塞面积,电镜观察心肌自噬泡的形成情况,Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin1、ATG5 和 LC3B 的表达情况。**结果** 与假手术组相比,模型组大鼠心肌病理变化损伤严重,心脏细胞凋亡与梗死面积百分比升高,心肌细胞线粒体发生肿胀及自噬相关蛋白 Beclin1、ATG5 和 LC3B-II 表达增加;与模型组相比,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼、50 mg/kg 丙泊酚以及 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼复合 50 mg/kg 丙泊酚预处理均显著减少了 I/R 大鼠心肌病理损伤,降低了心脏细胞凋亡与梗死面积百分比,并减轻了心肌细胞线粒体肿胀程度及降低了自噬相关蛋白 Beclin1、ATG5 和 LC3B-II 的表达,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼复合 50 mg/kg 丙泊酚预处理在其中的表现最好,而芬太尼和丙泊酚之间没有显著差异。**结论** 芬太尼和丙泊酚均能抑制心肌细胞自噬和线粒体肿胀,同时减轻心肌 I/R 损伤,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼与 50 mg/kg 丙泊酚对心肌 I/R 损伤的治疗效果没有显著差异,此外,芬太尼和丙泊酚联合使用对心肌 I/R 损伤有协同作用。

【关键词】 心肌缺血再灌注;芬太尼;丙泊酚;自噬;线粒体肿胀

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0022-07

The effects of fentanyl combined with propofol on heart ischemia-reperfusion injury in rats via autophagy

YAN Lin, LI Yaping, WANG Dong, JIA Wenqin, YAN Wenjun*

(Department of Anesthesia Operation, Gansu Province People's Hospital, Lanzhou 730000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of fentanyl combined with propofol on cardiac autophagy and cardiac ischemia reperfusion injury (I/R) in rats. **Methods** Thirty healthy male SPF SD rats were randomly divided into five groups: the sham group, model group, fentanyl group, propofol group and fentanyl+propofol group. The I/R model was established for all groups except the sham group. The fentanyl group, propofol group and fentanyl+propofol treatment group were pretreated with 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl, 50 mg/kg propofol and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl combined with 50 mg/kg propofol,

[基金项目] 2019 国家自然科学基金(81860233)。

[作者简介] 严琳(1986—),女,硕士,主治医师,研究方向:围术期麻醉。E-mail:yanlingssrmyy@163.com

[通信作者] 阎文军(1971—),女,博士,主任医师,研究方向:脑保护方向。E-mail:wenjunyangssrmyy@163.com

respectively. After 30 min, the rats were sacrificed and heart tissue was collected for analyses. HE and TUNEL staining were used to observe the pathological injury of rat heart tissue, TTC staining was used to observe the area of myocardial infarction and electron microscopy was used to observe mitochondrial structure. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins Beclin1, ATG5 and L3B. **Results** Myocardial pathological changes were observed in the model group but not the sham group; in addition, the percentage of cardiac cell apoptosis and infarct area were increased, mitochondrial swelling in myocardial cells was observed and the expression of autophagy-related proteins Beclin1, ATG5 and L3B-II were increased. Treatment of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl, 50 mg/kg propofol and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl combined with 50 mg/kg propofol pretreatment significantly reduced myocardial pathological injury, cardiac apoptosis and percentage of infarct area in I/R rats. The treatments alleviated mitochondrial swelling in myocardial cells and decreased the expression of autophagy-related proteins Beclin1, ATG5 and L3B-II. Pretreatment of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl combined with 50 mg/kg propofol showed the best performance among the three treatments; there was no significant difference between fentanyl and propofol. **Conclusions** Both fentanyl and propofol inhibit autophagy, alleviate mitochondrial swelling and reduce myocardial I/R injury. There was not a significantly different effect between 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fentanyl and 50 mg/kg propofol in the treatment of myocardial I/R injury. In addition, the combination of fentanyl and propofol had a synergistic effect on myocardial I/R injury.

【Keywords】 myocardial ischemia reperfusion; fentanyl; propofol; autophagy; autophagosome

心肌缺血是世界上最常见围术期死亡的原因。目前心肌缺血的主要治疗方法是及时再灌注。然而,再灌注方法使心肌更容易受到严重损伤,称为心肌缺血再灌注损伤(I/R),这限制了再灌注治疗的发展^[1]。芬太尼(fentanyl)作为阿片受体激动剂,作用于边缘系统与情绪有关的阿片类受体,有消除紧张和焦虑的作用。由于具有镇痛效价高、降低心肌氧耗及无组胺释放的优势,目前已广泛应用于手术前诱导、术中维持以及术后的镇静与镇痛,已基本取代吗啡。丙泊酚(propofol)具有起效快、苏醒迅速的特点,目前已是临床上常用的静脉麻醉药物。研究表明,芬太尼及丙泊酚可抑制 NF- κ B 的过度产生,从而减轻组织器官缺血/再灌注损伤的作用^[2]。自噬在心肌 I/R 中是把双刃剑:在缺血时,自噬保护心肌,但过度自噬在再灌注时损害心肌^[3]。然而目前关于芬太尼以及丙泊酚二者单独使用对心肌缺血再灌注损伤的保护效果如何以及联合应用在心肌缺血再灌注损伤中是否优于单纯使用芬太尼或丙泊酚尚不清楚。因此,本研究基于自噬作用,探究芬太尼、丙泊酚及其联合使用对心肌缺血再灌注损伤的治疗作用,为进一步明确其具体机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,8 周龄,(250 $\pm$ 20)g,购于成都达硕生物有限公司[SCXK(川)2020-030]。实验在甘肃中医药大学[SYXK(甘)2021-

0004]进行,整个实验饲养条件为自由采食及饮水,12 h/12 h 光照/黑暗条件下正常饲养,温度约(22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 。本研究的动物实验经甘肃省人民医院医学伦理委员会批准(IACUC-2021-248),并遵守审批内容实施,实验符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

TUNEL 试剂盒(Vazyme,南京,中国,No.A112-01);TTC 试剂(Sangon,上海,中国,No.298-96-4);LC3B(ab192890)、Beclin1(ab210498)、ATG5(ab108327)、 β -actin(ab8226)抗体均购自 Abcam 公司(Cambridge,美国)。CKX41 光学显微镜(170 Olympus, Tokyo, 日本);EM-1400PLUS 透射电镜(JEOL, Tokyo, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组与造模

(1) I/R 造模

造模方法根据已有报道进行造模^[4],具体步骤为:各组大鼠均腹腔注射 1%戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉,固定于实验台。胸部剃毛、常规消毒。然后将气管插管后接入动物呼吸机通气,通气频率为每分钟 60~80 次,潮气量 5 mL。于左锁骨中线第 4 肋间开胸,暴露心脏,用尼龙线结扎左冠状动脉前降支 30 min,后松开结扎线再灌注 2 h,建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型。

(2) 实验分组

将 30 只大鼠随机分为 5 组,每组 6 只大鼠:假手术组(Sham)、模型组(Model)、芬太尼治疗组(Fentanyl)、丙泊酚治疗组(Propofol)和芬太尼+丙

泊酚治疗组(Fentanyl+propofol)。模型组只行左冠状动脉前降支结扎 30 min,芬太尼治疗组结扎前给予 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼,之后结扎 30 min;丙泊酚治疗组结扎前给予 50 mg/kg 丙泊酚,芬太尼+丙泊酚治疗组给予 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼以及 50 mg/kg 丙泊酚后结扎 30 min。假手术组按照 I/R 造模中同样的方式打开胸腔,不进行左冠状动脉前降支结扎和药物治疗,其余处理与 I/R 造模处理方法一致(与其余 4 组时间相同)。实验完成后,处死,迅速取出大鼠心脏用于后续检测。

1.3.2 检测指标

(1) HE 染色

将心脏组织用 4% 多聚甲醛固定后,石蜡块包埋、脱水、切片,然后分别用苏木精和伊红染色,通过光学显微镜观察染色结果。

(2) TUNEL 染色

采用 TUNEL 试剂盒对心脏组织凋亡进行检测。Proteinase K 和 2% 过氧化氢修复后,将心脏切片与 50 μL 末端脱氧核苷酸转移酶反应混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境中覆盖 60 min。然后用 SSC 溶液停止 15 min,最后用 DAPI 染色对细胞核进行染色,在 488 nm 的激发光照射下可视化。

(3) TTC 染色

收集新鲜心脏,其切成 2~3 mm 的切片,将切片在 1% 2,3,5-三苯基氯化四唑(TTC)溶液中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。使用 Image J 软件拍摄和分析图像。

(4) 电镜

将新鲜心脏组织用 PBS 清洗后,先固定在冰冷 3% 戊二醛溶液中,然后用 1% 四氧化锇再固定。脱水切片后,先用醋酸铀染色 10 min,再用枸橼酸铅染色 1 min,室温下染色,TEM-1400PLUS 透射电镜观察。

(5) Western blot

使用蛋白提取试剂盒提取心脏组织中总蛋白,通过 BCA 蛋白试剂盒测定总蛋白含量。接下来采用 SDS-PAGE 分离蛋白,将蛋白质转 PVDF 膜上,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下添加一抗 LC3B、Beclin1、ATG5 与 β -actin 抗体(1:500),孵育过夜。洗涤后添加对应的二抗(1:5000),常温下孵育 2 h。以 β -actin 为内参,对 LC3B、Beclin1、ATG5 蛋白水平进行定量分析。

1.4 统计学方法

所有数据采用 GraphPAD 8 软件进行处理,结

果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示两组之间比较采用非配对 T 检验,3 组及以上比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 方法检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芬太尼复合丙泊酚对心脏缺血再灌注大鼠心脏组织病理损伤的作用

假手术组大鼠心脏组织结构清晰,心肌纤维形态正常,间质内无炎性细胞浸润,细胞凋亡数目极少;跟假手术组相比,模型组大鼠出现多量心肌纤维坏死,胞核溶解消失,坏死区域或间质见炎性细胞浸润,亦见出血,少量红细胞溢出,此外还见细胞大量凋亡。与模型组相比,芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组均减少了模型大鼠的心肌纤维坏死、炎性细胞浸润、出血及细胞凋亡,其中芬太尼+丙泊酚治疗在 3 个治疗组中表现了最好的治疗效果,芬太尼治疗与丙泊酚治疗之间没有显著差异,见图 1。

2.2 TTC 染色观察大鼠心肌梗塞面积

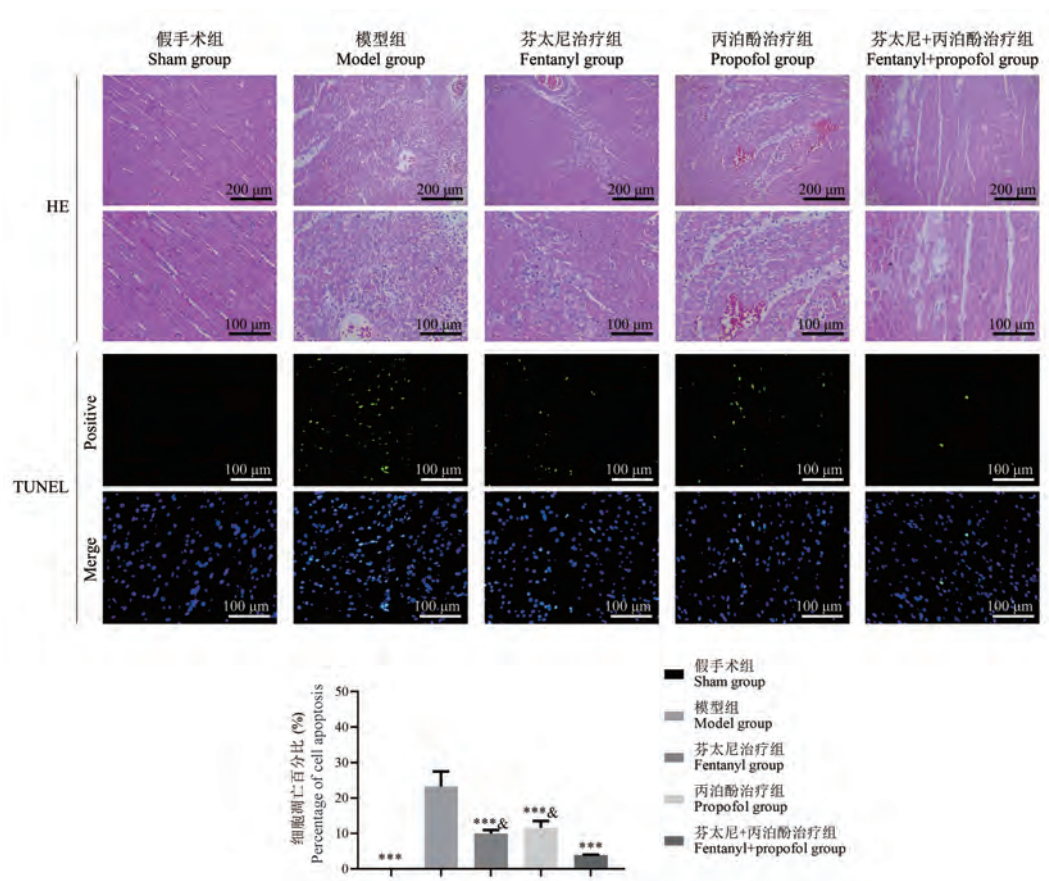
TTC 染色结果表明,假手术组大鼠未发生心肌梗塞,而通过缺血再灌注造模后,模型组大鼠心脏出现心肌梗塞;与模型组相比,芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组大鼠心肌梗塞面积显著减少,并且 3 个治疗组中,芬太尼+丙泊酚治疗组大鼠心肌梗塞面积减少最显著,而芬太尼治疗组与丙泊酚治疗组之间没有显著差异,见图 2。

2.3 透射电镜观察大鼠心肌线粒体结构

透射电镜结果表明,假手术组大鼠心肌细胞形态结构较正常,肌原纤维排列整齐,暗带、Z 线及 M 线清晰平直,线粒体形态结构正常。模型组大鼠心肌细胞的多数线粒体发生肿胀,嵴断裂、溶解,甚至消失。与模型组相比,芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组大鼠心肌细胞的线粒体肿胀程度减轻,其中芬太尼+丙泊酚治疗组的线粒体肿胀改善程度最显著,芬太尼治疗组和丙泊酚治疗组之间没有显著差异,见图 3。

2.4 Western blot 检测大鼠心脏组织自噬相关蛋白的表达

Western blot 检测自噬相关蛋白的结果如图 4 所示,与假手术组大鼠相比,模型组大鼠心脏组织 Beclin1、ATG5 和 LC3B-II 的蛋白表达以及 LC3B-II/LC3B-I 比值显著升高,LC3B-I 蛋白表达显著减

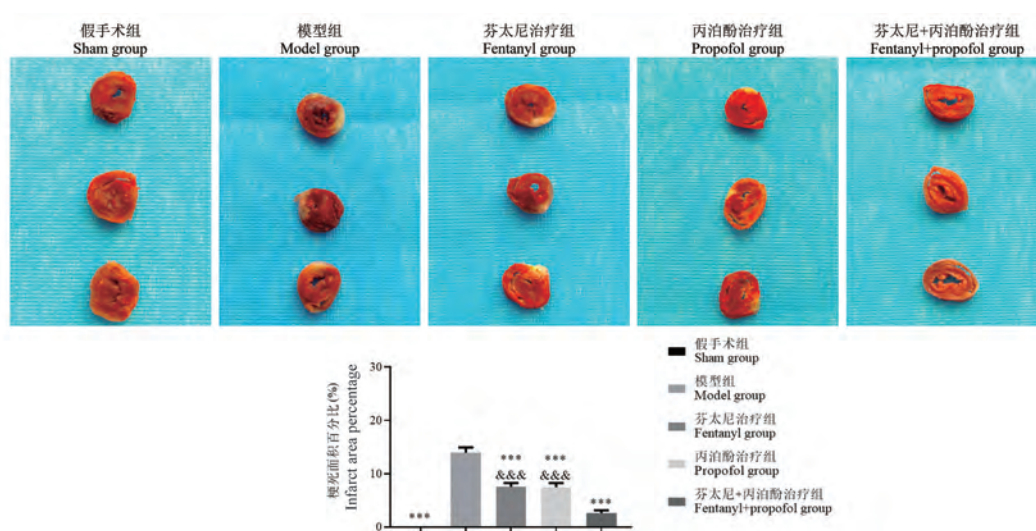


注:与模型组比较,*** $P<0.001$;与芬太尼+丙泊酚治疗组比较,& $P<0.05$ 。

图 1 通过 HE 和 TUNEL 染色观察大鼠心脏组织病理损伤

Note. Compared with model group, *** $P<0.001$. Compared with fentanyl+propofol group, & $P<0.05$.

Figure 1 HE and TUNEL staining were used to observe the pathological damage of rat heart tissue

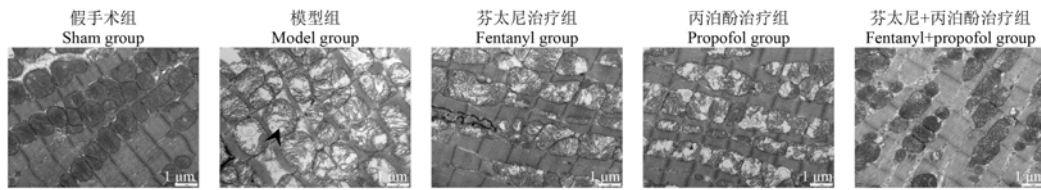


注:与模型组比较,*** $P<0.001$;与芬太尼+丙泊酚治疗组比较,&&& $P<0.001$ 。

图 2 TTC 染色观察大鼠心肌梗塞

Note. Compared with model group, *** $P<0.001$. Compared with fentanyl+propofol group, &&& $P<0.001$.

Figure 2 TTC staining was used to observe myocardial infarction in rats

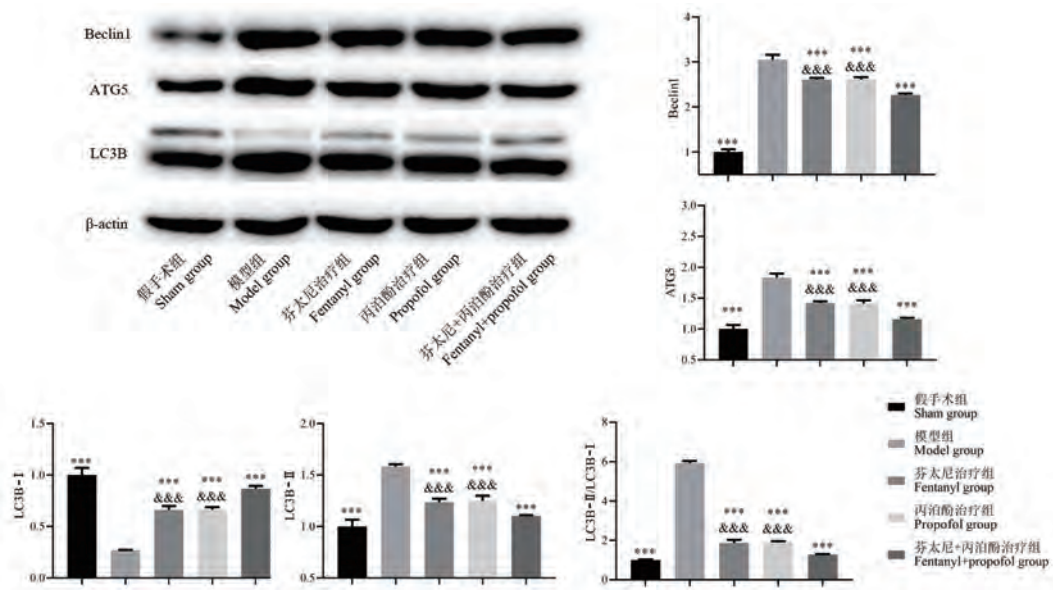


注:黑色箭头:线粒体肿胀。

图 3 透射电镜观察心肌线粒体结构

Note. Black arrow, Mitochondrial swelling.

Figure 3 Structure of myocardial mitochondria and the formation of autophagy vacuoles were observed by transmission electron microscopy



注:与模型组比较,*** $P < 0.001$;与芬太尼+丙泊酚治疗组比较, &&& $P < 0.001$ 。

图 4 Western blot 检测大鼠心脏组织自噬相关蛋白的表达

Note. Compared with model group, *** $P < 0.001$. Compared with fentanyl+propofol group, &&& $P < 0.001$.

Figure 4 Expression of autophagy related proteins were detected by western blot in rat heart tissue

少,表明缺血再灌注激活了大鼠心脏组织的自噬;与模型组相比,芬太尼治疗组、丙泊酚治疗组和芬太尼+丙泊酚治疗组大鼠心脏组织 Beclin1、ATG5 和 LC3B-II 的蛋白表达以及 LC3B-II/LC3B-I 比值显著降低,LC3B-I 蛋白表达显著增加,表明芬太尼治疗、丙泊酚治疗和芬太尼+丙泊酚治疗均有效降低 I/R 大鼠的心脏组织自噬,其中芬太尼+丙泊酚治疗表现最好,芬太尼治疗与丙泊酚治疗之间没有显著差异。

3 讨论

尽管对 I/R 损伤的研究历史悠久,但研究人员仍在不断尝试进一步研究这一现象。目前认为细胞凋亡是缺血再灌注损伤引起细胞死亡的主要原因^[5-6]。有报道表明芬太尼、丙泊酚可通过抑制细

胞凋亡作用进而减轻大鼠的 I/R 损伤^[7-8]。我们研究发现,单独使用 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼、50 mg/kg 丙泊酚及其联合使用均能有效减少缺血再灌注引起的心脏细胞凋亡,减轻心脏组织的损伤;其中,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚对 I/R 损伤的治疗效果之间没有显著差异,而 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼与 50 mg/kg 丙泊酚联合使用比他们的单独使用疗效更好,说明芬太尼与丙泊酚对抑制 I/R 损伤有协同作用。

心肌梗死面积大小也是评价 I/R 损伤疗效的重要指标之一。已有研究表明,20 mg/kg , 40 mg/kg 和 60 mg/kg 丙泊酚能有效减少 I/R 大鼠心肌梗死面积、心脏内膜出血和炎性细胞浸润,提示丙泊酚可一定程度改善大鼠心肌再灌注心肌病理损伤^[9]。此外,李方江等^[10]研究表明 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼能有效减少兔 I/R 损伤心肌梗死面积,并有效减少心率失

常的发生率。然而,丙泊酚与芬太尼联合使用是否对 I/R 损伤心肌梗死有更好的治疗效果尚不清楚。我们研究表明,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚均对 I/R 大鼠心肌梗死有显著的治疗效果,但两者的治疗效果并没有显著差异;进一步地,我们研究还发现 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚联合使用对 I/R 大鼠心肌梗死的治疗效果优于它们的单独使用,说明芬太尼与丙泊酚对 I/R 损伤心肌梗死的治疗有协同作用。

线粒体是急性 I/R 发作后心肌细胞命运的关键决定因素。特别是,急性 I/R 会诱导线粒体通透性转换孔(MPTP)的开放,这是一种通过解偶联氧化磷酸化并导致线粒体肿胀来介导心肌细胞凋亡的事件^[11-12]。因此我们推测芬太尼和丙泊酚通过改善线粒体损伤减少心肌细胞凋亡。本研究结果表明:20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚均显著抑制了 I/R 大鼠的心肌细胞线粒体肿胀,两者之间并没有显著差异;此外 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚联合使用对抑制 I/R 大鼠心肌细胞线粒体肿胀比它们单独使用有更好的作用。这些结果表明,芬太尼和丙泊酚均可以抑制 I/R 损伤引起的心肌细胞线粒体肿胀,从而减少细胞凋亡,并且芬太尼和丙泊酚对抑制 I/R 损伤引起的心肌细胞线粒体肿胀有协同作用。

自噬是一种生理过程,细胞中受损的蛋白质或细胞器会被隔离在自噬体内,然后与溶酶体融合进行降解^[13]。研究表明,肿胀的线粒体失去线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$),启动 PINK1-PRKN 通路进行自噬^[14]。然而,过度的自噬会促进细胞死亡和凋亡^[15-17],尤其是心肌细胞和内皮细胞。在某些情况下,自噬失调和持续的自噬会抑制细胞增殖,甚至加速心肌细胞死亡和凋亡^[18-19],而心肌再灌注损伤是过度自噬的结果^[20]。同时,功能失调的自噬也会加重线粒体氧化应激和损伤^[21]。此前有研究表明,异丙酚通过调控自噬相关基因抑制心肌凋亡,减轻 I/R 损伤^[22-23]。为进一步地探究芬太尼、丙泊酚及其联合使用对 I/R 损伤心肌自噬的调节作用,我们对自噬相关蛋白进行了检测。ATG5 作为 ATG12-ATG5-ATG16 复合物的一部分,在自噬囊泡形成中必不可少^[24-25]。ATG12-ATG5-ATG16 复合物定位于膜外表面,使 ATG8(LC3)与磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成 ATG8-PE 复合物,促进自噬膜的伸长、闭合并形成自噬体和溶酶体^[24],而自噬体与溶酶体的融合需

要 Beclin1 介导^[26-27]。我们的研究显示,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 芬太尼和 50 mg/kg 丙泊酚抑制了 I/R 中心脏组织 Beclin1、ATG5 和 LC3B-II 的蛋白表达,降低了 LC3B-II/LC3B-I 的比值,增加了 LC3B-I 蛋白的表达,表明芬太尼与丙泊酚对 I/R 心肌细胞自噬有抑制作用,此外,本研究也表明了芬太尼与丙泊酚对 I/R 心肌细胞自噬抑制的协同作用。

我们的研究发现芬太尼和丙泊酚都能抑制自噬,同时减轻线粒体肿胀改善 I/R 大鼠心肌细胞损伤,其中芬太尼与丙泊酚有协同作用,但芬太尼与丙泊酚对改善 I/R 心肌细胞损伤的协同作用仅做了一个初步探索,其具体机制及最佳配比还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang Y, Chen Z, Li Y, et al. Low density lipoprotein receptor related protein 6 (LRP6) protects heart against oxidative stress by the crosstalk of HSF1 and GSK3 β [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101699.
- [2] 温文, 郭光伟, 黄志刚, 等. 芬太尼联合丙泊酚对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国现代医生, 2014, 52 (15): 10-13.
- [3] Ji W, Wan T, Zhang F, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 protects against lipopolysaccharide-induced myocardial injury by suppressing mitophagy [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 641058.
- [4] Cao S, Sun Y, Wang W, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23 (10): 6897-6906.
- [5] Han X, Shi H, Liu K, et al. Protective effect of gastrodin on myocardial ischemia-reperfusion injury and the expression of Bax and Bcl-2 [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(6): 4389-4394.
- [6] Cheng Z, Liu L, Wang Z, et al. Hypoxia activates src and promotes endocytosis which decreases MMP-2 activity and aggravates renal interstitial fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (2): 581.
- [7] Xie LJ, Huang JX, Yang J, et al. Propofol protects against blood-spinal cord barrier disruption induced by ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(1): 125-132.
- [8] Xu Q, Li QG, Fan GR, et al. Protective effects of fentanyl preconditioning on cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats [J]. Braz J Med Biol, 2017, 50(2): e5286.
- [9] 张剑锋, 王平, 刘维. 丙泊酚对心肌再灌注大鼠的保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2020, 36(9): 1313-1317.
- [10] 李方江, 张文婷, 李清, 等. 芬太尼联合山莨菪碱后处理对兔心肌缺血再灌注心肌梗死面积和血流动力学及心律失常的影响 [J]. 中国医药, 2014, 9(10): 1419-1423.

- [11] Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, et al. Role of the MPTP in conditioning the heart-translatability and mechanism [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(8): 2074–2084.
- [12] Singh R, Dubey V, Wolfson D, et al. Quantitative assessment of morphology and sub-cellular changes in macrophages and trophoblasts during inflammation [J]. Biomed Opt Express, 2020, 11(7): 3733–3752.
- [13] Mizushima N. Physiological functions of autophagy [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2009, 335: 71–84.
- [14] Zhou Y, Long Q, Wu H, et al. Topology-dependent, bifurcated mitochondrial quality control under starvation [J]. Autophagy, 2020, 16(3): 562–574.
- [15] Gao C, Wang R, Li B, et al. TXNIP/Redd1 signalling and excessive autophagy: a novel mechanism of myocardial ischaemia/reperfusion injury in mice [J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(3): 645–657.
- [16] Menzie-Sudaram JM, Modi J, Xu H, et al. Granulocyte-colony stimulating factor gene therapy as a novel therapeutics for stroke in a mouse model [J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 99.
- [17] Ye J, Xue M, Liu YM, et al. Diosbulbin B-induced mitochondria-dependent apoptosis in L-02 hepatocytes is regulated by reactive oxygen species-mediated autophagy [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 676.
- [18] Zeng M, Wei X, Wu Z, et al. Simulated ischemia/reperfusion-induced p65-Beclin 1-dependent autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 37448.
- [19] Wang S, Wang C, Yan F, et al. N-Acetylcysteine attenuates diabetic myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting excessive autophagy [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 9257291.
- [20] Thapalia BA, Zhou Z, Lin X. Autophagy, a process within reperfusion injury: an update [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8322–8341.
- [21] Chung C, Seo W, Silwal P, et al. Crosstalks between inflammasome and autophagy in cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 100.
- [22] Yoon JY, Baek CW, Kim EJ, et al. Propofol protects against oxidative-stress-induced COS-7 cell apoptosis by inducing autophagy [J]. J Dent Anesth Pain Med, 2017, 17(1): 37–46.
- [23] Lu Y, Wang S, Cai S, et al. Propofol-induced miR-20b expression initiates endogenous cellular signal changes mitigating hypoxia/re-oxygenation-induced endothelial autophagy *in vitro* [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8): 681.
- [24] Li W, Zhang L. Regulation of ATG and autophagy initiation [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 41–65.
- [25] Bechelli J, Rumfield CS, Walker DH, et al. Subversion of host innate immunity by rickettsia australis via a modified autophagic response in macrophages [J]. Front Immunol, 2021, 12: 638469.
- [26] Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(24): 4721–4757.
- [27] Cheng Z, Zhu Q, Dee R, et al. Focal adhesion kinase-mediated phosphorylation of beclin1 protein suppresses cardiomyocyte autophagy and initiates hypertrophic growth [J]. J Biol Chem, 2017, 292(6): 2065–2079.

[收稿日期]2021-09-28

李婷,邹秋萍,毛泽伟,等. 三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 29-38.

Li T, Zou QP, Mao ZW, et al. Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 29-38.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 005

三点金中黄酮类化合物对溃疡性结肠炎小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响

李 婷, 邹秋萍, 毛泽伟, 吴石丽, 何红平, 李艳平*

(云南中医药大学中药学院, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨民族药三点金总黄酮及其中单体化合物毛蕊异黄酮和刺芒柄花素对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的溃疡性结肠炎(UC)小鼠的干预作用及其对肠道菌群的影响。**方法** 用3% DSS构建UC小鼠模型,将30只C57BL/6小鼠分为正常组、模型组、三点金总黄酮组(500 mg/kg)、毛蕊异黄酮组(100 mg/kg)以及刺芒柄花素组(100 mg/kg)。观察小鼠体重变化,进行疾病活动指数(DAI)、结肠组织病理学评分,检测小鼠血清中IL-1 β 和IL-6含量,通过高通量测序分析小鼠肠道菌群的变化。**结果** 三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素可有效减轻小鼠结肠炎症状,降低炎症因子表达;菌群测序结果显示三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素使得肠道菌群的多样性明显提高,科水平上主要表现为致病菌群螺杆菌科比例降低,*Muribaculaceae*和毛螺菌科比例升高;属水平上主要表现为乳酸菌属的增加和条件致病菌拟杆菌的减少;种水平上主要表现为对机会致病菌拟杆菌和大肠杆菌的减少。**结论** 三点金总黄酮、毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素对UC小鼠的体征及炎症因子有一定的改善作用,对肠道菌群有良好的恢复作用。

【关键词】 三点金;总黄酮;毛蕊异黄酮;刺芒柄花素;溃疡性结肠炎;肠道菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0029-10

Therapeutic effect of flavonoids from *Desmodium triflorum* on an ulcerative colitis mouse model and the influence on intestinal flora

LI Ting, ZOU Qiuping, MAO Zewei, WU Shili, HE Hongping, LI Yanping*

(Yunnan University of Chinese Medicine, College of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the effect of total flavones of *Desmodium triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* on mice with dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis (UC) and analyze the effects on intestinal flora. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were treated with 3% DSS to establish the UC model and divided into the normal group, model group, total flavones of *Desmodium triflorum* group (500 mg/kg), calycosin group (100 mg/kg) and formononetin group (100 mg/kg). Body weight changes, disease activity index (DAI), colon histopathology score and IL-1 β and IL-6 cytokine expression levels in the serum of the mice were

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81960777,81660717);云南省应用基础研究项目(2019FF002(-005),2017FB133);云南省教育厅项目(2019Y0332)。

【作者简介】 李婷(1996—),女,硕士研究生,研究方向:天然药物化学成分及生物活性研究。E-mail:1457044166@qq.com

【通信作者】 李艳平(1986—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药,天然药物化学成分及生物活性研究。

E-mail:lyp8691@163.com

determined, and changes of intestinal flora in mice were detected by high-throughput sequencing. **Results** Administration of total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* effectively alleviated colonic inflammatory symptoms and reduced the expression of inflammatory factors in UC mice, Resulting in a good therapeutic effect. Treatment with total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* significantly increased the diversity of intestinal microflora. The proportion of *Helicobacteraceae* was decreased and those of *Muribaculaceae* and *Lachnospiraceae* were increased at the family level. The proportion of *Bacteroides* was decreased and that of *Lactobacillus* was increased at the genus level. Regarding the species level, the proportions of *Bacteroides* and *Escherichia coli* were decreased. **Conclusions** Total flavones of *D. triflorum*, calycosin and formononetin from *D. triflorum* improve the changes of physical signs and inflammatory factors of UC mice and had a good recovery effect on intestinal flora.

[Keywords] *Desmodium triflorum*; total flavonoids; calycosin; formononetin; ulcerative colitis; intestinal flora

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种发生在直肠和结肠黏膜的慢性炎症性疾病, 病因未明, 反复发作是其典型特征, 对患者的生活造成极大的困扰, 被 WHO 列为难治症之一, 近年来 UC 的发病率呈显著上升趋势^[1-3]。UC 发病机制复杂, 涉及患者的遗传、免疫系统和环境因素之间的相互作用^[4]。其中, 慢性炎症反应和免疫应答紊乱是造成 UC 的关键病理环节, 而肠道内菌群紊乱又是造成炎症反应和免疫应答改变的重要因素^[5]。近年来, 越来越多的研究表明肠道菌群失调与 UC 的发生密切相关^[6-7], 主要表现为患者局部微脉管系统损伤, 产生趋化因子, 引起白细胞游出, 从而扩大炎症反应, 这使得上皮屏障破坏, 肠道中有害菌产物进入血液系统导致发病^[8]。

三点金 (*Desmodium triflorum* (L.) DC.) 为豆科山蚂蝗属多年生植物, 又名斑鸠窝, 遍地金钱, 在少数民族医学著作中记载它的全草可以用来治疗各种炎症包括急性肠炎、大叶性肺炎、感冒发烧、咳嗽和肝炎^[9]。本课题组前期的研究从云南省昆明市嵩明县的豆科山蚂蝗属植物三点金中分离纯化得到 12 个化合物, 包括牡荆素、异牡荆素、刺芒柄花素、毛蕊异黄酮等一系列黄酮及其苷类化合物。这些黄酮类化合物在抗炎方面表现出显著的作用。如 Yang 等^[10]发现刺芒柄花素是通过上调 Nrf2 的表达而起到抑制溃疡性结肠炎的作用。Chao 等^[11]发现毛蕊异黄酮可通过抑制 NF- κ B 通路和 JNK 通路活化抑制小鼠巨噬细胞炎症因子的产生。上述研究表明刺芒柄花素和毛蕊异黄酮可能对 UC 也有一定的治疗作用。因此, 本研究探讨了是否是通过三点金总黄酮及其两个单体化合物的干预起到了对 UC 小鼠的改善作用及肠道菌群失衡的调节作用, 为民族药三点金总黄酮及其两个单体化合物作为 UC 治疗药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 (30 只, 6 周龄, 体重 18~20 g) [SCXK(湘)2019-0004]。在 SPF 级动物房饲养, 昼夜节律 12 h/12 h, 实验前适应性饲养 1 周。动物饲养使用标准鼠饲料和水, 饲养于云南中医药大学动物房 [SYXK(滇)K2017-0005]。所有动物实验均经云南中医药大学动物实验伦理委员会审查通过 (IACUC-06202006) 并遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

刺芒柄花素 (南京源植生物科技有限公司, 批号: 20180801); 毛蕊异黄酮 (南京源植生物科技有限公司, 批号: 20170926), 纯度均大于 95%; DSS (美国 MP 公司, 批号 SR01606); IL-1 β , IL-6 ELISA 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号 A201B90612 和 A20600643); DNA 提取试剂盒 (美国 Omega Bio-Tek 公司); GeneJET 胶回收试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (美国 New England Biolabs 公司)。分析天平 AR224CN (常州奥豪斯仪器有限公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo Scientific 公司); 酶标仪 SPARK 10M (瑞士 TECAN 公司); Ion S5TMXL (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将动物随机分为正常组 (N1)、模型组 (M1)、三点金总黄酮组 (TF1) (500 mg/kg)、毛蕊异黄酮组 (F1) (100 mg/kg) 和刺芒柄花素组 (F2) (100 mg/kg), 每组 6 只。

1.3.2 三点金总黄酮的制备

在课题组前期工作的基础, 将民族药用植物三

点金的地上部分(1 kg)干燥后粉碎,用 70%丙酮在室温下超声提取,提取液减压浓缩得到总浸膏。所得浸膏用蒸馏水混悬,用石油醚萃取除去叶绿素,水相经乙酸乙酯萃取,萃取物浓缩后经大孔吸附树脂柱,依此用水,90%,100%甲醇-水进行洗脱,90%甲醇-水洗脱部分减压浓缩,经三氯化铁反应鉴定 90%甲醇-水洗脱部分富含黄酮类成分,即为三点金总黄酮。

1.3.3 造模方法及药物干预

参照参考文献^[12]的造模方法及通过预实验实践后,将小鼠适应性饲养 1 周,正常组和模型组灌胃给予 0.5%羧甲基纤维素钠溶液、3 个给药组 TF1、F1 及 F2 组灌胃给予相应浓度的药物,连续给药 11 d,从第 1 天开始,除正常组外,其余各组小鼠的饮用水更换为 3% DSS 水溶液连续 8 d,第 9 天将 3% DSS 水溶液更换为饮用水至实验结束。

1.3.4 检测指标与方法

(1)UC 小鼠的观察与评分

参照参考文献^[13]中的方法,在实验期间,每天观察小鼠的体征状态并记录体重。通过小鼠的腹

泻及便血情况得出小鼠 DAI 评分,判断溃疡性结肠炎模型是否构建成功。DAI 评分=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。DAI 的具体评分标准如表 1。

(2)结肠病理切片观察肠黏膜损伤程度

造模结束后,颈椎脱臼法处死小鼠,立即解剖,取小鼠结肠中段约 1 cm 左右,于 4%多聚甲醛中浸泡 48 h 固定,脱水,石蜡包埋,制片(4 μm 厚),HE 染色。参照参考文献^[14]中的方法进行组织病理学评分,如表 2 所示。

(3)动物取血及血清处理

实验结束当天,取眼眶血,3000 r/min,4℃离心 10 min,收集上清。于-80℃冰箱储存备用。按 ELISA 试剂盒说明书测定各组血清中 IL-1β、IL-6 含量。

1.3.5 小鼠粪便样本采集

在实验结束前 1 d,确认模型成功后,用左手抓取小鼠,促使小鼠应激性排便,右手持无菌 EP 管保证相对无菌环境下收集小鼠粪便。粪便收集结束后标记样本,置于冰盒中,及时放入-80℃冰箱保存备用,避免反复冻融。

表 1 DAI 评分标准
Table 1 Score criteria of DAI

计分 Score	体重下降(%) Loss of weight	大便性状 Stool characteristics	便血 Hematochezia
0	/	正常 Normal	阴性(-) Negative(-)
1	1~5	松散但不黏肛周 Loose but not sticky around the anus	阳性(±) Positive(±)
2	5~10	松散但不黏肛周 Loose but not sticky around the anus	阳性(+) Positive(+)
3	10~15	松散黏肛周 Loose and sticky around the anus	阳性(++) Positive(++)
4	>15	腹泻 Diarrhea	肉眼血便(>++) Bloody stool(>++)

表 2 病理切片评分
Table 2 Score of pathological section

评分 Score	炎症程度 Degree of inflammation	隐窝损伤 Crypt injury	炎症深度 Depth of inflammation	炎症浸润面积 Inflammatory infiltration area
0	无 Nothing	无 Nothing	无炎症 Without inflammation	0
1	浅显炎症 Superficial inflammation	少量隐窝变形 A small amount of crypt deformation	黏膜层 Mucosal layer	0~10%低水平(含1%) 0~10% low level (including 1%)
2	轻微溃疡 Slight ulcer	中等水平隐窝变形 Moderate horizontal recess deformation	黏膜下层 Submucosa	11%~25%中等水平(不含1%) 11%~25% medium level (excluding 1%)
3	明显溃疡 Obvious ulcer	高水平隐窝变形 High level recess deformation	肌层 Muscularis	26%~50%高水平 26%~50% high level
4	/	明显隐窝缺失 Obvious absence of crypt	/	51%~100%

1.3.6 粪便 DNA 提取和 PCR 扩增纯化

用 DNA 提取试剂盒提取粪便中的总 DNA 并检测其提取质量。以带有 barcode 序列的 515F 和 806R 为引物,以细菌 16S rRNA 基因的 V4 可变区序列为靶标进行 PCR 扩增,使用 1×TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物,剪切回收目标条带,使用 GeneJET 胶回收试剂盒回收产物。

1.3.7 文库构建和上机测序

使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 试剂盒进行文库的构建,经 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Ion S5TMXL 进行上机测序。测序分析内容包括:测序数据处理、OTU 聚类 and 物种注释、样品复杂度分析、多样品比较分析及评估样品中细菌菌群的丰富度和均匀度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件处理数据。结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析方法(ANOVA)分析,以 $P<0.05$ 表示统计学差异。使用 Graphpad Prism7 软件制图。

2 结果

2.1 一般体征及 DAI 评分结果

正常组小鼠精神状态,毛发色泽,进食及大便秘性状均正常;模型组小鼠造模后第 3 天,开始出现体重下降,精神萎靡,稀便并夹带脓血,第 5 天体重明显下降,便血严重;TF1、F1 及 F2 组在给药后,虽然也有稀便,便血情况,体重也呈下降趋势,但相比于模型组,均有不同程度的改善(图 1A)。

从实验开始至结束,每天固定时间观察小鼠粪便以进行 DAI 评分。TF1、F1 及 F2 组的小鼠在给药后的第 5 天,稀便,血便情况有所改善,第 8 天出现活动增加,食量增加,其毛发、腹泻、大便秘性状等情况均有所改善,DAI 评分显著降低(图 1B)。

2.2 HE 染色及病理组织学评分

正常组小鼠上皮组织完整,可见明显的隐窝及杯状细胞,无炎症细胞侵入。模型组小鼠上皮组织损伤严重,隐窝变形,杯状细胞丢失,黏膜及黏膜下层有炎症细胞浸润。而三点金总黄酮组、毛蕊异黄酮组及刺芒柄花素组组织学炎症程度减轻,结肠隐窝结构变形不明显。病理组织学评分显示,与模型组相比,三点金总黄酮组和毛蕊异黄酮组评分显著降低($P<0.01$)且改善效果优于刺芒柄花素组($P<0.05$)(见图 2A、2B)。

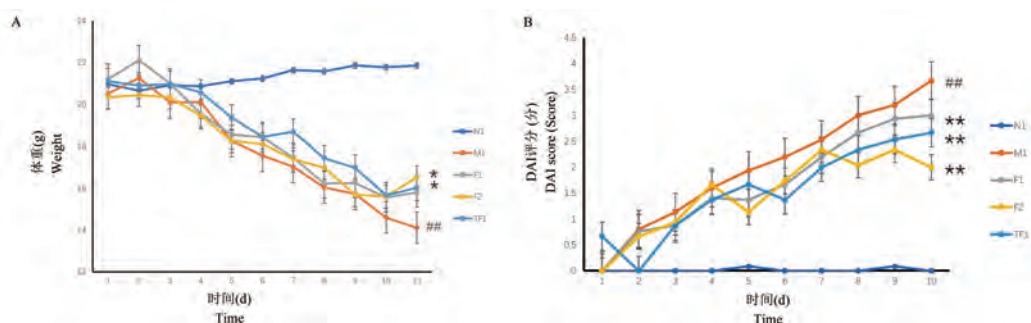
2.3 血清炎症因子检测结果

模型组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 水平相较于正常组显著升高($P<0.01$),给药组 IL-1 β 、IL-6 的水平有不同程度的降低,且毛蕊异黄酮组的效果优于三点金总黄酮组和刺芒柄花素组(见图 3)。

2.4 小鼠肠道菌群测序结果

2.4.1 测序样本质量检测

由图 4A 可见小鼠粪便中 OTU 数随测序量不断增加,最后趋于平稳,达到饱和状态,表明样品测序质量符合要求。等级丰度曲线能够反映物种的丰富度和均匀度。结果表明,5 组样品的曲线最后都趋于平稳,表明物种分布均匀(图 4B)。其中正常组的等级丰度在 400~580 之间,经 DSS 诱导后,各



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。与正常组比较, $^{###}P<0.01$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠体重变化和 DAI 评分的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group. Compared with control group, $^{###}P<0.01$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 1 Effect of weight change and DAI score in each group

组小鼠肠道菌群的物种总数降低,模型组的等级丰度在 350~450 左右,经给药治疗后,TF1 组的等级丰度在 500~750 之间,表明其肠道菌群的多样性明显提高;F1 组的等级丰度在 400~550 之间,其微生物种群丰度趋向正常组,然而单体 F2 组的等级丰度在 300~400 之间,并未有显著提高,且略低于模型组。

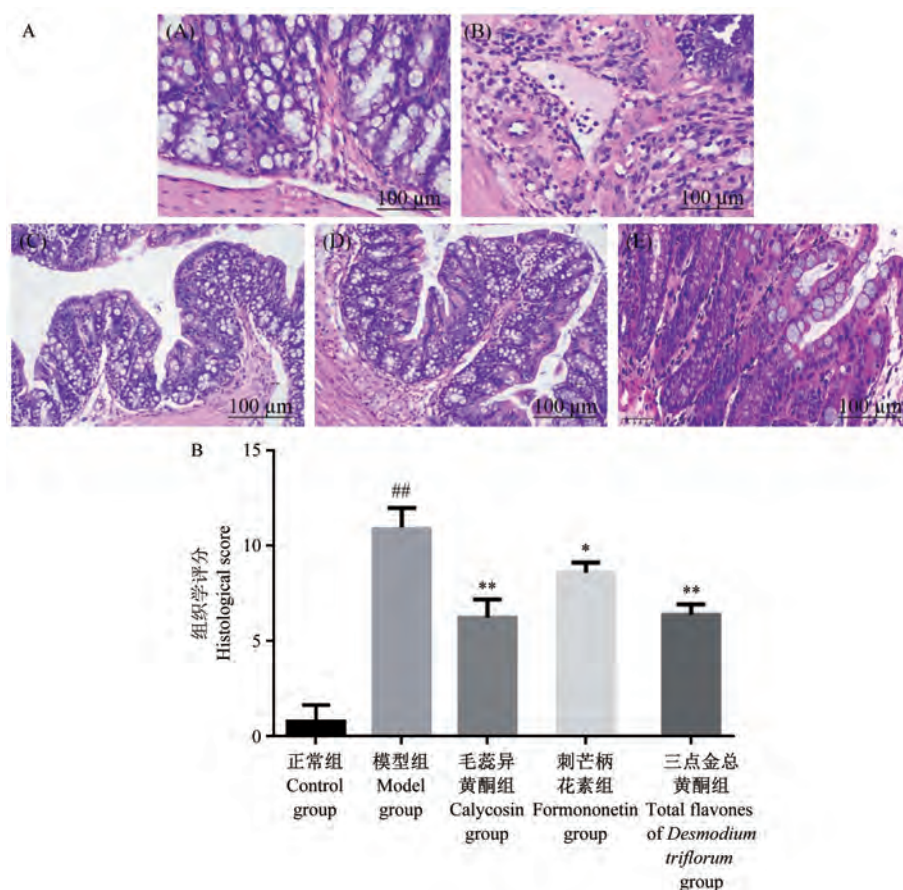
2.4.2 小鼠肠道菌群多样性分析

Observed species 和 Shannon 指数是评价结肠菌群多样性的重要指数,其数值越高表明样品物种丰富度越高。由图 5A 可见,相比于模型组,F1、F2 组观察到的物种差异显著,表明毛蕊异黄酮和刺芒柄花素显著改变了小鼠的肠道微生物的多样性。由图 5B 可见,相比于正常组,模型组肠道菌群多样性降低。相较于模型组,TF1 组肠道菌群多样性明显

升高,且恢复到正常组水平;F1 组呈略微升高的状态,但是 F2 组对于肠道菌群多样性没有起到改善作用,表明三点金总黄酮对于肠道菌群多样性的改善作用优于其两个单体化合物。

2.4.3 小鼠肠道菌群的整体变化

韦恩图分析可提供各组间菌群 OTU 数量及其种类交叉情况,主成分分析(PCA)检测样本间菌群丰度整体差异。结果表明,正常组、模型组、F1、F2 以及 TF1 组共有的 OTU 数为 453 个(图 6A)。与模型组相比,F1 处理组显著性增加了 OTU 数量但仍然略低正常组;F2 组减少了 OTU 数量;TF1 组显著性增加 OTU 的数量且比正常组的更为丰富。由 PCA 结果表明,各组间样本均能明显区分,说明小鼠肠道菌群的结构产生了一定的变化。给药组肠道菌群结构与模型组相比发生了一定偏移,值得注

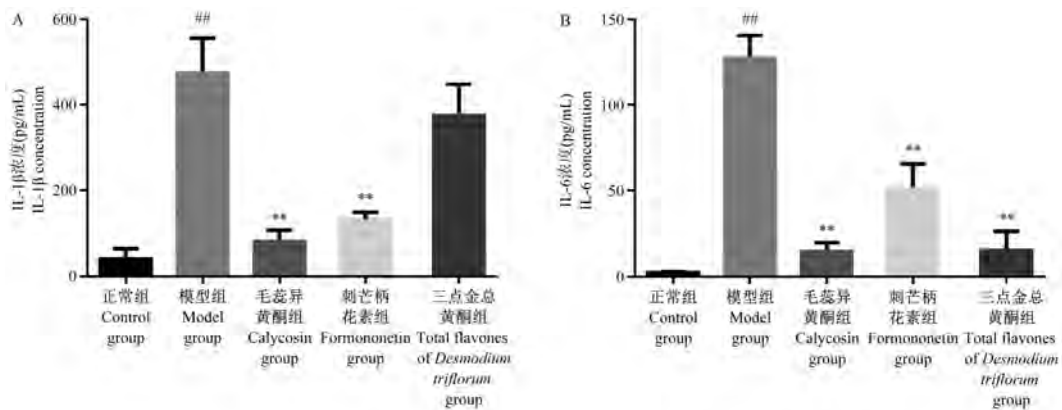


注:(A):正常组;(B):模型组;(C):毛蕊异黄酮组;(D):刺芒柄花素组;(E):三点金总黄酮组。与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 各组小鼠结肠 HE 染色及评分结果(HE 染色)($\bar{x} \pm s, n=6$)

Notes. (A), Control group. (B), Model group. (C), Calycosin group. (D), Formononetin group. (E), Total flavones of *Desmodium triflorum* group. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Colon HE staining and scoring results of mice in each group(HE staining)

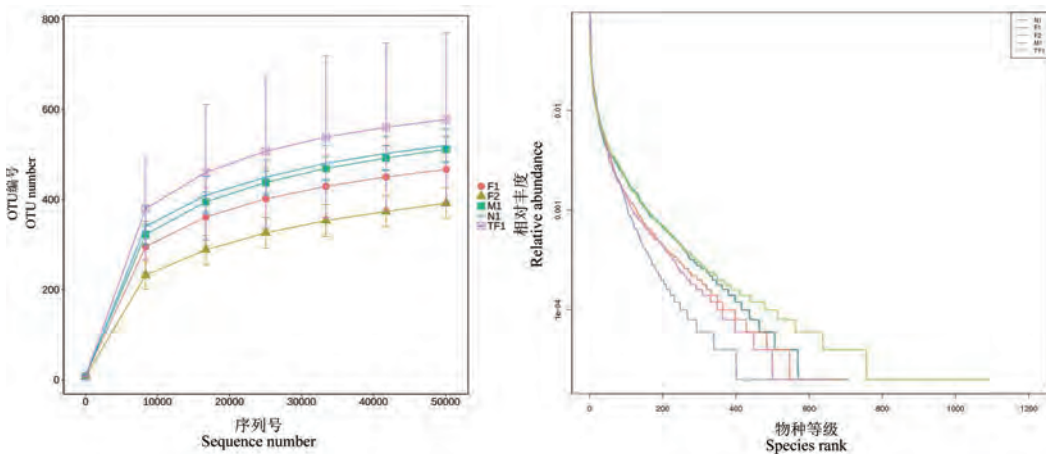


注:与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Notes. Compared with control group,## $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of IL-1 β and IL-6 levels in serum of mice in each group



注:N1:正常组;M1:模型组;F1:毛蕊异黄酮组;F2:刺芒柄花素组;TF1:三点金总黄酮组。

图4 样品稀释曲线和丰度分布曲线

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 4 Sample dilution curve and rank abundance curve

意的是 F1 和 TF1 组有向正常组回归的趋势,然而刺芒柄花素并没有这个趋势(图 6B)。说明毛蕊异黄酮和三点金总黄酮能一定程度上促进肠道菌群多样性及结构的恢复,而刺芒柄花素对于肠道菌群多样性及结构没有起到恢复的作用,则可能主要是通过降低致病菌的数量而起到治疗 UC 的作用。

2.4.4 小鼠肠道菌群物种差异分析

在科水平上,*Muribaculaceae* 和毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)是正常组的优势菌株,其相对丰度分别为 28.52% 和 19.35%;模型组中拟杆菌科(*Bacteroidaceae*),韦荣球菌科(*Erysipelotrichaceae*),瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)以及毛螺菌科优势菌株,相对丰度分别为 22.84%,16.39%,11.48%和

10.74%。与正常组相比,模型组中 *Muribaculaceae* (7.66%) 和毛螺菌科(10.74%)的相对丰度显著的降低,而条件致病菌拟杆菌科的丰度(22.84%)比正常组(2.26%)极大地升高。F1 组中杆菌科(*Enterobacteriaceae*),拟杆菌科以及毛螺菌科则为主要的优势菌株,其相对丰度分别为 23.54%,18.80%,以及 12.46%,其中毛螺菌科的相对丰度较模型组非常接近,但致病菌群螺杆菌科(*Helicobacteraceae*)的相对丰度(0.78%)相较于正常组(2.49%)和模型组(2.09%)发生了显著性地降低。F2 组杆菌科和拟杆菌科为其优势菌群,相对丰度分别为 43.50%和 13.53%,其中拟杆菌科的丰度与 F1 处理组较为接近,且致病菌群螺杆菌科的相

对丰度(0.43%)相较于 F1 组进一步的降低。TF1 组中 *Muribaculaceae*, 毛螺菌科以及拟杆菌科为其优势菌群, 相对丰度分别为 13.81%, 20.18% 以及 11.12%, 与以上各组相比, *Muribaculaceae* 和毛螺菌科再次成为优势菌群(与正常组一致), 这表明总黄酮对于结肠炎小鼠肠道微生物的调节和恢复有较好的作用(见图 7A)。

属水平上, 有益菌乳酸菌属(*Lactobacillus*)为正常组优势菌群, 相对丰度为 15.55%, 而模型组该属则降低为 1.97%, 取而代之的条件致病菌拟杆菌(*Bacteroides*)的丰度则极为提升, 为 22.84%, 说明在结肠炎模型组中, 有益菌极大的减少, 机会致病菌大量增殖。通过 F1、F2、TF1 处理后, 条件致病菌拟杆菌虽然仍然为 3 个组中的优势菌群, 但是其相对丰度(18.80, 13.52, 11.12)相比模型组均有显著性地降低, 同时 F1 与 TF1 处理组中, 乳酸菌属的相对丰度也比模型组(1.97%)分别提升了约 2~3 倍(4.06%和 6.28%)(见图 7B)。

进一步对种水平上对机会致病菌拟杆菌和大肠杆菌的分析发现 F1、F2 以及 TF1 处理组可以显著降低其丰度(见图 8)。

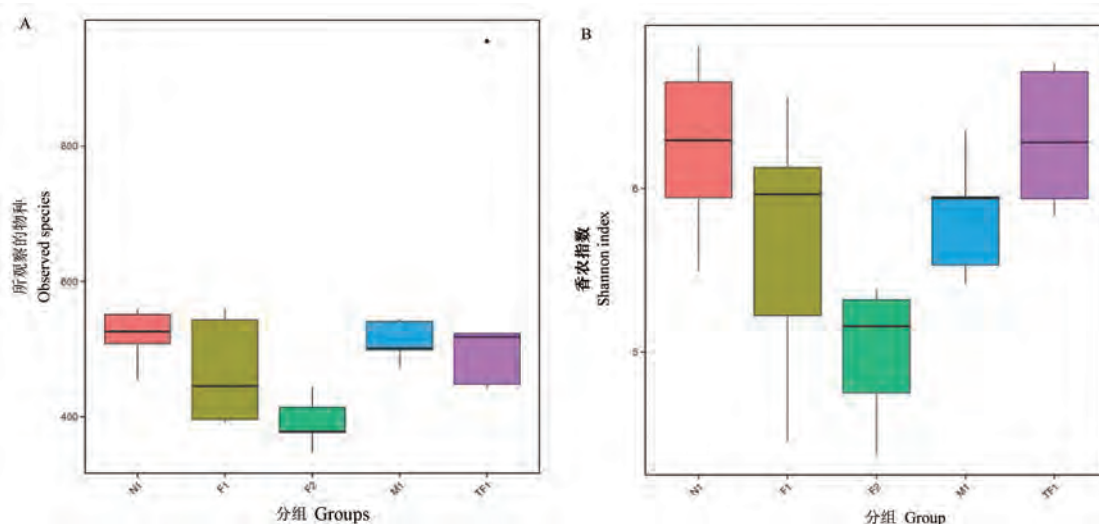
2.4.5 LefSe 分析

LefSe 分析可结合非参数检验和线性判别来确定丰度较高的微生物。由图 9 可看出, 正常组显著最高的是 *Muribaculaceae* 科和厚壁菌门(*Firmicutes*), 模型组是拟杆菌科和拟杆菌属, F1 处

理组显著最高的是肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*), F2 处理组显著最高的是变形菌门(*Proteobacteria*)、变形菌(*Gammaproteobacteria*)、肠杆菌科和肠杆菌目(*Enterobacterales*); TF1 处理组显著最高的是梭菌纲(*Clostridia*)和梭菌目(*Clostridiales*)。结果表明, 经三点金总黄酮、毛蕊异黄酮和刺芒柄花素可能是通过改变菌群的结构组成而发挥作用。

3 讨论

近年来, 随着膳食结构和环境的变化, UC 发病率在全球呈现逐年上升趋势, 以欧洲和北美最高, 严重影响了患者的生活质量^[15]。临床上, 虽然 5-氨基水杨酸和皮质类固醇等药物可抑制炎症, 一些免疫调节剂和抗生素可用于治疗类固醇耐药或依赖的患者, 但价格昂贵及治疗后的继发感染、敏感性降低和副作用大等安全性问题使得医生和 UC 患者难以接受, 严重影响 UC 的治疗效果^[16]。近年来研究表明, 多种黄酮类化合物如毛蕊异黄酮, 黄芩素, 刺芒柄花素等对炎性肠病有一定的改善作用^[10, 17-18]。本研究通过对 DSS 诱导的 UC 小鼠的体重、结肠组织病理及血清中 IL-1 β 和 IL-6 因子水平的检测, 表明三点金总黄酮, 毛蕊异黄酮及刺芒柄花素均可以抑制小鼠的体重下降、DAI 评分的增高; 通过 HE 染色及病理组织学评分得出三点金总黄酮和毛蕊异黄酮的改善效果优于刺芒柄花素; 然而对

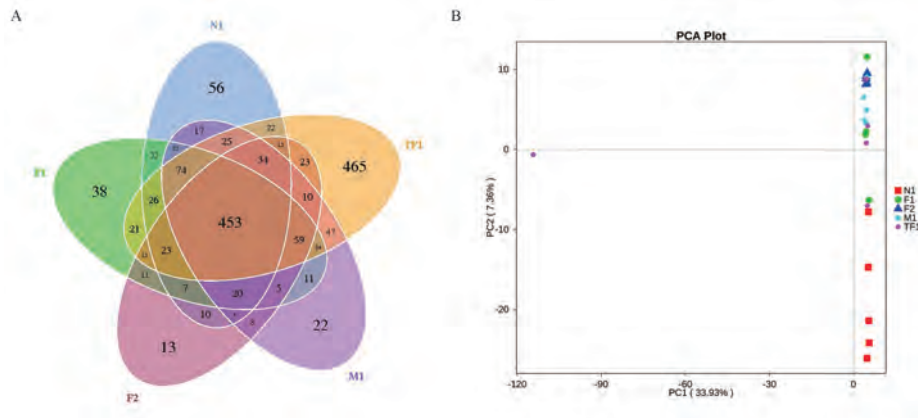


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 5 各组菌群多样性情况

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 5 Diversity of each group

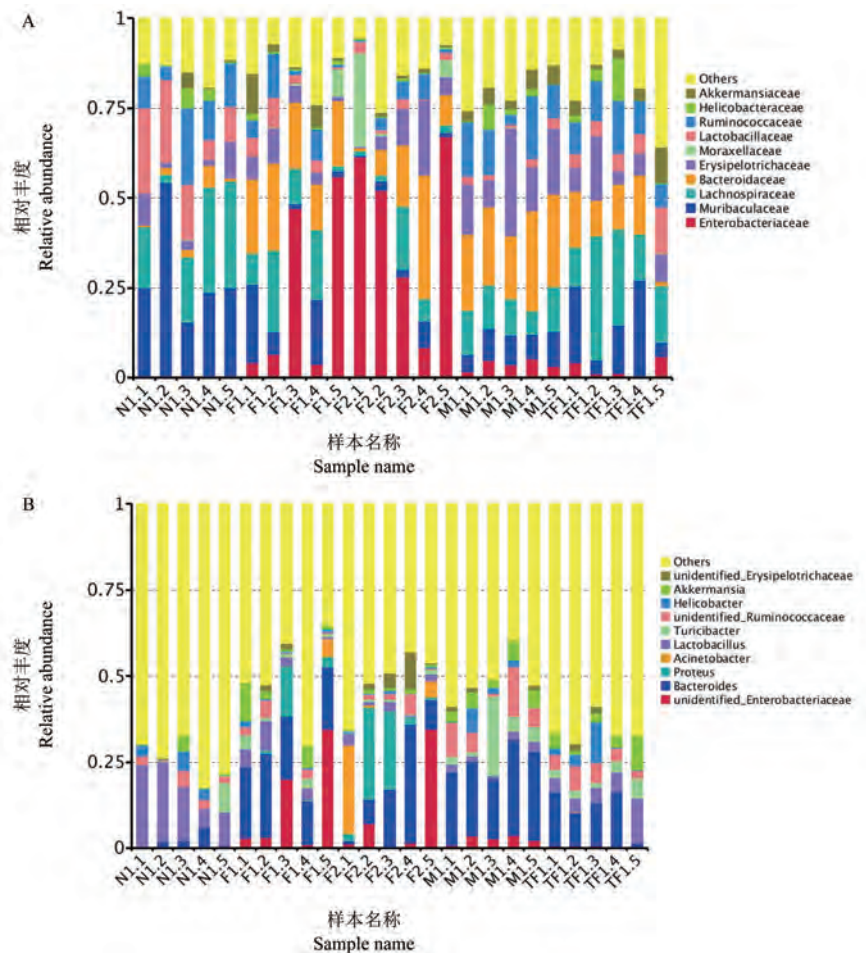


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 6 肠道菌群整体轮廓变化韦恩图和 PCA 分析

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 6 Venn and PCA analysis of changes in the overall profile of intestinal flora

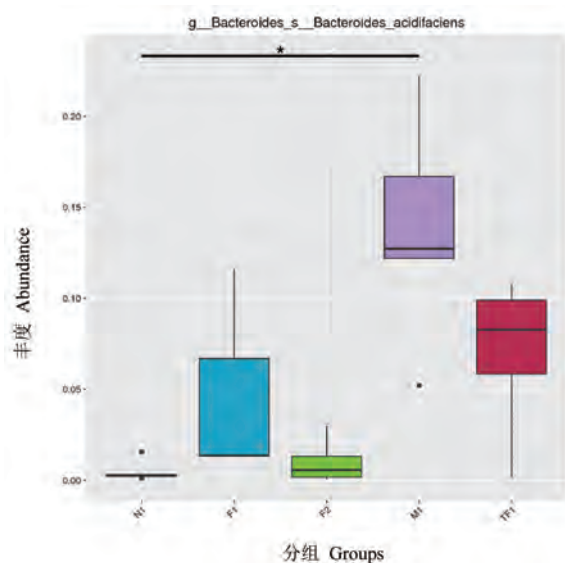


注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 7 科水平和属水平小鼠肠道微生物的富集

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 7 Enrichment of intestinal microflora in mice at family level and genus level



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

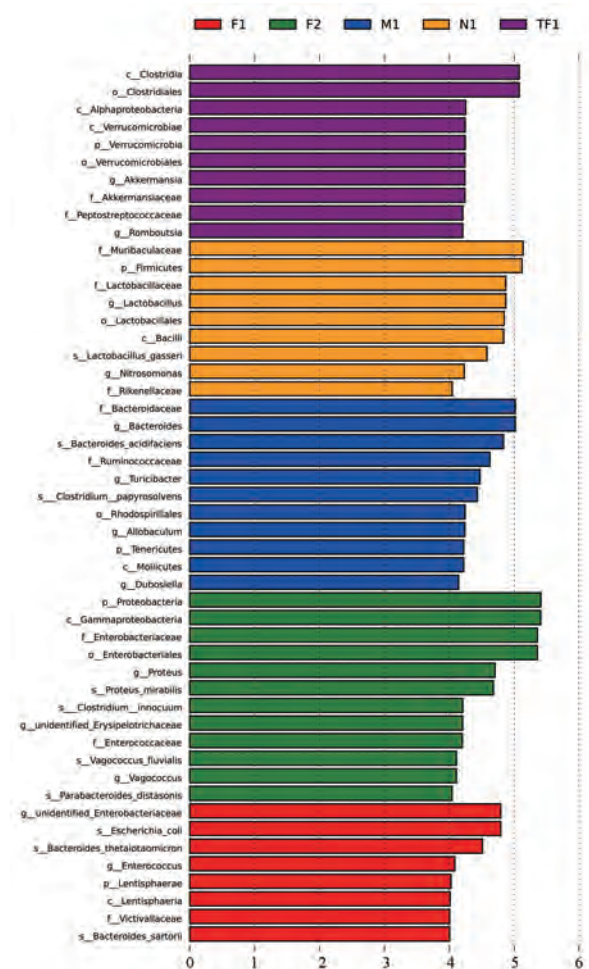
图 8 机会致病菌拟杆菌在小鼠肠道微生物中的富集

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 8 Enrichment of *Bacteroides acidifaciens* in intestinal microflora of mice

于 IL-1 β 、IL-6 水平的抑制效果, 则毛蕊异黄酮的效果优于三点金总黄酮和刺芒柄花素, 综上所述表明毛蕊异黄酮对于 UC 小鼠的治疗作用优于三点金总黄酮和刺芒柄花素。

肠道菌群与溃疡性结肠炎的发生发展关系密切, 越来越多的学者研究发现, 肠道菌群紊乱可能是溃疡性结肠炎发生、发展的始动因素^[19]。肠道正常菌群在肠道免疫系统的组成和营养物质的代谢, 肠道微生态平衡等多方面起到十分重要的作用。Nishikawa 等^[20]和吴瑞丽等^[21]发现 UC 患者人群的肠道菌群数量和结构多样性明显低于健康人群。梁淑文等^[22]通过比较 UC 与健康组的肠道菌群, 发现 UC 活动期优势菌乳酸杆菌、双歧杆菌、拟杆菌、真杆菌、消化球菌的菌群数量显著减少, 而条件致病菌如大肠杆菌、小梭菌菌群等数量显著增加。以上研究表明肠道细菌多样性降低、菌群结构的破坏以及致病菌的增加等导致的肠道菌群失衡在 UC 中起着重要的作用。黄酮类天然产物被证明能够抑制细菌生物膜的形成、抑制细菌的能量代谢, 抑制或杀死某些共生菌和病原体, 减少细菌产生的毒素如硫化氢和脂多糖, 进而改善肠道的生态平衡, 起



注: N1: 正常组; M1: 模型组; F1: 毛蕊异黄酮组; F2: 刺芒柄花素组; TF1: 三点金总黄酮组。

图 9 线性判别分析效应大小识别细菌的不同丰度

Notes. N1, Control group. M1, Model group. F1, Calycosin group. F2, Formononetin group. TF1, Total flavones of *Desmodium triflorum* group.

Figure 9 Linear discriminant analysis effect size to identify different abundances of bacteria

到改善溃疡性结肠炎的作用^[23]。

本研究探讨了三点金总黄酮, 毛蕊异黄酮及刺芒柄花素对 UC 小鼠肠道菌群的调节作用。结果显示, 三点金总黄酮和毛蕊异黄酮能够改善和部分恢复菌群多样性, 但是刺芒柄花素对菌群多样性却没有改善作用。徐豪明^[24]的研究证实在 TNBS 诱导结肠炎小鼠肠道菌群中, 条件致病菌拟杆菌和产酸拟杆菌的相对丰度明显升高, 而经 5-氨基水杨酸干预之后均显著下降。从目前的结果来看, 总黄酮的效果总体上优于其两个单体化合物, 这很可能系协同效果所致。刺芒柄花素没有提高物种多样性, 但是可能从降低条件致病菌拟杆菌而发挥作用。

综上所述,三点金总黄酮,毛蕊异黄酮以及刺芒柄花素对 UC 有一定的治疗作用且毛蕊异黄酮优于三点金总黄酮和刺芒柄花素,然而对于恢复肠道菌群多样性和改善肠道菌群结构来看,三点金总黄酮的效果总体上优于其两个单体化合物,这为 UC 治疗药物的研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Liang J, Chen S, Chen J, et al. Therapeutic roles of polysaccharides from *Dendrobium officinale* on colitis and its underlying mechanisms [J]. Carbohydr Polym, 2018, 185: 159–168.
- [2] 蔺晓源, 余星, 雷贵明, 等. 健脾益肠散对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 HSP70 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 91–96.
- [3] 宁丽琴, 叶柏, 沈洪, 等. 国医大师徐景藩治疗溃疡性结肠炎的用药规律分析和分子靶点预测 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 1042–1048.
- [4] Yamamoto T, Shimoyama T, Kuriyama M. Dietary and enteral interventions for Crohn's disease [J]. Curr Opin Biotechnol, 2017, 44: 69–73.
- [5] 马旭园, 代志峰, 王慧超, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化及其与 IL-23/IL-17 轴的关系 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(5): 884–892.
- [6] Li K, Wang J, Wei J, et al. Fecal microbiota in pouchitis and ulcerative colitis [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(40): 8929–8939.
- [7] Kumagai H, Yokoyama K, Imagawa T, et al. Failure of fecal microbiota transplantation in a three-year-old child with severe refractory ulcerative colitis [J]. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2016, 19(3): 214–220.
- [8] Aguilera M, Darby T. The complex role of inflammasomes in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases lessons learned from experimental models [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(6): 715–730.
- [9] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [10] Yang Q, Chen G, Yang Y, et al. Formononetin ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice through induction of Nrf2 in colons [J]. J Chin Pharm Sci, 2016, 25(3): 178–188.
- [11] Chao L, Zheng P, Xia L, et al. Calycosin attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced experimental colitis [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(9): 1056–1062.
- [12] 谭悦, 关雅迪, 郑长清. 山姜素对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠溃疡性结肠炎的保护作用及其作用机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(6): 1303–1311.
- [13] 孙洁, 包静瑶, 陈浩祎, 等. 不同维生素 B12 衍生物对 DSS 致小鼠结肠炎调控作用的研究 [J]. 世界华人消化杂志, 2019, 27(10): 611–617.
- [14] 郭雪艳. 双姜胃痛丸对葡聚糖硫酸钠诱导溃疡性结肠炎的改善作用及其机制研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [15] Molodecky N, Soon I, Rabi D, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review [J]. Gastroenterology, 2015, 142(1): 46–54.
- [16] Wang K, Li Y, Lv Q, et al. Bergenin, acting as an agonist of PPAR γ , ameliorates experimental colitis in mice through improving expression of SIRT1, and therefore inhibiting NF- κ B-mediated macrophage activation [J]. Front Pharmacol, 2018, 8: 981–1000.
- [17] Nie X, Ou-yang J, Xing Y, et al. Calycosin inhibits migration and invasion through modulation of transforming growth factor beta-mediated mesenchymal properties in U87 and U251 cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10(1): 767–779.
- [18] Wang W, Xia T, Yu X. Wogonin suppresses inflammatory response and maintains intestinal barrier function via TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF- κ B pathway *in vitro* [J]. Inflamm Res, 2015, 64(6): 423–431.
- [19] 周正华. 肠道微环境与溃疡性结肠炎 [J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(11): 1695–1700.
- [20] Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, et al. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis [J]. Scand J Gastroenterol, 2009, 44(2): 180–186.
- [21] 吴瑞丽, 孙自勤, 魏志. 溃疡性结肠炎肠道菌群结构 ERIC-PCR 指纹图谱分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(9): 798–801.
- [22] 梁淑文, 王晓英, 屈昌民, 等. 溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化的临床研究 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44(9): 60–62.
- [23] Vezza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, et al. Flavonoids in inflammatory bowel disease: A review [J]. Nutrients, 2016, 8(4): 211–232.
- [24] 徐豪明. PD-1 抑制剂对 TNBS 诱导肠炎小鼠肠道菌群及肠屏障作用的初步研究 [D]. 广州: 广州医科大学, 2018.

[收稿日期] 2021-04-07

谭爱华,冉思邈,石和元,等. 阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 39-46.

Tan AH, Ran SM, Shi HY, et al. Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 39-46.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 006

阿尔茨海默病-痰瘀互结病证结合动物模型的建立与评价

谭爱华^{1,2,3}, 冉思邈², 石和元², 杨 硕^{1*}

(1.湖北中医药大学附属黄冈中医医院,湖北 黄冈 438000;2.湖北中医药大学老年医学研究所,武汉 430065;
3.北京中医药大学博士后流动站,北京 100029)

【摘要】 目的 本研究以探索建立一种可靠的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)与痰瘀互结证的病证结合动物模型为目的,为中医药防治 AD 提供相应的动物模型以及为建立病证结合动物模型的研究提供借鉴。**方法** 以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型动物,并以冰水浴模拟“瘀”的病理状态;给予高脂饮食饲喂模拟“痰”的病理状态;二者结合以模拟“痰瘀互结”的病理状态。不同组小鼠给予不同的处理,分别建立 AD-疾病模型组、AD-痰证组、AD-瘀证组、AD-痰瘀互结组。同系非转基因 C57BL/6J 小鼠为对照组。造模 14 d 后检测不同组小鼠的 AD 样行为学改变、舌象的客观变化、血液流变学和血脂改变,以及海马组织中相关蛋白含量的差异。**结果** 造模 14 d 后,与对照组比较,AD 各组小鼠行为学均存在明显改变、相关蛋白含量均升高。与 AD-模型组比较,AD-各病理状态组小鼠舌色偏暗红、AD-瘀证组血液流变指标及 AD-痰证组血脂指标均升高,其中 AD-痰瘀互结组相关指标均显著升高。**结论** 通过冰水浴联合高脂饮食饲喂处理 APP/PS1 双转基因小鼠 14 d,可以成功建立 AD-痰瘀互结证的病证结合动物模型,此方法建模成型率高、与临床症状相贴合,可为后续相关研究提供稳定的动物实验载体。

【关键词】 阿尔茨海默病;痰瘀互结证;病证结合;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0039-08

Establishment of Alzheimer's disease with intermingled phlegm and blood stasis in a transgenic mice model

TAN Aihua^{1,2,3}, RAN Simiao², SHI Heyuan², YANG Shuo^{1*}

(1. Huanggang Hospital of TCM, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Huanggang 438000, China.

2. Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065. 3. Postdoctoral Station,

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective This study aimed to establish a reliable animal model of Alzheimer's disease (AD) with phlegm and stagnation to provide a corresponding animal model for the prevention and treatment of AD by Chinese medicine and to provide a reference on animal modelling method ology for the establishment of animal models combining disease and TCM evidence. **Methods** APP/PS1 2×Tg mice were used as AD model animals. The pathological state of “stasis” was simulated by ice water bath and the pathological state of “phlegm” was simulated by high-fat diet feeding. The two were

[基金项目] 国家重点研发计划中医药现代化重点专项(2019YFC1708502)。

[作者简介] 谭爱华(1991—),男,博士,在站博士后。研究方向:中医药防治老年病。E-mail:evan2018@stmail.hbctm.edu.cn

[通信作者] 杨硕(1991—),男,硕士,研究方向:中医药防治老年病及方剂作用机制。E-mail:734916256@qq.com

combined to simulate the pathological state of “phlegm and stasis interconnection”. The mice in different groups were treated differently: the AD-phlegm group was given a high-fat diet, the AD-stasis group was given an ice-water bath, the AD-phlegm-stasis group was given both a high-fat diet and an ice-water bath, and the AD-disease model group was left untreated. Non-transgenic C57BL/6J mice with the same genetic background were the control group. The differences in AD-like behavioral changes, objective changes in tongue image, blood rheology and lipid alterations and relevant protein content in hippocampal tissue were examined at 14 days after modeling. **Results** After 14 days of modeling, the AD-like behavioral changes and relevant protein content of mice in the AD groups were significantly changed compared with those in the control group. The tongue color was dark red in the AD-disease model group compared with result in the AD-model group; the hemorheology index of the AD-stasis group and the blood lipid index of the AD-phlegm group were increased. The related indexes of AD-phlegm-stasis interconnection group were significantly increased. **Conclusions** The combination of ice-water bath and high-fat diet to treat APP/PS1 mice for 14 days successfully established the combined animal model of AD-phlegm-stasis syndrome. This method has a high modeling rate, fits well with clinical symptoms and may represent a useful experimental animal system for subsequent studies.

【Keywords】 Alzheimer's disease; phlegm and stagnation syndrome; combination of disease and syndrome; animal model

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种认知及行为障碍进行性加重的神经系统疾病^[1]。据 2018 国际阿尔茨海默病报告显示, 全球共有 5000 万 AD 患者, 平均每 3 s 就能增加一例新患者^[2]。年龄是 AD 的重要发病因素, 随着我国老龄化的加剧, 我国将成为 AD 的重灾区^[3]。AD 属中医学中“痴呆”“健忘”“不慧”等范畴, “痴呆”之名首见于《华佗神医秘传·治痴呆神方》^[4]。AD 病机总属本虚标实, 肾精不足为发病基础, 痰、瘀为主要致病因素, 痰瘀互结, 经脉不畅, 精元不能上达于脑, 脑窍失养, 发为本病^[5]。目前 AD-痰瘀互结证尚无标准动物模型, 本研究以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型动物, 通过冰水浴联合高脂饮食饲喂干预, 构建 AD-痰瘀互结模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 只 SPF 级 3 月龄 APP/PS1 双转基因雄性小鼠, 5 只 SPF 级 3 月龄同遗传背景的 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重均为 (25±5) g, 均订购于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0008], 饲养于湖北中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障环境独立通气笼中 [SYXK (鄂) 2017-0067]。饲养室温度 22℃~25℃, 湿度 45%~55%, 12 h/12 h 昼夜交替。本研究通过了湖北中医药大学动物实验伦理审查 ([2020] IEC (012) 号), 实验期间按照 3R 原则给予小鼠人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

小鼠血生化检测试剂集成夹片 (美国 IDEXX);

RIPA 裂解液、50×cook tail、PMSF (100 mmol/L)、磷酸化蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、5×蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、脱脂奶粉、ECL、显影定影试剂、 β -actin、GAPDH、Histone H3、HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记驴抗山羊、HRP 标记山羊抗小鼠、HRP 标记山羊抗大鼠、转移缓冲液、电泳缓冲液、TBS 缓冲液均由武汉 Servicebio 公司提供; PVDF 膜 (Millipore, 0.45 μ m, 0.22 μ m); TWEEN 20 (Solarbio, T8220); T-Tau 抗体 (Servicebio, GB11178); TNF- α 抗体 (武汉三鹰, 17590-1-ap); IL-10 (武汉三鹰, 60269-1-ap); IL1- β (武汉 Abclonal, A11369)。

动物独立通气笼架 (浙江苏杭, IVC-BP5 型); 高脂饲料 (北京华阜康, D12492); 制冰机 (广州思克, MIYA-ICS60 型); 玻璃筒 (四川蜀牛, 60 cm/1500 mL); Morris 水迷宫视频分析系统 (安徽正华, ZH0065 型); 血流变分析仪 (北京赛科希德, SA-7000); Catalyst one 动物全自动生化分析仪 (美国 IDEXX); 酶标检测仪 (BIO-RED); 冷冻离心机 (湖南凯达); 双垂直电泳仪 (BIO-RED); 转印电泳仪 (BIO-RED); 感光胶片 (日本 kodak); 灰度分析软件 (美国 Protein Simple, Alpha Ease FC); 匀浆仪 (上海测博); 数码单反相机、镜头 (日本 Canon, EOS 6D Mark II; 24~70 mm f/2.8 L USM); 140 Color Checker (美国, X-RITE); D65 国际标准人工日光灯管 (荷兰 PHILIPS, 6500 k/18 w/30 cm); 摄影箱 (浙江昕昱发, Hakutatz 101260cm/LED); 图片分析软件 Photoshop CC (美国 Adobe)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

按照随机数表法将 20 只 APP/PS1 双转基因小鼠分为 4 组:AD-疾病模型组 (Alzheimer's disease model group, 记作 AD-Model 组)、AD-痰证组 (AD-Phlegm syndrome group, 记作 AD-Ps 组)、AD-瘀证组 (AD-Blood stasis syndrome group, 记作 AD-Bss 组)、AD-痰瘀互结组 (AD-Phlegm and blood stasis group, 记作 AD-Pbs 组), 每组 5 只。同系非转基因 C57BL/6J 小鼠 5 只作为空白对照组 (Blank control group, 记作 Control 组)。

1.3.2 实验动物造模

各组小鼠适应性喂养 1 周后开始造模。AD-Ps 组小鼠于入室后第 8 天开始饲喂高脂饮食, 自由饮水, 持续 14 d。AD-Bss 组小鼠于入室后第 8 天开始, 每天 14:00, 将小鼠放入底面直径为 10 cm、深 25 cm、壁厚 0.2 cm 的玻璃圆桶内, 冰水混合物深 12 cm 左右, 以小鼠后肢不能直接触到桶底为宜, 冰水混合物温度控制在 0℃~4℃。待小鼠在冰水混合物中挣扎动作明显减少, 即将沉至桶底时立即捞出。每天 1 次, 持续 14 d^[6]。AD-Pbs 组同时予高脂饮食和冰水浴处理, 持续 14 d。AD-Model 组和 Control 组正常饲养, 不予处理。

1.3.3 模型评价

(1) Morris 水迷宫法检测各组小鼠行为学变化

测试程序主要包括定位航行试验和空间探索试验两个部分, 主要检测小鼠的运动能力及空间记忆能力。定位航行试验共历时 5 d, 每天训练 4 次。记录最后一日上平台潜伏期 (单位: s), 同时记录各组小鼠抵达平台前或 90 s 内游泳的总路程 (单位: cm), 计算平均游泳速度 (单位: cm/s)。记录每只小鼠在水池中的运动路线, 生成定位航行试验运动轨迹图。空间探索试验在定位航行试验后, 撤去池中水下平台, 记录各组小鼠穿越原平台所在位置的次数, 记作穿越平台次数 (单位: 次), 并记录每只小鼠在水池中的运动路线, 生成空间探索试验运动轨迹图。

(2) 分析比色反应各组小鼠舌色客观变化

将小鼠用 0.3% 的戊巴比妥钠溶液 (0.15 mL/10 g) 麻醉术后移入摄影箱内, 充分暴露小鼠舌头, 标准人工日光下拍照。相同条件下, 拍摄 140 色 Color Checker 标准比色卡。用 Photoshop CC (Adobe) 处理小鼠舌面区域图像, 统一调整为成大

小为 500×500 px 的图片, 颜色选择 sRGB 模式。校正拍摄的标准比色卡, 将校正后的各组小鼠舌象图片分隔为 5×5 的区域, 分别提取每个区域中心位置 R、G、B 数值并计算平均值和 r 值, $r = R / (R + G + B)$, 用于反映各组小鼠舌色的客观变化。

(3) 血液流变学反应各组小鼠血液粘稠度

各组小鼠实验前撤去食物, 禁食 12 h, 不禁水。将小鼠用 0.3% 的戊巴比妥钠溶液 (0.25 mL/10 g) 麻醉术后, 心脏采血, 分装为两支, 其中一支置于含有肝素的抗凝管中, 血液流变分析仪分别检测血液高切 (200/s)、中切 (50/s)、低切 (1/s) 的全血黏度及血浆黏度。

(4) 生化分析反应各组小鼠血脂变化

上述采得另外一支血液, 分离血清, Catalyst one 全自动生化分析仪, 分别测定各组小鼠血清中的 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的含量。

(5) Western blot 法检测各组小鼠海马组织相关蛋白含量

采血后的小鼠迅速断头取脑, 剥离出海马组织, 提取海马组织总蛋白, 用 Western blot 法检测 TNF- α 、IL-1 β 及 T-Tau 蛋白含量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均使用 SPSS 23.0 软件进行分析, Graph Pad Prism 8.0 软件和 Adobe AI 2020 软件绘制统计图。结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有数据均保留小数点后 3 位。方差齐性检验 $P > 0.05$ 时, 采用 t 检验, 方差齐性检验 $P < 0.05$ 时采用 T_2 检验; 两组间比较采用 LSD。以 $P < 0.05$ 判定差异为有统计学意义, $P < 0.01$ 判定为差异具有高度统计学意义, $P > 0.05$ 判定为差异无统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验结果

与 Control 组小鼠比较, AD 各组小鼠的平均游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AD 各组小鼠的游泳总路程和上平台潜伏期明显更多, 穿越平台次数明显更少, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠比较, 各组小鼠的平均游泳速度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。AD 各组小鼠的游泳总路程、上平台潜伏期和穿越平台次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

说明各组小鼠运动能力没有明显差异。与 C57 小鼠相比, APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力明显降低, 从统计数据来看, 虽然冰水浴和高脂饮食造模处理后的各组小鼠学习记忆能力存在一定的差异, 但这些差异并没有统计学意义 ($P>0.05$)。统计结果如表 1, 各组小鼠定位航行试验和空间探索试验的运动轨迹代表图如图 1。

2.2 舌色客观化比较实验结果

与 Control 组小鼠相比, AD-Model 组小鼠舌色偏暗红, 但 r 值差异并没有统计学意义 ($P>0.05$)。其余各组小鼠舌色偏暗红, r 值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠相比, AD 各组小鼠舌色偏暗红, r 值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对 AD-Ps 组、AD-Bss 组和 AD-Pbs 组进行两两 LSD 比较, AD-Ps 组、AD-Bss 组小鼠舌色无明显差异, r 值差异也

没有统计学意义 ($P>0.05$), 而 AD-Ps 组和 AD-Pbs 组、AD-Bss 组和 AD-Pbs 组之间的差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。各组小鼠舌面 R、G、B 值及 r 值统计见表 2, 小鼠舌象图片见图 2。

2.3 血液流变学检测实验结果

与 Control 组小鼠相比, AD-Model 组与 AD-Ps 组小鼠全血黏度和血浆黏度较高, 但其差异无统计学意义 ($P>0.05$)。AD-Bss 组和 AD-Pbs 小鼠全血黏度和血浆黏度明显升高, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 AD-Model 组小鼠相比, AD-Ps 组小鼠的全血黏度和血浆黏度均有不同程度升高, 但其差异不具有统计学意义 ($P>0.05$); AD-Bss 组和 AD-Pbs 小鼠全血黏度和血浆黏度明显升高, 具有统计学意义 ($P<0.05$)。这说明冰水浴处理可以明显改变小鼠的血液流变, 能够较好地模拟“瘀”的病理状态。各组小鼠全血黏度和血浆黏度比较见表 3。

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫检测结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 1 Results of Morris maze test for each group of mice

组别 Groups	平均游泳速度 (cm/s) Average swimming speed	游泳总路程 (cm) Total distance swam	上平台潜伏期 (s) Time taken to reach the platform for the first time	穿越平台次数 (n) Number of crossings of the platform area
空白对照组 Control group	7.76 $\pm$ 1.01	207.08 $\pm$ 40.60 ^{Δ}	20.72 $\pm$ 7.46 ^{Δ}	2.62 $\pm$ 1.33 ^{Δ}
AD-疾病模型组 AD-Model group	7.31 $\pm$ 0.35	480.81 $\pm$ 42.42 [*]	59.43 $\pm$ 7.90 [*]	0.89 $\pm$ 0.78 [*]
AD-瘀证组 AD-Ps group	7.22 $\pm$ 0.62	504.28 $\pm$ 52.92 [*]	67.11 $\pm$ 14.05 [*]	0.77 $\pm$ 0.45 [*]
AD-瘀证组 AD-Bss group	6.75 $\pm$ 0.71	483.14 $\pm$ 44.78 [*]	65.15 $\pm$ 10.79 [*]	0.85 $\pm$ 0.47 [*]
AD-瘀瘀互结组 AD-Pbs group	6.94 $\pm$ 0.66	497.23 $\pm$ 40.26	62.09 $\pm$ 9.18 [*]	0.73 $\pm$ 0.42 [*]

注: 与空白对照组比较, $*P<0.05$; 与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

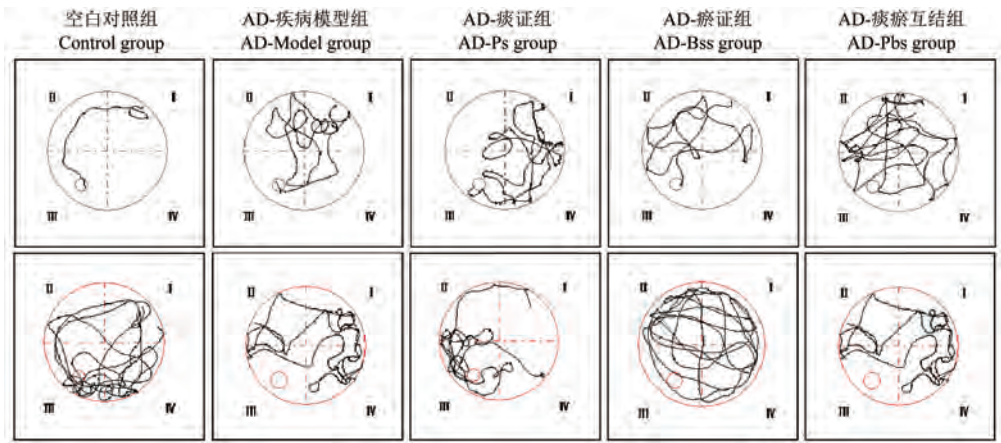
Note. Compared with the control group, $*P<0.05$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$.

表 2 各组小鼠舌面 R、G、B 值及 r 值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 R, G, B and r values of the tongue photos of mice in each group

组别 Groups	R 值 R value	G 值 G value	B 值 B value	r 值 r value
空白对照组 Control group	206.001 $\pm$ 4.072	83.680 $\pm$ 1.145	88.160 $\pm$ 1.434	0.545 $\pm$ 0.005
AD-疾病模型组 AD-Model group	183.280 $\pm$ 2.979	66.480 $\pm$ 2.027	93.000 $\pm$ 4.830	0.535 $\pm$ 0.010
AD-瘀证组 AD-Ps group	170.000 $\pm$ 5.694	71.520 $\pm$ 2.013	98.400 $\pm$ 7.848	0.500 $\pm$ 0.012 [*] ^{Δ}
AD-瘀证组 AD-Bss group	189.440 $\pm$ 0.961	86.400 $\pm$ 1.414	102.080 $\pm$ 2.397	0.501 $\pm$ 0.004 [*] ^{Δ}
AD-瘀瘀互结组 AD-Pbs group	174.040 $\pm$ 3.506	81.560 $\pm$ 1.609	110.360 $\pm$ 6.474	0.468 $\pm$ 0.011 [*] ^{Δ}

注: 与空白对照组比较, $*P<0.05$; 与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, $*P<0.05$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$.



注:上行图:定位航行试验;下行图:空间探索试验。
图 1 各组小鼠 Morris 水迷宫试验轨迹图
Note. Upper figure, Positioning navigation test. Lower figure, Space exploration test.

Figure 1 Action trajectory diagram of each group of mice in Morris test

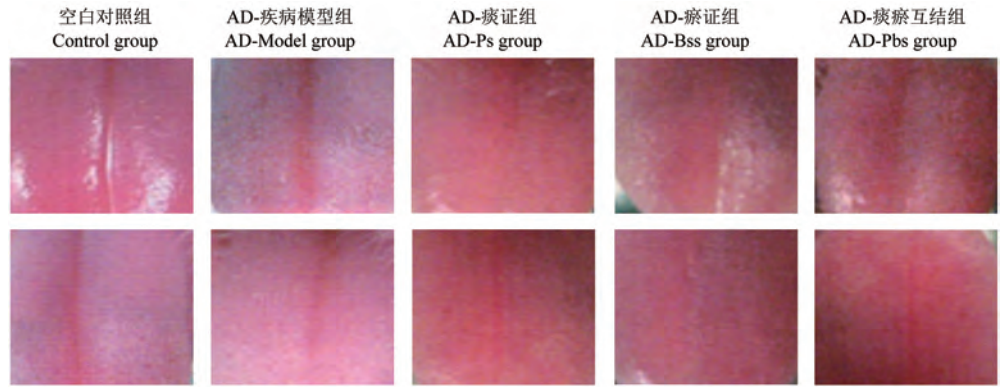


图 2 各组小鼠舌象图片
Figure 2 Tongue images of mice in each group

表 3 各组小鼠全血黏度、血浆黏度比较($\bar{x} \pm s$, mpa/s, $n=5$)
Table 3 Comparison of whole blood viscosity and plasma viscosity of mice in each group

组别 Groups	冰水浴处理 Ice and water mixture	全血黏度 Full blood viscosity			血浆黏度 Plasma viscosity
		高切 (200/s) High-cutting viscosity	中切 (50/s) Middle-cutting viscosity	低切 (1/s) Low-cutting viscosity	
空白对照组 Control group	-	5.88±0.10	8.22±0.08	15.74±0.33	1.78±0.06
AD-疾病模型组 AD-Model group	-	5.97±0.04	8.24±0.14	16.06±0.13	1.95±0.05
AD-痰证组 AD-Ps group	-	6.07±0.06	8.30±0.34	17.55±0.32	2.05±0.07
AD-瘀证组 AD-Bss group	+	6.41±0.12 * Δ	9.32±0.29 * Δ	22.78±0.47 * Δ	3.52±0.37 ** $\Delta\Delta$
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	+	6.84±0.59 * Δ	9.23±0.55 * Δ	23.67±0.51 ** $\Delta\Delta$	3.66±0.04 ** $\Delta\Delta$

注:+:进行冰水浴处理,-:不进行冰水浴处理。各组小鼠与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。
Note. +, Ice and water mixture treatment. -, No Ice and water mixture treatment. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

2.4 血脂检测实验结果

与 Control 组小鼠相比,AD-Model 与 AD-Bss 组小鼠血脂指标差异无统计学意义($P>0.05$)。AD-Ps 组和 AD-Pbs 组小鼠的各项血脂指标均明显升高,差异均具有高度统计学意义($P<0.01$)。

与 AD-Model 组小鼠相比,AD-Bss 组小鼠虽然在血脂指标上略有升高,但其差异不具有统计学意义($P>0.05$)。AD-Ps 组和 AD-Pbs 组小鼠的各项血脂指标均明显升高,差异均具有高度统计学意义($P<0.01$)。

对 AD-Ps 组和 AD-Pbs 组进行 LSD 分析,两者之间的差异不具有统计学意义($P>0.05$)。这说明高脂饮食饲喂可以明显改变小鼠的血脂指标,能够较好地模拟“痰”的病理状态。各组小鼠血脂指标比较见表 4。

2.5 Western blot 实验结果

与 Control 组相比,APP/PS1 双转基因的各组小鼠的海马组织的炎症指标 TNF- α 、IL-1 β 和 AD 病理改变指标 T-Tau 均明显升高,其差异均有统计学意义($P<0.05$),这说明转基因小鼠海马组织内发生了炎症反应,并产生了 AD 样病理改变。与 AD-Model 组比,AD-Bss 组和 AD-Ps 组在炎症指标和 AD 病理改变指标上虽然略有区别,但其差异不具有统计学意义($P>0.05$);而 AD-Pbs 组中的炎症指标和 AD 病理改变指标明显升高,其差异具有统计学意义($P<0.05$)。这说明同时模拟“痰”和“瘀”病理状态的小鼠 AD 病变程度更为严重,脑神经炎症的发生更加明显。各组小鼠海马区不同蛋白 WB 电泳条带图和相对灰度值统计见图 3。

3 讨论

AD 是一种神经系统疾病,以记忆减退、痴呆、生活能力减弱等为主要临床表现。目前,其发病机制尚不明确,主流观点认为炎症反应、Tau 蛋白的过度磷酸化、氧化应激等均可对其造成影响^[7]。中医学认为,老年人脾肾虚弱,无力运化水湿,聚湿成痰。《辨证录》记载:“痰积于胸中,盘踞于心外,使神明不清而成呆病矣”。老年人气血虚弱,无力推动血液流转,血停则成瘀。《景岳全书》曰:“凡心有瘀血,亦令健忘”^[8]。痰瘀互结,阻滞经脉,使气血精微不能上达脑窍,脑失所养,发为本病。因此,本研究以痰瘀互结证为切入点,建立 AD-痰瘀互结证病证结合动物模型。

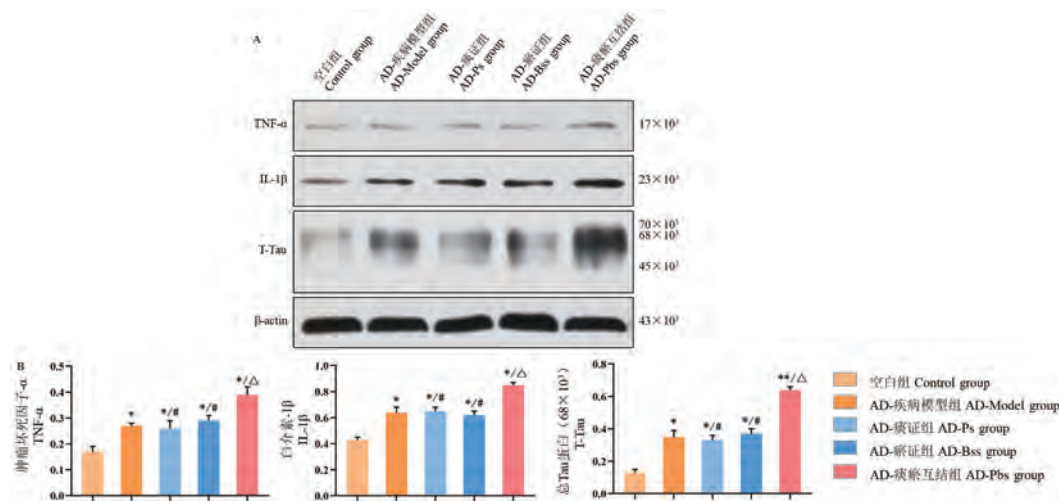
《医林改错·积块》曰:“血受寒则凝结成块”。寒邪克表,引起经脉痉挛、瘀阻,血行不畅,进而形成瘀证。郭文鹤、王丹丹等通过降低大鼠体表温度,获得瘀证动物模型^[9-10]。对于瘀证动物模型的评价可以观察舌苔的改变,也可通过检测血液流变学的改变,常选取的指标有血液粘稠度、血浆粘稠度、血沉等^[11]。“脾为生痰之源”,过食肥甘厚腻,损伤脾胃,而致脾胃生化失司,聚液为痰。彭丹虹等通过喂养大鼠高脂饮食,可以获得以血脂升高为主的痰证动物模型^[12]。Lee 等^[13]、Han 等^[14]通过喂养小鼠高脂饮食,可以稳定的升高小鼠血脂。痰证动物模型的评价,主要通过检测血脂的改变^[15]。辨证论治为中医的核心思想,以往涉及到 AD 的动物实验主要以病为主,鲜有症状的辨识。痰瘀互结

表 4 各组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L, $n=5$)
Table 4 Comparison of serum levels of TC, TG, HDL-C and LDL-C in various groups of mice

组别 Groups	食物类型 Feed types	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL-C	低密度脂蛋白 LDL-C
空白对照组 Control group	普通饲料 General feed	2.22 $\pm$ 0.27	1.47 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.45	0.18 $\pm$ 0.05
AD-疾病模型组 AD-Model group	普通饲料 General feed	2.14 $\pm$ 0.13	1.41 $\pm$ 0.56	1.72 $\pm$ 0.25	0.18 $\pm$ 0.04
AD-痰证组 AD-Ps group	高脂饲料 High-fat feed	8.37 $\pm$ 1.75 ** $\Delta\Delta$	4.72 $\pm$ 0.58 ** $\Delta\Delta$	0.95 $\pm$ 0.07 ** $\Delta\Delta$	1.95 $\pm$ 0.07 ** $\Delta\Delta$
AD-瘀证组 AD-Bss group	普通饲料 General feed	2.52 $\pm$ 1.06	1.78 $\pm$ 0.99	1.86 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.08
AD-痰瘀互结组 AD-Pbs group	高脂饲料 High-fat feed	9.75 $\pm$ 1.37 ** $\Delta\Delta$	5.81 $\pm$ 1.05 ** $\Delta\Delta$	0.68 $\pm$ 0.17 ** $\Delta\Delta$	1.02 $\pm$ 0.18 ** $\Delta\Delta$

注:各组小鼠与空白对照组比较,** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$. Compared of with the AD-Model group, $\Delta\Delta P<0.01$.



注:A:各组小鼠海马区不同蛋白 Western blot 电泳条带图;B:各组小鼠海马区不同蛋白相对灰度值统计图。各组小鼠与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 AD-疾病模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图3 各组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 、T-Tau 蛋白表达水平比较

Note. A, Western blot electrophoresis band of different proteins in the hippocampal region of each group of mice. B, Relative grayscale values of different proteins in the hippocampal region of each group of mice. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the AD-Model group, $\Delta P<0.05$.

Figure 3 Comparison of TNF- α , IL-1 β and T-Tau protein expression levels in various groups of mice

为 AD 的主要症状,本次研究主要通过冰水浴加高脂饮食干预 APP/PS1 双转基因小鼠来制造 AD-痰瘀互结证动物模型。通过观察小鼠舌色变化、血液流变学改变、血脂改变等评价造模情况,通过水迷宫实验以及 Western blot 实验评价 AD-痰瘀互结证小鼠与正常小鼠的差别。

本次研究结果表明,与 Control 组相比较,AD 各组小鼠的平均游泳速度无明显差异,表明各组小鼠的运动能力无差别。但 AD 各组小鼠游泳总路程和上平台潜伏期明显增多,穿越平台次数明显减少,表明 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力明显低于 C57 小鼠^[16]。AD 各组小鼠的 TNF- α 、IL-1 β 、T-Tau 的蛋白含量明显高于 Control 组,表明 AD 各组小鼠海马组织内发生了炎症反应,并产生了 AD 样病理改变^[17-18]。说明本次实验中 AD 各组小鼠模型均符合阿尔茨海默病的临床表现。其中,AD-Pbs 组各项指标改变最为明显,其 AD 病变程度更加严重。

未经过冰水浴及高脂饮食干预的 AD-Model 组与 Control 组在舌色、血液流变学及血脂方便无明显差别,表明在干预之前,小鼠无“痰”、“瘀”证的表现。干预之后,与 AD-Model 组相比较,AD-Bss 组、AD-Ps 组及 AD-Pbs 组小鼠舌色均偏暗红,AD-Bss

组与 AD-Pbs 组全血黏度和血浆黏度均升高,AD-Ps 组与 AD-Pbs 组血脂均升高,其中 AD-Pbs 组不但舌色更加暗红,而且全血黏度、血浆黏度、血脂均明显升高。实验表明只接受冰水浴的小鼠,只会形成“痰”证的病理表现,只接受高脂饮食的小鼠,只会形成“瘀”证的病理表现,只有同时接受冰水浴及高脂饮食的小鼠才能形成“痰瘀互结”的病理表现,而且痰瘀症状相互搏结,瘀阻经脉,致使“痰”、“瘀”症状表现的更加明显。

本次研究在借鉴以往“痰”、“瘀”动物模型的基础上,结合 AD 病因病机特点,创立 AD-痰瘀互结证动物模型。与普通 APP/PS1 双转基因小鼠相比较,本模型更加贴合中医辨证论治的思维体系,为相关中药或方剂研究提供更加准确的动物模型,以期达到方证对应。本模型制备可控性强,能做到统一化建模,且其证候表现与临床较一致。同时该方法也存在一定的缺点,如造模时间长,操作过程精细,过程繁琐等。通过以上分析,AD-痰瘀互结证动物模型可为相应研究提供可靠的动物载体。

参考文献:

- [1] The Alzheimer's Association. 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(3): 327-406.
- [2] Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2018

- [EB/OL]. [2018-09-21]. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2018/>.
- [3] 李笑阳, 刘冠含, 尹昊文, 等. 中国老年人群阿尔茨海默病发病危险因素的 Meta 分析 [J]. 现代预防医学, 2020, 47(6): 1100-1103, 1119.
- [4] 张译戈, 梁雨晴, 李雅黎, 等. 从“肾虚痰瘀”浅谈阿尔茨海默病的中医病机演变 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(1): 159-164.
- [5] 谭爱华, 宋子瑜, 胡玉萍, 等. 补肾化痰复方对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力及 SorLA 蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 4961-4964.
- [6] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [7] Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell [J]. J Biol Chem, 2009, 284(19): 12845-12852.
- [8] 王玉璧, 郭蕾, 窦志芳, 等. 关于老年痴呆病的中医病因病机探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4): 743-745.
- [9] 王丹丹, 王东梅, 马青, 等. 温经化痰止痛法对寒凝血瘀证痛经大鼠 Th17、Treg 细胞分化及其细胞因子表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 308-310.
- [10] 郭文鹤, 黄娜娜, 张晓亮, 等. 动脉粥样硬化(气滞血瘀证)病证结合大鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 32-41.
- [11] 刘校彤, 吕光华, 王巧稚, 等. 血瘀证动物模型制备的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 371-380.
- [12] 彭丹虹, 王燕萍, 刘晓琪, 等. 高脂血症痰证动物模型实验研究及思考 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9): 2338-2341.
- [13] Lee HS, Nam Y, Chung YH, et al. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice [J]. Life Sci, 2014, 118(1): 7-14.
- [14] Han JM, Lee JS, Kim HG, et al. Synergistic effects of *Artemisia iwayomogi* and *Curcuma longa* radix on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173: 217-224.
- [15] 赵宏艳, 胡明华, 从仁怀, 等. 可用于痰浊研究的动物模型探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(12): 1694-1696, 1700.
- [16] 杨玉洁, 李玉姣, 李杉杉, 等. 用于评价大小鼠学习记忆能力的迷宫实验方法比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 129-134.
- [17] 杨翠翠, 李林, 张兰. Tau 蛋白高度磷酸化致阿尔茨海默病动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 71-74.
- [18] 高媛媛, 王旭, 任路. “肾脑相济”电针对阿尔茨海默病模型小鼠行为学及 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(3): 359-364.

[收稿日期]2021-08-11

肖志刚,郑丽,王梓瀛,等. 小鼠第 13.5 天胚肝细胞诱导 HepG2 细胞分化的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 47-53.

Xiao ZG, Zheng L, Wang ZY, et al. The effect and mechanism of differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 47-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.007

小鼠第 13.5 天胚肝细胞诱导 HepG2 细胞分化的作用机制

肖志刚¹, 郑丽^{1,3}, 王梓瀛¹, 刘昆¹, 王瑜², 齐锦生^{1*}, 栗彦宁²

(1.河北医科大学中西医结合学院,石家庄 050017;2.河北医科大学实验动物学部,石家庄 050017;

3.邢台医学高等专科学校,河北 邢台 054000)

【摘要】 目的 探讨小鼠第 13.5 天胚肝细胞是否通过抑制 β -Catenin 诱导人肝细胞肝癌细胞株 HepG2 细胞分化及其作用机制。**方法** 用免疫荧光法检测肝细胞标记分子-白蛋白 (ALB) 的分布,以鉴定小鼠第 13.5 天胚肝细胞。小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株共培养 24 h、48 h 后,采用 qRT-PCR 方法检测 HepG2 细胞株中肝癌标记分子-甲胎蛋白 (AFP)、肝细胞分化调控因子-肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α) 和成熟肝细胞标记分子-细胞色素 P450 家族成员 1B1 (CYP1B1) 和乙醇脱氢酶 1C (ADH1C) 的 mRNA 表达。共培养 48 h 后,观察 HepG2 细胞株形态变化,采用 Western blot 法检测 AFP、HNF-4 α 和 β -Catenin 的蛋白含量,免疫荧光法检测 β -Catenin 蛋白在细胞的分布。应用 β -Catenin 抑制剂处理后,观察 HepG2 细胞株形态变化并且检测 AFP 蛋白表达。**结果** 原代培养细胞 ALB 荧光显示阳性。与对照组相比,共培养后 HepG2 细胞株中,AFP 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著降低,HNF-4 α 、CYP1B1 和 ADH1C 的相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著升高。与对照组相比,共培养 48 h 后,HepG2 细胞株生长明显抑制,细胞形态趋于正常肝细胞的六边形,AFP 和 HNF-4 α 蛋白表达明显升高。与对照组相比,共培养 48 h 后, β -Catenin 的蛋白含量明显降低,同时 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的荧光明显减弱。与对照组相比, β -Catenin 抑制剂处理可明显改变 HepG2 细胞株形态,引起共培养组 HepG2 细胞株形态更剧烈的变化,显著抑制 AFP 的蛋白表达。**结论** 小鼠第 13.5 天胚肝细胞可能主要通过抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化。

【关键词】 HepG2;细胞分化;胚肝细胞; β -Catenin;HNF-4 α

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0047-07

The effect and mechanism of differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation

XIAO Zhigang¹, ZHENG Li^{1,3}, WANG Ziyang¹, LIU Kun¹, WANG Yu², QI Jinsheng^{1*}, LI Yanning²

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China.

2. Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017.

3. Xingtai Medical College, Xingtai 054000)

【Abstract】 Objective To explore the differentiation of HepG2 cells induced by mouse embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation through the inhibition of β -Catenin. **Methods** The distribution of hepatocyte marker molecule-albumin (ALB) was detected by immunofluorescence to identify the hepatocytes of mouse embryo on day 13.5. After HepG2 cells were co-cultured with embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation for 24 h and 48 h, the mRNA

【基金项目】 河北省自然科学基金 (H2020206328, H2020206386); 邢台市科技局自筹项目 (2018ZC133)。

【作者简介】 肖志刚 (1991—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药防治和逆转肿瘤细胞的分子机制研究。E-mail: 1345449822@qq.com

【通信作者】 齐锦生 (1960—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治和逆转肿瘤细胞的分子机制研究。

E-mail: qijinsheng777@163.com

expressions of *AFP* (biomarker of hepatocellular carcinoma), *HNF-4 α* (controller of hepatocyte differentiation), *CYP1B1* (biomarker of mature hepatocytes) and *ADHIC* (another biomarker of mature hepatocytes) were measured by reverse transcriptional quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). After HepG2 cells were co-cultured with day 13.5 of gestation embryonic hepatocytes for 48 h, the morphology was observed; AFP, HNF-4 α and β -catenin expressions were measured by Western blot and β -Catenin distribution was determined by immunofluorescence. Following treatment with the β -catenin inhibitor, morphology was observed and AFP content was measured. **Results** Most cells were ALB-positive. The relative mRNA expression of *AFP* decreased significantly after 24 h and 48 h co-culture, and *HNF-4 α* , *CYP1B1* and *ADHIC* increased significantly at 24 h and 48 h co-culture compared with the levels in the controls. The proliferation of HepG2 cells was suppressed and cell morphology tended to be hexagonal like normal hepatocytes; AFP protein content decreased and HNF-4 α protein content increased after co-culture with embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation for 48 h. Compared with the levels in the control, β -Catenin protein content decreased in the co-culture group and β -catenin was markedly attenuated in the co-cultured HepG2 cells in immunofluorescence result. Compared with the effects in the control group, β -catenin inhibitor treatment caused notable morphological changes of HepG2 cells and induced more dramatic morphological changes of HepG2 cells; furthermore, it reduced AFP protein content. **Conclusions** HepG2 cells may be induced to undergo differentiation by embryonic hepatocytes at day 13.5 of gestation mainly through the suppression of β -catenin.

【Keywords】 HepG2; cell differentiation; embryonic hepatocytes; β -Catenin; HNF-4 α

原发性肝癌是全球第四位的致死性癌症,我国肝癌发病人数占全球一半以上,其中,肝细胞来源的肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占 90%,是原发性肝癌中最常见的类型^[1]。目前,针对 HCC 治疗主要以手术切除为主,切除率低及复发率高等,严重影响了病人生存率,亟需治疗新思路^[2-3]。基于胚胎干细胞和肿瘤细胞有很多共同特性,例:可塑性、永生化、免疫逃逸等,齐锦生教授提出“同源同步诱导分化”理论,即肿瘤是发育受阻于某个阶段而无限增殖的“干细胞”或是“返祖细胞”,而胚胎发育过程包含了所有组织细胞的所有发展阶段,用相同组织来源、发育阶段匹配的胚胎干细胞可诱导相应肿瘤细胞分化,且根据越原始越相似的理论,这种诱导作用是不受种属限制的^[4-6]。在此理论指导下,本课题组前期研究证实小鼠第 13.5 天胚肝细胞可诱导 HepG2 细胞株分化,但机制尚未阐明^[5-6]。已知,高度保守的 Wnt/ β -Catenin 信号通路 with 发育、分化等密切相关,也是促进 HCC 分化的重要因素^[7-8]。那么,小鼠第 13.5 天的胚肝细胞是否通过调控 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化,尚不清楚。本文以小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株体外共培养模型,研究了小鼠第 13.5 天胚肝细胞调控 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化机制,为 HCC 治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

清洁级健康 KM 小鼠,雄鼠 30 只,雌鼠 90 只,

体重 25~30 g,6~8 周龄,由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2018-004],饲养条件如下:自由进食和饮水,温度约 25℃,湿度约 50%,12 h 光照/12 h 黑暗,在河北医科大学实验动物中心饲养动物[SYXK(冀)2018-008],动物实验经由实验动物管理委员会批准(2018-0042),实验过程中严格遵循实验动物使用的 3R 原则,给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞

人肝癌细胞 HepG2,购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库(TCHu 72)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清购自北京全式金公司(货号:FS101); Gibco 的 DMEM 培养基(货号: C11885500BT) 购自 Life Technology 公司; Millicell 细胞培养小室(货号: PICMORG50)购自美国 Millipore 公司; β -Catenin 抑制剂 XAV-939 购自 Selleck (货号: S1180); 白蛋白 (ALB, 货号: sc-271605)、甲胎蛋白 (AFP, 货号: sc-8399)、肝细胞核因子 4 α (HNF-4 α , 货号: sc-374229)、 β -Catenin 抗体(货号: sc-7963)、 β -actin (货号: sc-8432)购自美国 Santa Cruz 公司; TRITC 标记二抗(货号: BA1089) 购自博士德公司; DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, 货号: D9542-1MG)购自 SIGMA 公司; TRIzol 试剂(货号: 15596-026)购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒(货号: K1622)购自 Thermo Fisher Scientific 公司; qPCR 试剂盒 (SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 货号: RR820A)购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成; 0.45 μ m

PVDF 膜(货号 IPVH00010)购自美国 Merck milipore 公司。二氧化碳培养箱(英国 NEW BRUNSWICK 公司,型号:Galaxy 170R);体视显微镜(德国 Leica 公司产品,型号:S9);倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司产品,型号:IX-51);PCR 仪(美国 Thermo 公司产品,型号:PX2);实时荧光定量 PCR 仪(中国香港 Gene 公司产品,型号:Corbett Rotor-Gene 3000);Odyssey 双色红外荧光成像系统(中国香港 Gene 公司产品,型号:9120)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠第 13.5 天胚肝细胞分离纯化

采用本实验室方法,用 6~8 周龄 KM 小鼠,雌鼠:雄鼠=3:1 合笼,次日出现阴栓日期为妊娠 0.5 d,取 13.5 d 孕鼠,消毒,在体视显微镜下取出胚肝,分离成小块,采用 IV 型胶原酶消化。过滤网后,采用差速贴壁法纯化胚肝细胞,常规培养,备用于鉴定及共培养实验^[5-6]。

1.3.2 小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的共培养

将 HepG2 细胞株置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。培养液为高糖培养基,含 1% 的非必需氨基酸,10% 的新生牛血清。利用“Transwell”小室建立小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的非接触式共培养模型,1 mL 胚肝细胞(每毫升 1×10⁶ 个)培养于六孔板中“Transwell”小室上层膜上,2 mL HepG2(每毫升 5×10⁴ 个)培养于六孔板中,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。分为对照组、共培养组,培养 24、48 h 后检测相关指标。

1.3.3 β-Catenin 抑制剂处理及分组

建立小鼠第 13.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株的共培养模型后,给予 β-Catenin 抑制剂 XAV-939 处理,分为对照组、XAV-939 组(1 μmol/L)、共培养+XAV-939 组(1 μmol/L)、共培养组,作用 48 h 后,相差显微镜观察 HepG2 细胞株形态,同时检测 AFP、β-Catenin 的蛋白含量。

1.3.4 免疫荧光法检测 ALB 的分布

取原代胚肝细胞,4% 多聚甲醛固定后,1% 的 TritonX-100 室温下处理 30 min,10% 山羊血清 37℃ 封闭 1 h。弃除封闭液,加入 AFP 抗体(1:50),4℃ 孵育过夜,加入 FITC 标记二抗(1:50),避光 37℃ 孵育 1 h,加入细胞核染色液 DAPI,避光室温作用 15 min,滴加适量的抗荧光衰减封片液(50% 甘油),盖玻片封片后荧光倒置显微镜下观察、拍照。ALB 的

染色为绿色,细胞核的染色为蓝色。采用 Image Pro Plus 6.0 版软件计数 3 个随机视野中免疫荧光阳性细胞。

1.3.5 qRT-PCR 检测 mRNA 水平

收集共培养 24 h、48 h 的 HepG2 细胞株,采用 TRIzol 法提取 RNA,并测定 RNA 浓度。按照试剂盒进行反转录和 PCR 反应。PCR 反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,第 2 步至第 3 步进行 40 个循环。以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 计算相关基因的 mRNA 的相对表达量。引物见表 1。

1.3.6 Western blot 检测蛋白含量

共培养及 β-Catenin 抑制剂处理 48 h 后,收集 HepG2 细胞株,用 RIPA 裂解液进行裂解,取上清至预冷的 EP 管中,即为细胞总蛋白提取物。蛋白精确定量后,取蛋白样品每孔 150 μg 经 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后,一抗封闭(5% 牛奶 1:200 稀释),4℃ 过夜,二抗(5% 牛奶 1:2000 稀释)室温孵育 2 h,采用 Odyssey 双色红外荧光成像系统读取图像。将所得图片用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 软件对条带进行定量分析,计算目的条带的灰度值。

1.3.7 免疫荧光法检测 β-Catenin 的分布

方法同 1.3.2,共培养 48 h 的 HepG2 细胞株,使用 β-Catenin 抗体(1:50)和 TRITC 标记的二抗,检测 β-Catenin 蛋白的分布。β-Catenin 的染色为红色,细胞核的染色为蓝色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所得结果采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。两组之间采用独立样本 *t* 检验分析,多组之间分析先进行方差齐性检验,组间比较采用 One-Way-ANOVA 法,进一步两两比较,采用 LSD-*t* 检验,*P*<0.05 为有统计学差异。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Primers for Real-time PCR

基因名称 Gene name	序列(5'-3') Sequence	产物长度 Product length
AFP	F:AGAGGAGATGTGCTGGATTG R:CTCCTGCTATCCTTTAGCAACT	327 bp
HNF-4α	F:GATGACAATGAGTATGCCTACCT R:CTCGTTGATGTAGTCTCCAA	132 bp
CYP1B1	F:TCTGTCTTGGGCTACCACATTCC R:TGGGTTGGCCCTGAAATCG	270 bp
β-actin	F:CTCCATCCTGGCCTCGCTGT R:GCTGTCACCTTCACCGTTCC	268 bp

2 结果

2.1 小鼠 13.5 天胚肝细胞的鉴定

原代胚肝细胞分离培养后,用免疫荧光法检测肝细胞标记分子 ALB 蛋白的分布。结果显示,91.84% 的 ALB 荧光染色阳性,见图 1。

2.2 qRT-PCR 检测相关基因的 mRNA 表达水平

与对照组相比,共培养 HepG2 细胞株中 *AFP* 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *HNF-4 α* 相对 mRNA 表达量在 24 h 和 48 h 均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), *CYP1B1* mRNA 的相对表达量在 24 h 无明显差异,48 h 显著升高 ($P < 0.01$), *ADH1C* mRNA 的相对表达量在 24 h 无明显差异,48 h 显著升高 ($P < 0.01$),见图 2。

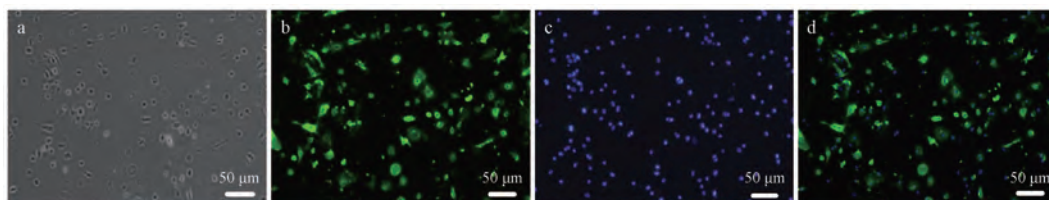
2.3 显微镜下观察细胞形态变化

对照组 HepG2 细胞株生长旺盛、密度大,形态

呈多角形或梭形,胞浆透亮,细胞核多且形状不规则。与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后, HepG2 细胞株生长受到明显抑制,形态多为六边形,接近正常成熟肝细胞,胞浆透亮度下降,细胞核多为单核,见图 3。

2.4 Western blot 法检测 AFP、HNF-4 α 、 β -Catenin 的蛋白含量

与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后,提取总蛋白,Western blot 法检测 HepG2 细胞株中, AFP、HNF-4 α 、 β -Catenin 的蛋白含量。计算 Western blot 条带灰度值并统计,发现与对照组相比,AFP 蛋白含量在共培养组 ($P < 0.05$) 显著降低, HNF-4 α 蛋白含量在共培养组显著升高 ($P < 0.05$)。同时,与对照组相比, β -Catenin 蛋白含量在共培养组显著下降 ($P < 0.05$),见图 4。



注: a: 明视场; b: ALB 荧光; c: DAPI 荧光; d: ALB 和 DAPI 荧光叠加图。

图 1 小鼠第 13.5 天胚肝细胞鉴定

Note. a, Bright field. b, ALB fluorescence. c, DAPI fluorescence. d, ALB and DAPI fluorescence merge.

Figure 1 Identification of 13.5 day mouse embryo hepatocytes

2.5 免疫荧光检测 β -Catenin 的分布

与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养 48 h 后,免疫荧光法检测 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的分布。结果可见,对照组 HepG2 细胞株增殖旺盛, β -Catenin 的荧光染色明显,提示其高含量;相比于对照组,共培养组 HepG2 细胞株数量明显减少, β -Catenin 的荧光强度显著减弱。结果验证了,与小鼠第 13.5 天胚肝共培养后, HepG2 细胞株中 β -Catenin 的含量减少,见图 5。

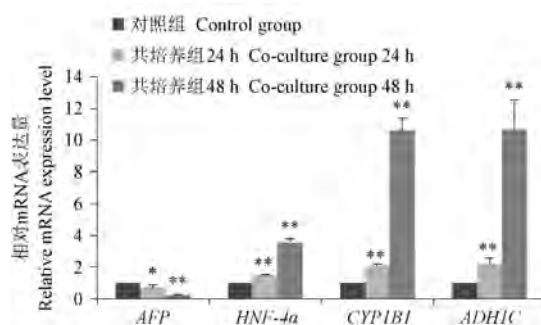
2.6 抑制 β -Catenin 引起 HepG2 细胞株形态变化

与对照组 HepG2 细胞株相比, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理后,细胞生长受到抑制,胞浆透亮度下降,细胞形态不规则,趋于死亡。而相对于共培养组, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理后,细胞形态变化的基础上,接近崩解,见图 6。

2.7 抑制 β -Catenin 减少 AFP 的蛋白含量

对照及共培养 HepG2 细胞株, β -Catenin 抑制剂 XAV-939 处理 48 h 后, Western blot 法检测 AFP 和

β -Catenin 的蛋白含量。与对照组相比, AFP 蛋白含量和 β -Catenin 蛋白含量在 XAV-939 组显著降低 ($P < 0.01$);同时,与共培养组相比, AFP 蛋白含量和 β -Catenin 蛋白含量在共培养+XAV-939 组显著降低 ($P < 0.01$),见图 7。

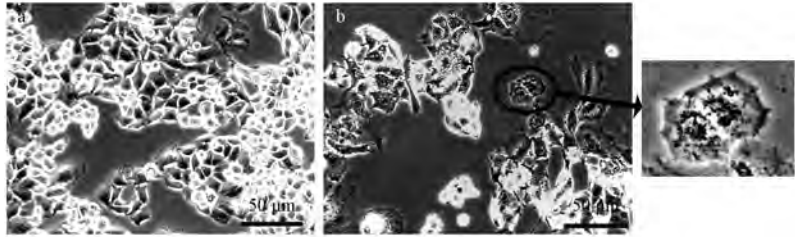


注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 共培养后相关基因 mRNA 表达水平

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

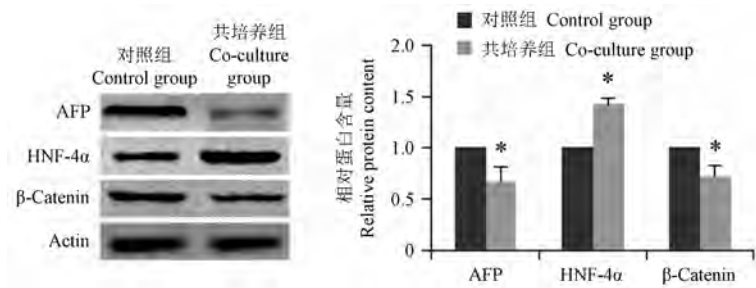
Figure 2 mRNA expression levels of related genes after co-culture



注:a:对照组;b:共培养组。
图3 对照组和共培养组 HepG2 细胞株的形态

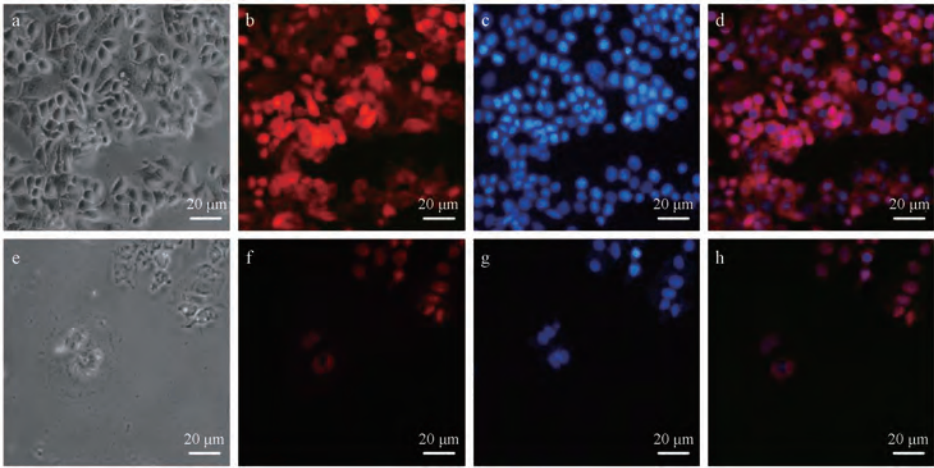
Note. a, Control group. b, Co-culture group.

Figure 3 Morphology of HepG2 cells in the control group and co-culture group



注:与对照组比较, * $P<0.05$ 。
图4 共培养 HepG2 细胞株中 AFP、HNF-4α 和 β-Catenin 的蛋白表达
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 4 Protein expression levels of AFP、HNF-4 and β-Catenin in co-culture group

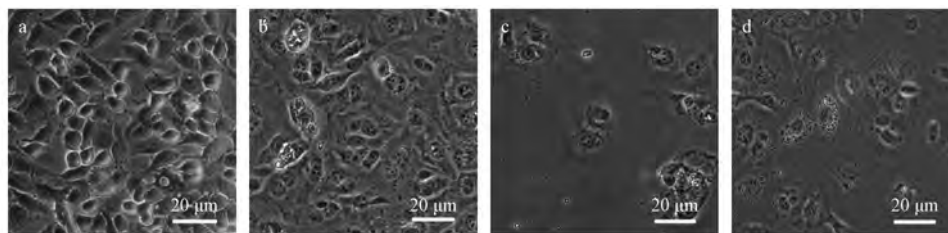


注:a:对照组明视场;b:对照组 β-Catenin 荧光;c:对照组 DAPI 荧光;d:对照组 β-Catenin 和 DAPI 荧光叠加图;e:共培养组明视场;f:共培养组 β-Catenin 荧光;g:共培养组 DAPI 荧光;h:共培养组 β-Catenin 和 DAPI 荧光叠加图。

图5 HepG2 细胞株中 β-Catenin 的分布

Note. a, Bright field in the control group. b, β-Catenin fluorescence in the control group. c, DAPI fluorescence in the control group. d, β-Catenin and DAPI fluorescence merge in the control group. e, Bright field in the co-culture group. f, β-Catenin fluorescence in the co-culture group. g, DAPI fluorescence in the co-culture group. h, β-Catenin and DAPI fluorescence merge in the co-culture group.

Figure 5 Distribution of β-Catenin in HepG2 cells

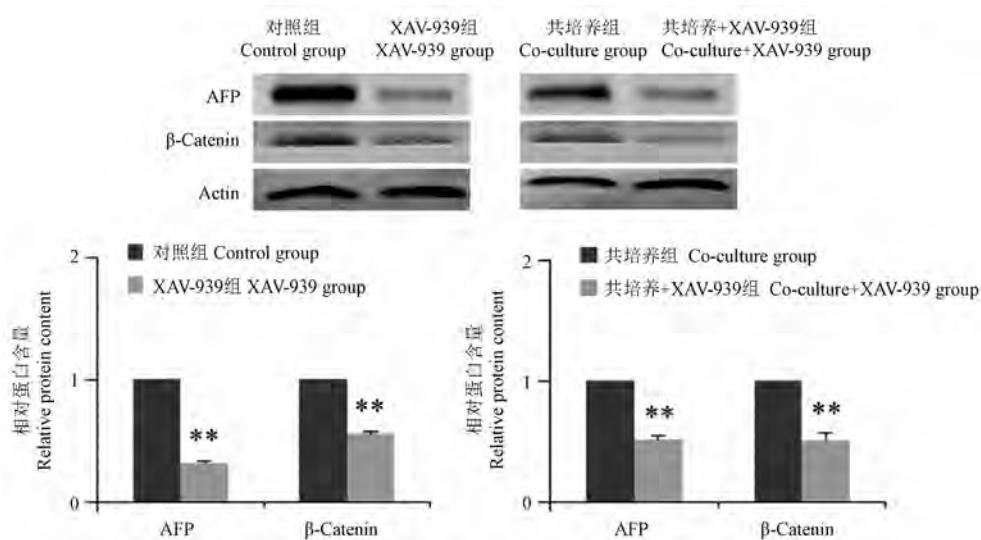


注: a: 对照组; b: XAV-939 组; c: 共培养组; d: 共培养+ XAV-939 组。

图 6 抑制 β -Catenin 引起 HepG2 细胞株的形态变化

Note. a, Control group. b, XAV-939 group. c, Co-culture group. d, Co-culture+XAV-939 group.

Figure 6 Morphology of HepG2 cells induced by inhibition β -Catenin



注: 与对照组和共培养组比较, $**P < 0.01$ 。

图 7 抑制 β -Catenin 减少 AFP 的蛋白含量

Note. Compared with the control group and the co-culture group, $**P < 0.01$.

Figure 7 Reduced AFP protein content induced by inhibition β -Catenin

3 讨论

目前,针对杀死肿瘤细胞的治疗策略,不能达到完全治愈肿瘤的目的,反而会产生严重的毒副作用。因此,我们必须改变思路。胚胎微环境是诱导肿瘤细胞分化的天然而有效的治疗良方^[4,9],然而,并不是所有的胚胎诱导肿瘤细胞分化的实验都能取得成功^[10],因此有必要探寻其内在的诱导机制。

根据肿瘤细胞和胚胎干细胞之间的相似性^[11-12],齐锦生教授提出“同源同步诱导分化”理论^[5-6]。有证据表明,HCC 细胞表达胚胎抗原、具有无限增殖等胚胎细胞的特性^[12-13]。在“同源同步诱导分化”理论的指导下,我们前期的实验证实,特定发育阶段的鸡胚或小鼠胚肝细胞可诱导 HepG2 细胞株分化^[6]。

鉴于小鼠胚肝细胞是在胚胎发育第 12~15 天

分化成熟^[14],我们用小鼠第 13.5~14.5 天胚肝细胞与 HepG2 细胞株共培养,能抑制 HepG2 细胞株增殖,促进其分化成熟^[5-6]。HNF-4 α 在肝发育和肝细胞功能形成中,发挥着不可或缺的关键作用,也是控制肝细胞分化的关键因子^[15-16]。

本实验用免疫荧光法检测小鼠第 13.5 天胚肝细胞中肝细胞标记分子 ALB 蛋白表达,结果显示绝大部分细胞的 ALB 荧光染色阳性,说明小鼠第 13.5 天胚肝细胞成功分离培养。HepG2 细胞株与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养后,肝癌标记分子 AFP 相对 mRNA 表达量降低,而肝细胞分化调控因子 HNF-4 α ,成熟肝细胞标记分子 CYP1B1、ADH1C 基因相对 mRNA 表达量升高。并且与小鼠 13.5 天胚肝细胞共培养可诱导 HepG2 细胞株的形态趋于正常肝细胞样。Western blot 结果显示 HepG2 细胞株中 AFP、HNF-4 α 蛋白在共培养后表达变化与相对 mRNA 表达变化相一致。这表明,小鼠第 13.5 天胚

肝细胞共培养可抑制 HepG2 细胞株中 AFP 表达,上调 HNF-4 α 表达,诱导 HepG2 细胞株分化。而 HNF-4 α 还调控很多成熟肝细胞特异酶的表达,如 *CYP1B1* 和 *ADH1C* 等。本实验也证实,与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养,可上调 HepG2 细胞株中 *CYP1B1* 和 *ADH1C* 的表达。然而,小鼠第 13.5 天胚肝细胞是通过什么信号通路,诱导 HepG2 细胞株分化成熟呢?

已知 Wnt/ β -Catenin 信号通路是一个高度保守的,调控胚胎发育、细胞增殖和分化的重要信号通路^[17]。肝细胞分化过程中,Wnt/ β -Catenin 信号通路起关键调控作用,而其紊乱或过度激活,则导致 HCC 的发生发展^[7-8]。Western blot 和免疫荧光结果均显示与小鼠 13.5 天胚肝共培养后,HepG2 细胞株中 β -Catenin 蛋白含量下降。这说明与小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养可显著抑制 HepG2 细胞株中 β -Catenin 的含量和分布。加入 β -Catenin 抑制剂后,HepG2 细胞株出现明显的形态变化,细胞趋于死亡,采用 Western blot 方法检测蛋白表达,发现抑制 β -Catenin 可减少 HepG2 细胞株以及共培养的 HepG2 细胞株中 AFP 蛋白含量。这说明抑制 β -Catenin 可引起对照组及共培养组 HepG2 细胞株明显的形态变化,减少 AFP 蛋白含量。但是,抑制 β -Catenin 并不能完全模拟小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养的效果。总之,这说明,小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养很可能是主要通过抑制 Wnt/ β -Catenin 信号通路,促使 HepG2 细胞株分化成熟的。

然而,小鼠第 13.5 天胚肝细胞还通过哪些信号通路,及怎样抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化成熟,还需进一步的深入探讨。此外,胚胎发育和免疫形成之间亦是存在紧密的联系^[10]。因此,胚胎诱导分化与免疫治疗之间内在的联系和机制,也需不断探讨揭示^[18]。

总之,本研究揭示,小鼠第 13.5 天胚肝细胞共培养可能主要通过抑制 β -Catenin,诱导 HepG2 细胞株分化成熟。

参考文献:

- [1] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 7.
- [2] Zhang W, Zhang B, Chen XP. Adjuvant treatment strategy after curative resection for hepatocellular carcinoma [J]. Front Med, 2021, 15(2): 155-169.
- [3] 白芸,李永臻,祁艳娟,等. 黄芪多糖联合 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞 EMT 转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 8-15.
- [4] Hendrix MJ, Sefior EA, Sefior RE, et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(4): 246-255.
- [5] Li Y, Liu D, Zong Y, et al. Developmental stage-specific hepatocytes induce maturation of HepG2 cells by rebuilding the regulatory circuit [J]. Mol Med, 2015, 21(1): 285-295.
- [6] Li Y, Zong Y, Xiao Z, et al. Developmental stage-specific embryonic induction of HepG2 cell differentiation [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(4): 1098-1106.
- [7] He S, Tang S. WNT/ β -catenin signaling in the development of liver cancers [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110851.
- [8] Li Q, Sun M, Wang M, et al. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases in hepatocellular carcinoma and its therapeutic application [J]. Cancer Sci, 2021, 112(5): 1695-1706.
- [9] Yang E, Wang X, Gong Z, et al. Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 242.
- [10] Sharma A, Seow JJW, Dutertre CA, et al. Onco-fetal reprogramming of endothelial cells drives immunosuppressive macrophages in hepatocellular carcinoma [J]. Cell, 2020, 183(2): 377-394.
- [11] Rezaiofi A, Vrynas AV, Dehghanian M, et al. Lessons from the embryo: an unrejected transplant and a benign tumor [J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 17(3): 850-861.
- [12] Ngo MT, Jeng HY, Kuo YC, et al. The role of IGF/IGF-1R signaling in hepatocellular carcinomas: stemness-related properties and drug resistance [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1931.
- [13] Wang X, Wang J, Tsui YM, et al. RALYL increases hepatocellular carcinoma stemness by sustaining the mRNA stability of TGF- β 2 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1518.
- [14] Gong T, Zhang C, Ni X, et al. A time-resolved multi-omic atlas of the developing mouse liver [J]. Genome Res, 2020, 30(2): 263-275.
- [15] Wang P, Cong M, Liu T et al. Inhibitory effects of HNF4 α on migration/maltransformation of hepatic progenitors: HNF4 α -overexpressing hepatic progenitors for liver repopulation [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 183.
- [16] Yang G, Zhang M, Zhao Y, et al. HNF-4 α inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation through mir-122-adam17 pathway [J]. PLoS One, 2020, 15(3): e0230450.
- [17] Sferazza G, Corti M, Brusotti G, et al. Nature-derived compounds modulating Wnt/ β -catenin pathway: a preventive and therapeutic opportunity in neoplastic diseases [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10(10): 1814-1834.
- [18] Weinmann A, Galle PR. Role of immunotherapy in the management of hepatocellular carcinoma: current standards and future directions [J]. Curr Oncol, 2020, 27(3): S152-S164.

[收稿日期]2021-06-15

李梦媛,张文龙,杨星九,等. 慢病毒介导的 HNRNPK 下调对肝癌细胞 HepG2 增殖及迁移的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 54-59,115.

Li MY, Zhang WL, Yang XJ, et al. Effect of HNRNPK downregulation mediated by lentivirus infection on HepG2 cell proliferation and migration [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 54-59,115.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 008

慢病毒介导的 HNRNPK 下调对肝癌细胞 HepG2 增殖及迁移的影响

李梦媛, 张文龙, 杨星九, 朱紫薇, 张国新, 魏育敏, 高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家人类疾病动物模型资源库, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 构建慢病毒介导 HNRNPK 下调的 HepG2 细胞稳转株, 研究 HNRNPK 沉默对肝癌细胞增殖与迁移功能的影响。**方法** 以构建的慢病毒感染 HepG2 细胞并筛选阳性细胞获得稳定表达的细胞株, 并检测 HNRNPK 表达效率。通过 CCK-8 法与细胞克隆形成实验研究 HNRNPK 下调对细胞增殖的影响。通过划痕实验与 Transwell 实验研究 HNRNPK 下调对细胞迁移的影响。**结果** 成功构建了慢病毒介导 HNRNPK 沉默的 HepG2 细胞稳转株, HNRNPK 沉默显著抑制了 HepG2 细胞的增殖与迁移能力。**结论** HNRNPK 下调能够在体外抑制 HepG2 细胞的增殖与迁移。

【关键词】 HNRNPK; HepG2; 细胞迁移; 细胞增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0054-06

Effect of HNRNPK downregulation mediated by lentivirus infection on HepG2 cell proliferation and migration

LI Mengyuan, ZHANG Wenlong, YANG Xingjiu, ZHU Ziwei, ZHANG Guoxin, WEI Yumin, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College; National Human Diseases Animal Model Resource Center; NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a HepG2 cell line with downregulated heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK) mediated by lentivirus and study the effects of HNRNPK downregulation on cell proliferation and migration. **Methods** HepG2 cells were infected with packaged lentivirus, and positive cells were selected to obtain stable transgenic cell lines. Then detected expression efficiency of HNRNPK. The effect of HNRNPK downregulation on cell proliferation was detected using cell counting CCK-8 and colony formation assays. The effect of HNRNPK downregulation on cell migration was detected using the wound healing and Transwell assays. **Results** The HepG2 cell line with downregulated HNRNPK mediated by lentivirus infection was successfully constructed. HNRNPK-downregulation inhibited the proliferation and migration of HepG2 liver cells. **Conclusions** HNRNPK-downregulation inhibits the proliferation and migration of HepG2 liver cells *in vitro*.

【Keywords】 HNRNPK; HepG2; cell migration; cell proliferation

【基金项目】首都卫生发展科研专项项目(首发 2021-1G-4271);中央高校基本科研业务费(3332020050)。

【作者简介】李梦媛(1988—),女,主管技师,研究方向:肿瘤学。E-mail:limengyuan767@126.com

【通信作者】高苒(1980—),女,副研究员,硕士生导师,研究方向:肿瘤学。E-mail:gaoran26@hotmail.com

核不均一核糖核蛋白 K (heterogeneous nucleoribonucleoprotein K, HNRNPK) 是一种能够在细胞质和细胞核中穿梭的高度保守的 RNA 结合蛋白,属于 hnRNPKs 家族成员。HNRNPK 在人类基因中广谱表达,能够作用于细胞的转录、翻译、染色体重塑等多种生理功能^[1-2]。HNRNPK 能够参与肿瘤生长和转移等调控,多种肿瘤的形成和发展都与 HNRNPK 密切相关^[1-4]。当前研究显示,HNRNPK 在人肺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌、宫颈癌等多种肿瘤中异常表达,其表达增多通常与恶性肿瘤患者的预后负相关^[3-4]。原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是世界最高发的恶性肿瘤之一,在全球恶性肿瘤发病率中位居第 5 位,其发病机制复杂,死亡率高,且发病率逐年上升^[5]。已有研究证实 HNRNPK 在肝癌组织细胞核中表达上调,并且随着肝癌细胞密度的增加,表达逐渐增强,乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)感染还有可能会促进 HNRNPK 的表达^[6]。目前,HNRNPK 在肝癌发生发展中的分子机制尚未完全明确。本研究构建了通过强力霉素(doxycycline, DOX)诱导系统实现时间可控性 HNRNPK 沉默的 HepG2 细胞稳转株,为研究肝癌发病机制与治疗手段提供了实验工具。

1 材料和方法

1.1 细胞

HepG2 细胞系为本实验室冻存。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂、反转录试剂盒购自 Thermo 公司;SYBR green 荧光染料购自 Toyobo 公司;HNRNPK 抗体、HRP 标记的二抗购自 Abcam 公司;c-Myc、c-Jun 等抗体购自 CST 公司;CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技有限公司;定量 PCR 专用 96 孔板购自 Life 公司;细胞培养板、Transwell 嵌套 24 孔板等购自 Corning 公司。实时荧光定量 PCR 仪和酶标仪购自 BIO RAD 公司;拍照显微镜为 Zeiss Axio Imager Z2 光学显微镜。

PCR 实验所用引物由英潍捷基公司合成。HNRNPK 的 siRNA 序列为 5'-GAGCTTCGATCAAAA TTGA-3',由本实验室设计并提供给吉凯基因进行慢病毒载体的构建。

1.3 实验方法

1.3.1 稳转株的构建

按吉凯基因操作手册进行 HepG2 细胞的转染。将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,18 h 后,加入 MOI = 10 的病毒,8 h 后更换新鲜的培养基。并在 72 h 后,用工作浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素继续筛选 48 h。观察细胞状态,用含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的培养基维持并扩大培养阳性细胞。

1.3.2 HNRNPK 下调的 HepG2 细胞的形态观察

将构建的 HepG2 稳转株细胞接种于细胞培养板,用 DOX 诱导 HNRNPK 下调。48 h 后观察 HNRNPK 下调后 HepG2 细胞的形态。

1.3.3 Real time PCR 检测 HNRNPK 的下调水平

将构建的 HepG2 稳转株细胞接种于 12 孔板,分别用 0、1、2、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 DOX 诱导 HNRNPK 下调。48 h 后,使用 TRIzol 试剂裂解细胞并提取 RNA,并进行反转录。采用 Real-time PCR 检测 HNRNPK mRNA 的相对表达量。HNRNPK 与 GAPDH 基因的上下游引物以及 PCR 反应体系参考本课题组前期研究^[7]。通过 HNRNPK mRNA 的相对表达量确定 DOX 诱导 HepG2 细胞 HNRNPK 下调的最适浓度。

1.3.4 Western blot 检测 HNRNPK 的表达

接种构建的 HepG2 稳转株细胞,通过 DOX 诱导 HNRNPK 下调,48 h 后收集细胞。通过 RIPA 裂解液冰上裂解并提取蛋白,加入 5 $\times$ loading buffer 煮沸制成蛋白样品,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后按 300 mA 恒流转膜 90 min,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h 后,用 HNRNPK 一抗(1:1000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,用 HRP 标记的二抗(1:10000 稀释)室温孵育 1 h,显影检测目的蛋白。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞增殖

于 96 孔板按 3×10^3 个/孔的密度接种稳转株细胞,用 DOX 诱导 HNRNPK 下调。接种当天取 1 组培养上清,加入 CCK-8 试剂(1:100 稀释),按照 CCK-8 检测试剂盒说明书检测 OD450,随后每 24 h 检测 1 次,直至 96 h。

1.3.6 细胞克隆形成实验检测细胞增殖

按 1×10^3 个/孔的密度将稳转株细胞接种于 6 孔板。DOX 诱导 HNRNPK 下调后,在显微镜下观

察克隆大小。待孔中大多数单个克隆中细胞数大于 50 时终止实验,用 4%多聚甲醛固定细胞,洗涤细胞后用 0.1%的结晶紫染色,洗去多余的结晶紫后,在显微镜下观察计算单克隆数并拍照。

1.3.7 划痕实验检测细胞迁移

按 2.5×10^5 个/孔的密度将稳转株细胞接种于 12 孔板。细胞贴壁后用 200 μ L 枪头竖直划线。除去孔中漂浮的细胞,用含 DOX 与 1%胎牛血清的培养基继续培养细胞。在划痕后第 48 h 拍照记录细胞迁移状态。

1.3.8 Transwell 实验检测细胞迁移

将稳转株细胞接种于 6 孔板,用 DOX 诱导 HNRNPk 下调。次日,用胰酶消化重悬细胞,并用无血清培养基离心洗涤两次除去血清,随后用含 DOX 的无血清培养基重悬并制备细胞悬液。在 24 孔板(下室)中加入 500 μ L 含 20%胎牛血清的完全培养基,在 Transwell 小室(上室)中加入含有 DOX 的 150 μ L 细胞悬液。将 Transwell 小室浸入 24 孔板中,继续诱导培养 24 h。除去 Transwell 小室中的培养基,PBS 洗涤后用甲醇于室温固定细胞。用 PBS 洗去多余的甲醇后,用 0.1%的结晶紫染色。最后用 ddH₂O 洗去多余的结晶紫,并用棉签小心除去 Transwell 小室腔内多余的细胞,揭下基底膜固定于载玻片,用中性树脂封片,晾干后在显微镜下观察并计算迁移细胞的数量。

1.3.9 Western blot 检测相关信号通路

检测步骤同 1.3.4,通过 Western blot 方法检测 β -Catenin、c-Myc、c-Jun、MMP7、CCND1、Cyclin-D1 等蛋白的表达。

1.4 统计学方法

通过 GraphPad Prism V.5.0 软件对实验数据进行统计学分析及 *t* 检验,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HNRNPk 沉默不影响 HepG2 细胞的形态

实验结果如图 1 所示,DOX 诱导 HNRNPk 下调后,HepG2 细胞在形态上无明显变化,但与对照病毒组比较,细胞密度稍有不同,可能是增殖能力受到影响,具体差异需进一步实验分析。

2.2 HepG2 稳转株中 HNRNPk 的表达显著下调

实验结果如图 2A 所示,DOX 诱导后 HepG2 稳转株中 HNRNPk mRNA 显著下调。在 DOX 的浓度为 5、10 μ g/mL 时,HNRNPk 均能下调约 60%,且二者之间无显著差异,显示 5 μ g/mL 是 DOX 诱导 HNRNPk 下调的最适浓度。进一步检测 HNRNPk 蛋白水平的表达,如图 2B、图 2C 所示,用工作浓度为 5、10 μ g/mL 的 DOX 诱导细胞,HNRNPk 表达同样下调。

2.3 HNRNPk 下调抑制了 HepG2 细胞的增殖

实验结果如图 3 所示,检测 HepG2 细胞的增殖能力,经统计学分析,与对照组比较,HNRNPk 下调的 HepG2 细胞增殖能力明显减弱,并且单克隆数量明显减少,表明 HNRNPk 下调显著抑制了 HepG2 细胞的增殖。

2.4 HNRNPk 下调抑制了 HepG2 细胞的迁移

实验结果如图 4 所示,通过划痕实验与 Transwell 实验检测 HepG2 细胞的迁移能力,经统计学分析,HNRNPk 下调的 HepG2 细胞的迁移距离明显减小,并且穿过基底膜的细胞数量明显减少,表明 HNRNPk 下调显著抑制了 HepG2 细胞的迁移。

2.5 HNRNPk 下调对 HepG2 细胞增殖与迁移相关的信号通路的抑制

实验结果如图 5 所示,检测稳转株细胞中增殖与迁移相关的信号通路的蛋白表达。HNRNPk 下调后,HepG2 细胞中的 Cyclin-D1、CCND1、 β -Catenin、c-Myc、c-Jun、MMP7 等蛋白表达均降低。

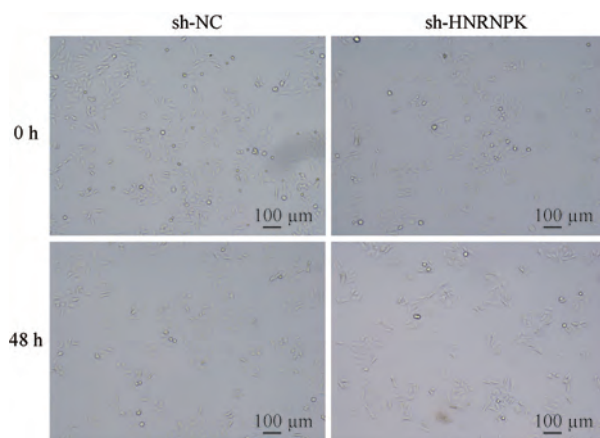
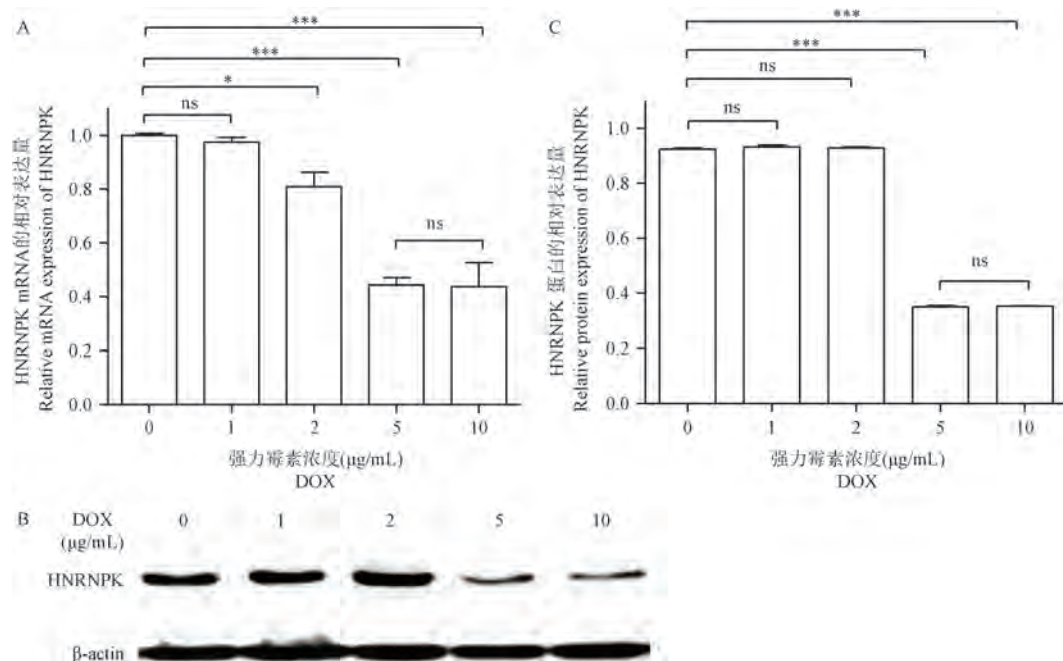


图 1 HNRNPk 下调的 HepG2 细胞形态

Figure 1 Cellular morphology of HepG2 cells after HNRNPk downregulation

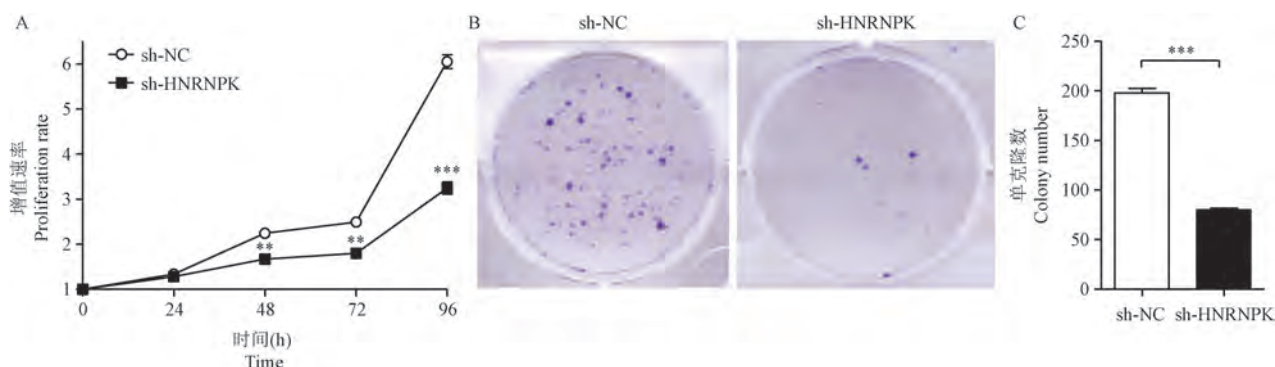


注:A:定量 PCR;B:Western blot;C:HNRNPk 蛋白相对表达量。与对照组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

图 2 不同浓度 DOX 诱导 HNRNPk 下调($n=3$)

Note. A, qPCR. B, Western blot. C, Relative protein expression of HNRNPk. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 2 HNRNPk downregulated by different doses of DOX



注:A:CCK-8 分析实验;B:细胞克隆形成实验;C:单克隆计数。与对照组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 3 HNRNPk 下调抑制 HepG2 细胞的增殖($n=3$)

Note. A, CCK-8 assay. B, Colony formation assay. C, Colony number. Compared with the control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

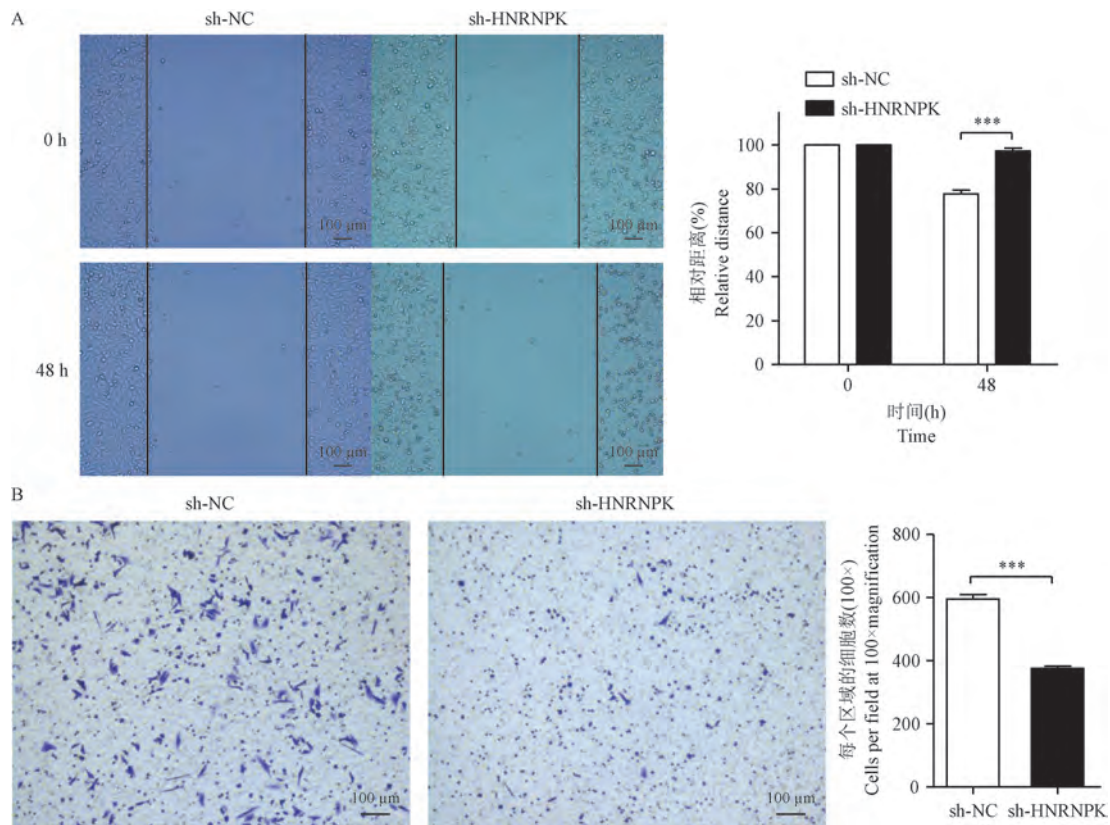
Figure 3 HNRNPk downregulation inhibited the proliferation of HepG2 cells

3 讨论

与正常人比较,HNRNPk 在慢性 HBV 性肝炎、肝炎后肝硬化及乙肝相关性原发性肝癌患者的血清、尿液中表达上调,表明其与乙肝相关性原发性肝癌具有相关性^[8]。并且,HNRNPk 同样在肝癌组织细胞核中表达上调,其表达随着肝癌细胞密度的增加逐渐增强,提示 HNRNPk 的高表达可能与肝癌细胞恶性转化和肿瘤发展密切相关^[6]。长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, lncRNAs) 是 HNRNPk 的主要调节因子,二者相互作用能够调控

基因的转录与翻译^[3]。Qin 等^[9]通过研究证实一种名为 p53 稳定和激活 RNA (p53-stabilizing and activating RNA, PSTAR) 的 lncRNA 能够通过抑制 HNRNPk 的去类泛素化促进 p53 信号传导,从而抑制肝癌细胞的增殖。

Zhang 等^[10]发现 lncRNA CASC11 能够与 HNRNPk 相互作用激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路,继而促进结直肠癌的生长转移。Liu 等^[11]研究证实 Wnt/ β -Catenin 信号通路能够参与 HNRNPk 驱动的头颈鳞癌增殖和迁移抑制过程。Wnt/ β -Catenin 通路在肝脏发育、再生和肝癌发生过程中也起着重要

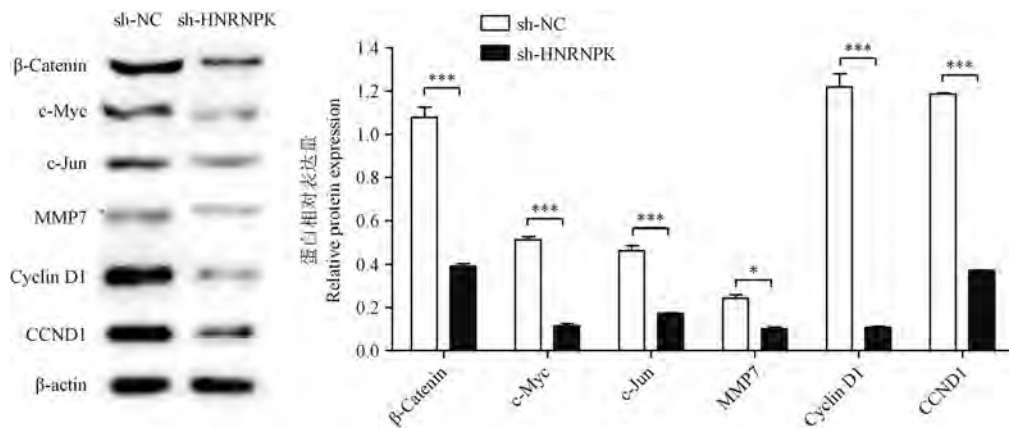


注: A: 划痕实验; B: Transwell 实验。与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 4 HNRNPK 下调抑制 HepG2 细胞的迁移 ($n=3$)

Note. A, Wound healing assay. B, Transwell assay. Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

Figure 4 HNRNPK downregulation inhibited the migration of HepG2 cells



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 HNRNPK 下调抑制 HepG2 细胞增殖与迁移相关的信号通路 ($n=3$)

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

Figure 5 HNRNPK downregulation inhibited related signaling pathways of proliferation and migration in HepG2 cells

作用^[12],已有研究显示激活 Wnt/ β -Catenin 通路能够促进 HepG2 细胞的增殖和迁移,因而该通路的激活能够促进肝癌的发展,是肝癌发生的重要分子机制^[13]。当 Wnt/ β -Catenin 信号通路被激活时,包括 Cyclin-D1、c-Jun、c-Myc 和基质金属蛋白酶 7 (matrix

metalloproteinase 7, MMP7) 在内的下游靶向基因也被异常激活^[14]。MMPs 能降解细胞外基质中的各种蛋白成分、生长因子和细胞表面受体,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,从而被认为是肿瘤浸润转移过程中主要的蛋白水解酶^[15]。HNRNPK 能够激

活 Ras-raf-MARK 信号通路,上调在肿瘤转移中起关键性作用的相关基因,如 MMP3、MMP10 等^[16]。肝癌组织中 β -Catenin 的异常表达通常与 MMP-7 呈正相关^[17]。本实验中,当 HNRNPK 下调时,HepG2 细胞中的 β -Catenin 表达水平也降低,同时其通路下游的 Cyclin-D1、c-Jun、c-Myc、MMP7 表达受到抑制。表明 HNRNPK 的下调抑制了 Wnt/ β -Catenin 通路的激活,因而抑制其下游 MMP7 等一系列调控细胞迁移的靶基因表达,最终导致 HepG2 细胞的迁移受到抑制。此外,已有研究证实 HNRNPK 能够参与细胞周期 G0/G1 期与调控 Cyclin-D1 开关蛋白 2,从而影响膀胱癌细胞增殖和凋亡^[18]。原癌基因 Cyclin-D1 由 CCND1 基因所编码,是一种 G1/S 期特异性周期蛋白。Cyclin-D1 在多种肿瘤中均被发现基因过表达,过表达的 Cyclin-D1 能够导致细胞癌变^[19]。本实验中,HNRNPK 的下调抑制了 CCND1 与 Cyclin-D1 的表达,可能导致细胞周期阻滞,抑制了 HepG2 细胞的增殖。

本实验构建了由 DOX 诱导系统调控 HNRNPK 稳定下调的 HepG2 细胞株,能够实现时间可控性 HNRNPK 表达,为进一步研究 HNRNPK 对肿瘤形成时间以及肿瘤转移的影响及作用机制提供了更便利的条件与良好的实验基础。当前的研究报导显示,虽然 HNRNPK 在多种恶性肿瘤中均显示出异常表达的现象,其不同肿瘤发生发展中发挥的具体作用却不甚相同^[20-22],因此不能单纯地将 HNRNPK 划分为癌基因或抑癌基因。HNRNPK 在肿瘤中发挥的具体生物学功能可能与其和不同蛋白、RNA 相互作用从而参与多种信号通路的调控有关。综上所述,HNRNPK 的下调抑制了肝癌细胞 HepG2 的增殖与迁移,表明 HNRNPK 的异常表达可能促进了肝癌的发展、且对多种肿瘤都有着至关重要的影响,深入研究 HNRNPK 的作用机制可能为临床肿瘤治疗和预后提供新的思路。

参考文献:

- [1] Chen Y, Zeng Y, Xiao Z, et al. Role of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in tumor development [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 14296-14305.
- [2] 张国新, 张文龙, 李梦媛, 等. hnRNPs 家族参与调控肿瘤免疫微环境的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 273-277.
- [3] 杨明, 聂国辉, 柯朝阳. hnRNPK 蛋白功能与肿瘤的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(18): 3605-3610.
- [4] 黄昊, 杨星九, 李梦媛, 等. 异质性胞核糖核蛋白 K 与肿瘤研究的最新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 100-105.
- [5] Jiang X, Tan HY, Teng S, et al. The role of AMP-activated protein kinase as a potential target of treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(5): 647.
- [6] 范薇薇, 余艳婷, 洪毅, 等. 异质性胞核糖核蛋白 K 在肝癌组织及不同密度肝癌细胞中的表达 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(1): 20-23.
- [7] 李梦媛, 杨星九, 张文龙, 等. DOX 调控 HNRNPK 稳定下调的 H1299 细胞株的构建与研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 59-65.
- [8] 侯佳影, 周晓明, 陈晨, 等. 核不均一核糖核蛋白 K(hnRNP K)在慢性肝病不同病理阶段的表达水平 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 665-673.
- [9] Qin G, Tu X, Li H, et al. Long noncoding RNA p53-stabilizing and activating RNA promotes p53 signaling by inhibiting heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K deSUMOylation and suppresses hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2020, 71(1): 112-129.
- [10] Zhang Z, Zhou C, Chang Y, et al. Long non-coding RNA CASC11 interacts with hnRNP-K and activates the WNT/ β -catenin pathway to promote growth and metastasis in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 376(1): 62-73.
- [11] Liu H, Chen X, Yang X, et al. Involvement of the Wnt/ β -Catenin signaling pathway in the heterogenous nuclear ribonucleoprotein K-driven inhibition of proliferation and migration in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncol Lett, 2020, 20(6): 394.
- [12] 杨茂, 邹清亮, 程丽. Wnt- β -catenin 信号在肝脏发育再生和肝癌发生中的作用 [J]. 成都医学院学报, 2020, 15(5): 669-672, 676.
- [13] 李伟, 谢肖俊, 陈胜林, 等. Wnt/ β -Catenin 信号通路在肝癌发生中的分子机制研究 [J]. 中国现代手术学杂志, 2014, 18(1): 3-8.
- [14] Liang S, Zhang S, Wang P, et al. LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/ β -catenin signaling [J]. Gene, 2017, 608: 49-57.
- [15] Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, et al. Matrix metal-loproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2019, 137: 57-83.
- [16] Gao R, Yu Y, Inoue A, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) promotes tumor metastasis by induction of genes involved in extracellular matrix, cell movement, and angiogenesis [J]. J Biol Chem, 2013, 288(21): 15046-15056.
- [17] 王春峰, 张连峰. HBV 相关性肝癌组织中 β -catenin 和基质金属蛋白酶-7 表达及意义 [J]. 医药论坛杂志, 2013, 34(7): 76-77.
- [18] Chen X, Gu P, Xie R, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is associated with poor prognosis and regulates proliferation and apoptosis in bladder cancer [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(7): 1266-1279.

(下转第 115 页)

姜笑雨,刘梦迪,马嘉昕,等. 基于植入式渗透泵经异丙肾上腺素诱导心肌肥厚模型大鼠条件的改进及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 60-67.

Jiang XY, Liu MD, Ma JX, et al. Establishment and evaluation of a cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through a subcutaneously implanted osmotic pump [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 60-67.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 009

基于植入式渗透泵经异丙肾上腺素诱导心肌肥厚 模型大鼠条件的改进及评价

姜笑雨^{1,2}, 刘梦迪^{1,2}, 马嘉昕^{1,2}, 董伟^{1,2,3}, 张旭^{1,2,3}, 张连峰^{1,2,3}, 吕丹^{1,2,3*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; 2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021; 3. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021)

【摘要】 目的 心肌肥厚是一种缓慢发展的有效代偿功能, 是对血流动力学或心肌损伤的适应性反应, 是导致心衰的独立风险因素。已有报道显示, 经异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的心肌肥厚大鼠模型, 其给药途径和诱导剂量差异很大, 模型动物病理表型发展进程不均一。**方法** 综合以往方法的先进性、模型表型的均一性、方法稳定性及复制的难易性等因素, 本文利用皮下植入渗透泵的方式, 采用低剂量长时程给予 ISO (4 mg/kg, 持续 28 d) 诱导构建心肌肥厚大鼠模型, 并利用超声影像、病理组织学染色、免疫荧光染色及 Real-time PCR 等技术对模型表型进行评估。**结果** 模型大鼠病理表型典型。整体表型, 包括增大的心脏体积、心室壁厚度及心重指数; 细胞表型, 包括增大的心肌细胞, 严重的心肌纤维化, 心肌纤维断裂、溶解, 线粒体脊消失、空泡化, 心肌 Z 线、M 线以及闰盘扭曲模糊等; 分子表型, 包括心肌肥厚标志物心房钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 及脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 显著升高。**结论** 本文建立的心肌肥厚大鼠模型, 方法稳定易复制, 表型特征典型, 更适于基因功能分析及相关药物筛选等科学研究。

【关键词】 心肌肥厚; 大鼠; 异丙肾上腺素; 植入式渗透泵

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0060-08

Establishment and evaluation of a cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through a subcutaneously implanted osmotic pump

JIANG Xiaoyu^{1,2}, LIU Mengdi^{1,2}, MA Jiaxin^{1,2}, DONG Wei^{1,2,3}, ZHANG Xu^{1,2,3}, ZHANG Lianfeng^{1,2,3}, LYU Dan^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021. 3. National Human Diseases Animal Model Resource Center, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【基金项目】 北京市自然科学基金 (5212017)。

【作者简介】 姜笑雨 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管疾病相关动物模型创制。E-mail: jiangxiaoyu@cnilas.org

【通信作者】 吕丹 (1980—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 从事心血管相关动物模型创制, 发病机制及基因功能分析。

E-mail: lvd@cnilas.org

【Abstract】 Objective Cardiac hypertrophy (CH) is classified into physiologic and pathological types; it can be induced under chronic stress and is an independent risk factor for heart failure. Previous reports have suggested that drug delivery routes and dosage of isoprenaline (ISO) vary widely. The pathological characteristic of CH animal models varies induced by ISO treatment. **Methods** We established a rat CH model by subcutaneous implantation of an osmotic pump with low dose of ISO and long duration (4 mg/kg, for 28 days). The phenotypes were determined by echocardiography, histopathological observation, immunofluorescence and Real-time PCR. **Results** The pathological phenotypes of rats were typical. The overall phenotypes included markedly increased heart size, heart weight to body weight ratio and heart wall thickness. The cell phenotypes included enlarged cardiomyocytes and severe myocardial fibrosis, myocardial fiber rupture and myolysis, mitochondria ridge disappearance and vacuolation, distortion of the Z-line, M-line and leap disk. The molecular phenotypes including increased expression of ANP and BNP. **Conclusions** The rat model established in this study exhibited typical CH phenotypes. This method is stable and easy to replicate and this model can be used for scientific research such as for gene function analysis and relevant drug screening.

【Keywords】 cardiac hypertrophy; rat; isoproterenol; implantable osmotic pump

心肌肥厚,作为一种适应性效应,通常包括病理性和生理性两种类型,而病理性肥厚是导致心衰的独立风险因素^[1-2]。心肌肥厚的主要特征包括心重指数增大、收缩力增强,这些皆是心脏功能及心肌耗氧量增加后的代偿效应,同时,它可以在某种程度上维持相对正常的心输出量和血液循环功能。所以,心肌肥厚是一个缓慢发展且有效的代偿进程。

尽管心肌肥厚在最初的阶段可以获得心肌功能的代偿性适应效应,但长期的病理性心肌肥厚,可以导致基因调控网络异常,诱发严重的心肌纤维化和心肌功能受损,并最终失代偿发展为心衰,甚至死亡。

动物模型是研究发病机制的重要工具,而目前报道显示,通过手术或者药物皆可诱导建立心肌肥厚动物模型。通过手术诱导,如主动脉缩窄术(transverse aortic constriction, TAC),对操作技术要求较高,需要长期反复的练习,且因手法差异的原因,不同技术员建立的模型,动物表型一致性较差,实验室内数据变异亦较大。利用药物诱导建立心肌肥厚模型,包括异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO),去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和血管紧张素(angiotensin II, AngII)等药物^[3-5],方法简易,但造模剂量及给药方式差异较大,建立的模型动物表型变异范围广。

异丙肾上腺素已广泛应用于临床基础医学研究,包括疾病发病信号机制,疾病的代谢调节调控,生理进程的应激反应等等多种生物进程。其作为非选择性 Beta 激动剂^[6-9],其可诱发心脏骤停已经心肌细胞传导障碍等,在这种情况下,增加处理剂量后,可继而诱发心肌细胞的不可逆转的刺激和损伤,进而引发心肌缺血性损伤^[10-11]。近年来,随着

研究的深入,其在血管内皮生成以及细胞氧化应激损伤方面有了进一步的发现^[7,12]。

ISO 可引起大鼠和小鼠心肌损伤、坏死、纤维化和心室重构。同时,随着心脏功能的下降,可出现许多类似于人类心肌肥大的形态及代谢异常改变。目前,已报道的经 ISO 建立的心肌肥厚动物模型,有多种给药途径,且剂量范围差异亦较大,如大鼠皮下注射 ISO (5 mg/(kg·d), 7 d), 大鼠皮下注射 ISO (1 mg/(kg·d), 10 d), 微量渗透泵皮下植入小鼠 (50 mg/(kg·d), 28 d) 等。此外,上述方法建立的动物模型病理发展进程也存在不均一的问题^[13-16]。目前,心肌肥厚动物模型制备方法还没有统一的标准,尤其是大鼠心肌肥厚模型的制备。

因此,我们通过总结已报道的构建方法,并综合上述方法的先进性、模型表型的均一性,方法的稳定性及复制的难易性等因素。通过皮下植入渗透泵给予 ISO,经低剂量长时程(4 mg/kg, 持续 28 d)诱导建立心肌肥厚大鼠模型,从心脏整体形态及功能改变、心肌细胞显微和超微结构的改变以及分子标志物 3 个水平进行评估,结果显示模型动物间病理表型均一性好,心肌肥厚表型典型。

综上所述,本研究建立的大鼠模型具有典型的心肌肥厚表型,动物表型均一性好、方法稳定且易于复制,更适合于基因功能分析及相关药物筛选等科学研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 7 只(10~12 周龄,体重 250~300 g),由中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心繁育并提供[SCXK

(京)2019-0011],大鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房内[SYXK(京)2019-0014],同时饲养房间,采用每 12 h 进行交替明暗式照明。同时,动物实验中涉及的操作已得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用及管理委员会(IACUC,ZLF18003)的许可认证。

1.2 主要试剂与仪器

异丙肾上腺素(I5627, sigma, 美国);WGA 抗体(W7024, Invitrogen, 美国);磷钨酸(Innochem, 中国);重铬酸钾(Innochem, 中国);TRIzol 试剂(Solarbio, 中国);10%福尔马林(益利, 中国)。小动物超声影像系统(加拿大, Vevo3100);逆转录试剂盒(TaKaRa, PrimeScript RT reagent Kit, 美国);切片扫描机(徕卡 TCS SP2, 德国);干燥仪(泰斯特, 中国);渗透泵(MODEL 2004, ALZET, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 异丙肾上腺素药物处理

选择的渗透泵(MODEL 2004, ALZET)腔体容积为 200 μ L, 泵药容积为 6 μ L/d。配制好的 ISO(I5627, sigma, 药物剂量为 4 mg/(kg · d))注入渗透泵, 随后置入无菌生理盐水中浸泡至少 40 h (37℃)方可使用。对照组渗透泵注入生理盐水, 后续操作相同。

大鼠经异氟烷(1.5%~2.0%)麻醉后, 俯卧位放置于手术台热垫上, 四肢固定, 颈部皮肤经备皮及消毒后, 剪取 1 cm 左右纵向切口, 渗透泵从切口处植入颈部皮下位置。经缝合消毒后, 动物解除麻醉。将动物放置观察笼内, 直至苏醒并恢复正常活动状态, 随后常规饲养, 每日记录动物状态, 于手术后 28 d 时, 对大鼠模型的表型, 包括整体形态和功能, 心肌细胞显微和超微结构的改变以及分子标志物 3 个水平进行评估。

1.3.2 超声影像学检查

大鼠于超声检查前, 需经麻醉(异氟烷, 浓度为 1.5%~2.0%)及备皮(胸前区脱毛, 以降低对超声波的干扰), 动物固定于超声仪自带操作台面上(含加热板, 动物采取仰卧位), 对大鼠的四肢进行固定, 以保持检查全程图像的稳定性。动物麻醉至其呼吸平稳后, 利用 201 探头, 经胸前区长轴和短轴两个切面, 采集灰阶模式和运动模式信号, 经 3100 工作站数据分析系统, 导出超声参数。包括左室内径(收缩末期和舒张模型两个节点);左室容积(收缩

末期和舒张模型两个节点);左心室室壁厚度(收缩末期和舒张模型两个节点)以及左心室收缩功能等多项超声参数。

1.3.3 苏木素伊红染色

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。HE 染色完成后, 将切片扫描成电子文档, 并于专业工作站进行图像分析并截图。

1.3.4 Masson 三原色染色

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。经丽春红染色、磷钨酸分化、亮绿染色后, 随后经脱水透明。染色完成后, 将切片扫描成电子文档, 并于专业工作站进行图像分析并截图。

1.3.5 透射电镜观察

大鼠经安乐死后, 摘取心脏, 经生理盐水清洗, 摘取左室处约 2 mm³ 心肌组织, 置于 2.5%的戊二醛固定液中固定 24 h (4℃)。经饿酸固定、梯度乙醇脱水、环氧丙烷置换, 最后经环氧树脂 Epon812 包埋。经透射电镜观察心肌组织超薄切片结构变化。

1.3.6 免疫荧光观察

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。经抗原修复、Triton-100 穿透、羊血清封闭后, 孵育抗体, 于荧光显微镜下观察并导出图片。

1.3.7 RNA 提取及实时荧光定量分析

大鼠经安乐死后, 摘取心脏, 经生理盐水清洗后, 摘取约 20 mg 心肌组织, 于自动破碎仪及 TRIzol Reagent 裂解后, 经氯仿分层、异丙醇沉淀及乙醇清洗, 即获得总 RNA 提取物。经逆转录获得 cDNA。经 PCR 扩增 (ANP 引物序列, F: 5'-

GAGCCTGCGAAGGTCAAG-3', R: 5'-GTCTGTCCGTGGTGCTGA-3'; BNP 引物序列, F: 5'-TAGCCAGTCTCCAGAACAA-3', R: 5'-AACAACCTCAGCCCGTCA-3'; GAPDH 引物序列, F: 5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3', R: 5'-TGCTGACAATCTTGAGGGA-3'), 鉴定 ANP 及 BNP 的表达情况。

1.4 统计学方法

本文数据采用 GraphPad 软件(版本 Prism 7)统计处理,获得数据表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),间采用 Student's *t* 分析,且 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 模型大鼠心脏整体形态及功能表型评价

通过总结已报道的构建方法,并综合上述方法的先进性、模型表型的均一性、方法稳定性及复制的难易性等因素。我们利用植入式渗透泵给予 ISO,经低剂量长时程(4 mg/kg,持续 28 d)诱导建立了心肌肥厚大鼠模型,并利用超声影像、病理组织学观察、免疫荧光染色及 Real-time PCR 等技术,从心脏整体形态及功能、心肌细胞显微和超微结构以及分子标志物 3 个水平,对模型表型进行评估(图 1)。

首先,超声影像分析显示模型大鼠收缩末期前壁和后壁厚度显著增高(图 2A~2C, LVAWS, $P=0.0327, n=3$; LVPWS, $P=0.0275, n=3$),反映心脏收缩功能的射血分数和短轴缩短率(图 2D~2E,

EF%, $P=0.0206, n=3$; FS%, $P=0.0188, n=3$)亦显著增高,而模型大鼠左室腔内径没有显著改变,这与临床上观察到的心肌肥厚表型一致,即心室壁增厚,心脏收缩功能增强,心室腔减少或不改变。

随后,我们利用病理组织学染色观察模型大鼠心肌组织学改变,首先,通过模型大鼠心脏长轴整体切片的 HE 染色,发现模型大鼠心脏整体增大,心室壁增厚。同时,大体解剖时经心脏湿重获得的心重/体重比显著增高(图 3A~3B, HW/BW, $P=0.0202, n=3$)。这些观察结果与超声影像学观察结果一致。

2.2 模型大鼠心肌显微和超微水平表型评价

我们首先通过 HE 染色,对模型大鼠心肌显微结构形态的改变进行分析,发现模型大鼠心肌纤维发生不均一性肥大,排列紊乱(图 3C)。

随后通过 Masson 染色观察模型大鼠心肌胶原沉积情况,发现模型大鼠纤维化程度显著增高(图 3D~3E, $P<0.0001, n=3$)。

为进一步观察模型大鼠心肌细胞形态并对肥大细胞进行定量分析,我们利用模型大鼠心肌切片进行细胞膜标志物 WGA (Wheat Germ Agglutinin Conjugate) 免疫荧光染色。结果显示模型大鼠心肌细胞不均一性肥大、排列不齐、细胞膜不连续、膜结构破损严重,经心肌细胞横截面积定量分析,显示模型大鼠心肌细胞显著增大(图 4A~4B, $P<0.0001, n=3$)。

随后,我们通过透射电镜观察了模型大鼠心肌组织超微结构形态的改变,我们发现模型大鼠

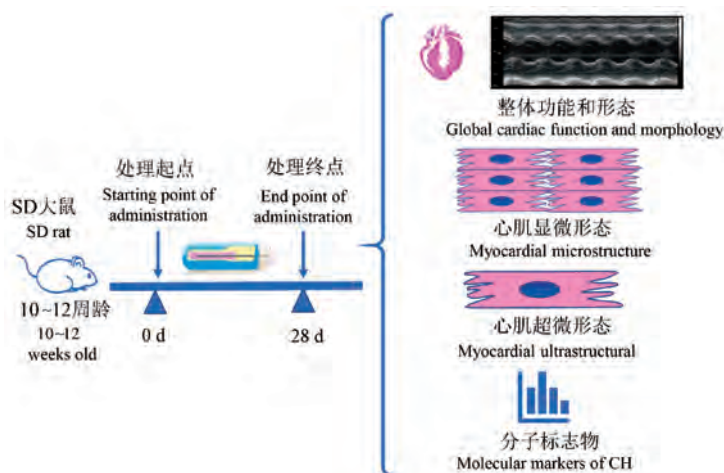
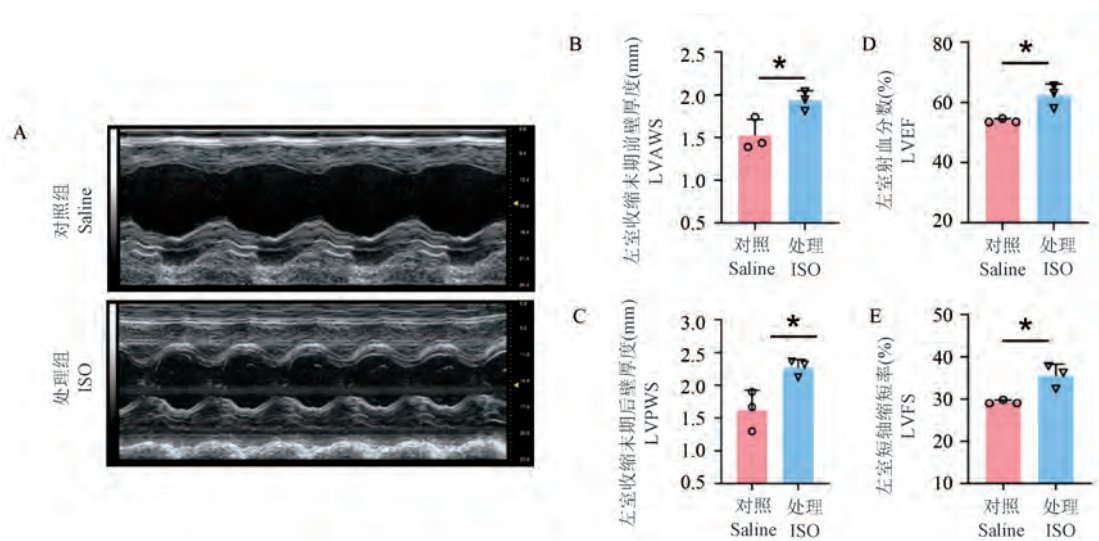


图 1 基于植入式渗透泵经 ISO 诱导心肌肥厚大鼠模型及表型评估流程图

Figure 1 Flow diagram of establishment and evaluation of cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through subcutaneously implanted osmotic pump

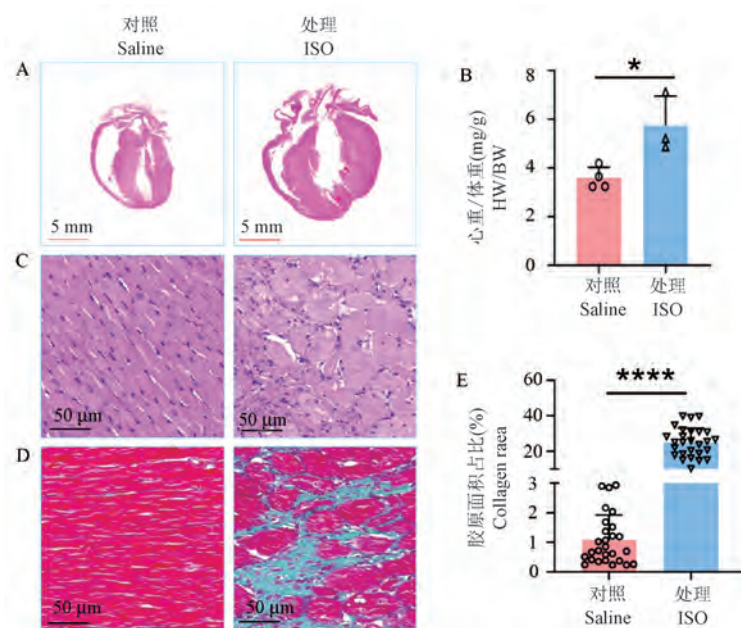


注:A:超声影像分析运动模式截图;B:LVAWS,左室收缩末期前壁厚;C:LVPWS,左室后壁厚(为收缩末期节点);D:LVEF,射血分数(左心室);E:LVFS,短轴缩短率(左心室)。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 对照组与处理组大鼠超声影像分析

Note. A, Typical M-mode screenshot of echocardiography. B, LVAWs, Left ventricular(LV) anterior walls thickness at end-systole. C, LVPWS, LV posterior walls thickness at end-systole. D, LVEF, LV ejection fraction. E, LVFS, LV fraction shortening. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Echocardiographic analysis of rats in control group and treatment group

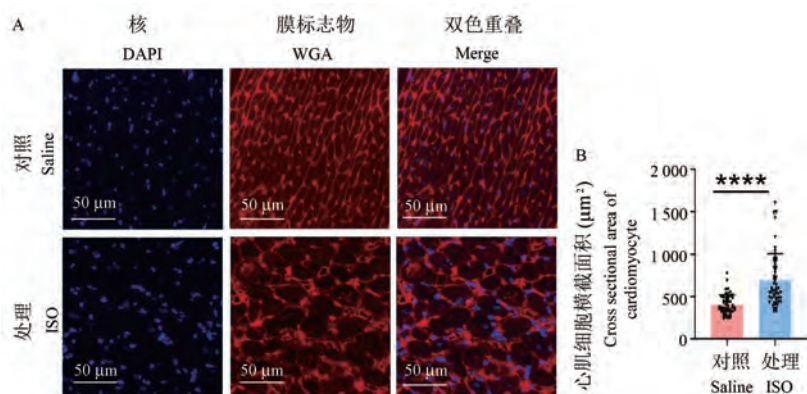


注:A:模型大鼠心脏 HE 染色(为长轴纵向切面);B:模型大鼠心重指数;C:模型大鼠心肌染色后高倍截图(HE 染色);D:模型大鼠心肌组织 Masson 染色;E:模型大鼠心肌胶原面积占比定量分析。 $n = 3$ 只/组, $n = 9$ 视野/只。与对照组比较, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 对照组与处理组大鼠心肌病理组织学检查

Note. A, Whole-heart longitudinal sections with HE staining. B, Ratio of heart weight/body weight. C, Magnification of the whole-heart longitudinal sections with HE staining. D, Magnification of Masson trichrome-stained left ventricle section, myocytes are stained red, and collagen is stained green. E, Quantitative analysis of collagen area. $n = 3$ rats per group and $n = 9$ fields per rat. Compared with control group, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Histological analysis in myocardial of rats in control group and treatment group

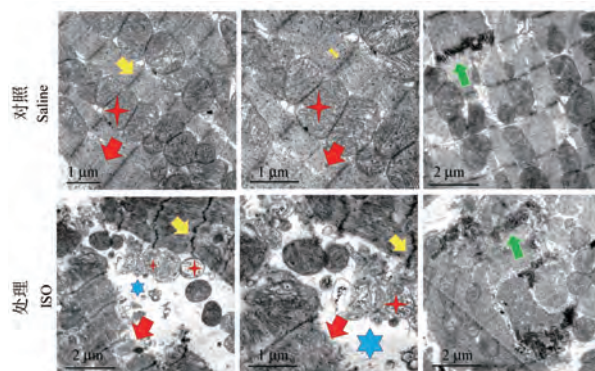


注:A:模型大鼠心肌组织中细胞膜标志物 WGA 免疫荧光染色;B:心肌细胞横截面积定量分析。 $n=3$ 只/组, $n=18$ 视野/只。与对照组比较, **** $P<0.0001$ 。

图 4 对照组与处理组大鼠心肌细胞形态观察及定量分析

Note. A, Immunofluorescence detection of WGA in the heart tissues. B, Quantitative analysis of cross-sectional area of cardiomyocyte. $n=3$ rats per group and $n=18$ fields per rat. Compared with control group, **** $P<0.0001$.

Figure 4 Morphological observation and quantitative analysis of cardiomyocytes in control group and treatment group rats



注:利用透射电镜观察模型大鼠心肌超微结构变化。红色箭头:心肌纤维断裂溶解,排列不齐;蓝色六角星:部分被肌浆网代替;红色四角星:线粒体肿胀;黄色箭头:Z线和M线模糊;绿色箭头:闰盘结构扭曲。

图 5 对照组与处理组大鼠心肌超微结构观察

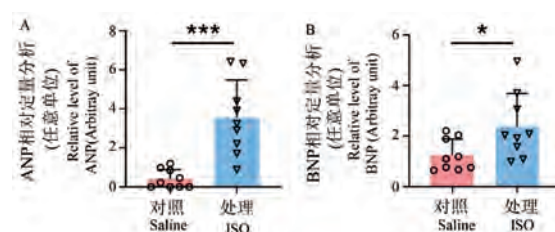
Note. Ultrastructural analysis in left ventricular of heart tissues. Red arrow, Myocardial fiber rupture and myolysis. Blue star, Myocardium was occupied by the sarcoplasmic reticulum. Red star, Mitochondria swelling. Yellow arrow, Ridge smear in the Z-Line and M-line. Green arrow, Leap disk distorted.

Figure 5 Ultrastructural observation of heart tissue in control group and treatment group rats

心肌纤维断裂,部分区域出现心肌溶解,并被肌浆网代替,心肌线粒体出现脊消失,甚至空泡化,心肌Z线、M线以及闰盘出现严重扭曲模糊等(图5)。

2.3 模型大鼠心肌分子水平表型评价

我们随后利用实时荧光定量PCR技术,分析模型大鼠心肌组织内心肌肥厚标志物心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)的表达变化,从而在分子水平,观察模型大鼠心肌肥厚表型。结果显示模型大鼠心肌组织内,这两个分子标志物的表达水平显著增高(图6A~6B, $P<0.001$, $P<0.001$, $n=3$)。



注:利用实时荧光定量PCR分析模型大鼠心肌组织内肥厚标志物,心钠肽(A)和脑钠肽(B)的表达水平。 $n=3$ 只/组, $n=3$ 个重复/只。与对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 6 对照组与处理组大鼠心肌肥厚标志物分析

Note. Quantitative analysis of markers of cardiac hypertrophy, ANP (A) and BNP (B), which determined by Real-time PCR. $n=3$ rats per group and 3 repeats per rat. Compared with control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Level of markers of cardiac hypertrophy from heart tissues in control group and treatment group rats

3 讨论

已有研究报道显示,ISO 作为肾上腺素能激动剂,其可诱发细胞内钙分布紊乱,并导致细胞内钙离子水平异常增高,进而引发心室收缩期缩短耗氧量增大,长期诱导下的心肌细胞可发生缺血性梗死^[17]。同时,其在代谢过程中产生的氧化应激损伤,可继发磷脂的过氧化损伤,对心肌细胞造成损害。研究表明,异丙肾上腺素可引起心肌肥大,心肌纤维化增高,心肌炎症,长期诱导可引起心室重构等不可逆性损伤^[18-22]。

目前,国内外心肌肥厚动物模型应用最广泛的诱导方式,包括手术诱导和药物诱导两种。手术诱导方式对技术人员的要求较高,因技术水平及操作手法差异等因素,不同课题组建立的手术诱导模型,动物表型的一致性较差,实验室间数据变异亦较大。利用药物诱导建立心肌肥厚模型,包括异丙肾上腺素,去甲肾上腺素和血管紧张素等药物^[3-5],虽然诱导方法简易,但造模剂量及给药方式差异极大,同时建立的动物模型表型变异也较大,从急性心肌缺血,心肌肥厚到心肌重度纤维化,建立的动物模型病理表型特点也存在明显差异。如,腹腔注射 ISO(2 mg/(kg·d))连续 10 d 可引起大鼠心肌纤维化^[23],皮下注射 ISO(85 mg/(kg·d))连续 2 d 可诱导大鼠急性心肌缺血^[24],皮下注射 ISO(0.25 mg/(kg·d))7 d 可诱导大鼠心肌肥厚^[25],Chowdhury 等^[26]发现皮下注射 ISO(5 mg/(kg·d))连续 14 d 可诱导心肌肥厚,Ardjmand 等^[27]发现每 24 h 皮下注射 ISO(0.25 mg/(kg·d))连续 2 d 诱导心肌损伤。

总结已报道方法,ISO 药物用量差异大,诱发的病理表型发展变异性大。目前,利用 ISO 诱导建立的包括心肌肥厚在内的多种心血管疾病动物模型,特别是大鼠心肌肥厚模型,尚无统一的标准。

渗透泵给药系统,在疾病机理研究、药物筛选、药理及药物代谢调控等领域应用广泛,被认为是目前较为先进的给药系统之一。该系统依据渗透原理输送靶药物,并且给药速度可控^[28]。渗透泵植入动物皮下,由于泵内渗透压的作用,当达到平衡后,药物以恒定的速率输送到靶部位^[29]。

与传统给药方式相比,可连续给药及给药剂量准确,为该系统的优势。所以模型表型的稳定性和均一性可大大提高。在药物筛选和发病机制研究

中,可以大大减少使用的动物数量,提高动物福利,降低成本,同时,获得的数据离散程度更小,结果更可信。

因此,综合以往方法的先进性、模型表型的均一性,方法稳定性及复制的难易性等因素,我们通过皮下植入渗透泵经 ISO 建立心肌肥厚大鼠模型,并采用低剂量长时程的给药方案。获得的模型表现出典型的心肌肥厚表型,包括整体功能和结构形态,心肌细胞和分子标志物,3 个层面的表型分析。

此外,以往关于 ISO 诱导心肌肥厚模型的报道,主要集中在整体和显微结构层面的变化分析,对其超微结构的观察研究较少。本研究中,我们利用透射电镜技术,发现了明显的超微结构变化,包括心肌纤维紊乱、断裂和肌溶解,肌浆网扩张,线粒体嵴消失和空泡化,Z 线、M 线和闰盘结构的严重扭曲和模糊,这些都为进一步理解心肌肥大的组织学特征提供了证据和线索。

总结以往的报道和我们的研究发现,本文建立的大鼠模型具有典型的心肌肥厚表型,方法稳定且易于复制,更适用于基因功能分析和相关药物筛选等科学研究。

参考文献:

- [1] Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, et al. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis [J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2016, 22: 75-79.
- [2] Deng KQ, Wang A, Ji YX, et al. Suppressor of IKK ϵ is an essential negative regulator of pathological cardiac hypertrophy [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11432.
- [3] Zhao L, Cheng G, Jin R, et al. Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction [J]. *Circ Res*, 2016, 118(12): 1918-1929.
- [4] Gesmundo I, Miragoli M, Carullo P, et al. Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(45): 12033-12038.
- [5] Wang J, Liu Z, Feng X, et al. Tumor suppressor gene ING3 induces cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of AMPK and activation of p38 MAPK signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 562: 22-30.
- [6] Ansari MA, Iqbal A, Ekbal R, et al. Effects of nimodipine, vinpocetine and their combination on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1372-1380.
- [7] Yan YY, Wang ZH, Zhao L, et al. MicroRNA-210 plays a critical role in the angiogenic effect of isoprenaline on human umbilical vein endothelial cells via regulation of noncoding RNAs

- [J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(22): 2676–2682.
- [8] Li JD, Cheng AY, Huo YL, et al. Bilateral renal denervation ameliorates isoproterenol-induced heart failure through downregulation of the brain renin-angiotensin system and inflammation in rat [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016, 35: 62634.
- [9] Ren S, Chang S, Tran A, et al. Implantation of an isoproterenol mini-pump to induce heart failure in mice [J]. J Vis Exp, 2019, 152: 10.
- [10] Al-rasheed NM, Al-rasheed NM, Al-rabeeah DA, et al. Possible protective mechanisms exerted by metformin or metformin and vitamin E in isoproterenol-induced cardiac injury [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(5): 3903–3912.
- [11] Gyongyosi A, Zilinyi R, Czeglédi A, et al. The role of autophagy and death pathways in dose-dependent isoproterenol-induced cardiotoxicity [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(19): 2192–2198.
- [12] Wang J, Li J, Liu J, et al. Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced DNA damage in vascular smooth muscle cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4063–4068.
- [13] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141–151.
- [14] Sun JM, Wang CM, Guo Z, et al. Reduction of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and modulation of myocardial connexin43 by a KATP channel agonist [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1845–1850.
- [15] 伍学翠, 赵云, 李聪, 等. miRNA 在异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚中的表达及生物信息学分析 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(5): 476–480.
- [16] Gao W, Guo N, Zhao S, et al. Carboxypeptidase A4 promotes cardiomyocyte hypertrophy through activating PI3K-AKT-mTOR signaling [J]. Biosci Rep, 2020, 40(5): BSR20200669.
- [17] Grant MKO, Abdelgawad IY, Lewis CA, et al. Lack of sexual dimorphism in a mouse model of isoproterenol-induced cardiac dysfunction [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0232507.
- [18] Patel V, Upananlawar A, Zalawadia R, et al. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 644(1–3): 160–168.
- [19] Sözlmen M, Devrim AK, Kabak YB, et al. The effects of periostin in a rat model of isoproterenol: mediated cardiotoxicity [J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18(2): 142–160.
- [20] Akila P, Vennila L. Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An *in vivo* study [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 208–214.
- [21] Si LY, Kamisah Y, Ramalingam A, et al. Roselle supplementation prevents nicotine-induced vascular endothelial dysfunction and remodelling in rats [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2017, 42(7): 765–772.
- [22] Rona G, Chappel CI, Balazs T, et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat [J]. AMA Arch Pathol, 1959, 67(4): 443–455.
- [23] Zhang W, Chang H, Zhang H, et al. MiR-30e attenuates isoproterenol-induced cardiac fibrosis through suppressing snail/TGF- β signaling [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 70(6): 362–368.
- [24] Zheng P, Liu J, Mai S, et al. Regulation of signal transducer and activator of transcription 3 and apoptotic pathways by betaine attenuates isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2015, 34(5): 538–547.
- [25] Sun R, Zhu B, Xiong K, et al. Senescence as a novel mechanism involved in β -adrenergic receptor mediated cardiac hypertrophy [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182668.
- [26] Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, et al. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats [J]. J Transl Med, 2013, 11: 130.
- [27] Ardjmand A, Shahaboddin ME, Mazoochi T, et al. Ameliorative effects of cerebrolysin against isoproterenol-induced myocardial injury in male rats [J]. Life Sci, 2019, 227: 187–192.
- [28] Chen J, Pan H, Ye T, et al. Recent aspects of osmotic pump systems: functionalization, clinical use and advanced imaging technology [J]. Curr Drug Metab, 2016, 17(3): 279–291.
- [29] Cooper JD, Heppert KE, Davies MI, et al. Evaluation of an osmotic pump for microdialysis sampling in an awake and untethered rat [J]. J Neurosci Methods, 2007, 160(2): 269–275.

[收稿日期] 2021-02-24

张沁丽,王玉芬,刘红,等. 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 68-76.

Zhang QL, Wang YF, Liu H, et al. Effects of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 68-76.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 010

阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响

张沁丽,王玉芬*,刘红,刘博雯

(长治医学院附属和平医院神经内科,山西 长治 046000)

【摘要】 目的 探讨阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎(EAE)小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响。**方法** 采用 MOG35-55 免疫建立 EAE 小鼠模型,小鼠随机分为空白组、模型组、阿托伐他汀组、高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组,每组 6 只,阿托伐他汀每只小鼠每天按 0.5 mL 混悬液灌服,连续 28 d。各组小鼠神经功能评分,采用苏木精-伊红(HE)、固蓝(LFB)染色、透射电镜及免疫组化染色方法检测各组小鼠脊髓组织炎症反应、髓鞘脱失及髓鞘再生情况;酶联免疫吸附法(ELISA)检测小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、一氧化氮(NO)的表达;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测脑组织 RAS 同源基因家族成员 A(RhoA)、Rho 相关蛋白激酶 1(Rock1)蛋白表达;实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测脊髓组织硫酸软骨素蛋白多糖(NG2)、髓鞘碱性蛋白(MBP)及脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 表达。**结果** 与空白组比较,模型组小鼠见较多炎性细胞浸润、发生明显髓鞘改变、部分髓鞘崩解、断裂、脱失;模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量及脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达均明显升高($P<0.01$),脊髓组织 NG2、MBP 蛋白及 mRNA 表达明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组小鼠见极少量炎性细胞浸润、脱髓鞘程度明显好转,明显降低小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量及脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$),明显升高 MBP、NG2 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$);高脂饮食+阿托伐他汀组明显降低小鼠神经功能评分、脑组织 RhoA、Rock1 蛋白表达,明显升高 NG2 mRNA 表达。**结论** 阿托伐他汀能改善 EAE 小鼠炎性细胞浸润及脱髓鞘程度,降低高脂饮食 EAE 小鼠神经功能评分,其中作用机制可能与调节 RhoA/Rock1 通路改善脱髓鞘程度,从而发挥对 EAE 小鼠的治疗作用有关。

【关键词】 自身免疫性脑脊髓炎;髓鞘修复;阿托伐他汀;RhoA/ROCK-1 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0068-09

Effects of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis

ZHANG Qinli, WANG Yufen*, LIU Hong, LIU Bowen

(Department of Neurology, Heping Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of atorvastatin on myelin repair and the RhoA/Rock1 pathway in mice with autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Methods** MOG35-55 immunization was used to establish an EAE mouse model. The mice were randomly divided into the control group, model group, atorvastatin group, high fat diet group

【基金项目】 山西省卫生和计划生育委员会科研课题(2017164)。

【作者简介】 张沁丽(1979—),女,硕士,副主任医师,研究方向:脑血管病、脱髓鞘疾病。E-mail:shengmingkx2020@163.com

【通信作者】 王玉芬(1966—),硕士,主任医师,研究方向:脑血管病。E-mail:3385314799@qq.com

and high fat diet+atorvastatin group ($n=6$ per group). The atorvastatin was administered to each mouse daily by 0.5 mL suspension, for 28 consecutive days. Mice were scored for neurological function and clinical symptoms were observed. Hematoxylin-eosin (HE) staining, Luxol fast blue (LFB) staining, transmission electron microscopy and immunohistochemical staining method were used to detect inflammation and demyelination and remyelination of the spinal cord tissue of each group of mice. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO) in serum was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); protein immunoblotting assay (Western blot) method was used to detect the expression of Ras homologous gene family member A (RhoA) and Rho associated protein kinase 1 (ROCK1) in brain tissue. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of chondroitin sulfate proteoglycan (NG2) and myelin basic protein (MBP) in spinal cord and *RhoA* and *Rock1* mRNA expression in brain tissue. **Results** Compared with the control group, the model group showed more inflammatory cell infiltration, marked demyelination, partial myelination disintegration, breakage and demyelination; TNF- α , IL-6 and NO in serum and the expression of RhoA, Rock1 protein and mRNA in brain tissue were significantly increased, while the expression levels of NG2 and MBP protein and mRNA in spinal cord tissue were significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, the atorvastatin group showed significant improvement in inflammatory cell infiltration and demyelination, significantly decreased TNF- α , IL-6 and NO in serum, expression of RhoA and Rock1 protein and mRNA in brain tissue and increased expression of MBP, NG2 protein and mRNA in brain tissue ($P<0.05$). The high fat diet + atorvastatin group showed significantly decreased neurological function scores, brain tissue RhoA and Rock1 expression and significantly increased NG2 mRNA expression. **Conclusions** Atorvastatin improved inflammatory cell infiltration and demyelination in EAE mice and reduced neurological function scores in EAE mice on a high fat diet. The mechanism of action may be related to the regulation of the RhoA/Rock1 pathway to improve the degree of demyelination and thus exert a therapeutic effect on EAE mice.

【Keywords】 autoimmune encephalomyelitis; myelin repair; atorvastatin; RhoA/ROCK-1 pathway

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是中枢神经系统(central nervous system, CNS)的一种慢性自身免疫性和退行性疾病,其病理改变包括中枢神经系统白质中的多发性脱髓鞘斑块,并伴有反应性胶质增生和轴突损伤^[1]。尽管对 MS 的病因、发病机制和治疗的研究越来越多,但目前对 MS 的治疗方案尚相对有限,MS 仍然是世界范围内的治疗挑战^[2]。虽然 MS 的病因和机制仍不清楚,但神经炎症被证明在 MS 的发生和发展中发挥了关键作用,过度的炎症会导致细胞死亡和组织损伤,如脱髓鞘损伤和轴突损伤^[3]。在成人 CNS 中,受损神经元轴突再生不良的部分原因是髓鞘相关轴突生长抑制剂的存在,如髓鞘相关糖蛋白、Nogo、少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白等,这些抑制剂可以激活 RhoA^[4]。研究表明 RhoA 的激活会导致生长锥的塌陷和轴突生长的抑制,而 RhoA 的失活可以促进受损中枢神经系统的轴突再生和功能恢复,RhoA 的下游效应因子是 Rho 相关激酶(Rock),包括 Rock1 和 Rock2, Rock 活化可促进肌球蛋白轻链磷酸酶的磷酸化^[5]。因此,我们推测 RhoA/Rock 信号通路可能参与自身免疫性脑脊髓炎。他汀类药物是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,广泛用于

降低胆固醇,以减少动脉粥样硬化和心血管发病率^[6]。最近在自身免疫性疾病动物模型中的研究表明,他汀类药物的抗炎和免疫调节特性可能有益于神经退行性疾病的治疗^[7]。目前关于阿托伐他汀在治疗 MS 中的作用机制的研究主要集中在免疫调节方面,关于其是否可通过调节髓鞘修复及 RhoA/Rock 通路来改善 MS 进展的研究尚少。因此,本研究旨在探讨阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘修复及 RhoA/Rock1 通路的影响,以为 MS 的治疗提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选用 30 只 SPF 级 C57BL/6 雌性近交系小鼠,6~8 周,18~20 g,购自成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2020-030],饲养于长治医学院动物实验房[SYXK(晋)2022-0001],饲养条件为室温(24 ± 2)℃的环境中,维持光-暗 12 h 循环交替,并予以充足的饲料和洁净饮水。研究方案经长治医学院实验动物伦理委员会批准(IACUC 2019072A),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 菌株

结核杆菌 H37Ra (批号: RNCC263834) 购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂与仪器

阿托伐他汀 (批号: 20141008) 购自辉瑞制药; MOG35-55 购自西安联美生物, 纯度>95% 杆菌; 百日咳素 (PTX, 批号: C7897)、完全弗氏佐剂 (CFA, 批号: F5881) 购自美国 Sigma 公司; 苏木素染液 (批号: R20568)、伊红染液 (批号: R24044) 购自 yuanye Bio-Technology Co., Ltd (上海); IL-6 (货号: ZC-36404)、TNF- α (货号: ZC-37624)、NO (货号: ZC-S0647) ELISA 试剂盒购自上海茁彩生物; 相关一抗 NG2 (货号: #52635)、MBP (货号: #2396)、RhoA (货号: #2117)、Rock1 (货号: #4035)、生物素化山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: #32935) 购自 CST; RNA TRIzol Reagent (批号: 15596026)、TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (货号: A44662) 购自 ThermoFisher SCIENTIFIC (上海); Western blot 细胞裂解液 (货号: P0013)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0009) 购自上海碧云天生物; ECL 发光试剂盒 (货号: E-IR-R307)、Immobilon-PSQ PVDF 膜 (货号: E-BC-R266) 购自武汉 Elabscience。实时荧光定量 (RT-PCR) 仪 (型号 PIKORed 96) 和全功能酶标仪 MK3 均为美国 ThermoFisher 仪器。

1.3 实验方法

1.3.1 自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型制备及分组

将实验小鼠随机分为 5 组, 空白组、模型组 (实验性自身免疫性脑脊髓炎)、阿托伐他汀组、高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组, 每组 6 只。建模步骤^[8]: 将抗原 MOG35-55 用生理盐水稀释成 5 mg/mL, 并按 1:1 等体积加入 CFA, 加入结核杆菌 H37Ra 使其终浓度为 4 mg/mL, 充分混合乳化。乳化后按每只 0.1 mL 于小鼠脊柱两侧分四点皮下注射, 0、48 h 每只小鼠腹腔注射 0.5 mL PTX (百日咳毒素 500 ng)。空白组以等量生理盐水代替 MOG 多肽, 其余步骤和方法相同。

1.3.2 给药方法

高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组均给予高脂饲料喂养 3 周后开始免疫、干预, 空白组、模型组、阿托伐他汀组给予普通饲料喂养 3 周后开始免疫、干预。阿托伐他汀给药剂量为 8 mg/(kg·d), 将 40 mg 阿托伐他汀溶于 125 mL 的 0.1 mol/L PBS 溶液中形成混悬液, 其终浓度为 0.32 mg/mL。免疫

后第 3 天开始应用小鼠灌胃针每只小鼠每天灌服 0.5 mL 混悬液, 连续 28 d。其中, 高脂饲料配比为: 胆固醇 1%、蛋黄粉 10%、猪油 10%、普通饲料 79%。阿托伐他汀给药剂量参考 Zeyghami 等^[9]的报道。

1.3.3 神经功能评分

采用 Koz 评分法^[10]评估小鼠病情变化, 连续观察直至动物处死, 具体评分标准如下: 0 分: 无症状; 1 分: 尾部失去张力; 2 分: 后肢力弱; 3 分: 后肢瘫痪; 4 分: 后肢及前肢瘫痪; 5 分: 濒临死亡或死亡。

1.3.4 HE 染色和 LFB 染色观察

苏木精-伊红 (HE) 染色: 取小鼠脑脊髓, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 将组织标本放入含 30% 蔗糖的 4% 多聚甲醛中保存, 脑脊髓组织石蜡包埋, 连续切片, 厚度 5 μ m, 用 HE 染色评价炎性细胞浸润情况。并采用双盲法进行炎细胞浸润评分: 0 分, 无炎性细胞浸润; 1 分, 脑膜细胞浸润; 2 分, 血管周细胞浸润最多 4 个小区; 3 分, 血管周细胞浸润 5 个或 5 个以上小区, 和/或 1 个以上大型细胞浸润; 4 分, 大量细胞浸润, 累及 20% 以上的白质。

固蓝 (LFB) 染色: 为了评估脱髓鞘, 切片按上述方法处理, 并用 LFB 染色。将组织切片在 60℃ 的 0.1% LFB 溶液中孵育过夜, 然后在 0.05% 的碳酸锂溶液中进行区分, 以区分白质和灰质, 最后在光学显微镜下观察切片。采用以下评分标准对小鼠的脱髓鞘情况进行双盲法评估: 0 分, 无髓鞘丢失; 1 分, 小范围髓鞘丢失; 2 分, 2 个或 3 个小范围髓鞘丢失; 3 分, 最多 2 个大规模髓鞘丢失; 4 分, 大范围髓鞘丢失, 累及超过 20% 的白质。

1.3.5 ELISA 法检测

按照 ELISA 试剂盒说明操作, 检测小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的表达。

1.3.6 透射电镜观察

取脑组织, 切取胼胝体区域组织, 组织块切成 1 mm³×1 mm³×3 mm³ 大小转入 2.5% 戊二醛固定液中 4℃ 固定 24 h。组织块用 1% 锇酸后固定 2 h, 然后梯度丙酮脱水, 组织块用环氧树脂包被, 切取半薄片 1% 甲苯胺蓝染色后, 超薄切片用醋酸铀酰和柠檬酸铅染色, 在透射电镜下观察中枢神经系统胼胝体区髓鞘超微结构改变。

1.3.7 免疫组织化学染色观察

脑脊髓组织切片脱蜡复水, 用 3% H₂O₂ 室温孵育 30 min, 加正常山羊血清后 37℃ 孵育 30 min, 滴

加一抗(NG2、MBP(1:300))37℃孵育1h。用山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶(1:200)室温孵育2h。用DAB试剂显示阳性细胞,苏木精复染、酒精盐酸分化、脱水、中性树胶封片,显微镜观察,用Image Pro Plus 6.0软件对NG2、MBP进行定量分析。

1.3.8 qRT-PCR 检测

根据制造商的说明,采用TRIzol试剂从脑组织或脊髓组织中提取总RNA,然后对RNA进行量化,将一定量的RNA逆转录成cDNA。随后使用TaKaRa TB Green™ PreMix Ex Taq™的聚合酶链式反应对基因表达水平进行定量,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因表达水平,并用内源性参考GAPDH值进行归一化。本研究使用的引物序列如表1所示。qRT-PCR反应条件为预变性95℃ 30s,变性95℃ 5s,退火55℃ 30s,延伸72℃ 30s,45个循环,记录CT值。

1.3.9 Western blot 分析

脑组织用冷PBS洗涤2次,用添加了蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液从脑组织提取蛋白质,冰上孵育,裂解产物在12000 r/min下离心15 min,收集上清液,并通过BCA蛋白检测试剂盒分析蛋白浓度。然后,将上清液与12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶样品加载缓冲液混合,并转移到PVDF膜(微孔)上,根据制造商的说明,转移的印迹与封闭剂(5%脱脂牛奶在Tris缓冲盐水中)室温封闭2h后,将膜与抗RhoA(1:500)、Rock1(1:500)或 β -actin(1:2500)的抗体在4℃下一起孵育过夜。然后,在摇床上用TBST缓冲液(含0.1%

Tween 20的Tris缓冲液,pH=7.6)和生物素化山羊抗兔IgG抗体孵育2h。使用增强型化学荧光检测试剂盒(ECL)进行显影,使用化学发光成像仪检测化学发光膜的免疫反应性,并通过使用Image-ProPlus分析光密度,以 β -actin为内参,对蛋白进行量化,实验重复3次。

1.4 统计学方法

使用SPSS 22.0软件(IBM Corp.)对数据进行统计分析,数据表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组间比较分析,方差齐性时用LSD检验,方差不齐时用Tamhane's T^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠神经功能评分的影响

与空白组比较,模型组小鼠神经功能评分于给药前、给药15d、给药28d时均明显升高($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组于给药15d和给药28d明显降低神经功能评分,且28d时降低更明显($P<0.05$),见表2。

2.2 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎性脑浸润和脊髓脱髓鞘的影响

空白组:未见明显炎性细胞浸润(炎细胞浸润评分为0分)及未发生脱髓鞘改变(脱髓鞘评分0分)。模型组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见较多炎性细胞浸润,以核呈圆形深染的淋巴细胞为

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

引物 Primer	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
MBP	ACACCCCTTCAAGTTCACCC	GGAAGCCTGGACCACACAG
NG2	TCCAGTCATGCCGAAATCTCAC	TGGTAGGGTCCACGACATGAAG
RhoA	GGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAG	CACAAGATGAGGCACCCAGA
Rock1	GGAAACGCTCCGAGACACTG	CTGGGATTTGCTGAAGGTAAG
GADPH	ATCCCATCACCATCTTCCAG	CCATCACGCCAGTTTTC

表2 各组小鼠神经功能评分

Table 2 Neurological function scores of mice in each group

组别 Groups	给药前 Pre-administration	给药15d Administered 15 d	给药28d Administered 28 d
空白组 Control group	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	3.36 $\pm$ 0.50**	3.56 $\pm$ 0.53**	3.49 $\pm$ 0.72**
阿托伐他汀组 Atorvastatin group	3.34 $\pm$ 0.41	1.83 $\pm$ 0.88 [#]	1.14 $\pm$ 0.02 [#]
高脂饮食组 High fat diet group	3.33 $\pm$ 0.39	2.25 $\pm$ 0.78	2.08 $\pm$ 0.05
高脂饮食阿托伐他汀组 High fat diet + atorvastatin group	3.39 $\pm$ 0.25	1.86 $\pm$ 1.36 [#]	1.52 $\pm$ 0.02 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。

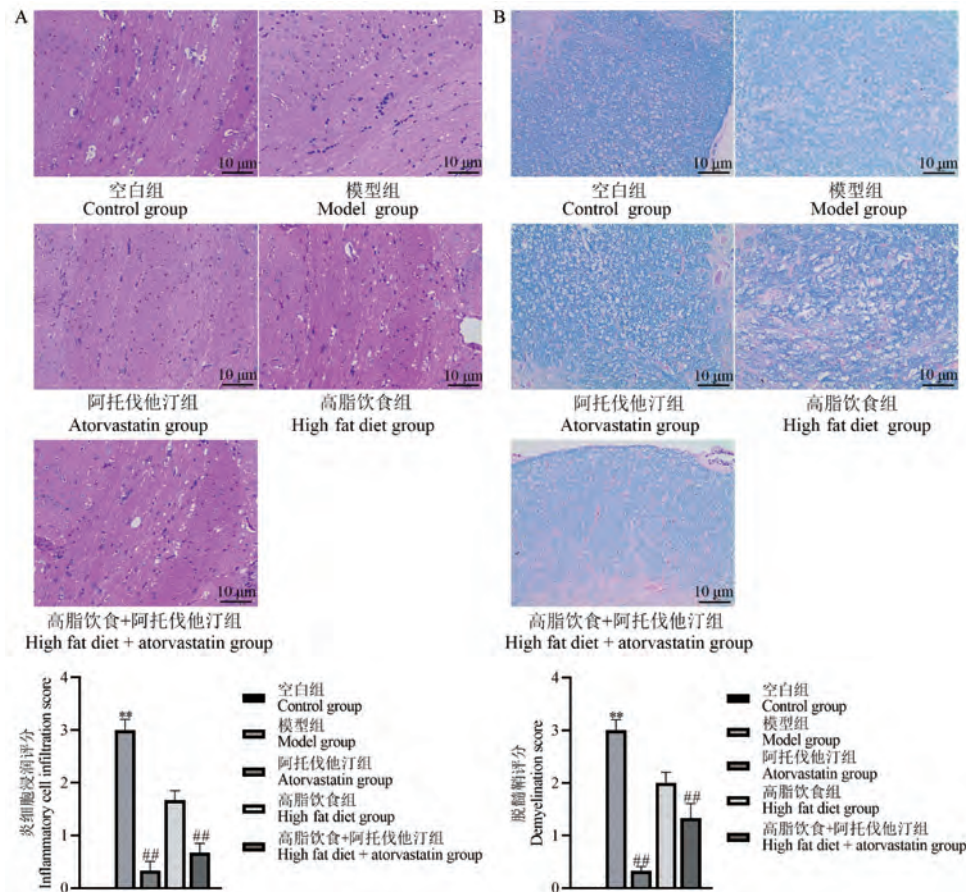
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, [#] $P<0.05$.

主,部分炎性细胞围绕在血管周围;脊髓组织 LFB 染色可见髓鞘蓝染区域的面积显著减少,可见大面积髓鞘脱失后着色为白色的区域,即发生明显脱髓鞘改变。阿托伐他汀组和高脂饮食组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见极少量炎性细胞浸润,以及少量小胶质细胞增生;脱髓鞘程度较模型组好转。高脂饮食+阿托伐他汀组:小鼠脑组织白质区神经纤维束间见少量淋巴细胞浸润,少量小胶质细胞增生;脱髓鞘程度较模型组好转。进一步量化分析,

与模型组比较,阿托伐他汀组、高脂饮食+阿托伐他汀组小鼠炎细胞浸润评分及脱髓鞘评分明显降低 ($P<0.01$) (图 1)。

2.3 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠炎性细胞因子的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量明显升高 ($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀可明显降低小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量 ($P<0.05$),见表 3。



注:A;HE 染色及定量分析;B:LFB 染色及定量分析。与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 1 小鼠炎性脑浸润和脊髓脱髓鞘变化

Note. A, HE staining and quantitative analysis. B, LFB staining and quantitative analysis. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Changes of inflammatory brain infiltration and spinal cord demyelination in mice

表 3 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量

Table 3 Contents of TNF- α , IL-6 and NO in serum of mice in each group

组别 Groups	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	NO (μ mol/L)
空白组 Control group	93.43 $\pm$ 2.29	17.50 $\pm$ 0.88	0.80 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	104.36 $\pm$ 2.50**	20.81 $\pm$ 0.42**	0.91 $\pm$ 0.03**
阿托伐他汀组 Atorvastatin group	97.00 $\pm$ 3.85#	18.14 $\pm$ 0.88#	0.83 $\pm$ 0.02#
高脂饮食组 High fat diet group	102.13 $\pm$ 3.89	19.05 $\pm$ 1.78	0.88 $\pm$ 0.05
高脂饮食+阿托伐他汀组 High fat diet + atorvastatin group	99.39 $\pm$ 4.85	19.68 $\pm$ 1.36	0.86 $\pm$ 0.02

注:与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$ 。

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

2.4 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠髓鞘再生修复的影响

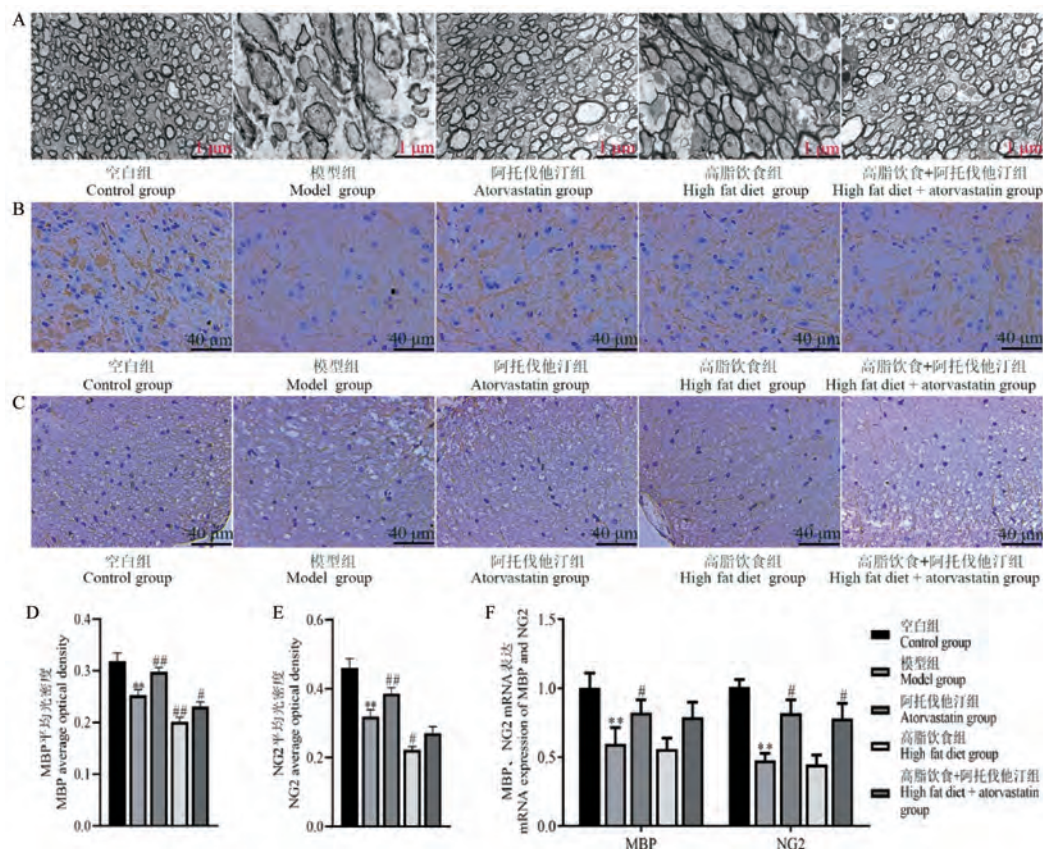
透射电镜观察结果显示,空白组小鼠的轴突间距、髓鞘板层结构正常。模型组髓鞘呈松散的层状结构,排列极为松散,部分髓鞘崩解、断裂、脱失,轴索萎缩变性,结构不清晰。阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组可见髓鞘排列松散,少量髓鞘崩解脱失及轴索萎缩,结构尚清晰。高脂饮食组髓鞘呈松散的层状结构,结构不清晰(图 2A)。免疫组化检测结果显示,模型组较空白组 NG2、MBP 表达明显降低($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀组 NG2、MBP 表达明显升高($P<0.01$)(图 2B~2E)。qRT-PCR 检测表明,与空白组比较,模型组 MBP、NG2 mRNA 表达明显降低($P<0.01$),与模型组比较,阿托伐他汀可明显升高 MBP、NG2 mRNA 表达($P<0.05$)(图 2F)。

2.5 阿托伐他汀对自身免疫性脑脊髓炎小鼠 RhoA/ROCK-1 通路的影响

与空白组比较,模型组小鼠脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 和蛋白表达均明显升高($P<0.01$),与模型组比较,仅阿托伐他汀可明显降低小鼠脑组织 RhoA、Rock1 mRNA 和蛋白表达($P<0.05$),见图 3。

3 讨论

MS 是一种以自身免疫性炎症、脱髓鞘和轴突损伤为特征的中枢神经系统慢性疾病^[11]。文献^[12]显示脂质代谢和炎症途径在许多点相互交叉调节,并通过局部机制参与调节中枢神经系统的神经功能。不仅如此,Mandoj 等^[13]认为与胆固醇异常稳态相关的血栓形成和神经退行性机制可能有助于 MS 进展。Tettey 等^[14]进行的一项前瞻性队列研究亦表明高胆固醇水平对于 MS 患者产生不利影响,

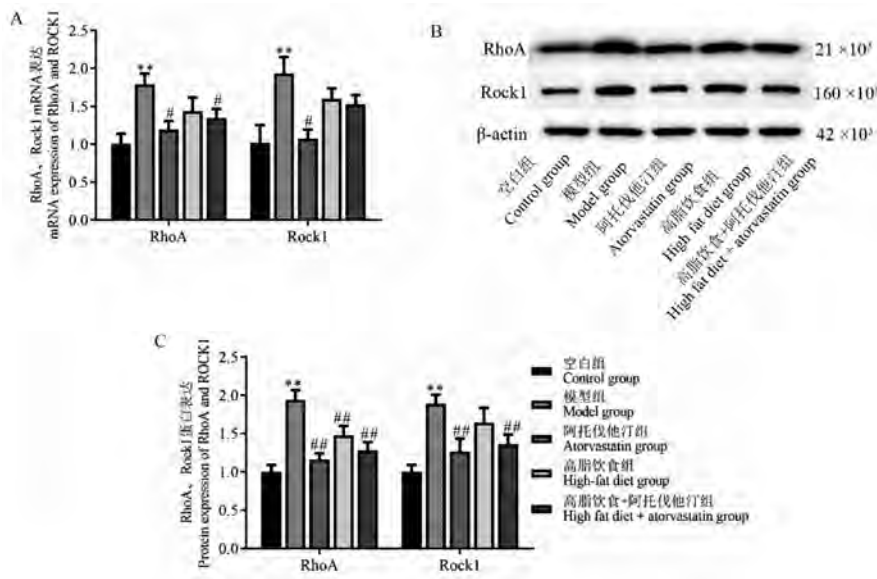


注:A:透射电镜观察;B:MBP 免疫组化染色;C:NG2 免疫组化染色;D:MBP 平均光密度;E:NG2 平均光密度;F:MBP、NG2 mRNA 表达。与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠髓鞘再生修复情况

Note. A, Transmission electron microscope observation. B, MBP immunohistochemical staining. C, NG2 immunohistochemical staining. D, MBP average optical density. E, NG2 average optical density. F, MBP and NG2 mRNA expression. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 Remyelination and repair of mice in each group



注:A:RhoA、Rock1 mRNA 相对表达;B:RhoA、Rock1 蛋白表达条带;C:RhoA、Rock1 蛋白相对表达。与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图3 各组小鼠 RhoA/ROCK-1 通路相关因子的表达

Note. A, RhoA and Rock1 mRNA expression. B, RhoA and Rock1 protein expression bands. C, RhoA and Rock1 protein expression. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Expression of RhoA/ROCK-1 pathway related factors in each group of mice

与残疾及疾病的进展相关。故高脂与 MS 之间存在一定联系。阿托伐他汀作为临床常用的降血脂药物,其安全性已经得到肯定,但目前关于其是否可改善 MS 髓鞘修复及是否可通过调节降脂水平来改善 MS 的研究尚少。EAE 可较好的模拟 MS 临床表现及病理特征,由此,本研究选用 MOC35-55 多肽片段诱导 EAE 小鼠模型作为研究对象,设置阿托伐他汀组的同时设置高脂饮食组、高脂饮食+阿托伐他汀组,观察其对髓鞘再生修复情况以及对 RhoA/Rock-1 通路的影响,为他汀在 MS 治疗中的应用提供更多依据,为 MS 的治疗提供更多契机。

神经炎症是中枢神经系统最基本的保护性反应之一,在许多生理和病理过程中发挥着至关重要的作用^[15]。大脑和脊髓作为一种自我防御机制,可以对损伤产生免疫反应,这些反应包括消除侵袭性病原体,清除受损细胞,促进组织修复^[16]。然而,神经炎症过程是一把双刃剑,在不平衡的条件下,可能导致不同程度的组织损伤和功能障碍^[17]。过度的神经炎症反应已被认为是 MS 的病因之一,控制炎症是该病早期的主要治疗目标^[18]。在 EAE 模型小鼠连续给予阿托伐他汀、高脂饮食+阿托伐他汀后,我们观察到与未治疗的小鼠相比,神经学评分被明显改善,而高脂饮食组小鼠神经学评分未见明

显变化。此外,脑部炎症浸润以及脊髓脱髓鞘程度也有所减轻。EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量明显高于空白组,阿托伐他汀可明显降低 EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量,高脂饮食+阿托伐他汀干预后 EAE 模型小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、NO 的含量无明显变化,但有降低趋势。在正常的中枢神经系统条件下,NO 调节多种生理过程,如血流、免疫反应和突触传递。然而,越来越多的证据表明 iNOS 诱导的高 NO 水平与 MS 的许多病理表现有关^[19]。同样,本实验证实 EAE 模型小鼠的 NO 含量明显升高。根据阿托伐他汀缓解 EAE 症状的功能,阿托伐他汀可下调 NO 的产生,高脂饮食+阿托伐他汀组可下调 NO 的水平,但无明显改善。因此,中枢神经系统抗炎能力的明显提高可能归因于阿托伐他汀的神经保护作用,饲喂高脂饲料的 EAE 小鼠给予阿托伐他汀后 TNF- α 、IL-6、NO 含量较 EAE 模型小鼠有降低趋势,提示阿托伐他汀可能通过降脂改善 MS 病理学特征和促炎因子的表达等。

髓鞘修复被认为是 MS 功能恢复的关键,然而,脱髓鞘给轴突带来了巨大的新陈代谢负担,造成不可逆的损害,导致 MS 的永久性神经缺陷^[20]。MS 的脱髓鞘病变是由神经炎症和自身免疫机制引起

的,然而,中枢神经系统可以在脱髓鞘事件后再生,特别是在 MS 的初期。但随着脱髓鞘攻击次数的增加和时间的延长,再髓鞘形成的效果似乎降低,并导致具有神经症状的损伤^[21]。研究已表明 IFN- γ 诱导的炎症和少突胶质细胞死亡被认为是 MS 病变髓鞘再生不良的主要因素^[22]。EAE 中过多的 IL-1 β 产生会杀死神经元和少突胶质细胞,但也会通过诱导胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 的产生来促进髓鞘再生^[23]。此外 TNF- α 、IL-6 在 EAE 小鼠的脱髓鞘免疫炎症病变中驱动脱髓鞘^[24]。由此,探讨髓鞘修复对于开发抗 MS 进展的恢复性疗法至关重要。NG2 是一种表达在少突胶质前体细胞膜上的糖蛋白,可作为少突胶质前体细胞的特异性细胞标志物^[25]。MBP 是一种具有黏附作用并在髓鞘的形成中起到关键作用的一个重要的髓鞘组成成分^[26],在少突胶质前体细胞分化过程中,有丝分裂后期的少突胶质细胞成熟阶段,髓鞘抗原 MBP 被合成,并在髓鞘外缘形成稳定膜状板层结构,从而保证了髓鞘的完整性^[27]。RhoA/ROCK-1 信号通路是体内普遍存在的信号转导通路,参与细胞的形态发生、粘附、迁移和增殖等多种生物学过程^[28]。在成人中枢神经系统中,受损神经元轴突再生不良的部分原因是髓鞘相关轴突生长抑制剂的存在,如髓鞘相关糖蛋白、Nogo、少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白等,这些抑制剂可以激活 RhoA^[4]。激活的 RhoA 会导致生长锥塌陷和轴突生长抑制,而 RhoA 的失活可以促进受损中枢神经系统的轴突再生和功能恢复,RhoA 的下游效应因子 Rock 活化可促进肌球蛋白轻链磷酸酶的磷酸化^[5]。本研究结果显示,阿托伐他汀组和高脂饮食+阿托伐他汀组可见髓鞘排列松散,少量髓鞘崩解脱失,少量轴索萎缩,结构尚清晰;模型组小鼠较空白组 NG2、MBP 蛋白及 mRNA 表达明显降低,阿托伐他汀可明显升高小鼠 MBP、NG2 蛋白及 mRNA 表达;且模型组小鼠脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达均较空白组明显升高,仅阿托伐他汀可明显降低小鼠脑组织 RhoA、Rock1 蛋白和 mRNA 表达。揭示阿托伐他汀在自身免疫性脱髓鞘疾病中的有效保护作用,可能通过降脂改善 MS 髓鞘崩解。

综上所述,阿托伐他汀明显缓解了 EAE 疾病的进展,促进了 EAE 髓鞘修复,抑制炎症因子的产生,并有降低高脂饮食 EAE 小鼠神经功能评分及髓鞘崩解的作用,是潜在的治疗 MS 的药物,具有新的作

用机制,RhoA/Rock-1 可能是治疗 MS 的一个有前途的治疗靶点。

参考文献:

- [1] 王敏,李作孝. 基于 JAK2/STAT3/SOCS3 信号通路探讨复方甘草酸苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎的防治作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 62-68.
- [2] Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, et al. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment [J]. Brain, 2017, 140(3): 527-546.
- [3] Faber H, Kurtoic D, Krishnamoorthy G, et al. Gene expression in spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis is linked to human multiple sclerosis risk genes [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2165.
- [4] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, et al. MAG and OMGP synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma [J]. J Neurosci, 2010, 30(20): 6825-6837.
- [5] Chen Y, Tian Y. Influence of miR-26b on hepatic cirrhosis and portal pressure in rats with cirrhotic portal hypertension by targeting hENT1 depending on RhoA/ROCK-1 pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(4): 1668-1673.
- [6] Lanzillo R, Moccia M, Russo CV, et al. Therapeutic lag in reducing disability progression in relapsing-remitting multiple sclerosis: 8-year follow-up of two randomized add-on trials with atorvastatin [J]. Mult Scler Relat Disord, 2019, 28: 193-196.
- [7] Ghasami K, Faraji F, Fazeli M, et al. Interferon β -1a and atorvastatin in the treatment of multiple sclerosis [J]. Iran J Immunol, 2016, 13(1): 16-26.
- [8] 刘建春,张红珍,李俊莲,等. 黄芪皂苷对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的神经保护及修复机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6700-6704.
- [9] Zeyghami MA, Hesam E, Khadivar P, et al. Effects of atorvastatin and metformin on development of pentylenetetrazole-induced seizure in mice [J]. Heliyon, 2020, 6(4): e03761.
- [10] 李振飞,聂玲玲,陈丽萍,等. 雷帕霉素通过上调 TGF- β /smad 信号通路减轻小鼠的实验性自身免疫性脑脊髓炎 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(1): 35-42.
- [11] Domínguez-Mozo MI, Nieto-Guerrero A, Pérez-Pérez S, et al. MicroRNAs of human herpesvirus 6A and 6B in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2142.
- [12] Ferreira HB, Melo T, Monteiro A, et al. Serum phospholipidomics reveals altered lipid profile and promising biomarkers in multiple sclerosis [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 697: 108672.
- [13] Mandoj C, Renna R, Plantone D, et al. Anti-annexin antibodies, cholesterol levels and disability in multiple sclerosis [J]. Neurosci Lett, 2015, 606: 156-160.
- [14] Tetley P, Simpson S Jr, Taylor B, et al. An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in

- people with MS [J]. *Mult Scler*, 2014, 20(13): 1737–1744.
- [15] Berglund R, Guerreiro-Cacais AO, Adzemovic MZ, et al. Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(52): 5077.
- [16] Marchese E, Valentini M, Di Sante G, et al. Alternative splicing of neurexins 1–3 is modulated by neuroinflammation in the prefrontal cortex of a murine model of multiple sclerosis [J]. *Exp Neurol*, 2020, 335: 113497.
- [17] Mimouna S, Rollins DA, Shibu G, et al. Transcription cofactor GRIP1 differentially affects myeloid cell-driven neuroinflammation and response to IFN- β therapy [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(1): e20192386.
- [18] Yamamoto S, Sakemoto C, Iwasa K, et al. Ursolic acid treatment suppresses cuprizone-induced demyelination and motor dysfunction via upregulation of IGF-1 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(3): 119–122.
- [19] Teixeira NB, Pico G, Giardini AC, et al. Alterations of peripheral nerve excitability in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model for multiple sclerosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 266.
- [20] Cheli VT, Correale J, Paez PM, et al. Iron metabolism in oligodendrocytes and astrocytes, implications for myelination and remyelination [J]. *ASN Neuro*, 2020, 12: 1759091420962681.
- [21] Matias-Guñu J, Oreja-Guevara C, Matias-Guñu JA, et al. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis [J]. *Neurologia (Engl Ed)*, 2018, 33(3): 177–186.
- [22] Wooliscroft L, Silbermann E, Cameron M, et al. Approaches to remyelination therapies in multiple sclerosis [J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2019, 21(7): 34.
- [23] Duncan GJ, Plemel JR, Assinck P, et al. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(3): 403–422.
- [24] Vallée A, Vallée JN, Guillemin R, et al. Interactions between the canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR gamma on neuroinflammation, demyelination, and remyelination in multiple sclerosis [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(4): 783–795.
- [25] Xing YL, Röth PT, Stratton JA, et al. Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(42): 14128–14146.
- [26] Vincze A, Mázló M, Seress L, et al. A correlative light and electron microscopic study of postnatal myelination in the murine corpus callosum [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(6): 575–584.
- [27] 郑双双, 赵经纬. 复髓鞘机制及其在多发硬化症脱髓鞘模型中的研究进展 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(4): 524–530.
- [28] 吴进福, 周晓慧, 范慧敏, 等. RhoA/ROCK 信号通路在左心疾病致大鼠肺动脉高压模型中的作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 612–616.

〔收稿日期〕2021-03-02

魏抗抗,董伟华,帖红艳,等. 基于 miR-34a/SIRT1 轴研究柚皮素对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 78-85.

Wei KK, Dong WH, Tie HY, et al. The protective effect of naringenin on H_2O_2 -induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial cells via the miR-34a/SIRT1 axis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 78-85.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 011

基于 miR-34a/SIRT1 轴研究柚皮素对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞氧化损伤的保护作用

魏抗抗^{1*}, 董伟华¹, 帖红艳², 何章彪¹, 赵琳¹

(1. 商丘医学高等专科学校五官科教研室, 河南 商丘 476006;

2. 郑州大学基础医学院人体解剖学教研室, 郑州 450001)

【摘要】 目的 基于 miR-34a/沉默信息调节因子 1(SIRT1)轴探讨柚皮素对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞(RPE)氧化损伤的保护作用。**方法** MTT 法检测不同浓度的柚皮素对 H_2O_2 诱导的人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 存活率的影响以选取适宜柚皮素浓度为后续实验浓度。取对数期生长的 ARPE-19 细胞分为对照组、 H_2O_2 组(200 $\mu\text{mol/L}$)、20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组、20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组、20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组。采用 RT-qPCR 检测细胞中 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 的表达,MTT 法及 Annexin V-FITC/PI 双染分别检测细胞存活与凋亡情况,荧光探针检测细胞内 ROS 水平,生化法检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平,并采用 JC-1 法检测线粒体膜电位(MMP),Western blot 检测 SIRT1 及 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达。**结果** 与对照组相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞中 miR-34a 表达、ARPE-19 细胞凋亡率、ROS、MDA 含量、Bax 和 Caspase-3 表达显著升高($P<0.05$),SIRT1 mRNA 表达、ARPE-19 细胞存活率、SOD、GSH 含量、MMP 水平、SIRT1 和 Bcl-2 表达显著降低($P<0.05$);与 H_2O_2 相比,柚皮素可改善 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞损伤,下调 miR-34a 表达,降低 ROS、MDA、Bax 和 Caspase-3 含量($P<0.05$),上调 SIRT1、MMP、Bcl-2 表达,增加 GSH、SOD 活性($P<0.05$);上调 ARPE-19 细胞 miR-34a 的表达,可逆转柚皮素对 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化损伤的保护作用。**结论** 柚皮素可能通过下调 miR-34a,促进 SIRT1 的表达,抑制 RPE 细胞凋亡,保护 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化损伤。

【关键词】 柚皮素;视网膜色素上皮细胞;氧化损伤;miR-34a;沉默信息调节因子 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0078-08

The protective effect of naringenin on H_2O_2 -induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial cells via the miR-34a/SIRT1 axis

WEI Kangkang^{1*}, DONG Weihua¹, TIE Hongyan², HE Zhangbiao¹, ZHAO Lin¹

(1. Department of Otolaryngology, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476006, China.

2. Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of naringenin on H_2O_2 -induced oxidative damage of human retinal pigment epithelial (RPE) cells via the miR-34a/silent information regulator 1 (SIRT1) axis. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of naringenin at different concentrations on the survival rate of ARPE-19 cells treated with H_2O_2 , and the appropriate naringenin concentration for subsequent experiments was identified. ARPE-19 cells

【基金项目】 2016 年度河南省医学科技攻关计划项目(201602105)。

【作者简介】 魏抗抗(1985—),女,本科,讲师,研究方向:眼科疾病诊断及教学。E-mail: wkk29491871@163.com

in logarithmic phase were divided into the control group, H_2O_2 group (200 $\mu\text{mol/L}$), 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin group, 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin+mimics NC group and 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin+miR-34a mimics group. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-34a and SIRT1 mRNA, MTT assay and Annexin V-FITC/PI double staining were used to detect cell survival and apoptosis, respectively. A fluorescence probe was used to detect the level of ROS, and a biochemical method was used to detect the activity of SOD and levels of MDA and GSH. JC-1 method was used to detect the mitochondrial membrane potential (MMP), and Western blot was used to detect the proteins expression of SIRT1 and Bcl-2, Bax and Caspase-3. **Results** The expression of miR-34a, apoptosis rate, contents of ROS and MDA and expression of Bax and Caspase-3 in ARPE-19 cells were significantly increased in the H_2O_2 group compared with those in the control group ($P < 0.05$). The expression of SIRT1 mRNA, survival rate of APRE-19 cells, contents of SOD and GSH, level of MMP, expression of SIRT1 and Bcl-2 were significantly decreased in the H_2O_2 group compared with those in the control group ($P < 0.05$). Naringenin improved the damage of ARPE-19 cells induced by H_2O_2 , down-regulated the expression of miR-34a, decreased the contents of ROS, MDA, Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$), up-regulated the expression of SIRT1, MMP and Bcl-2 and increased the activities of GSH and SOD compared with effects in the H_2O_2 group ($P < 0.05$). Up-regulation of miR-34a expression in ARPE-19 cells reversed the protective effect of naringenin on H_2O_2 -induced oxidative damage in RPE cells. **Conclusions** Naringenin down-regulates miR-34a, promotes the expression of SIRT1, inhibits the apoptosis of RPE cells and protects RPE cells from oxidative damage induced by H_2O_2 .

【Keywords】 naringenin; retinal pigment epithelial cells; oxidative damage; miR-34a; silence information regulator 1

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一种累进性和变性性眼病, 会影响视网膜的黄斑区域, 是导致老年人严重和永久性视力障碍及失明的常见原因^[1]。AMD 发生率较高, 据估计全球范围内 AMD 的人数到 2040 年将增加到 3 亿^[2], 严重影响患者的生活质量, 也给经济造成沉重负担。AMD 的主要表现为视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial cells, RPE) 对视细胞外节盘膜吞噬消化能力降低, 导致未被完全消化的盘膜残余小体存在, 形成玻璃膜疣, 从而导致视力受损甚至失明^[3]。虽然 AMD 的发病机制尚未完全了解, 但 RPE 功能障碍在 AMD 的进展中发挥中心作用^[4-6]。

据报道, miR-34a 在调节细胞增殖、迁移、分化和凋亡中至关重要, 可抑制 RPE 细胞的增殖和迁移^[7]; miR-34a 的调节功能与年龄相关性疾病 (包括 AMD) 中的沉默信息调节因子 1 (silence information regulator 1, SIRT1) 有关, 研究显示 miR-34a 的显著上调, 可导致细胞中 SIRT1 表达降低, 使 ARPE-19 细胞对氧化应激的耐受性降低^[8]。氧化应激在 AMD 的发展进程中起关键作用, 抗氧化系统组分活性与 AMD 的严重程度有关, 补充抗氧化剂可以保护 RPE 免受氧化应激损伤, 可预防或治疗 AMD^[9]。柚皮素是一类黄酮类化合物, 在柑橘类物种中含量丰富, 具有强大的抗炎^[10] 和抗氧化活性^[11]。研究

发现柚皮素可抑制视网膜组织神经节细胞凋亡, 降低糖尿病视网膜病变大鼠氧化应激损伤^[12]; 然而, 目前尚不清楚柚皮素是否可以预防 AMD, 且柚皮素在氧化应激诱导的 RPE 损伤中的作用尚未可知。为此, 本研究采用 H_2O_2 诱导人 RPE 氧化损伤, 初步探讨柚皮素能否通过调控 miR-34a 减轻 RPE 氧化应激损伤。

1 材料和方法

1.1 细胞

人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 (ATCC) 购自上海青旗生物科技发展有限公司, 货号: BFN60807591。

1.2 主要试剂与仪器

柚皮素 ($\geq 95\%$, 货号: 67604-48-2)、过氧化氢 (H_2O_2 , $\geq 98\%$, 货号: 247079-84-1) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; miR-34a 模拟物 (mimics) 和阴性对照 (NC) 购自上海 GenePharma 公司; TRIzol RNA 分离试剂 (日本 TaKaRa, 货号: 9108-1); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (日本 TaKaRa, 货号: HRR041A-1); PCR 引物的设计合成由美国赛默飞世尔科技公司完成; Lipofectamine 2000 (11668019) 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 货号: 16000044、10569-044、25200056), MTT、BCA、JC-1

法线粒体膜电位检测及 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、RIPA 裂解液均购自碧云天生物科技公司(碧云天生物科技公司,货号:C0009 S、P0010、C2006、C1062 L、P0013B);活性氧(ROS)检测试剂盒 DCFH-DA(北京索莱宝科技有限公司,货号:CA1410-500);WST-1 法超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、TBA 法丙二醛(malondialdehyde, MDA)及微板法还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A001-3-2、A003-1-2、A006-2-1);兔抗人 SIRT1(ab32441)、Bcl-2(ab32124)、Bax(ab182733)、Caspase-3(ab32150)、 β -actin(ab8227)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP)(ab205718)购自英国 abcam 公司。

细胞培养箱购于美国赛默飞世尔科技公司;IX73 倒置荧光显微镜购于日本奥林巴斯公司;ABI Prism[®] 7300 型荧光定量 PCR 仪购于美国应用生物系统公司;BD FACSCanto II 流式细胞仪、iMark680 多功能酶标仪及蛋白转膜装置均来于美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 柚皮素浓度的筛选

ARPE-19 细胞置于 DMEM 培养基(100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素及 10% 胎牛血清)中培养,条件为 37℃,5% CO₂。取对数期生长的 ARPE-19 细胞,以 6×10^3 细胞/孔的浓度接种到 96 孔板中,待细胞贴壁后,向培养基中添加不同浓度(0、5、10、20、40 μ g/mL)的柚皮素预处理 24 h,然后用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h,每个浓度设置 6 个复孔。在 37℃ 的 5% CO₂ 中继续培养,随后将 MTT 溶液(5 mg/mL,20 μ L)在 12、24、48 h 时加入各孔并孵育 4 h,吸去上层清液后每孔加入 150 μ L 的 DMSO,490 nm 波长处测定各孔吸光度(OD),计算细胞存活率。选取可增加 ARPE-19 细胞活性的柚皮素浓度为后续实验浓度。细胞存活率=(用药组 OD 值-调零孔的 OD 值)/(对照组 OD 值-调零孔的 OD 值)×100%。

1.3.2 实验分组及转染

将对数期生长的 ARPE-19 细胞分成 5 个处理组:(1)对照组:未经处理的 ARPE-19 细胞;(2)H₂O₂ 组:ARPE-19 细胞用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12

h^[3];(3)20 μ g/mL 柚皮素组:ARPE-19 细胞用 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h;(4)20 μ g/mL 柚皮素 + NC 组:用 Lipofectamine 2000 将 100 nmol/L miR-34a 阴性对照(NC)转染 ARPE-19 细胞,转染 24 h 后,给予 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h;(5)20 μ g/mL 柚皮素 + miR-34a mimics 组:用 Lipofectamine 2000 将 100 nmol/L miR-34a mimics 转染 ARPE-19 细胞,转染 24 h 后,给予 20 μ g/mL 柚皮素预处理 24 h,再用 200 μ mol/L H₂O₂ 处理 12 h。在 37℃ 的 5% CO₂ 中继续培养 48 h。

1.3.3 RT-qPCR 检测 mRNA

48 h 后从培养 ARPE-19 细胞中提取总 RNA,后反转录为 cDNA 并扩增。20 μ L 反应体系:cDNA (200 ng/ μ L)2 μ L,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×)10 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,ddH₂O 7.2 μ L。反应条件:40 个循环,先预变性 10 min(94℃),后变性 15 s(95℃),随后退火 20 s(60℃),最后延伸 20 s(75℃)。相对 miR-34a(对照 U6)和 SIRT1 mRNA(对照 GAPDH)的表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算,引物序列见表 1。

1.3.4 MTT 法检测细胞活力

对数期生长 ARPE-19 细胞接种到 96 孔板,浓度 6×10^3 细胞/孔,按照 1.3.2 项步骤处理,48 h 后每孔中加入 20 μ L 的 MTT 溶液(5 mg/mL),于培养箱中孵育 4 h,吸去上层清液后加入 150 μ L 的 DMSO,各孔吸光度(OD)在 490 nm 波长处测定,计算细胞存活率。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数期生长的 ARPE-19 细胞,按照 1.3.2 项步骤处理,将培养的 ARPE-19 细胞用 0.25% 胰蛋白酶进行消化处理,离心,去除上层清液,PBS 洗涤,随后将细胞重悬,密度为每毫升 1×10^6 细胞,避光孵育

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
miR-34a	F:5'-GCCCTGGCAGTGTCTTAG-3'
	R:5'-CAGTGCCTGTCGTGGAGT-3'
U6	F:5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
	R:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
SIRT1	F:5'-GGAGGAGCTGGATTTTGGGACTGAT-3'
	R:5'-GGTGGAACAATTCCTGTACCTGCACA-3'
GAPDH	F:5'-GAGTCAACGGATTTGGTCTG-3'
	R:5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

15 min(需加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L PI), 细胞凋亡率用流式细胞仪分析并依步骤操作。

1.3.6 荧光探针检测细胞内 ROS 水平

取对数期生长的 ARPE-19 细胞,按照 1.3.2 项步骤处理,ARPE-19 细胞用 PBS 洗涤 3 次,与 10 mmol/L 的 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)于 37℃ 避光孵育 30 min。后用酶标仪检测二氯荧光素(DCF)荧光(激发波长 488 nm、发射波长 525 nm),其荧光强度代表 ROS 水平。

1.3.7 生化法检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平

按照 1.3.2 项步骤处理 ARPE-19 细胞,收集细胞培养上清液,按照试剂盒说明书的操作检测 SOD 活性、MDA 和 GSH 水平。

1.3.8 JC-1 法检测线粒体膜电位(MMP)

按照线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1 法)说明书步骤进行染色。按照 1.3.2 项步骤处理,向每孔加入 JC-1(DMSO 溶解为浓度 5 mg/mL),使终浓度为 10 μ g/mL,于培养箱中避光孵育 20 min,将 96 孔板置于多功能荧光酶标仪检测荧光值,激发光为 488 nm,发射光为 530 nm 时(绿色荧光,检测 JC-1 单体)的荧光值为 A1;激发光为 529 nm,发射光为 590 nm 时(红色荧光,检测 JC-1 聚合物)的荧光值为 A2。各组的荧光值 $A = A2/A1$,最终以相对荧光值对 MMP 进行定量分析。相对荧光值 = 实验组 A/对照组 A。

1.3.9 Western blot 检测 SIRT1 和凋亡相关蛋白表达

使用 RIPA 裂解液提取 ARPE-19 细胞中蛋白质

并测定蛋白浓度(BCA 法),随后取等量蛋白质样品上样,每条泳道 30 μ g/泳道,SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜封闭,加入一抗 SIRT1、Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin(1 : 1000),孵育过夜(4℃)后加入二抗(1 : 5000),室温孵育 1 h,ECL 显色。内参均为 β -actin,并计算目的条带相对表达水平。

1.4 统计学方法

SPSS 22.0 和 Image-Pro Plus 分析数据。平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单向方差分析(ANOVA)和 Tukey 事后检验比较多组测量数据之间的差异。以上所有实验均重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

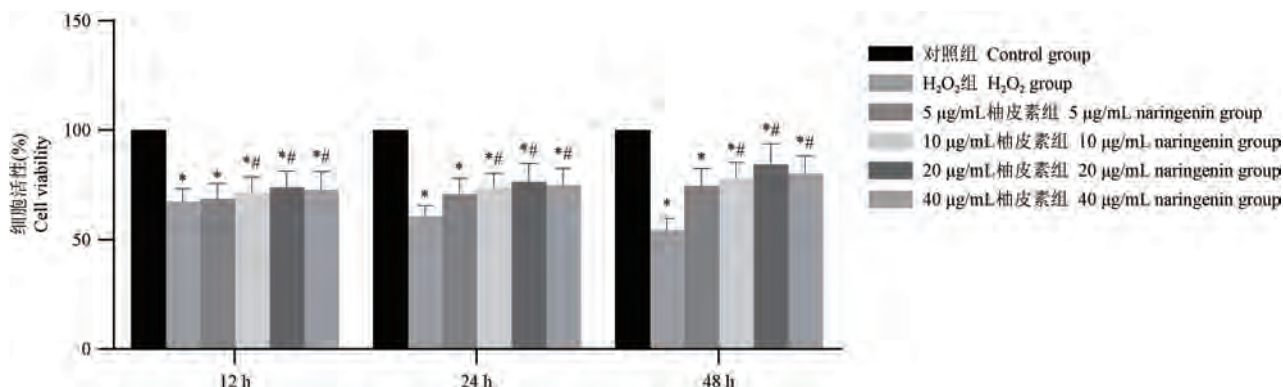
2 结果

2.1 柚皮素的浓度筛选

MTT 结果显示,柚皮素在浓度为 10、20 μ g/mL 时培养 48 h 后可显著提高 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞活力($P < 0.05$),且浓度为 20 μ g/mL 时对 ARPE-19 细胞活力的促进作用优于 10 μ g/mL,而 40 μ g/mL 柚皮素处理的细胞活性较 20 μ g/mL 柚皮素明显降低,见图 1;因此选择 20 μ g/mL 柚皮素为后续实验药物干预浓度。

2.2 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 表达的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 miR-34a 表达明显升高,而 SIRT1 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$);与 H_2O_2 组相比,20 μ g/mL 柚皮素组和 20 μ g/mL 柚皮素+mimics NC 组细胞中 miR-34a 表达明显降低,



注:与对照组比,* $P < 0.05$;与 H_2O_2 组比,# $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度的柚皮素对细胞活性的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the H_2O_2 group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Effects of naringenin at different concentrations on cell viability

SIRT1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组细胞中 miR-34a 表达明显升高, SIRT1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞活力的作用

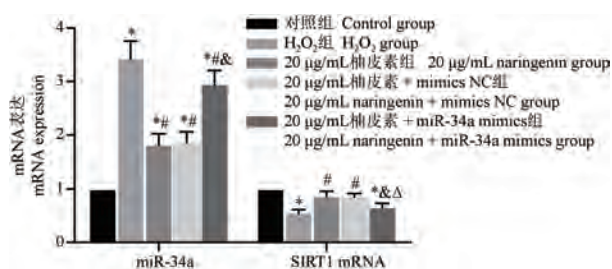
与对照组相比, H_2O_2 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞凋亡的作用

与对照组 (3.28±0.41)% 相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞凋亡率 (17.85±1.23)% 明显升高 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 (9.63±0.95)% 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组 (10.07±1.03)% 细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组 (14.86±1.17)% 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞内 ROS、SOD、MDA 和 GSH 含量的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞内 ROS、



注: 与对照组比, * $P < 0.05$; 与 H_2O_2 组比, # $P < 0.05$;

与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组比, & $P < 0.05$ 。下同。

图 2 各组细胞中 miR-34a 和 SIRT1 mRNA 的表达

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$. Compared with the H_2O_2 group, # $P < 0.05$. Compared with the 20 $\mu\text{g/mL}$ naringenin group, & $P < 0.05$. The same as below.

Figure 2 Expression of miR-34a and SIRT1 mRNA in each group

MDA 含量明显升高, SOD、GSH 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组细胞内 ROS、MDA 含量明显降低, SOD、GSH 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组细胞内 ROS、MDA 含量明显升高, SOD、GSH 含量明显降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.6 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 MMP 的作用

与对照组 (1.00±0.00) 相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞内 MMP 水平 (0.45±0.05) 明显降低 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 (0.83±0.07) 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组 (0.85±0.08) 细胞内 MMP 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组 (0.69±0.06) 细胞内 MMP 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 6。

2.7 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞 SIRT1 和凋亡相关蛋白表达的作用

与对照组相比, H_2O_2 组 ARPE-19 细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显降低, 而 Bax、Caspase-3 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组和 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+mimics NC 组细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显升高, 而 Bax、Caspase-3 表达明显降低 ($P < 0.05$); 与 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组相比, 20 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素+miR-34a mimics 组细胞 SIRT1、Bcl-2 表达明显降低, 而 Bax、Caspase-3 表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 7。

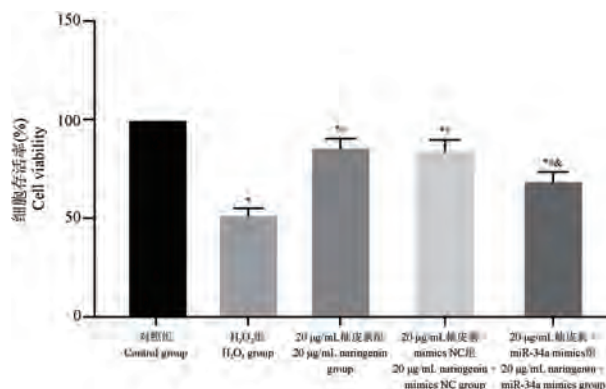
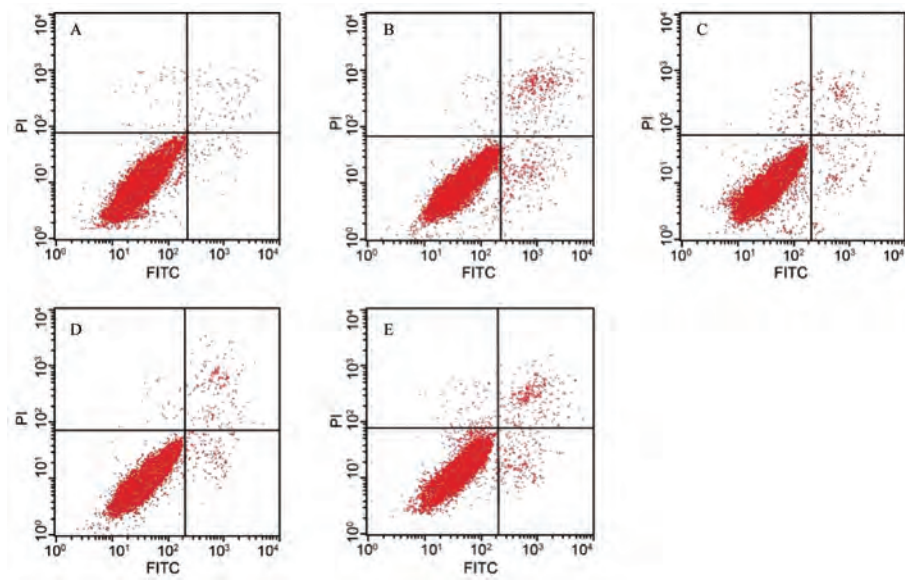


图 3 各组细胞中细胞存活率

Figure 3 Cell viability in each group of cells

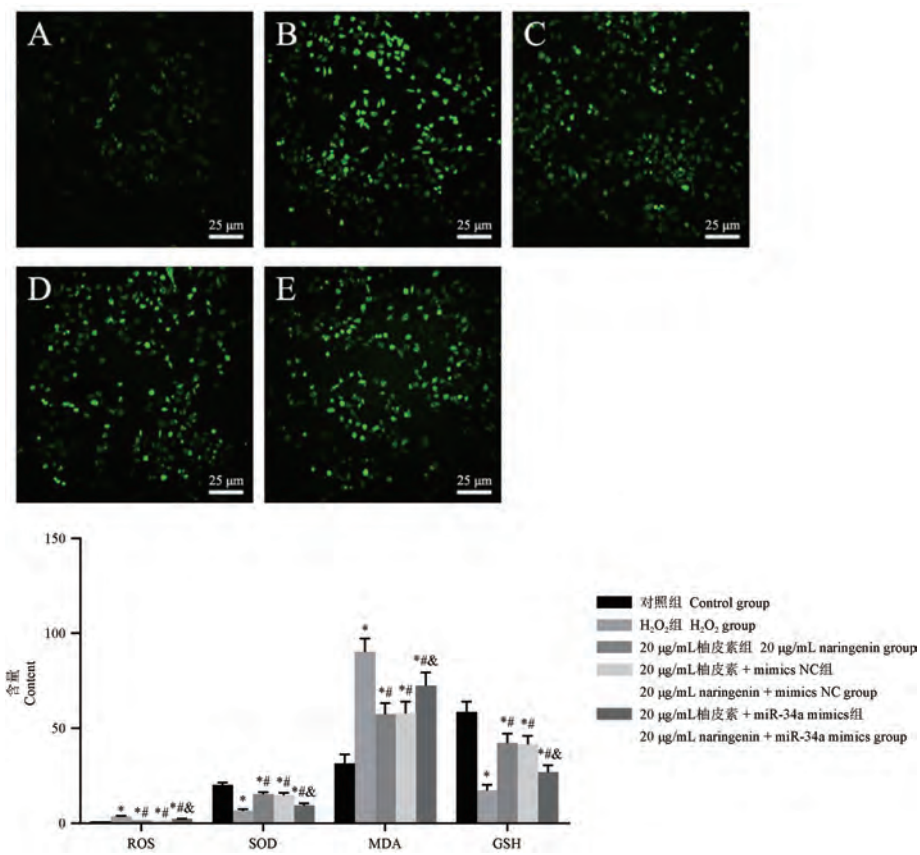


注:A:对照组;B:H₂O₂ 组;C:20 μg/mL 柚皮素组;D:20 μg/mL 柚皮素+mimics NC 组;E:20 μg/mL 柚皮素+miR-34a mimics 组。

图 4 各组 ARPE-19 细胞凋亡率

Note. A, Control group. B, H₂O₂ group. C, 20 μg/mL naringenin group. D, 20 μg/mL naringenin+mimics NC group. E, 20 μg/mL naringenin+miR-34a mimics group.

Figure 4 Apoptotic rate of ARPE-19 cells in each group



注:A:对照组;B:H₂O₂ 组;C:20 μg/mL 柚皮素组;D:20 μg/mL 柚皮素+mimics NC 组;E:20 μg/mL 柚皮素+miR-34a mimics 组。

图 5 各组 ARPE-19 细胞内 ROS、SOD、MDA 及 GSH 含量

Note. A, Control group. B, H₂O₂ group. C, 20 μg/mL naringenin group. D, 20 μg/mL naringenin+mimics NC group. E, 20 μg/mL naringenin+miR-34a mimics group.

Figure 5 Contents of ROS, SOD, MDA and GSH in ARPE-19 cells of each group

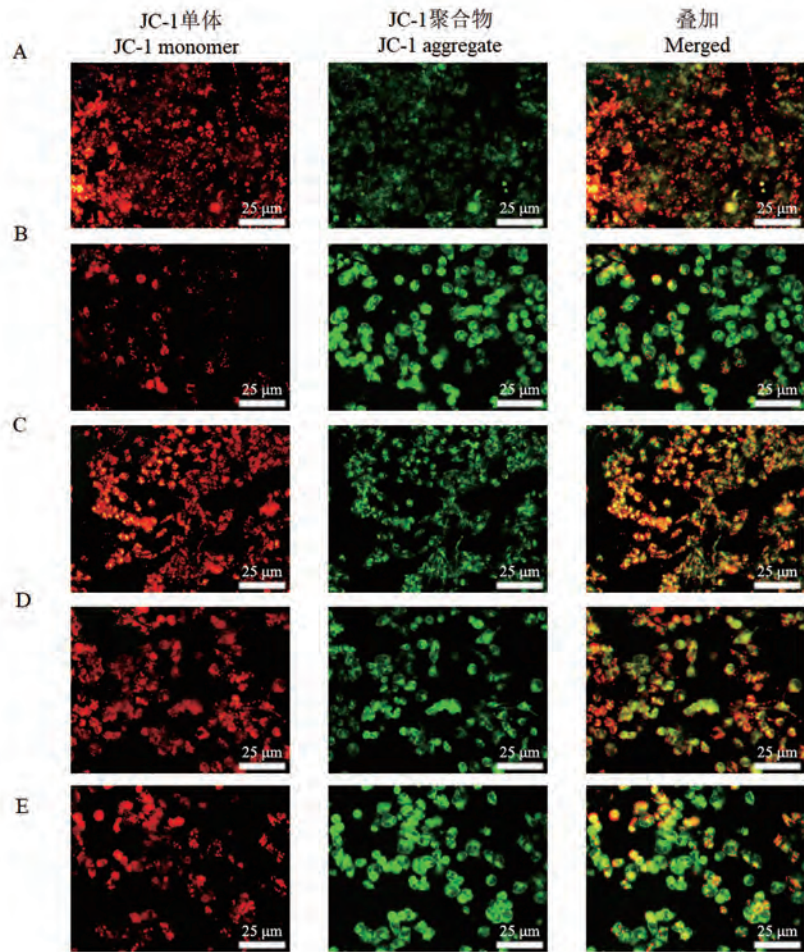


图 6 各组 ARPE-19 细胞 MMP

Figure 6 MMP in ARPE-19 cells of each group

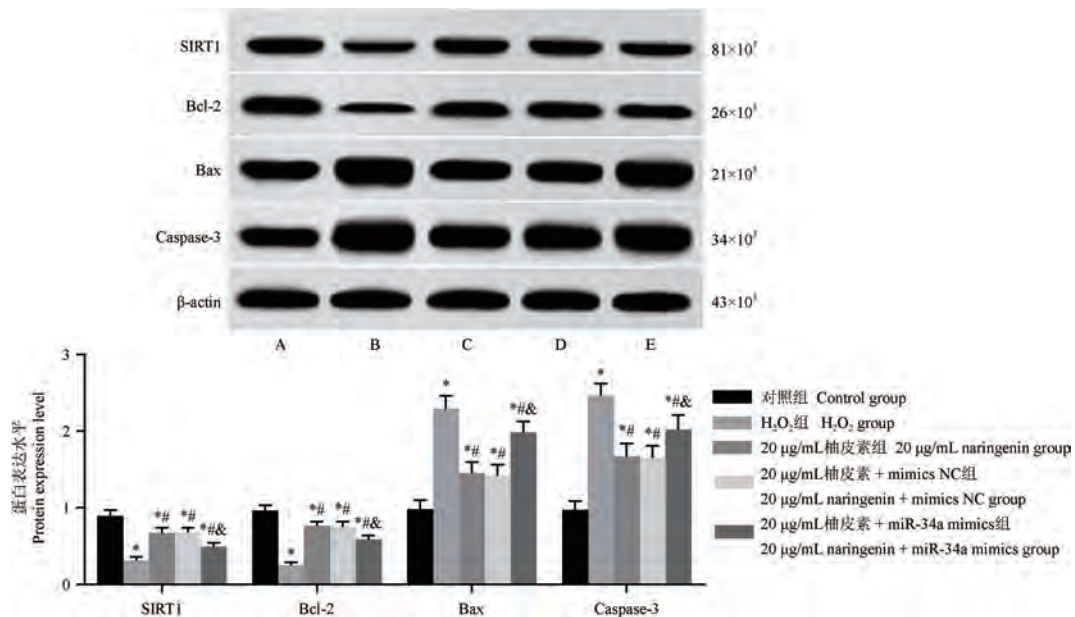


图 7 各组细胞 SIRT1、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

Figure 7 Protein expression of SIRT1, Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each group

3 讨论

眼睛持续暴露于环境刺激中,如辐射、化学物质、大气中的氧气^[13]。在正常情况下,这些刺激引起的氧化应激可以通过机体的抗氧化系统消除^[14]。然而,随着人口老龄化,年龄介导的氧化应激和抗氧化剂水平下降导致蛋白质修饰和氧化,引起 RPE 功能障碍和随后的细胞凋亡^[15],RPE 细胞介导的氧化应激在 AMD 的发病机理和进程中起着重要作用。氧化应激是 ROS 水平在机体内大量产生和积累的结果。在各种 ROS 中, H_2O_2 被确定为可以介导各种细胞作用的第二信使分子,其过量产生是氧化还原信号传导和氧化应激的中心枢纽^[16]。因此, H_2O_2 通常在体外实验中用于诱导氧化应激^[17]。据报道,用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 ARPE-19 细胞 12 h,可显著抑制 ARPE-19 细胞活力,促进 ARPE-19 细胞 ROS 产生和凋亡,并诱导细胞出现氧化应激损伤^[3]。因此,本研究使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 诱导建立 RPE 细胞氧化损伤模型。有文献报道,阿霉素会诱导心肌细胞损伤,产生大量的 ROS,柚皮素可升高 GSH 含量及 SOD 酶活力,降低 ROS 水平,产生抗氧化应激作用,减轻心肌细胞损伤^[18-19]。本研究发现 H_2O_2 诱导后细胞活力下降,而 ROS 水平增加,柚皮素减轻了 RPE 细胞中 H_2O_2 对细胞活力和 ROS 产生的影响。此外,柚皮素还可以降低 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 MDA 水平,增加内源性抗氧化剂 GSH 及抗氧化酶 SOD 活性。表明柚皮素处理提高了 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中的 GSH 水平和 SOD 活性。提示柚皮素处理逆转了 RPE 细胞中 H_2O_2 诱导的氧化应激。

ROS 介导的氧化应激可能导致 RPE 细胞凋亡^[20]。而柚皮素可以降低 Caspase-3 蛋白表达,升高 Bcl-2 蛋白水平及 Bcl-2/Bax 比值,抑制细胞凋亡,减轻心肌细胞损伤^[18-19]。本研究结果显示,柚皮素处理可抑制 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞凋亡,Western blot 结果进一步显示柚皮素抑制了 RPE 细胞中促凋亡 Bax 蛋白的表达,并诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达。此外,柚皮素还阻止了 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 Caspase-3 的活化。MMP 参与细胞凋亡的发展和进程,MMP 的降低是细胞凋亡的特异性标志^[21]。JC-1 是一种碳氮化合物类阳离子荧光染料,广泛用于检测 MMP。正常情况下,JC-1 能依赖跨膜电位聚集在线粒体的基质中,形成红色荧光的聚合

物;当发生凋亡则降低跨膜电位,释放线粒体中的 JC-1,在胞质内以单体的形式存在发绿色荧光^[22];柚皮素可明显升高红/绿荧光比值,升高 MMP 水平。这些结果均提示柚皮素可抑制 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞凋亡。

此外,本研究发现 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞中 miR-34a 水平显著增加,而 SIRT1 mRNA 水平显著降低。有报道显示 miR-34a 是 RPE 细胞中高度表达的调节因子之一,miR-34a 上调可通过直接或间接抑制 c-Met 和其他细胞周期相关分子的表达来抑制 RPE 细胞的增殖和迁移^[7],证实了其可调节 RPE 细胞功能。SIRT1 已被证明是 miR-34a 的靶基因,在细胞分化、衰老、凋亡、转录调节、氧化应激等多种重要的生物学过程中发挥重要作用;既往研究已经证实 SIRT1 可通过抗炎、抗氧化、减少凋亡等机制发挥细胞保护作用^[23-24]。Tong 等^[8]发现过表达 miR-34a 可显著抑制 SIRT1 转录后表达,同时 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞对氧化应激的耐受性降低。本研究结果显示柚皮素可下调 miR-34a,促进 SIRT1 mRNA 和蛋白表达;采用 Lipofectamine 2000 将 miR-34a 转染 ARPE-19 细胞上调 miR-34a,结果显示 miR-34a 转染 ARPE-19 细胞后,miR-34a 水平明显增加,而 SIRT1 的表达降低,明显逆转了柚皮素对 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化损伤的保护作用。提示,柚皮素的保护作用可能是由 miR-34a/SIRT1 信号通路介导的。

综上所述,柚皮素可通过下调 miR-34a,促进 SIRT1 表达,抑制 RPE 细胞凋亡,保护 H_2O_2 诱导的 RPE 细胞氧化应激损伤。然而,本研究存在一定的局限性, H_2O_2 诱导氧化损伤后柚皮素是否能发挥较长时间的保护作用需要进一步的实验,且需要进行体内动物研究以及柚皮素与其他药物相比的功效进一步明确柚皮素的保护作用。

参考文献:

- [1] Dieguez HH, Romeo HE, Alaimo A, et al. Oxidative stress damage circumscribed to the central temporal retinal pigment epithelium in early experimental non-exudative age-related macular degeneration [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 131: 72-80.
- [2] Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2017, 6(6): 493-497.
- [3] Zhao B, Wang Z, Han J, et al. Rhizoma paridis total saponins alleviate H_2O_2 -induced oxidative stress injury by upregulating the

- Nrf2 pathway [J]. Mol Med Rep, 2020, 21(1): 220–228.
- [4] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration [J]. Lancet, 2018, 392(10153): 1147–1159.
- [5] Ricci F, Bandello F, Navarra P, et al. Neovascular age-related macular degeneration: therapeutic management and new-upcoming approaches [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8242–8282.
- [6] Hallak JA, de Sisternes L, Osborne A, et al. Imaging, genetic, and demographic factors associated with conversion to neovascular age-related macular degeneration: secondary analysis of a randomized clinical trial [J]. JAMA Ophthalmol, 2019, 137(7): 738–744.
- [7] Hou Q, Tang J, Wang Z, et al. Inhibitory effect of microRNA-34a on retinal pigment epithelial cell proliferation and migration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(10): 6481–6488.
- [8] Tong N, Jin R, Zhou Z, et al. Involvement of microRNA-34a in age-related susceptibility to oxidative stress in ARPE-19 cells by targeting the silent mating type information regulation 2 homolog 1/p66shc pathway: implications for age-related macular degeneration [J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 137–143.
- [9] Ułańczyk Z, Grabowicz A, Cecerska-Heryć E, et al. Dietary and lifestyle factors modulate the activity of the endogenous antioxidant system in patients with age-related macular degeneration: correlations with disease severity [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 954.
- [10] Bai J, Li SY, Wu G, et al. Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced activation of microglia cells [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2019, 65(5): 38–42.
- [11] Pengnet S, Prommaouan S, Sumarithum P, et al. Naringin reverses high-cholesterol diet-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats via regulating LOX-1 and NADPH oxidase subunit expression [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3708497.
- [12] 徐辉勇, 陈金鹏, 章剑. 柚皮素对糖尿病视网膜病变大鼠氧化损伤、细胞凋亡及 Nrf2-ARE 的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 128–132.
- [13] Matos AL, Bruno DF, Ambrósio AF, et al. The benefits of flavonoids in diabetic retinopathy [J]. Nutrients, 2020, 12(10): 3169–3195.
- [14] Zhou J, Chen F, Yan A, et al. Madecassoside protects retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through the activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Biosci Rep, 2020, 40(10): BSR20194347.
- [15] Kaarniranta K, Pawlowska E, Szczepanska J, et al. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD) [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): 2374.
- [16] Cui R, Tian L, Lu D, et al. Exendin-4 protects human retinal pigment epithelial cells from H₂O₂-induced oxidative damage via activation of NRF2 signaling [J]. Ophthalmic Res, 2020, 63(4): 404–412.
- [17] 白振军, 张慧宇, 郭敏芳. 毛蕊异黄酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 H₂O₂ 导致的 SH-SY5Y 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 37–43.
- [18] 刘欢, 雷欢, 梁瑞华, 等. 柚皮素对阿霉素致心肌细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 788–793.
- [19] 李燕, 冯健, 谢发江, 等. 柚皮素通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路减轻糖尿病小鼠心肌损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(1): 38–46.
- [20] He HJ, Wei DH, Liu H, et al. Glycyrrhizin protects against sodium iodate-induced RPE and retinal injury through activation of AKT and Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3495–3504.
- [21] 傅增辉, 姜岩, 刘晶, 等. 白桦脂醇对 A β_{25-35} 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 54–61.
- [22] 李晓文, 周越菡, 邓健志, 等. 穿心莲内酯对急性淋巴细胞白血病细胞的生长抑制及凋亡诱导作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 977–984.
- [23] Song L, Chen TY, Zhao XJ, et al. Pterostilbene prevents hepatocyte epithelial-mesenchymal transition in fructose-induced liver fibrosis through suppressing miR-34a/Sirt1/p53 and TGF- β 1/Smads signalling [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(11): 1619–1634.
- [24] 田河, 王志龙, 张智慧, 等. 白藜芦醇通过靶向 SIRT1 激活 Keap1-Nrf2-HO-1 途径发挥对草酸钙肾结石形成的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 77–83.

[收稿日期] 2021-01-25

李彬,甘德堃,王璐璐. 和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 86-93.

Li B, Gan DK, Wang LL. Honokiol inhibits immune imbalance and provides lung protection in mice with chronic obstructive pulmonary disease through the Notch signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 86-93.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 012

和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用

李 彬*, 甘德堃, 王璐璐

(河南省中医院肺病科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨和厚朴酚(HNK)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)小鼠免疫失衡及肺功能的影响,并考察 Notch 信号通路是否介导该过程。**方法** 将 30 只 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组:正常对照组(Normal)、COPD 组和 COPD+HNK 组,每组 10 只。通过香烟烟雾诱导 COPD 小鼠模型,然后对 COPD+HNK 组小鼠隔日腹腔注射 HNK(10.00 mg/kg),共 30 d。采用法国 EMKA GYD-003 型动物肺功能测试系统检测吸气峰流速(PIF)和呼气峰流速(PEF)。苏木精-伊红(HE)染色评价肺组织病理变化。用流式细胞仪检测小鼠脾 T 细胞 Th1/Th2 和 Th17/Treg 亚群的比值。Western blot 检测 T 细胞中 Notch 1/2/3/4、Hes1、Hes5 和 Hey1 的蛋白表达。采用 ELISA 法检测小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平。**结果** 与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠的 PIF 和 PEF 均显著升高($P<0.05$)。COPD+HNK 组小鼠肺组织病变较 COPD 组减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡数增多,肺泡腔缩小。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠的 Th1 百分比、Th1/Th2 比值、Th17 百分比和 Th17/Treg 比值均显著降低($P<0.05$)。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠脾 T 细胞中的 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白相对表达量均显著降低($P<0.05$)。与 COPD 组相比,COPD+HNK 组小鼠血清中的 IFN- γ 和 IL-17 水平均显著降低($P<0.05$),而 IL-4 和 IL-10 水平显著升高($P<0.05$)。**结论** 和厚朴酚通过抑制 COPD 小鼠脾 T 细胞 Notch 信号通路的激活,进而纠正了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞的失衡,从而改善了肺功能。

【关键词】 和厚朴酚;慢性阻塞性肺疾病;Notch 信号通路;免疫失衡;肺功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0086-08

Honokiol inhibits immune imbalance and provides lung protection in mice with chronic obstructive pulmonary disease through the Notch signaling pathway

LI Bin*, GAN Dekun, WANG Lulu

(Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Department of Pulmonary Disease, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of honokiol (HNK) on immune imbalance and lung function in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) mice and to investigate whether the Notch signaling pathway mediates this process. **Methods** BALB/c mice (male, 6~8 weeks old) were randomly divided into three groups: normal control group (Normal), COPD group and COPD+HNK group ($n = 10$ mice per group). A mouse model of COPD was induced by cigarette smoke, and HNK (10 mg/kg) was intraperitoneally injected into the COPD+HNK group every other day for 30

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项(2019JDZX069)。

【作者简介】 李彬(1988—),男,硕士,研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail:347359469@qq.com

days. The French EMKA GYD-003 animal lung function test system was used to detect the peak inspiratory flow rate (PIF) and peak expiratory flow rate (PEF). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological changes of lung tissue. Flow cytometry was used to detect the ratio of Th1/Th2 and Th17/Treg subgroups of mouse spleen T cells. Western blot was used to examine the protein expression of Notch 1/2/3/4, Hes1, Hes5 and Hey1 in T cells. ELISA was used to detect the levels of serum IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 in mice. **Results** The PIF and PEF of the COPD+HNK group mice were significantly increased compared with result in the COPD group ($P<0.05$). In addition, the lung tissue lesions of the mice in the COPD+HNK group were reduced, the inflammatory cell infiltration was reduced, the number of alveoli increased and the alveolar cavity was reduced compared with result in the COPD group. Compared with the COPD group, the COPD+HNK group mice showed significantly reduced Th1 percentage, Th1/Th2 ratio, Th17 percentage and Th17/Treg ratio ($P<0.05$). In addition, the relative expression levels of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1, Hes5 and Hey1 in the spleen T cells of the COPD+HNK group mice were significantly reduced ($P<0.05$). The levels of IFN- γ and IL-17 in the serum of the COPD+HNK group were significantly reduced ($P<0.05$), while the levels of IL-4 and IL-10 were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** HNK inhibits activation of the Notch signaling pathway of T cells in the spleen of COPD mice, thereby correcting the imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg cells in COPD mice and improving lung function.

【Keywords】 honokiol; chronic obstructive pulmonary disease; Notch signaling pathway; immune imbalance; lung function

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以不完全可逆的气流受限为特征的肺部疾病^[1-2]。最近的研究发现,COPD 患者存在 T 细胞亚群失衡的免疫紊乱。T 细胞亚群执行以 Th1 和 Th17 为主的获得性免疫反应,这种免疫反应可导致 COPD 慢性炎症的持续和扩大,加速气道重塑,这与 COPD 的发病机制和病情加重有关^[3]。杨鑫娜等^[4]报道,Notch 信号通路可调节 COPD 患者 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的免疫失衡,参与 COPD 的发病机制。和厚朴酚(honokiol, HNK, $C_{18}H_{18}O_2$)是从厚朴或凹叶厚朴树皮中提取的一种双酚类化合物,在中国和日本的传统医药中有广泛的应用,多用于治疗血栓性中风、治疗焦虑和胃肠道症状,并且还具有心脏保护作用、抗微生物作用、抗炎作用、抗血管生成作用和抗血管生成作用^[5-7]。最近的研究报道和厚朴酚能显著抑制哮喘小鼠嗜酸性粒细胞浸润,减轻气道炎症,抑制炎性细胞因子的产生,这些结果提示和厚朴酚可能是治疗肺哮喘相关疾病的候选药物^[8]。然而,目前尚无文献报道和厚朴酚在 COPD 中的应用效果。因此,本研究旨在揭示和厚朴酚是否可改善 COPD 小鼠免疫平衡并提供肺保护作用,并进一步探讨 Notch 信号通路是否介导和厚朴酚对 COPD 的治疗机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 6~8 周龄无特定病原体(SPF)雄性

BALB/c 小鼠购自凯学生物科技(上海)有限公司[SCXK(沪)2020-0005],平均体重(20 ± 2)g。所有小鼠于温度(22 ± 1)℃、湿度(50 ± 5)%、光照/黑暗周期 12 h/12 h 的 SPF 级实验室内饲养,饲养室位于河南中医药大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0004],不限制食物和水。本研究由河南省中医院动物实验伦理委员会批准(IACUC:20200013),实验研究过程中做到了 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

和厚朴酚(货号 SND-287)购自滁州仕诺达生物科技有限公司;香烟购自河南安阳卷烟厂;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号 C0105M)购自碧云天生物技术研究;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD3 抗体(货号 LM-10498R-FITC)购自上海联迈生物工程有限公司;RPMI-1640(货号 PM150110A)购自上海雅吉生物科技有限公司;藻红蛋白-花青苷 5(PE/CY5)标记的 CD4 抗体(货号 100409)、藻红蛋白(PE)标记的 IL-4(货号 504103)、FITC 标记的 IFN- γ (货号 505805)、PE 标记的 Foxp3(货号 364703)和 FITC 标记的 IL-17A(货号 512303)购自美国 Bio Legend 公司;Notch 1(货号 ab52627)、Notch 2(货号 ab245325)、Notch 3(货号 ab23426)、Notch 4(货号 ab184742)、Hes1(货号 ab119776)、Hes5(货号 ab194111)、Hey1(货号 ab154077)和 β -actin(货号 ab8227)一抗购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶偶联 IgG 二抗(货号 ZB-2306)购自北京中杉金桥生物科技有限公司;IFN- γ (货号

439007)、IL-4(货号 EA-2510)、IL-17(货号 HIL-17A-175)和 IL-10(货号 EA-2513)ELISA 试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司。

GYD-003 型动物肺功能测试系统购自法国 EMKA 公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司;BP121S 电子天平购自德国赛多利斯公司;动物恒温系统 ALC-HTP 购自上海奥尔科特生物科技有限公司;Nanodrop 2000 紫外分光光度计、MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司;Mini P-4 垂直电泳槽、电泳仪、电转仪购自美国 Bio-Rad 公司;Western blot 显影仪购自德国 QUANTUM 公司;Leica RM2235 石蜡切片机购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 COPD 模型制备

将小鼠随机分为 3 组:正常对照组(Normal)、COPD 组和 COPD+HNK 组,每组 10 只。将 COPD 组和 COPD+HNK 组小鼠置于 50 cm、30 cm、35 cm 的有机玻璃盒子进行香烟烟雾诱导(焦油量:14 mg,烟气烟碱量:1.1 mg),每天吸烟 4 次(4 支,45 min),间隔 1 h,连续 90 d。从造模第 61 天开始,COPD+HNK 组隔日腹腔注射和厚朴酚(HNK,10.00 mg/kg),至第 90 天。和厚朴酚的使用剂量参考文献^[9-10]进行设置,前文献中和厚朴酚的使用剂量为 2~16 mg/kg,因此本文将的剂量设置为 10.00 mg/kg。

1.3.2 肺功能测试

治疗完成后,采用法国 EMKA GYD-003 型动物肺功能测试系统检测吸气峰流速(PIF)和呼气峰流速(PEF)。

1.3.3 肺组织病理形态学观察

治疗完成后,采用颈椎脱臼法处死小鼠。取小鼠肺组织,置于 10%多聚甲醛溶液中固定。石蜡包埋,切片,然后进行苏木精-伊红(HE)染色,检测方法严格按照制造商说明书进行。

1.3.4 小鼠脾 T 细胞分离

在无菌条件下,取小鼠脾,研磨后在 200 目滤网上滤过,制成单细胞悬液,缓慢加入小鼠淋巴细胞分离液中,以 2500 r/min 离心 20 min。吸取中间层淋巴细胞,调整细胞数至每毫升 1×10^6 个,加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 CD3 抗体,流式细胞仪检测总 T 细胞(CD3⁺T)纯度。

1.3.5 CD4⁺T 细胞亚群检测

使用 RPMI-1640 调整脾 T 淋巴细胞浓度为每

毫升 1×10^6 个,细胞中加入藻红蛋白-花青苷 5(PE/CY5)标记的 CD4 抗体。然后,用 4%多聚甲醛固定细胞。分别加入膜裂解剂、藻红蛋白(PE)标记的 IL-4、FITC 标记的 IFN- γ 、PE 标记的 Foxp3 和 FITC 标记的 IL-17A。用流式细胞仪检测 Th1、Th2、Th17 和 Treg 的表达,计算 Th1/Th2 和 Th17/Treg 亚群的比值。

1.3.6 Western blot

提取小鼠 T 淋巴细胞总蛋白,用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 50 μ g 蛋白样品。将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温下用 5%脱脂牛奶封闭膜 30 min。然后将膜与 Notch 1/2/3/4(1:500 稀释)、Hes1(1:1000 稀释)、Hes5(1:500 稀释)、Hey1(1:2000 稀释)和 β -actin(1:1000 稀释)4℃孵育过夜。然后将膜与辣根过氧化物酶偶联 IgG 二抗(1:2000 稀释)在室温下孵育 2 h,ECL 显影。 β -actin 作为内参蛋白,将目标蛋白的灰度值标准化为 β -actin 的灰度值。

1.3.7 血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平检测

采集小鼠静脉血,分离血清。采用 ELISA 法严格按照试剂盒说明书检测小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17 和 IL-10 水平。

1.4 统计学方法

所有实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。每组数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。多重比较采用最低显著性差法(LSD-*t*)。 $P < 0.05$ 说明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺组织病理变化的影响

通过 HE 染色评价各组小鼠肺组织病理变化(图 1)。Normal 组小鼠肺组织结构基本完整,未见明显病理改变。COPD 组小鼠肺泡间隔内可见炎性细胞浸润,终末细支气管远端气腔膨胀,间隙变窄,肺泡数明显减少,肺泡腔扩张,肺泡壁破裂,符合 COPD 的病理学表现。COPD+HNK 组小鼠肺组织病变较 COPD 组减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡数增多,肺泡腔缩小。

2.2 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺功能的影响

HE 染色结果显示,小鼠肺组织形态符合 COPD 的病理学表现,表明建模成功。通过吸气峰流速

(PIF)和呼气峰流速(PEF)评价各组小鼠肺功能,如图2所示,与Normal组相比,COPD组小鼠的PIF和PEF均显著降低($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠的PIF和PEF均显著升高($P<0.05$)。说明和厚朴酚能改善COPD模型小鼠的肺功能。

2.3 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞亚群的影响

各组小鼠 T 细胞亚群分布如图3所示,与Normal组相比,COPD组小鼠的Th1百分比、Th1/Th2比值、Th17百分比和Th17/Treg比值均显著升高($P<0.05$),而Treg百分比和Th2百分比无显著变化($P>0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠的Th1百分比、Th1/Th2比值、Th17百分比和Th17/Treg比值均显著降低($P<0.05$)。这些结果说明和厚朴酚可改善COPD小鼠T细胞亚群。

2.4 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞 Notch 信号通路的影响

通过 Western blot 检测各组小鼠脾 T 细胞中

Notch 信号通路的蛋白表达(图4),结果显示,与Normal组相比,COPD组小鼠脾T细胞中的Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1的蛋白相对表达量均显著升高($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠脾T细胞中的Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1的蛋白相对表达量均显著降低($P<0.05$)。这些结果说明和厚朴酚抑制了COPD小鼠T细胞中的Notch信号通路。

2.5 和厚朴酚对 COPD 小鼠血清细胞因子的影响

通过 ELISA 法检测各组小鼠血清细胞因子水平(图5),结果显示,与Normal组相比,COPD组小鼠血清中的IFN- γ 和IL-17水平均显著升高($P<0.05$),而IL-4和IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与COPD组相比,COPD+HNK组小鼠血清中的IFN- γ 和IL-17水平均显著降低($P<0.05$),而IL-4和IL-10水平显著升高($P<0.05$)。说明和厚朴酚影响了COPD小鼠血清细胞因子的分泌。

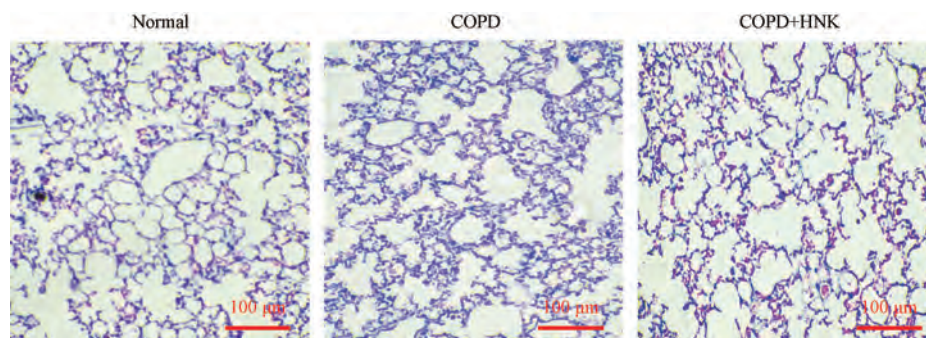
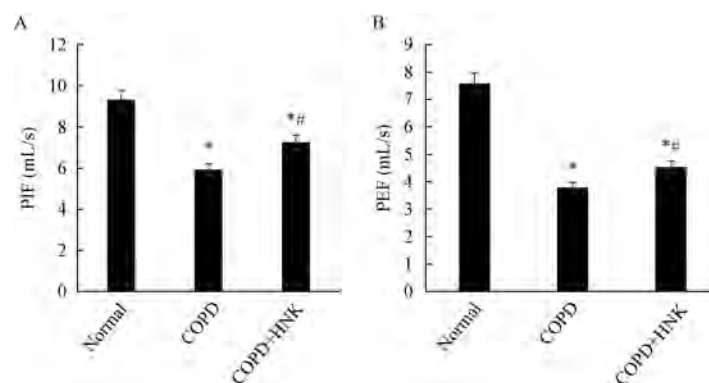


图1 各组小鼠肺组织的 HE 染色

Figure 1 HE staining of lung tissue of mice in each group

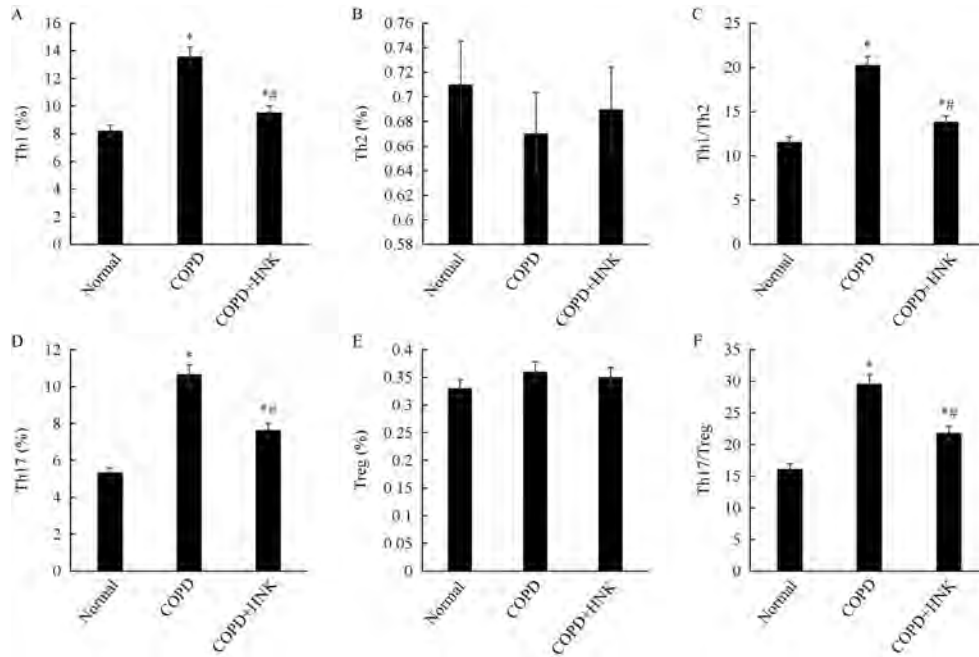


注:A:吸气峰流速(PIF);B:呼气峰流速(PEF)。与正常组相比,* $P<0.05$;与COPD组相比,# $P<0.05$ 。

图2 和厚朴酚对 COPD 小鼠肺功能的影响

Note. A, Peak inspiratory flow(PIF). B, Peak expiratory flow(PEF). Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with COPD group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effect of honokiol on the lung function of COPD mice

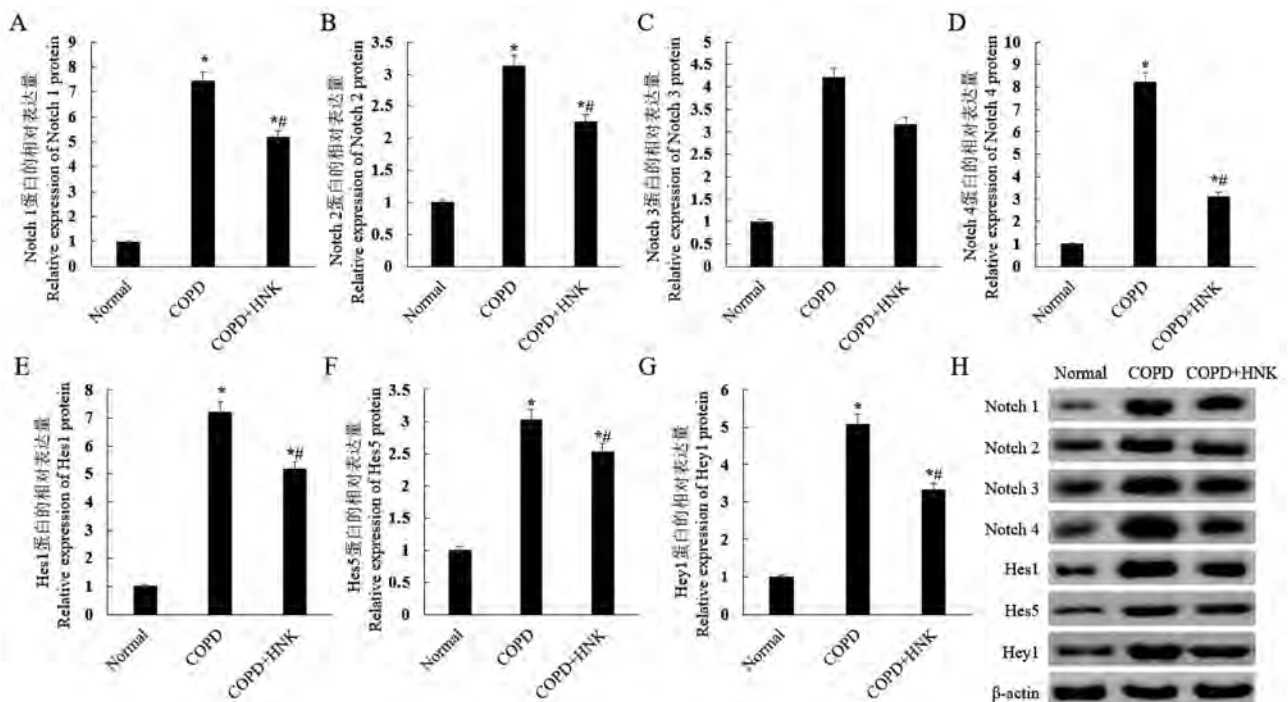


注:A:小鼠脾 Th1 百分比;B:Th2 百分比;C:Th1/Th2 比值;D:Th17 百分比;E:Treg 百分比;F:Th17/Treg 比值。与正常组相比, * $P < 0.05$;与 COPD 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞亚群的影响

Note. A, Mouse spleen Th1 percentage. B, Th2 percentage. C, Th1/Th2 ratio. D, Th17 percentage. E, Treg percentage. F, Th17/Treg ratio. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with COPD group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of honokiol on T cell subsets in COPD mice

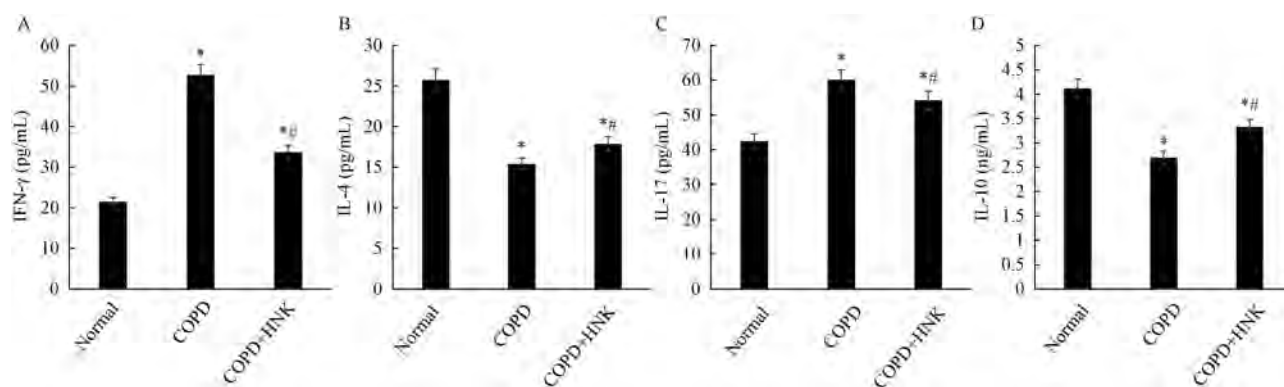


注:A~G:小鼠脾 T 细胞中 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白相对表达量;H:蛋白质印迹代表条带。与正常组相比, * $P < 0.05$;与 COPD 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 和厚朴酚对 COPD 小鼠 T 细胞 Notch 信号通路的影响

Note. A~G, Relative expression of Notch1, Notch2, Notch3, Notch4, Hes1, Hes5, Hey1 in mouse spleen T cells in sequence. H, Western blot representative band. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with COPD group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Effect of honokiol on the Notch signaling pathway of T cells in COPD mice



注: A~D: 依次为小鼠血清 IFN- γ 、IL-4、IL-17、IL-10 水平。与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 COPD 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 和厚朴酚对 COPD 小鼠血清细胞因子的影响

Note. A~D, Levels of mouse serum IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-10 in sequence. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with COPD group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Effect of honokiol on serum cytokines in COPD mice

3 讨论

和厚朴酚最初是从厚朴或凹叶厚朴树皮中提取的具有抗衰老、抗氧化、抗炎和抗肿瘤等作用的一种双酚类化合物。据报道,和厚朴酚通过激活 Akt 介导的胆碱能神经元存活通路改善快速老化 SAMP8 小鼠衰老相关的学习和记忆损伤^[11]。和厚朴酚通过减少 ROS 的产生而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤^[12]。在肾缺血/再灌注损伤 (I/R) 模型中,与 I/R 组相比,和厚朴酚预处理降低炎症标志物如肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平^[13]。此外,和厚朴酚在多种癌细胞中显示出强大的抗肿瘤活性^[14-15]。本研究中,和厚朴酚显著升高 COPD 小鼠的 PIF 和 PEF,并且 HE 染色也显示和厚朴酚减轻了香烟烟雾诱导的肺组织病理变化,说明和厚朴酚能改善 COPD 模型小鼠的肺功能。其他学者报道和厚朴酚对哮喘也具有良好的治疗作用^[8],因此,和厚朴酚在治疗肺部疾病方面可能具有较高的潜力。

T 淋巴细胞介导的过度免疫反应在 COPD 的发生和发展中起着重要作用,并且这些细胞的数量随着气流限制的增加和肺气肿的加重而增加^[16]。T 淋巴细胞可以分化为 Th1 或 Th2 细胞,具体取决于它们产生的细胞因子类型。目前,许多研究发现 COPD 存在 Th1 介导的免疫应答,表现为 IFN- γ (Th1 细胞因子) 水平升高,IL-4 (Th2 细胞因子) 水平降低,Th1/Th2 失衡^[17]。另外,IL-17/Treg 的平衡是维持免疫系统稳定和避免过度免疫反应的重要因素。最近的研究发现 COPD 患者也存在 Th17/

Treg 失衡,表现为 IL-17 (Th17 细胞因子) 分泌增加,IL-10 (Treg 细胞因子) 分泌减少^[18]。本研究中,和厚朴酚显著降低了 COPD 小鼠的 Th1 百分比、Th1/Th2 比值、Th17 百分比和 Th17/Treg 比值,显著降低 IFN- γ 和 IL-17 水平,而升高 IL-4 和 IL-10 水平,纠正了 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡。Th1 细胞主要分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α ^[19]。Th2 细胞主要分泌 IL-4,刺激 B 淋巴细胞增殖产生 IgG 和 IgE,并介导体液免疫^[20]。此外,高水平的 IL-4 可通过激活自然杀伤 T 细胞^[21]。大量的文献均证实,Th2 细胞分泌的细胞因子在减轻炎症方面发挥着重要作用。结合本研究结果可知,和厚朴酚可使 COPD 小鼠体内 Th1 细胞向 Th2 细胞漂移,从而抑制了 Th1/Th2 细胞失衡引起的过度炎症反应。IL-17 是中性粒细胞炎症的关键启动子。既往研究报道 COPD 患者 IL17 水平升高,这可能导致中性粒细胞募集和浸润到炎症部位,最终通过刺激肺微血管内皮细胞产生 CXCL8 (IL-8)、E-选择素、血管细胞粘附分子-1 和细胞间粘附分子-1,从而加重 COPD^[22]。IL-17 可诱导急性炎症、募集 Th17 细胞并激活 Th1 细胞以促进细胞免疫反应。IL-10 是 B 淋巴细胞的经典刺激物,它通过抑制核因子 κ B (一种关键的炎症转录因子) 的表达来抑制 Th1 细胞产生 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ ^[23]。因此,抑制 IL-17 的表达并增加 IL-10 的表达可通过多种途径来抑制炎症。本研究结果说明,和厚朴酚抑制了 COPD 小鼠 IL-17 的表达并增加 IL-10 的表达,从而使 Th17 细胞向 Treg 细胞漂移,进而抑制了 Th17/Treg 细胞失衡引起的过度炎症反应。另外,Wang 等^[24]发现 COPD 患者 Th17 和

调节性 T 细胞 (Treg) 失衡,血清 IL-6 和 IL-17 水平升高,与用力肺活量 (FVC)、第一秒用力呼气量 (FEV1)、FEV1/FVC 值降低密切相关,这些变化与 COPD 患者病情严重程度相关。总之,和厚朴酚通过纠正 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡,进而改善了 COPD 小鼠的肺功能。

Notch 信号通路是一个高度保守的信号转导通路,包括 4 个同源受体 Notch1/2/3/4 和 5 个配体 Delta1/3/4 和 Jagged1/2,它们表达在 T 细胞和多个成熟免疫细胞表面,参与 T 细胞的分化^[25]。在 Notch 受体与配体结合后,下游的靶基因被激活以抑制分化调节因子的表达,最终影响细胞的分化、增殖和凋亡^[26]。Laky 等^[27]发现抗原提呈细胞表面的 Delta 样 4 (DLL4) 与 CD4⁺T 细胞表面的 Notch 受体结合,增加 IL-2 的分泌,调节适应性免疫反应。Notch1 受体的激活可以调节 Th17 细胞分化^[28]。杨鑫娜等^[4]报道,Notch 信号通路可调节 COPD 患者 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的免疫失衡,参与 COPD 的发病机制。Notch 配体 DLL1 和 DLL4 可以诱导 Th1 细胞分化,抑制 Th2 细胞分化,促进 CD4⁺T 细胞分泌 IFN- γ ,并下调 IL-4 和 IL-13 水平^[25]。在 CD4⁺T 细胞的早期激活过程中,Notch 受体已经被激活,并且可以启动 Th17 细胞中的基因转录^[29]。抑制 Notch 信号可以降低外周血中 Th17 细胞的百分比,导致 Th17/Treg 比值降低,进而减弱 Th17 细胞介导的免疫应答,增强 Treg 细胞的免疫抑制功能^[30]。另外,Notch 受体通过细胞间相互作用和配体结合,以及通过 γ -分泌酶的酶解激活下游靶基因 Hes 和 Hey 家族,这两个基因共同参与了 T 细胞的激活、增殖和分化。本研究中,Notch 信号通路在 COPD 小鼠体内被激活,这是 Th1 和 Th17 介导的促炎性免疫紊乱的主要原因。然而,和厚朴酚显著降低了 COPD 小鼠脾 T 细胞中的 Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Hes1、Hes5、Hey1 的蛋白表达。结果表明,和厚朴酚通过抑制 T 细胞 Notch 信号通路的激活降低了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 的比例,从而减少血清 IFN- γ 和 IL-17 的分泌,并促进 IL-4 和 IL-10 的分泌。

综上所述,本研究表明香烟烟雾诱导的 COPD 小鼠模型存在 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡。而和厚朴酚通过抑制 COPD 小鼠脾 T 细胞 Notch 信号通路的激活,进而纠正了 COPD 小鼠 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞的失衡,从而改善了肺功能。

参考文献:

- [1] 曾宗鼎,邢崇浩,郑辉才,等. 血浆 miR-145 及 miR-183 对慢性阻塞性肺疾病患者的预后评估价值 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(10): 1246-1250.
- [2] 周利航,王导新. 慢性阻塞性肺疾病急性加重患者 PGRN 的水平变化及临床意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(22): 2769-2773.
- [3] Jin Y, Wan Y, Chen G, et al. Treg/IL-17 ratio and Treg differentiation in patients with COPD [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111044.
- [4] 杨鑫娜,刘晓菊,赵兰婷,等. Notch 信号通路在慢性阻塞性肺疾病免疫失衡中的作用及机制研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(11): 881-885.
- [5] Rauf A, Patel S, Imran M, et al. Honokiol: An anticancer lignan [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 555-562.
- [6] Sarica A, Kirika N, Romeo M, et al. Safety and toxicology of magnolol and honokiol [J]. Planta Med, 2018, 84(16): 1151-1164.
- [7] Zhang B, Wang PP, Hu KL, et al. Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model [J]. Molecules, 2019, 24(11): 2035.
- [8] Hong T, Min H, Hui Z, et al. Oral administration of honokiol attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model [J]. Pak J Pharm Sci, 2018, 31(4): 1279-1284.
- [9] 郝庆红,陈冠华,冯雅琪,等. 和厚朴酚延缓小鼠衰老作用研究 [J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(6): 87-90.
- [10] 郝庆红,陈冠华,冯雅琪,等. 和厚朴酚对 D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 798-800.
- [11] Matsui N, Takahashi K, Takeichi M, et al. Magnolol and honokiol prevent learning and memory impairment and cholinergic deficit in SAMP8 mice [J]. Brain Res, 2009, 1305: 108-117.
- [12] Liou KT, Shen YC, Chen CF, et al. Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production [J]. Brain Res, 2003, 992(2): 159-166.
- [13] Yu Y, Li M, Su N, et al. Honokiol protects against renal ischemia/reperfusion injury via the suppression of oxidative stress, iNOS, inflammation and STAT3 in rats [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1353-1360.
- [14] Banik K, Ranaware AM, Deshpande V, et al. Honokiol for cancer therapeutics: A traditional medicine that can modulate multiple oncogenic targets [J]. Pharmacol Res, 2019, 144: 192-209.
- [15] Wang Y, Liu Z, Liu Q, et al. Honokiol suppressed pancreatic cancer progression via miR-101/Mcl-1 axis [J]. Cancer Manag Res, 2020, 12: 5243-5254.
- [16] Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [J].

- Lancet, 2011, 378(9795): 1015–1026.
- [17] 王成阳, 李泽庚. 慢性阻塞性肺病大鼠肺功能降低与 Th1/Th2 极化, STAT4/6 表达的关系 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(12): 1233–1236, 1241.
- [18] Gu XY, Chu X, Zeng XL, et al. Effects of PM2.5 exposure on the Notch signaling pathway and immune imbalance in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Environ Pollut, 2017, 226: 163–173.
- [19] Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, et al. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation [J]. J Clin Invest, 1999, 103(2): 175–183.
- [20] van Oosterhout AJ, Motta AC. Th1/Th2 paradigm: not seeing the forest for the trees? [J]. Eur Respir J, 2005, 25(4): 591–593.
- [21] Tsao CC, Tsao PN, Chen YG, et al. Repeated activation of lung invariant NKT cells results in chronic obstructive pulmonary disease-like symptoms [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147710.
- [22] Zhang L, Cheng Z, Liu W, et al. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. Copd, 2013, 10(4): 459–465.
- [23] Leon-Cabrera S, Arana-Lechuga Y, Esqueda-León E, et al. Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 493409.
- [24] Wang H, Ying H, Wang S, et al. Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Clin Respir J, 2015, 9(3): 330–341.
- [25] Mochizuki K, He S, Zhang Y. Notch and inflammatory T-cell response: new developments and challenges [J]. Immunotherapy, 2011, 3(11): 1353–1366.
- [26] Tilley AE, Harvey BG, Heguy A, et al. Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(6): 457–466.
- [27] Laky K, Evans S, Perez-Diez A, et al. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4⁺ T cells by tuning co-stimulation [J]. Immunity, 2015, 42(1): 80–94.
- [28] Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation [J]. J Immunol, 2011, 187(2): 692–701.
- [29] Amsen D, Helbig C, Backer RA. Notch in T cell differentiation: all things considered [J]. Trends Immunol, 2015, 36(12): 802–814.
- [30] Yu S, Liu C, Li L, et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia [J]. Lab Invest, 2015, 95(2): 157–167.

[收稿日期]2021-07-14

综述:成年后海马神经发生与阿尔茨海默病的神经再生治疗

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,是导致老年痴呆的最常见原因。然而,目前尚无能够终止 AD 病程进展的治疗药物和方法。其中部分原因可能与老年 AD 患者脑内神经网络退变的不可逆性有关。通过诱导神经元新生补偿神经元丢失以及重塑退变的神经网络,有望成为 AD 治疗的新方向。

来自遵义医科大学基础药理教育部重点实验室的研究者对 AD 与海马神经发生的研究进展进行了回顾。尽管成年海马神经元新生(adult hippocampal neurogenesis, AHN)数目有限,但数目不多的新生神经元仍然可以赋予海马神经环路极高的可塑性,并在学习-记忆/遗忘、情绪等功能调控中发挥重要作用。文中对目前 AD 患者和大/小鼠中 AHN 改变的相关研究进行了总结和分析,指出尽管在 AD 前中期海马神经发生可能呈现数量上的短暂增多,但在中后期 AHN 整体呈现为减少。虽然内源性 AHN 在数量、范围和新生神经元类型等方面具有较大局限性,促进 AHN 对于 AD 的预防和治疗仍可能具有一定意义。同时, AHN 也可以作为一个简单易得、稳定且最接近 AD 患者大脑实际情况的模型,用以研究和测试其他的 AD 促神经再生治疗方法。

此外,本文还回顾了通过细胞移植以及诱导胶质细胞重编程两种手段诱导 AD 脑内神经再生相关研究进展,分析了其在补偿神经元丢失和重塑退变神经网络以治疗阿尔茨海默病存在广阔前景,以及在诱导神经新生效率、特异性及安全性等方面尚存在的较多问题和可能的研究方向。

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): 3–14. <https://doi.org/10.1002/ame2.12212>)。

魏山山,王孟迪,姜宁,等. 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 改善东莨菪碱致小鼠认知障碍的作用比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 94-101.

Wei SS, Wang MD, Jiang N, et al. Comparison of the effects among ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 on scopolamine-induced cognitive impairment in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 94-101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.013

人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 改善东莨菪碱致小鼠 认知障碍的作用比较

魏山山^{1,2}, 王孟迪¹, 姜宁³, Ayaz Ahmed⁴, 刘新民^{1,3*}, 王琼^{1,2*}

(1.西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心/中西医结合学院,四川 泸州 646000;2.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;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.巴基斯坦卡拉奇大学国际化学和生命科学研究院 Panjwani 博士分子医学和药物研究中心,巴基斯坦 卡拉奇 74200)

【摘要】 目的 比较人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 改善东莨菪碱模型小鼠短期空间与非空间学习记忆的作用及机制。**方法** 建立东莨菪碱所致认知障碍模型,采用物体认知实验、液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法、比色法观察人参皂苷 Rg1 或 Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$),Rg1+Rb1(各 30 $\mu\text{mol/kg}$ 相加)对模型小鼠的行为学和神经递质及氧化应激水平的影响。**结果** 与对照组比较,模型小鼠的短期空间学习记忆和非空间学习记忆都受到严重损伤($P<0.001$, $P<0.001$);而石杉碱甲和人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 给药能显著逆转模型小鼠所引起的短期非空间学习记忆损伤,但人参皂苷 Rg1+Rb1 改善短期空间学习记忆的能力弱于人参皂苷 Rb1($P<0.01$)。与对照组比较,模型小鼠海马 ACh、5-HT、Glu 水平都显著下降,石杉碱甲和人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 给药能使模型小鼠海马 ACh、5-HT、Glu 水平显著增加。与对照组比较,模型小鼠血清氧化应激水平显著增高,而石杉碱甲和人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 给药能使模型小鼠血清 SOD、CAT、GSH 活力显著增加和 MDA 水平显著下降,虽然人参皂苷 Rg1+Rb1 调节 GSH 活力水平的能力弱于人参皂苷 Rb1($P<0.01$, $P<0.05$),但在调节 MDA 的能力上,人参皂苷 Rg1+Rb1 强于人参皂苷 Rg1、Rb1。**结论** 尽管人参皂苷 Rg1+Rb1 在各自有效剂量减半组合的情况下,改善空间短时学习记忆的能力有所下降,但三者改善短时非空间学习记忆损伤的效果是一样的。其差异可能与剂量的选择、调节脑内不同类神经递质 ACh、5-HT、Glu 和氧化应激水平 SOD、CAT、GSH、MDA 的能力有关。

【关键词】 短期空间学习记忆;短期非空间学习记忆;人参皂苷 Rg1;人参皂苷 Rb1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0094-08

Comparison of the effects among ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 on scopolamine-induced cognitive impairment in mice

WEI Shanshan^{1,2}, WANG Mengdi¹, JIANG Ning³, Ayaz Ahmed⁴, LIU Xinmin^{1,3*}, WANG Qiong^{1,2*}

(1. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193. 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193. 4. Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Karachi 74200, Pakistan)

【基金项目】 (泸州-医科大)应用基础研究项目(2018LZXNYD-ZK32);中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务(CAAS-ASTIP-2020-IFST);泸州市高端人才引进项目(刘新民团队);国家重点研发计划(2016YFE0131800)。

【作者简介】 魏山山(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:734558757@qq.com

【通信作者】 王琼(1975—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与航天医学。E-mail:luyiwangqiong@163.com

刘新民(1962—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药神经药理与方法学研究。E-mail:liuxinmin@hotmail.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To compare the effects and mechanisms of the ginsenosides Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 on improving spatial and non-spatial learning memory in a scopolamine-induced mouse model for cognitive impairment. **Methods** A scopolamine-induced cognitive impairment mouse model was established, and the effects of ginsenoside Rg1 or Rb1 (60 $\mu\text{mol/kg}$) and Rg1+Rb1 (30 $\mu\text{mol/kg}$ each combined) on behaviors were observed by using object cognition experiments. Liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry will be used to determine neurotransmitter levels in mice, while colorimetric methods will be used to determine oxidative stress levels. **Results** Compared with the control group, the model mice showed severe impairment on both short-term spatial learning memory and non-spatial learning memory ($P<0.001$). Huperzine A and ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 administration significantly reversed the short-term non-spatial learning memory impairment in the model mice, but the effect of ginsenoside Rg1+Rb1 on improving short-term spatial learning memory was weaker than that of ginsenoside Rb1 ($P<0.01$). Hippocampal Ach, 5-HT and Glu levels were decreased in the model mice compared with controls. Administration of Huperzine A or ginsenosides Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 significantly increased hippocampal Ach, 5-HT and Glu levels in the model mice. Serum oxidative stress levels were significantly increased in the model mice compared with controls. Administration of ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 significantly increased serum SOD, CAT and GSH activity and significantly decreased MDA levels in the model mice. Although ginsenoside Rg1+Rb1 was weaker than ginsenoside Rb1 in regulating GSH activity ($P<0.01$, $P<0.05$), ginsenoside Rg1+Rb1 was stronger than ginsenoside Rg1 and Rb1 in the ability to regulate MDA. **Conclusion** Although half dosage combination of ginsenoside Rg1+Rb1 exhibited decline in the ability to improve spatial short-term learning memory. However, ginsenosides Rg1, Rb1 and Rg1+Rb1 were comparable in their ability to improve short-term non-spatial learning memory impairment. The differences may be related to the dose and the ability of different ginsenosides on the regulation of neurotransmitters and oxidative stress levels in the brain.

【Keywords】 short-term spatial learning memory; short-term non-spatial learning memory; ginsenoside Rg1; ginsenoside Rb1

认知障碍是阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的主要症状,其短期学习记忆受损是该疾病特征性的早期临床表现,也是脑疾病诊断和治疗中最困难的问题之一^[1-2]。据阿尔茨海默病协会报告,每 3 s 就会有一人患痴呆症^[3]。预计到 2050 年,国际上的痴呆症患者数将高达 1.52 亿,其照护费用高达 2 万亿美元,给整个社会带来沉重的经济负担^[4-5]。

AD 发病机制复杂,至今为止,其详细明确的病因仍不清楚,神经元结构及功能的损伤以及相关蛋白通路的异常表达都会导致认知障碍。尽管西医标准化的靶向治疗能短期改善临床症状,但并不能延缓疾病的发展,且副作用大^[6]。

中药对于认知功能障碍的治疗,始终坚持"辨证论治"和"整体观"的原则,已在病因病机探讨、疾病预防、药物治疗方面取得了大量的进展,且中药具有副作用小,多靶点多途径的特点^[7-8]。在中医学中,痴呆早期阶段多为虚证,且以补益药为主。作为补益药之首的人参在不同疾病的不同阶段发挥了重要作用^[9]。近年来,随着传统中药的现代药理研究,借助分离技术的应用,我们发现人参具有复杂的化学成分、广泛的生物活性和独特的药理作

用,其中最重要的活性成分是人参皂苷^[10]。在大量现代药理研究中,人参皂苷已被证明其能应用多元化的靶点治疗相关疾病^[11]。此外,在中药神经药理学研究中,人参皂苷已被证明具有显著的神经保护作用^[12]。其中,达玛烷型人参皂苷 Rg1、Rb1 已被广泛证明在不影响中枢运动神经的情况下可从多途径改善认知功能障碍,包括介导氧化应激引起的细胞凋亡、抑制淀粉样蛋白的沉积、调节各类神经递质水平等^[13-15]。尽管人参皂苷 Rg1、Rb1 的单独使用已被证明能够改善认知功能障碍^[16],但人参皂苷 Rg1+Rb1 对于东莨菪碱 (scopolamine, Scop) 模型小鼠所引起的短时空间与非空间学习记忆改善作用及机制尚不清楚。因此,本研究采用东莨菪碱腹腔注射所致认知障碍模型,比较人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱认知障碍模型所引起短时空间与非空间学习记忆力的影响及差异,并对其作用及机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只体重为 20~22 g 的雄性 SPF 级 ICR 小鼠 (3 周龄) 购自北京维通利华实验动物公司 [SCXK

(京)2021-0006]并饲养于中国医学科学院药用植物研究所[SYXK(京)-2017-0020]。小鼠在正式实验前适应性喂养 7 d。在此期间保持饮食和水源的充足。光暗将交替循环(12 h:12 h),室温 21℃~24℃,湿度条件为(55±10)%。本实验经中国医学科学院药用植物研究所实验动物伦理委员会审批(SLXD-202107020023)。

1.2 主要试剂与仪器

人参皂苷 Rg1(CAS:22427-39-0)、人参皂苷 Rb1(CAS:41753-43-9)购自成都瑞芬思生物科技有限公司;石杉碱甲(Huperzine A,批号:H10940156)购于河南太龙药业股份有限公司;氧化应激的试剂盒包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD,批号:20210924)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH,批号:20210923)、过氧化氢酶(catalase, CAT,批号:20210917)、丙二醛(malondialdehyde, MDA,批号:20210916)购于南京建成生物工程研究所;东莨菪碱氢溴酸盐(Scopolamine hydrobromide trihydrate, 1 g, CAS 号:6533-68-2)购于麦克林公司;乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach,批号:123K262)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT,批号:114K702)、谷氨酸(Glutamate, Glu,批号:140690-20120)均购于美国 Sigma 公司。

小鼠物体认知识别实验仪器是由中国医学科学院药用植物研究所、中国航天员科研训练中心和北京康森益友科技有限公司联合研发;Q-Trap5500 型质谱分析仪(美国应用生物技术公司);Vibra-Cell 型超声波破碎仪(美国 Sonics 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及给药

将 60 只实验鼠按照每组 10 只的标准分为对照组,模型组(东莨菪碱组,Scop, 1 mg/kg),石杉碱甲组(Hup, 0.1 mg/kg),人参皂苷 Rg1 组(60 μmol/kg),人参皂苷 Rb1 组(60 μmol/kg),人参皂苷 Rg1+Rb1 组(30+30 μmol/kg)。给药组灌胃给药 14 d,其余组给予蒸馏水,第 15 天时,除对照组外,其余组将在给药 30 min 后进行东莨菪碱腹腔注射,使其诱导认知障碍。腹腔注射间隔 30 min 再进物体认知识别实验,每天持续给药直到行为学结束为止。

1.3.2 物体位置识别实验

物体位置识别实验参考本实验室建立的方法^[17]并作细微修改后进行。简而言之,该实验共计 4 d(3 个阶段)。前 3 d 为适应期,熟悉期和测试期

在第 4 天分时段进行。适应期时,动物每天同一时间段被放于测试箱中自由活动 10 min。第 4 天上半时段为熟悉期,在两测试箱内右上角侧内固定位置分别放一个相同的物体,将小鼠放入后 5 min 的探索行为将被自动记录。间隔 30 min 进入测试期。测试期间,两个相似物体中的其中一个将被移到另一物体的斜对角,5 min 的自由探索行为将再次被记录。

1.3.3 新物体识别实验

新物体实验的方法与物体位置识别实验基本相同。不同的是,测试期内将其中一个物体换为另一新物体,其放置位置未作改变。记录 5 min 内小鼠对两物体的探索时间^[18]。

1.3.4 海马神经递质水平测定

(1) 样品处理

所有行为学检测完成后,将小鼠处死,剥开头骨,在冰上迅速分离出海马并称重之后加入超纯水(50 μL)超声匀浆(10 s)。20 μL 的 IS 溶液将被加入到 50 μL 匀浆液中,涡旋混匀后,加入 10 μL 的三氯乙酸沉淀蛋白,4℃低温离心(2×10⁴ r/min, 15 min),取 40 μL 上清液放入 4℃冰箱,次日检测^[19]。

(2) 含量测定

含量测定参见本课题组先前建立的方法^[20],用于定量分析的离子为 m/z 146.1→87.4(ACh);m/z 177.0→160.0(5-HT);m/z 148.0→84.0(Glu)。

1.3.5 氧化应激水平测定

四个氧化应激相关指标(SOD、CAT、GSH、MDA)按照试剂盒标准方法进行测定。

1.4 统计学方法

数据采用统计软件 SPSS 21.0 进行分析,所有值记为平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$), $P < 0.05$ 表示数据有统计学差异。物体位置识别实验和新物体识别实验熟悉期对 A1 和 A2 的探索时间采用配对 t 检验进行分析。其余实验数据符合正太分布,各参数组间差异采用单因素方差(One-way ANOVA)分析;若数据为非正态分布或者方差不齐,使用非参数检验(Nonparametric tests)进行组间比较。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠短时空间记忆力的影响

图 1A 所示,在熟悉期实验阶段,与 Scop(1 mg/kg)组比较,对照组人参皂苷 Rg1(60 μmol/kg)、Rb1(60 μmol/kg)、Rg1+Rb1(30+30 μmol/kg)的探索总时间没有显著差异,与东莨菪碱 Rg1(60 μmol/kg)

比较, Hup(0.1 mg/kg) 的总探索时间显著减少($P<0.01$), 表明模型组动物对物体的探索能力没有差异。图 1B 所示, 各组动物对熟悉期的两物体未见位置偏好。图 1C 所示, 与对照组比较, Scop(1 mg/kg) 的相对辨别指数显著下降($P<0.001$); 与 Scop(1 mg/kg) 比较, HUP(0.1 mg/kg)、人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 给药组都能显著提高东莨菪碱小鼠的相对辨别指数($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.05$)。但与人参皂苷 Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$) 比较, 人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$) 改善短时空间记忆力的能力无显著性差异, 而人参皂苷 Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 改善短时空间记忆力的能力有所下降($P<0.01$)。

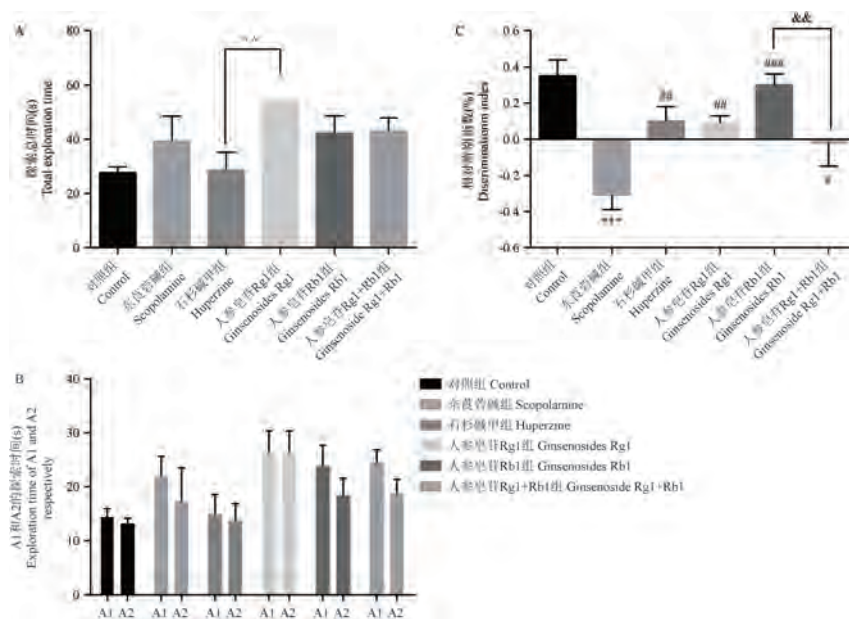
2.2 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠短时非空间记忆能力的影响

图 2A 所示, 在熟悉期实验阶段, 与 Scop(1 mg/kg) 组比较, 对照组和人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 的探索总时间没有显著差异; 与人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$) 比较, 模型组动物对物体的探索能力没有差异。图 2B 所示, 各组动物对熟悉

期的两物体未见位置偏好。图 2C 所示, 与对照组比较, Scop(1 mg/kg) 组的相对辨别指数显著下降($P<0.001$); 与 Scop(1 mg/kg) 组比较, HUP(0.1 mg/kg)、人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 给药组都能显著提高东莨菪碱小鼠的相对辨别指数($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.01$)。此外, 与人参皂苷 Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$) 比较, 人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、人参皂苷 Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 给药组改善短时非空间记忆能力并未出现显著差异性。

2.3 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠海马神经递质的影响

图 3A~3C 所示, 与对照组比较, Scop(1 mg/kg) 组海马中的神经递质 ACh、5-HT、Glu 水平都显著下降($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$); 与 Scop(1 mg/kg) 比较, Hup(0.1 mg/kg)、人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 都能显著提高神经递质 ACh、5-HT、Glu 水平。此外, 与人参皂苷 Rb1(60 $\mu\text{mol/kg}$) 比较, 人参皂苷 Rg1(60 $\mu\text{mol/kg}$)、人参皂苷 Rg1+Rb1(30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 对于调节神经递质 ACh、5-HT、Glu 水平的



注:与对照组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与人参皂苷 Rb1 组比较,& $P<0.01$;与人参皂苷 Rg1 组比较,^^ $P<0.01$ 。

图 1 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠物体位置识别实验中左右位置偏好、探索总时间、相对辨别指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8\sim 10$)

Note. Compared with the control group, *** $P<0.001$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with ginsenoside Rb1, & $P<0.01$. Compared with ginsenoside Rg1, ^^ $P<0.01$.

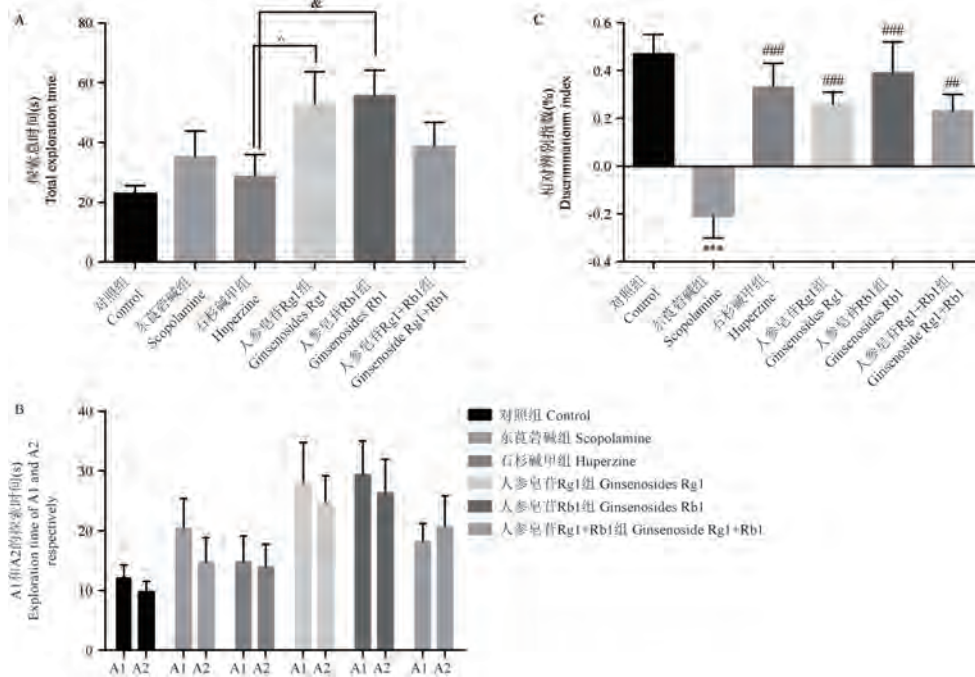
Figure 1 Effects of Ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1 + Rb1 on left-right position preference, total exploration time and relative discrimination index of scopolamine mice in object recognition task

能力并未出现显著性差异。

2.4 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠血清氧化应激的影响

如图 4A~4D 所示,与对照组比较,Scop (1 mg/kg) 组能使小鼠血清中 SOD、CAT、GSH 活力显著下降和使 MDA 含量显著升高 ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.05$, $P<0.001$)。与 Scop (1 mg/kg) 组比较, Hup (0.1 mg/kg)、人参皂苷 Rg1 (60

$\mu\text{mol/kg}$)、Rb1 (60 $\mu\text{mol/kg}$)、Rg1+Rb1 (30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 能显著提高血清中 SOD、CAT、GSH 活力和降低 MDA 的含量。此外,与东莨菪碱 Rb1 (60 $\mu\text{mol/kg}$) 比较,人参皂苷 Rg1+Rb1 (30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 对于调节 GSH 的能力有所下降 ($P<0.01$)。与东莨菪碱 Rg1、Rb1 (30 $\mu\text{mol/kg}$) 比较,人参皂苷 Rg1+Rb1 (30+30 $\mu\text{mol/kg}$) 调节 MDA 含量的能力显著上升 ($P<0.05$)。

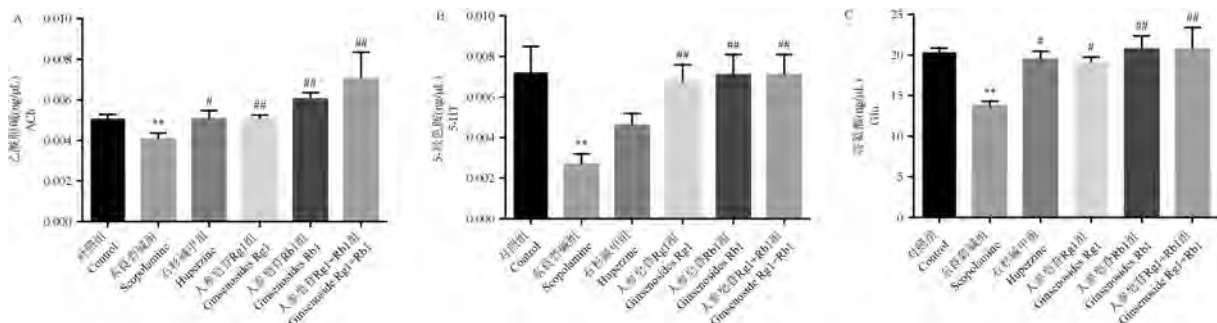


注:与对照组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与人参皂苷 Rb1 比较,* $P<0.05$;与人参皂苷 Rg1 比较, $\wedge P<0.05$ 。

图 2 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠新物体识别实验探索总时间、左右位置偏好、相对辨别指数的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8\sim 10$)

Note. Compared with the control group, *** $P<0.001$. Compared with the model group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with ginsenoside Rb1, * $P<0.05$. Compared with ginsenoside Rg1, $\wedge P<0.05$.

Figure 2 Effects of Ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1 + Rb1 on left and total exploration time, right position preference and relative discrimination index of scopolamine mice in novel object recognition

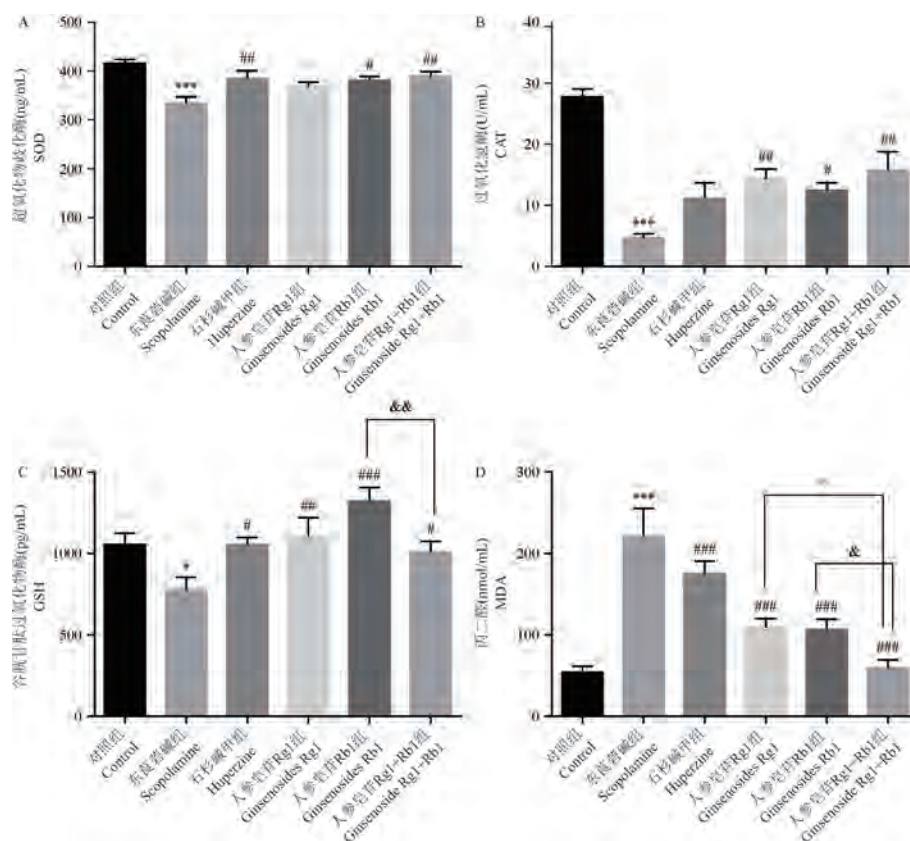


注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图 3 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠海马神经递质的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8\sim 10$)

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

Figure 3 Effects of Ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1 + Rb1 on hippocampal neurotransmitters of scopolamine mice



注:与对照组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$;与人参皂苷 Rb1 比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$;与人参皂苷 Rg1 比较, ^ $P < 0.05$ 。

图 4 人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 对东莨菪碱小鼠血清氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$. Compared with ginsenoside Rb1, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$. Compared with ginsenoside Rg1, ^ $P < 0.05$.

Figure 4 Effects of Ginsenoside Rg1, Rb1 and Rg1 + Rb1 on serum oxidative stress level of scopolamine mice

3 讨论

在老年痴呆防治药物筛选的研究中,模拟痴呆主要症状的认知障碍模型占据重要地位^[21-22]。胆碱功能障碍假说在 AD 发病机制中占据不可估量的地位^[23-24]。东莨菪碱腹腔注射所致认知障碍模型是模拟认知障碍模型的经典模型^[25]。学习记忆的行为学检测方法分为三大类:惩罚(跳台、避暗、穿梭和迷宫)、奖赏(奖赏操作条件反射、食物性迷宫)和自主选择(物体识别)等。水迷宫、物体位置和新物体识别是检测空间学习记忆和非空间学习记忆的主要行为学检测方法,而后两者是公认的评价短时空间和非空间学习记忆的动物行为学评价方法^[26]。有研究表明,胆碱能神经功能障碍可引起短时学习记忆的损伤^[27]。本实验结果与其一致,在物体位置识别实验中,与空白组比较,东莨菪碱模型小鼠的短时空间学习记忆显著下降;在新物体识别实验中,与空白组比较,模型小鼠的短时非空间学

习记忆也出现显著性下降的结果。

越来越多的研究发现,除中枢胆碱能系统中胆碱能神经递质维持正常水平是认知功能正常的重要影响因素之外^[28],单胺类、氨基酸类神经递质与神经精神疾病密切相关^[29-30]。例如,大蒜素通过调节神经递质 DA、NE、5-HT、GABA 和 Glu 的水平可以改善铝和铜诱导 Wistar 大鼠导致的认知功能障碍^[31]。本研究也表明,模型组的胆碱能神经递质 Ach、单胺类神经递质 5-HT、氨基酸类神经递质 Glu 水平显著下降。

氧化应激可引起神经细胞膜脂质过氧化、突触功能受损及线粒体损伤。大量研究证明, SOD、GSH、MDA、CAT 的水平变化可以综合反应大脑的氧化应激状态^[32-35]。GSH 和 SOD 为机体内的重要抗氧化酶,MDA 是机体氧化应激反应中的脂质过氧化产物, CAT 可清除体内的过氧化氢而保护机体免受损害^[36]。本研究模型组的 SOD、GSH、CAT 水平显著下降、MDA 的水平显著增高。

人参作为治疗痴呆的中药已多有报道^[37]。近几十年的现代药理研究中发现,人参皂苷是人参的主要活性成分,其结构确定的皂苷成分就有 40 余种,而人参皂苷 Rg1、Rb1 的含量最高^[38]。例如,向玥等^[39]通过惩罚类 Morris 水迷宫行为学检测方法发现人参皂苷 Rg1 能显著改善 D-半乳糖 (D-gal) 所致认知障碍小鼠的空间位置辨知的长时学习记忆能力。Zhang 等^[40]通过惩罚类 Morris 水迷宫法发现人参皂苷 Rb1 能显著改善淀粉样蛋白 1-42 (A β 1-42) 脑室注射学习记忆障碍模型大鼠的长时空间学习能力。本实验结果表明,人参皂苷 Rg1、Rb1、人参皂苷 Rg1+Rb1 在改善空间短时学习记忆和非空间短时学习记忆的能力有一定差异。在新物体实验中发现人参皂苷 Rg1、Rb1、人参皂苷 Rg1+Rb1 改善模型组非空间短时学习记忆的能力相当,其主要表现为对于神经递质 ACh、5-HT、Glu 和氧化应激 SOD、CAT 水平的调节。在早期对 Rg1 和 Rb1 抗学习记忆机制的初步研究中就发现^[39],Rb1 可以拮抗脂质过氧化,清除氧自由基,增加过氧化氢酶和 GSH-PX 活性,而 Rg1 没有。在本研究中对 GSH 指标,Rb1 的效果优于联合用药,可能是 Rg1、Rb1 联合应用用药剂量减半组合后改善这类指标的剂量未达到。且先前有研究表明,人参皂苷 Rg1 和 Rb1 组合与黄芪甲苷联合应用会增强 MDA 含量的增加。在本研究中,与其结果一致,联合用药调节 MDA 含量的效果优于单独使用任何一个药^[41]。

综上所述,本实验采用东莨菪碱小鼠腹腔注射成功建立了短期空间与非空间学习记忆损伤的认知障碍模型,并分别运用了动物认知行为学评价方法、LC-MS-MS 法、比色法对人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 改善认知障碍模型小鼠行为学和脑组织进行了一系列的观察,发现尽管人参皂苷 Rg1+Rb1 在各自有效剂量减半重新组合的情况下,人参皂苷 Rg1+Rb1 改善短时空间短时学习记忆的能力有所下降。但人参皂苷 Rg1、Rb1、Rg1+Rb1 在改善短时非空间学习记忆损伤的能力依然相当,足以说明 Rg1+Rb1 联用依然显示出在改善学习记忆损伤上有一定的优势。其机制可能与有效调节脑内不同类神经递质和氧化应激水平的能力有关。

参考文献:

[1] Cai H, Li G, Hua S, et al. Effect of exercise on cognitive function in chronic disease patients: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials [J]. Clin Interv Aging, 2017, 12: 773-783.

[2] Zheng C, Xu R. The Alzheimer's comorbidity phenome: mining from a large patient database and phenome-driven genetics prediction [J]. JAMIA Open, 2019, 2(1): 131-138.

[3] Bron EE, Klein S, Papma JM, et al. Cross-cohort generalizability of deep and conventional machine learning for MRI-based diagnosis and prediction of Alzheimer's disease [J]. Neuroimage Clin, 2021, 31: 102712.

[4] Krivanek TJ, Gale SA, McFeeley BM, et al. Promoting successful cognitive aging: a ten-year update [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 81(3): 871-920.

[5] Park KH, Lim JS, Seo SW, et al. Executive summary of the 2019 international conference of Korean dementia association: exploring the novel concept of Alzheimer's disease and other dementia: a report from the academic committee of the Korean dementia association [J]. Dement Neurocogn Disord, 2020, 19(2): 39-53.

[6] Li Y, Hai S, Zhou Y, et al. Cholinesterase inhibitors for rarer dementias associated with neurological conditions [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 3: CD009444.

[7] Boopathi S, Poma AB, Garduño-Juárez R. An overview of several inhibitors for Alzheimer's disease: characterization and failure [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10798.

[8] Song Z, Luo D, Wang Y, et al. Neuroprotective effect of danggui shaoyao san via the mitophagy-apoptosis pathway in a rat model of Alzheimer's disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 3995958.

[9] Sun Y, Liu Y, Chen K. Roles and mechanisms of ginsenoside in cardiovascular diseases: progress and perspectives [J]. Sci Chin Life Sci, 2016, 59(3): 292-298.

[10] Wang K, Zhang Z, Li S, et al. Transcriptome-wide analysis for ginsenoside Rb3 synthesis-related genes and study on the expression of methyl jasmonate treatment in panax ginseng [J]. Life (Basel), 2021, 11(5): 387.

[11] Ratan ZA, Haidere MF, Hong YH, et al. Pharmacological potential of ginseng and its major component ginsenosides [J]. J Ginseng Res, 2021, 45(2): 199-210.

[12] Fernández-Moriano C, González-Burgos E, Iglesias I, et al. Evaluation of the adaptogenic potential exerted by ginsenosides Rb1 and Rg1 against oxidative stress-mediated neurotoxicity in an in vitro neuronal model [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182933.

[13] Qiong W, Yong-Liang Z, Ying-Hui L, et al. The memory enhancement effect of Kai Xin San on cognitive deficit induced by simulated weightlessness in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 187: 9-16.

[14] Ahmed A, Zeng G, Jiang D, et al. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats [J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(5): 1431-1446.

[15] 王琼. 跳台/自主活动实验方法改进和人参皂苷及代谢产物益智作用比较 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010.

[16] Yang Y, Li S, Huang H, et al. Comparison of the protective effects of ginsenosides Rb1 and Rg1 on improving cognitive

- deficits in SAMP8 mice based on anti-neuroinflammation mechanism [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 834.
- [17] 范琳犀, 杨玉洁, 姜宁, 等. 皮质酮诱导小鼠抑郁伴发的学习记忆损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(4): 59-64.
- [18] 吕静薇, 宋广青, 董黎明, 等. 物体认知——基于动物自发行为的一种学习记忆评价方法的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 21-27.
- [19] 黄红. 天麻不同品种 DNA 鉴别及改善学习记忆和抗疲劳研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [20] 裴海月, 姜宁, 王孟迪, 等. 槟榔对小鼠的抗抑郁作用影响及机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 24-32.
- [21] 李令文, 陈明苍, 季宇彬. 老年痴呆症模型研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(5): 43-45.
- [22] 曾贵刚, 李峻, 彭海东, 等. 大鼠血管性痴呆动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3): 50-55.
- [23] Chen X, Drew J, Berney W. Neuroprotective natural products for Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1309.
- [24] Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(2): 488-498.
- [25] 裴名宜. 东莨菪碱对小鼠学习和记忆再现的影响 [J]. *医药产业资讯*, 2005, 2(11): 92.
- [26] 郑前敏, 徐平. 认知功能相关的动物行为学实验研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(7): 85-89.
- [27] 吕静薇, 宋广青, 董黎明, 等. 物体认知——基于动物自发行为的一种学习记忆评价方法的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 21-27.
- [28] Jasiecki J, Targońska M, Wasąg B. The role of butyrylcholinesterase and iron in the regulation of cholinergic network and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2033.
- [29] Wang Q, Sun LH, Jia W, et al. Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(12): 1748-1754.
- [30] 王蕾, 赵明镜, 杨涛, 等. 氨基酸类神经递质与认知活动关系及中医药应用的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(35): 40-43.
- [31] Kaur S, Raj K, Gupta YK, et al. Allicin ameliorates aluminium- and copper-induced cognitive dysfunction in Wistar rats: relevance to neuro-inflammation, neurotransmitters and A β ₍₁₋₄₂₎ analysis [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2021, 26(4): 495-510.
- [32] 秦川, 常洋, 张兵林, 等. 老年性痴呆病转基因动物模型自发疾病病理学观察 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2001, 11(1): 28-30.
- [33] 许玉珉, 沈晓明, 兰瑞, 等. 开心散对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力和突触功能的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(20): 15-22.
- [34] 谢超敏, 郑桂兰, 钟志勇, 等. 中药银杏叶对老年痴呆症小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(9): 26-29.
- [35] 高冰冰, 徐淑萍, 刘新民, 等. 开心散与去茯苓开心散改善拟 AD 动物学习记忆作用比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(7): 57-62.
- [36] 莫颂轶, 张丽凤, 黄彦峰, 等. 慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 63-67.
- [37] 党海霞, 王立为, 刘新民. 人参改善模拟中风大小鼠模型所致认知功能障碍的作用机理分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(5): 302-305.
- [38] 王琼, 王逸, 韩春勇, 等. 人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 及其代谢产物益智作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(13): 1960-1965.
- [39] 向玥, 陈粼波, 姚辉, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对 D-半乳糖所致衰老小鼠海马的保护机制 [J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3789-3795.
- [40] Zhang JT, Qu ZW, Liu Y, et al. Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1990, 103(11): 932-938.
- [41] Huang XP, Qiu YY, Wang B, et al. Effects of Astragaloside IV combined with the active components of Panax notoginseng on oxidative stress injury and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 signaling pathway after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(40): 402-409.

[收稿日期]2021-11-03

张润东,赵琳娜,姚华. 小型猪肺部三维重建与脉管 3D 打印模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 102-106.

Zhang RD, Zhao LN, Yao H. Three-dimensional modeling of pulmonary and 3D printing of vessels and bronchus in Bama minipigs [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 102-106.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 014

小型猪肺部三维重建与脉管 3D 打印模型

张润东^{1,2#}, 赵琳娜^{3#}, 姚 华^{1*}

(1.北京农学院动物科学技术学院,北京 102206;2.强生医疗专业教育学院,北京 100016;
3.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 目的 探讨小型猪肺部三维重建模型建立方法及 3D 打印模型的应用。**方法** 4 头巴马小型猪行全身麻醉做肺部 CT 血管成像,获取数据采用 MIMICS 软件重建肺段组织结构,3D 打印肺部脉管的实体模型。**结果** 基于 CT 血管成像数据重建的三维模型,清晰展现小型猪肺部血管和支气管 3~4 级分支的解剖结构,并显示叶裂和部分段间平面,可任意旋转和缩放。**结论** 利用三维重建和 3D 打印技术可成功创建巴马小型猪肺部解剖结构模型,为比较医学研究和胸外科手术培训材料提供基础。

【关键词】 肺;三维重建;3D 打印;小型猪

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0102-05

Three-dimensional modeling of pulmonary and 3D printing of vessels and bronchus in Bama minipigs

ZHANG Rundong^{1,2#}, ZHAO Linna^{3#}, YAO Hua^{1*}

(1. Animal Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China. 2. Johnson & Johnson Institute, Beijing 100016. 3. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To explore establishment method of three-dimensional modeling and 3D printing of pulmonary in minipigs, and apply the constructs to clinical trials. **Methods** Four Bama minipigs were subjected to general anesthesia and CT angiography. Imaging data were reconstructed by MIMICS software into tissues of pulmonary and used to print the indicated structures of pulmonary vessels and bronchus using a 3D printer. **Results** The three-dimensional model from the CT angiography data revealed three to four levels of anatomical structure of pulmonary vessels and bronchus, lobar fissure and partial intersegmental planes. The 3D model, rotating and auto-zooming is consistent with the pulmonary tissue. **Conclusions** Constructs of pulmonary vessels, bronchus and whole pulmonary tissue in Bama minipigs could be reconstructed by three-dimensional reconstruction and 3D printing technology, which provide reference for comparative medical research and have been materials for thoracic surgery training.

【Keywords】 pulmonary; three-dimensional reconstruction; 3D printing; minipigs

肺癌是全球癌症死亡的主要原因。2015 年,中国肺癌的发病率和病死率为 57.26/10 万和 45.87/10 万,均为所有恶性肿瘤之首,总体五年生存率仅约为

20%^[1-2]。临床医学中,外科手术仍然是目前肺癌最主要的治疗方法。小型猪是开展胸外科手术培训的良好模型^[3-4],巴马小型猪由于具有遗传性能稳定、

[作者简介] 张润东(1992—),男,硕士,研究方向:实验动物模型。E-mail: randolphzhang@hotmail.com

赵琳娜(1991—2021),女,硕士,研究方向:实验动物学。E-mail: zhaolinn_1991@126.com #共同第一作者

[通信作者] 姚华(1976—),女,副教授,研究方向:代谢病与小动物临床疾病。E-mail: vetyao@163.com

体型小的特点^[5-6],同时部分解剖结构与生理功能又与人类非常相似^[7],因此可以用于实验动物模型的建立,以协助胸外科医生快速、熟练地掌握胸腔镜手术操作技巧。鉴于此,采用三维重建技术应用于胸腔镜肺段手术的术前规划和术中定位,采用 3D 打印技术创建小型巴马猪肺部组织结构模型,可应用于胸外科规范化培训教学,帮助临床医生和外科医学生熟练应用和掌握肺段切除手术,提高学习兴趣和临床思维能力^[8]。本研究采用 CT 血管成像技术和 MIMICS 软件重建小型巴马猪肺部模型,能够应用于临床实践,为比较医学研究和胸外科手术培训提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级广西巴马小型猪 4 头,雌雄各半,2 头雌性小型猪分别为 3 月龄和 6 月龄,体重分别为 35 kg 和 45 kg;2 头雄性小型猪分别为 4 月龄和 6 月龄,体重分别为 40 kg 和 45 kg,均由北京实创世纪小型猪养殖基地提供[SCXK(京)2018-0011]。动物麻醉后的数据采集实验在强生医疗专业教育学院开展[SYXK(京)2016-0037],CT 影像学检查在中国农业大学动物医院影像学检查室进行。本研究在 IACUC 强生(上海)医疗器材有限公司组建指导下开展,伦理审批号(JNBJ21-1806-2),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

阿托品购于天津金耀药业有限公司(批号:H12020382);舒泰 50 购于法国维克(批号:外兽药证字 43 号);盐酸赛拉嗪注射液购于吉林省华牧动物保健品有限公司(批号:兽药字 070012926)。

MX-16 SLICE CT(荷兰飞利浦);呼吸麻醉机(美国 MATRX);心电监护仪(美国 Cardell Touch);ProX800 3D 打印机(美国 3D system 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CT 血管成像技术

实验巴马猪扫描前 20 min 笼内给予阿托品 0.02 mg/kg,10 min 后肌注舒泰 2.2 mg/kg 和盐酸赛拉嗪 2.2 mg/kg,观察动物安静、眼睑反射消失后转运至扫描床,行气管插管,连接呼吸机机械通气,在股内侧建立静脉通路。调整体位至俯卧位,监测血氧、血压、呼末 CO₂ 和气道压力等指标。静脉推注碘海醇造影剂,扫描参数:管电压 120 kV,管电流 200 mAs,探测器准直器 16 mm×0.75 mm,旋转时间

0.75 s,层厚 1 mm,重建间隔 1.5 mm,软组织滤波。扫描结束后,持续动态监测动物体征,直至复苏,图像数据以 DCIOM 格式保存。

1.3.2 三维重建与 3D 打印模型制作

使用 Mimics Medical 21.0 软件依次对支气管、动脉和静脉进行重建。肺裂和段间交界面采用自动和手动相结合的方式分割。将 Mimics Medical 21.0 处理的支气管、动脉和静脉数据导入 ProX800 打印机,以光敏树脂为原料,通过计算机控制紫外激光使其凝固成型。打印精度 0.025 mm,成型尺寸 650 mm×750 mm×500 mm。

2 结果

2.1 肺部脉管三维重建模型的建立

4 头巴马实验小型猪经增强薄层 CT 扫描,切面图像显示巴马小型猪的肺组织边界清晰、脉管扫描结构明确(见图 1),各肺段结构一致,符合实验动物品系一致的基本属性,可用于三维重建数据的采集及 3D 打印模型的创建。

分别建立肺部支气管、肺动脉和肺静脉,白色标记为支气管,蓝色标记为肺动脉,红色标记为肺静脉。由图 2 可见,通过 CT 扫描数据创建的肺支气管 III 及其远端 a、b 两个分支,L₁ 为右肺中叶支气管且有 a、b 两个分支,右肺下叶支气管分别为外侧面的 L₂、L₃、L₄ 以及背侧面的 D₂、D₃、D₄ 和 D₅,肺动脉和肺静脉结构清晰,脉络有致,符合动物肺部结构的基本特征。

将肺部支气管、肺动脉和肺静脉模型组合,形成三维重建肺部模型。由图 3 可见,模型中肺动脉、肺静脉和支气管的 3~4 级分支交叉错落、排列有序,具立体感,同时可任意旋转和缩放。正面观(图 3A)可见右肺门脉管从前到后的排布顺序为右上肺静脉、肺动脉、右支气管和右下肺静脉。右上叶脉管从前向后排布为右上肺静脉 V¹、V² 和 V^{2t}、右上肺动脉 A¹ 和 A²、右上支气管 B¹ 和 B²,其中支气管位置靠上,其次是动脉和静脉。右中叶支气管 B⁴ 和 B⁵、静脉 V⁴ 和 V⁵ 位于脏层浅表,后方是中叶动脉 A⁴ 和 A⁵,支气管位于静脉的下方。右下叶动脉 A⁸ 位于最外侧,向内依次为支气管 B⁸ 和静脉 V⁸。左肺门脉管从前到后的排布顺序为左上肺静脉 V¹⁺²+V³ 和 V⁴+V⁵,肺动脉包括 A¹⁺²+A³、A⁴+A⁵、A⁶ 和 A⁸,左支气管 B¹⁺²+B³、B⁴+B⁵、B⁶ 和 B⁸,左下肺静脉包括 V⁶ 和 V⁸。背面观(图 3B)可见肺部脉管结构

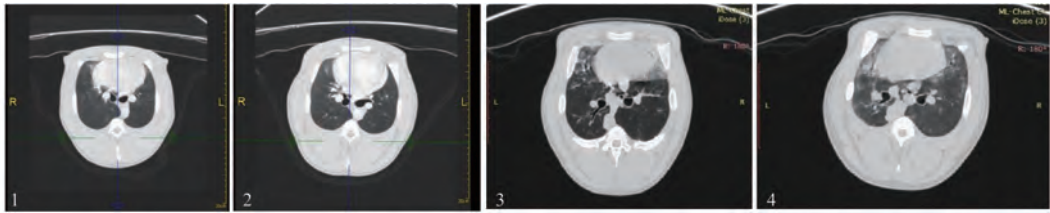
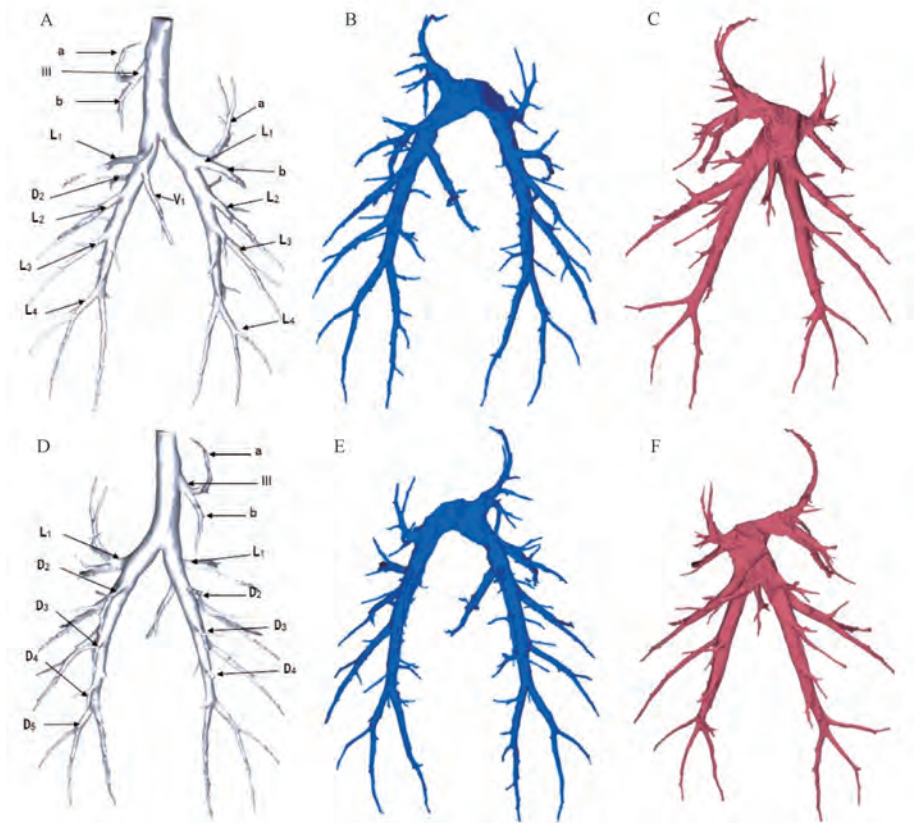


图 1 4 头巴马小型猪肺 CT 薄层扫描的切面图像
Figure 1 Thin-section CT image of pulmonary in Bama minipigs



注:A:支气管正面观;B:肺动脉正面观;C:肺静脉正面观;D:支气管背面观;E:肺动脉背面观,F:肺静脉的背面观。

图 2 巴马小型猪肺部脉管三维重建图像

Note. A, Front view of bronchus. B, Front view of pulmonary artery. C, Front view of pulmonary vein. D, Dorsal view of bronchus. E, Dorsal view of pulmonary artery. F, Dorsal view of pulmonary vein.

Figure 2 Three dimensional reconstruction image of pulmonary vessels in Bama minipigs

层次与正面观相符。

2.2 肺实质模型的建立

考虑到影像学 CT 扫描对肺泡组织不显像的原理,通过数据构建肺实质并采用肺灌注模型对段间交界面进行分割。如图 1 所示,右肺水平裂发育不全,斜裂前份发育良好,后份发育较差;左肺水平裂发育正常。段间交界面在 CT 影像上并不明确,根据肺段支气管、血管的解剖结构,基于 CT 影像资料人工标注,将肺段在形态上进行分隔。小型猪肺段单元较多且复杂,选取与人类最

为相似的几个肺段标注相应的段间交界面,参考 Nomori 等^[9]肺癌解剖节段切除术图谱的原则对各肺段进行命名。

在图 4 重建结构中,右上叶包括:右上叶尖段(RS¹)和右上叶后段(RS²),右中叶包括:右中叶外侧段(RS⁴)和右中叶内侧段(RS⁵),右下叶包括:右下叶背段(RS⁶)、右下叶*(RS^{*})段、右下叶前基底段(RS⁸)和其他未标注的下叶各分段。副叶相对独立,未展示。

左上叶包括:左上叶固有段(LS¹⁺²+LS³)和左上

叶舌段(S^4+S^5),左下叶包括;左下叶背段(LS^6)、左下叶前基底段(LS^8)和其他未标注的下叶各段。

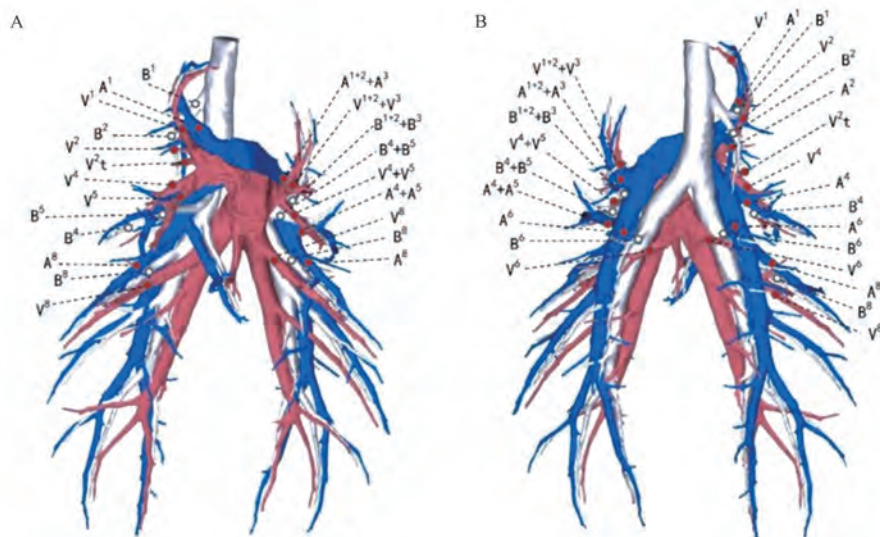
2.3 肺部脉管 3D 模型的打印

根据 1.3.2 的方法,采用 3D 打印技术制作出巴马小型猪的肺部脉管实体模型。

在肺部脉管 3D 打印模型(见图 5)上,右肺门脉管从前到后的排布顺序为右上肺静脉、肺动脉、右支气管和右下肺静脉。右上叶从前向后排布为右

上肺静脉、右上肺动脉、右上支气管,其中支气管位置靠上,其次是动脉和静脉。右中叶脉管支气管和静脉位于脏层浅表,后方是中叶动脉,支气管位于静脉下方。右下叶动脉位于最外侧,向内依次为支气管和静脉。

左肺门脉管从前到后的排布顺序为静脉、支气管和动脉。左上叶脉管排布顺序与肺门相同,左下叶脉管排布顺序同右下叶。

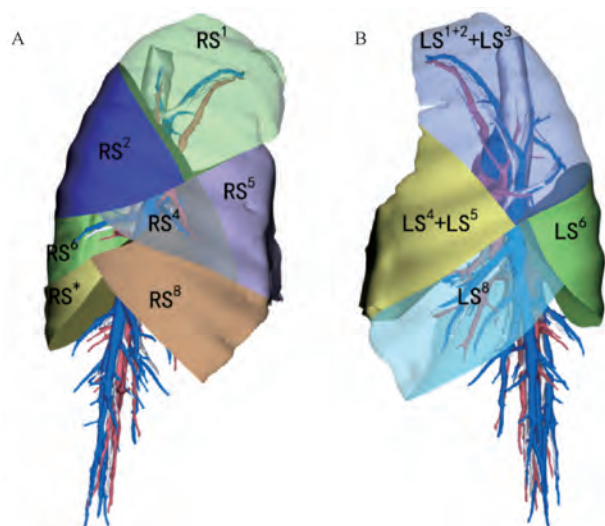


注:A:正面观;B:背面观。

图3 巴马小型猪肺血管和支气管三维重建模型

Note. A, Front view. B, Dorsal view.

Figure 3 Three dimensional reconstruction model of pulmonary vessels and bronchus in Bama minipigs

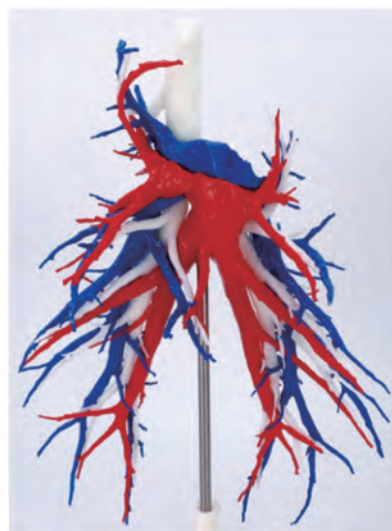


注:A:右侧观;B:左侧观。

图4 巴马小型猪肺部分肺实质重建及段间交界面

Note. A, Right side view. B, Left side view.

Figure 4 Partial pulmonary parenchymal reconstruction and intersegmental border in Bama minipigs



注:与图 3A 对应的正面观。

图5 巴马小型猪肺血管和支气管3D打印模型

Note. Front view corresponding to Figure 3A.

Figure 5 3D printing model of pulmonary vessels and bronchus in Bama minipigs

3 讨论

巴马小型猪肺部解剖结构和人类有相似的解剖单元,也存在一定的特异性,因此可参考人类肺部结构的基本组成,创建巴马小型猪的肺部模型。与传统铸型标本的结构和命名方法^[10-11]相比,有研究观察到右肺上叶头侧段的操作类似于人的 S⁶^[12]。本课题综合解剖学结构命名法和临床命名法的特点,更关注到肺部模型的外科手术切除术的临床应用,以临床命名法为主要原则,有望协助临床医生或外科医学生更熟悉肺部的组织名称,将更多精力集中在手术的熟练度培训和手术术式研究的探索中。

试验中,雌雄性别差异在广西巴马小型猪作为实验动物保证其品系的稳定性上显示:其肺部三维重建模型的建立不产生显著影响,且均与 CT 影像学观察结果相符^[13]。与 Nakakuki^[11]创建的猪肺铸型标本相比,巴马小型猪右肺中叶二级结构发育更加完善,向远端发出内侧(B⁴)与外侧(B⁵)两段细支气管,因此右肺中叶包含两个二级结构。右肺下叶背段支气管(B⁶)向外分化两支三级结构与 D₂ 和 D₃ 细支气管相似,鉴于 V⁶ 和 A⁶ 的结构与 B⁶ 基本相符, B⁶ 两支细支气管是否共干,是否发育为两个二级结构,还需要进一步研究和探讨。本课题中,样本数量较少,小型猪肺部解剖的相关文献尚不丰富,目前还无法确定 B⁶ 的结构分子是否可作为广西巴马小型猪肺部结构的品系特征。

广西巴马小型猪在心脏解剖、消化系统与脂质代谢等医学研究领域与人类较为相似,是优秀的动物模型^[7]。本课题发现,广西巴马小型猪右上肺叶仅包含两个二级结构 RS¹ 和 RS²,人类则为 3 个;巴马猪 B¹ 从主干分出后,马上分化出两个主要细支气管,分别向体前侧和腹侧走形,类似人类 B¹ 与 B³ 支气管共干。右肺中叶两段(RS⁴、RS⁵)与人类在支气管与血管分化上一致,但巴马小型猪的副叶结构向心脏侧走行,对于临床部分肺段切除术的操作不会造成影响。巴马小型猪左上肺叶两段(B¹⁺²+B³、B⁴+B⁵)与人体肺部解剖结构相符,可作为理想的肺部外科手术练习模型,为临床医生和外科医学生的技术培训提供材料,帮助医生提高手术准确率和安全性,实现精准的肺段切除^[14-15]。

基于医学影像学的三维重建及虚拟手术规划技术的快速发展,在解剖结构复杂且具有个体化差

异的胸腔镜解剖性肺段切除术中,利用三维重建技术获得小型猪的清晰肺部解剖影像,再联合 3D 打印技术创建肺部模型,对于肺部切除手术的术前规划和术中导航以及手术熟练度的练习均有积极作用,甚至对肺癌的手术治疗有一定的推动作用。

参考文献:

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] 邱斌,冀瑛,白广宇,等. 解剖性部分肺叶切除术治疗早期肺癌:实践与发展[J]. 中华胸外科电子杂志, 2020, 7(4): 240-246.
- [3] Oizumi H, Kato H, Endoh M, et al. Swine model for training surgeons in minimally invasive anatomic lung segmentectomy[J]. J Vis Surg, 2017, 3: 72.
- [4] Tedde ML, Brito Filho F, Belmonte Ede A, et al. Video-assisted thoracoscopic surgery in swine: an animal model for thoracoscopic lobectomy training[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2015, 21(2): 224-230.
- [5] 石兴勇,王吉,陈斌. 我国实验小型猪的发展现状及展望[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 104-109.
- [6] 王爱德. 广西巴马小型猪的选育研究[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(3): 160.
- [7] 庞琳琳,张会永,杨关林. 巴马小型猪在医学研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1): 94-98.
- [8] 于跃,王伟,叶俊,等. 三维影像重建技术在胸外科规培生肺段解剖教学中的应用研究[J]. 科技视界, 2019, 1: 180-181, 151.
- [9] Nomori H, Okada M. Illustrated anatomical segmentectomy for lung cancer[M]. Japan: Springer; 2012.
- [10] 那顺巴雅尔,吴清洪,陈丽,等. 西藏小型猪部分脏器血管铸型标本制作[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(10): 48-51, 90.
- [11] Nakakuki S. Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung[J]. J Vet Med Sci, 1994, 56(4): 685-689.
- [12] Ohsima M, Waseda R, Tanaka N, et al. A new fluorescent anatomic pulmonary segmentectomy using PDD endoscope system and vitamin B2: evaluation in a clinical setting using living animal[J]. Surg Endosc, 2016, 30(1): 339-345.
- [13] 江雨航,申玉建,张其伟,等. 广西巴马小型猪全身 CT 影像学观察[J]. 南方农业学报, 2020, 51(3): 677-685.
- [14] 王黎彬,戚维波. 三维重建及虚拟手术规划在胸腔镜解剖性肺段切除术中的应用进展[J]. 浙江医学, 2019, 41(5): 485-486, 491.
- [15] 孙超,陆世春,王霄霖,等. 三维重建技术在胸腔镜解剖性肺段切除术中的应用[J]. 中国微创外科杂志, 2019, 19(2): 115-117.

[收稿日期]2021-04-07

魏盛,耿希文,徐凯勇,等. 小动物神经行为学实验平台规划设计原则及施工建设要求 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 107-115.

Wei S, Geng XW, Xu KY, et al. Planning and design principles and construction requirements of small animal neurobehavior experiment platform [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 107-115.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.015

小动物神经行为学实验平台规划设计原则及施工建设要求

魏 盛^{1,2},耿希文^{1,2},徐凯勇^{1,2},张 浩^{1,2},赵 峰^{1,2},胡明会^{1,2},艾志福³,
贺文彬^{4,5},秦冬冬⁶,王晓良⁷,葛加兵⁸,王 斌⁹,徐子翔¹⁰,苏茜茜¹¹,
李自发^{1,2*},王可洲^{12*}

(1.山东中医药大学动物行为学实验平台,济南 250355;2.山东中医药大学中医药与脑科学交叉学科研究中心,济南 250355;
3.江西中医药大学实验动物科技中心,南昌 330004;4.山西中医药大学分子中医药学国家级国际联合研究中心,太原 030024;
5.山西中医药大学中医脑病学山西省重点实验室,太原 030024;6.云南中医药大学基础医学院科研中心实验室,昆明 650500;
7.上海梵碧智能科技有限公司,上海 201707;8.上海欣软信息科技有限公司,上海 201100;9.深圳市瑞沃德生命
科技有限公司,广东 深圳 518057;10.中海(山东)净化工程有限公司,济南 250117;11.北京西文智慧科技有限公司,
北京 102600;12.山东第一医科大学(山东省医学科学院)实验动物学院(山东省实验动物中心),济南 250002)

【摘要】 小动物神经行为学实验平台已经是神经科学和脑科学领域最基本的支撑条件,本文拟从小动物神经行为学实验平台设计建设一般原则、小动物神经行为学实验平台布局及功能区划、小动物神经行为学实验平台相应配套设施设备、小动物神经行为学实验平台施工建设要求方面系统论述小动物神经行为学实验平台规划设计原则及施工建设要求,以期能为小动物神经行为学专业化实验室建设提供可资借鉴的规划设计参考及施工建设规范。

【关键词】 小动物神经行为学实验平台;规划设计;施工建设

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0107-09

Planning and design principles and construction requirements of small animal neurobehavior experiment platform

WEI Sheng^{1,2}, GENG Xiwen^{1,2}, XU Kaiyong^{1,2}, ZHANG Hao^{1,2}, ZHAO Feng^{1,2}, HU Minghui^{1,2}, AI Zhifu³, HE Wenbin^{4,5},
QIN Dongdong⁶, WANG Xiaoliang⁷, GE Jiabing⁸, WANG Bin⁹, XU Zixiang¹⁰, SU Xiqi¹¹, LI Zifa^{1,2*}, WANG Kezhou^{12*}

(1. Behavioral Phenotyping Core Facility, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Chinese Medicine and Brain Science Interdisciplinary Research Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. Laboratory Animal Science and Technology Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004.
4. National International Joint Research Center of Molecular Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024.
5. Shanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Encephalopathy, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024.

【基金项目】 国家自然科学基金(81974553,82004078);山东省自然科学基金(ZR2019MH053,ZR2021LZY018,ZR2020ZD17);山东中医药大学中医药与脑科学青年科研创新团队(22202101)。

【作者简介】 魏盛(1980—),男,副教授,博士,研究方向:中医情志病证的脑环路基础和中医药干预机制。E-mail:weisheng@sducm.edu.cn

【通信作者】 李自发(1977—),男,高级实验师,研究方向:动物模型与比较医学。E-mail:zifa_0611@163.com

王可洲(1974—),男,研究员,博士,研究方向:实验动物药理毒理学。E-mail:wangkezhou_cn@163.com * 共同通信作者

6. Scientific Research Center Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500.
7. Shanghai VanBi Intelligent Technology Co., Ltd., Shanghai 201707. 8. Shanghai XinRuan Information Technology Co., Ltd., Shanghai 201100.
9. Shenzhen RWD Life Science Co., Ltd., Shenzhen 518057. 10. ZhongHai (Shandong) Purification Engineering Co., Ltd., Jinan 250117.
11. Beijing Xiwen Intelligence Technology Co., Ltd., Beijing 102600. 12. College of Laboratory Animal (Shandong Laboratory Animal Center), Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250002)

【Abstract】 The small animal neurobehavior experiment platform has been the most basic supporting condition in the field of neuroscience and brain science. This paper systematically discusses the planning and design principles and construction requirements of the small animal neurobehavior experiment platform, including general principles for design and construction, platform layout and function division, the corresponding supporting facilities and equipment and the construction requirements for the small animal neurobehavior experiment platform. These discussions help provide planning and design references and construction specifications for the construction of specialized small animal neurobehavior laboratories.

【Keywords】 small animal neurobehavior experiment platform; planning and design; construction

动物行为学(ethology)主要任务是科学客观观测自然条件下的动物行为,对象包括动物的沟通行为、情绪表达、社交行为、学习行为、繁殖行为等,是现代神经科学和脑科学领域的关键技术之一^[1]。神经行为学实验,尤其是啮齿类实验动物的神经行为学评估可从整体上对小鼠的学习记忆、精神情绪、运动协调能力、痛觉等各方面进行综合评价,应用于毒理、药理、精神病学、麻醉医学、运动医学、神经退行性疾病等各个学科领域动物模型复制及药效学评价。尤其是近年来转基因及基因操纵动物的行为损伤测定,更可为后续的机制及靶点探索提供方向性支持^[2]。

国外(主要以美国、欧洲和以色列为代表)的小动物神经行为学检测起步较早,经过几十年的发展,已形成了比较全面的学科体系,其实验技术和方法也不断得到发展,相关的仪器设备也大多来自这些国家,尤其以美国为领先^[3]。美国是世界上开展小动物神经行为学实验最为广泛、成果最多的国家,同时也是实验过程中自动化、信息化集成最好的国家^[4]。90年代中期,美国开始尝试利用计算机技术和图像/视频处理技术对小动物神经行为作客观定量评价,并逐渐有一些公司/院所开发出用于小动物神经行为定量评价系统。这些系统被应用于包括临床前一般药效和毒性客观定量评价、神经生物学、心理学、动物行为学等领域,使用效果良好^[5]。目前,国内对小动物神经行为学检测还处于起步阶段,经费投入普遍不足,使用的仪器普遍落后,工作开展得也不多,尤其是国内特别缺乏动物行为学/药理学专家与计算机软件专家结合的开发队伍,当前,国内利用自主开发的小动物神经行为定量评定系统来分析小鼠的

行为,以及评价药物的药理学/毒理学等的相关报道不多^[6]。

对比国外相关领域进展,国内小动物神经行为检测理论与技术的全面滞后也制约了专业化实验平台设计建设领域的发展。按生物学通行观点,动物表型是自然(基因型)和后天(环境)之间复杂而动态相互作用的产物,用以解释实验设计和动物实验即是动物神经行为检测是对以最大有效性(复杂性)模拟现实世界现象和设计切实可行的实验项目(抽象性)之间的折衷和平衡^[7]。受限于理论知识的匮乏和检测技术的落后,国内专业化小动物神经行为学实验平台阙如,平台设计及建设中普遍具有如下问题:一是缺少科学规划设计。因为对动物神经行为检测相关背景知识了解不多,国内公司/院所动物行为学实验室普遍缺少科学合理的规划设计。二是缺少规范施工建设。考虑到国内动物神经行为检测技术相对落后,很多机构仍停留于人工观测或传感检测水平,动物行为学实验室建设普遍缺少规范施工要求。因此,及时总结国内外专业化实验平台规划建设中经验教训,联合国内多个平台建设单位推动建立规范标准显得尤为迫切且必要。

山东中医药大学动物行为学实验平台是山东中医药大学“十三五”期间专项规划建设的专业化实验平台,主要用于开展啮齿类动物神经精神药理学实验、情绪行为及学习记忆功能检测、成瘾及运动行为检测、复杂精细行为检测及分析等。本文拟立足本单位建设实践系统论述小动物神经行为学实验平台规划设计原则及施工建设要求,以期为本单位神经行为学专业化实验室建设提供可资借鉴的规划设计参考及施工建设规范。

1 小动物神经行为学实验平台规划设计一般原则

除必须依照屏障环境建设标准(实验动物设施建筑技术规范 GB 50447-2008)^[8-10]外,因神经行为学实验要求的特殊性,还应注意遵循以下原则。

1.1 光照要求

行为实验区光照要求(图 1):小动物神经行为学实验室的灯光要求一定的控制,整体要求每个房间里要灯光柔和均匀。室内光照度恒定,阻断室外光线(隔光窗帘或无窗户),室内光源由室内灯提供,分为实验光源和工作光源。实验光源根据不同实验设备专门布置不同颜色灯具位置及角度(一般为暗淡红色灯光,照度为 2 lx^[11-13]),实验时保持实验光源提供的光照度恒定不变。工作光源漫反射光源(将光源分布于两侧相对的墙壁顶端上,离开地面 1.8 m 左右,避免分布于实验室中央),颜色为白色,照度为 100~200 lx。所有光源开关要求单独控制且照度可调。

动物饲养区光照要求:动物房内要有较亮的工作光线和较暗的生活光线调节,要装有昼夜明暗交替照明系统,每 12 h 轮转照明。工作照度 100~200 lx,颜色为白色;动物照度 15~20 lx,颜色为淡黄色,调节实验动物节律和人类一致。

1.2 通风要求

实验动物一般对气味非常敏感,所以实验室、动物房要有独立的通风系统,换气次数每小时 15~20 次,气流速度 0.1~0.2 m/s^[14]。

1.3 隔音要求

实验室于四周墙壁中加装隔音层,室内噪音低于 60 dB,具有振动的设备务必做好减振处理。

1.4 温湿度要求

安装溶液空调保持室内恒温恒湿,室内温度恒定 20℃~24℃(日温差小于 4℃),相对湿度控制为 50%~70%。

1.5 空间设计要求

小动物神经行为学实验设备一般体积较大、数量较多,实验室空间根据实验设备的要求定制和设计实验场地。

1.6 电力配备要求

实验室的电气指标要求三相,可拼配接 20 A 电流。实验室应配置 UPS 设备,保证实验室供电稳定性。

1.7 端口预留要求

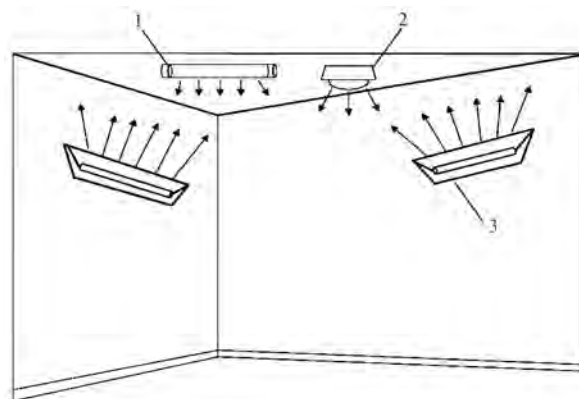
小动物神经行为学实验室传输线主要是电源线和视频信号线,每面墙至少安装 3 个相应端口,必须暗装。考虑到大型小动物神经行为学实验室摄像机电源较多,所以墙壁上要多预留电源插口。

1.8 给排水要求

Morris 水迷宫、强迫游泳等涉及用水房间,无菌冷热水分别独立提供,水压 0.3~0.5 MPa,下水口做洁净密闭处理。

2 小动物神经行为学实验平台布局及功能区域

总体规划是设立符合生物安全规范要求的



注:1:实验照明,光源为长条吸顶式净化灯,房顶均匀布置,红色,2 lx;2:动物照明,光源为圆形吸顶式净化灯,房顶均匀布置,淡黄色,15~20 lx;3:工作照明,光源为长条嵌入式净化灯,墙壁均匀布置,白色,100~200 lx。

图 1 小动物神经行为学实验室光照设计示意图

Note. 1, Experiment lighting, the light source is long strip ceiling purification lamp, the roof is evenly arranged, red, 2 lx. 2, Animal lighting, the light source is circular ceiling purification lamp, the roof is evenly arranged, light yellow, 15~20 lx. 3, Working lighting, the light source is a long embedded purification lamp, the wall is evenly arranged, white, 100~200 lx.

Figure 1 Schematic diagram of lighting design for small animal neurobehaviour laboratory

功能性齐备的动物实验室及相关配套设施(屏障环境),涉及实验动物主要包括大鼠、小鼠^[15]。中心下设各实验室及配套设施基本功能见图 2、表 1。

3 小动物神经行为学实验平台相应配套设施设备

3.1 小动物神经行为学实验平台配套设施

依据国家相关规定及要求,特别是行业规范,小动物神经行为学实验平台应满足动物实验环境净化、温度、湿度、洁净度、噪声、换气等要求,同时设立技术夹层满足设施设备及配套承载。小动物神经行为学实验平台建成后实现平台内全年全天 24 h 智能化信息化远程控温、控湿、隔噪音、空气全进全排、尾气无害化处置,双电源、不停电,客货梯分离(4 部电梯,楼两侧各有客梯和货梯),污染区与洁净区分离,符合生物安全设施标准^[16]。基本配套设施主要包括:

(1)脉动真空灭菌器(实验动物专用,自带洁净蒸汽发生器):用于动物饲料、动物垫料、笼盒、饲养员服装、器皿、金属制品等物品进行灭菌处理。

(2)垫料自动添加系统:配合隧道清洗机使用,用于笼盒垫料的自动添加。

(3)全自动饮水瓶清洗机:用于自动清洗动物

饮水瓶。

(4)全自动饮水瓶灌装机:用于自动灌装动物饮用水。

(5)实验动物消毒传递柜:用于活体动物传递或各类实验仪器的消毒传递。

(6)大型消毒传递舱:用于笼架及大批量物品的低温消毒、灭菌,适用于向屏障环境内大批量传递物品及实验动物。

(7)大小鼠 IVC 系统:用于实验室饲养 SPF 级大小鼠,实现实验动物生存空间的严格微生物控制,防止不同笼盒间交叉感染。

(8)换笼工作站:适用于 SPF 级动物房的动物笼交换、垫料添加,可同时对动物和人员起到防护作用。

(9)生物安全柜:应用于实验室的生物安全防护隔离,防止有害悬浮颗粒、气溶胶的扩散。

(10)洁净工作台:一种局部净化设备,可有效保护被操作物品免受污染。

(11)集成式过氧化氢气体消毒器:用于设施空间及设备舱体内的空气及物品表面进行彻底的消毒或灭菌。

(12)电热清洁蒸汽发生器:用于为相关设备提供洁净饱和蒸汽。

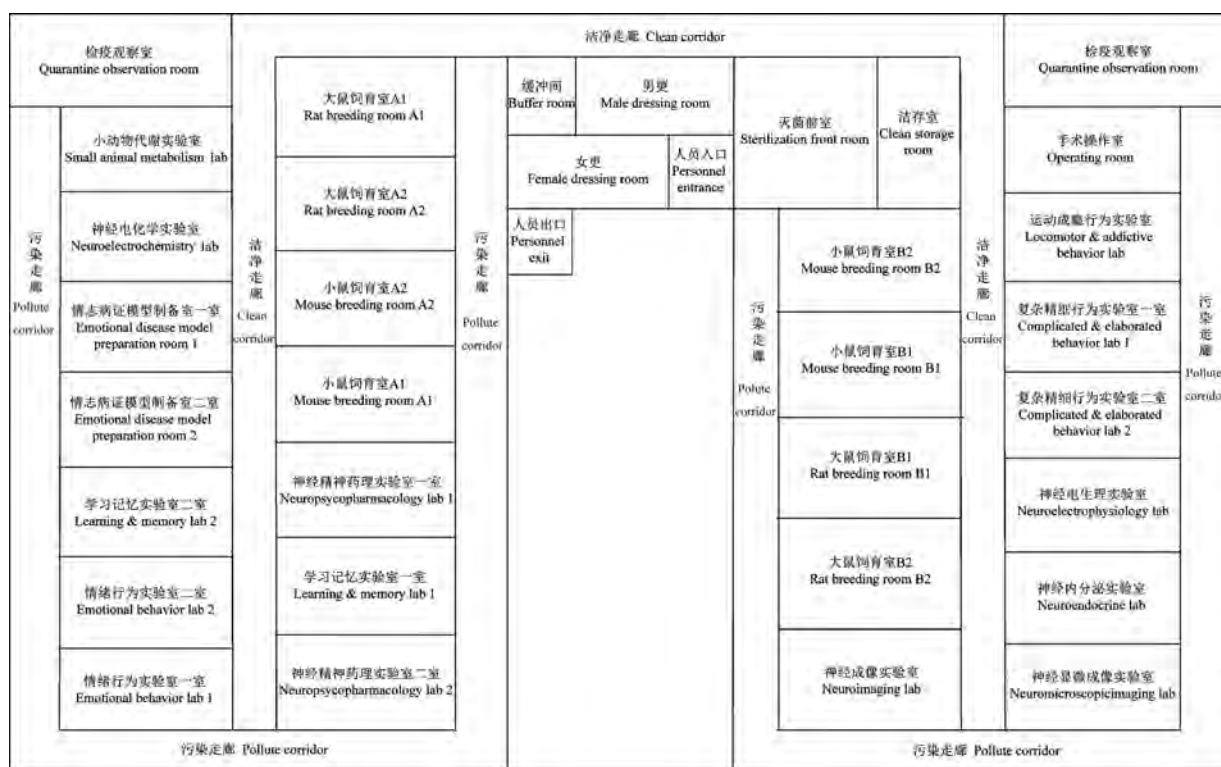


图 2 小动物神经行为学实验平台布局规划图

Figure 2 Layout plan of small animal neurobehaviour experiment platform

表 1 小动物神经行为学实验平台主要功能实验室分布及基本功能表

Table 1 Main functional laboratory distribution and basic function table of small animal neurobehaviour experiment platform

序号 Serial number	实验室分布 Laboratory distribution	基本功能 Basic function
1	数据存储与分析中心 Data storage and analysis center	主要用于开展行为数据备份存档,复杂精细行为微结构描述、时序分析、行为测序等生物信息挖掘类实验。 It is mainly used to carry out biological information mining experiments such as behavior data backup and archiving, complicated and elaborated behavior microstructure description, T-pattern analysis and behavior sequencing.
2	屏障环境饲养室 Barrier environment breeding room	主要用于基因操纵或模型动物饲养繁育,标准屏障环境,分饲养前区和饲养区。 It is mainly used for gene manipulation or model animals breeding. The standard barrier environment is divided into breeding front and breeding area.
3	情志病证模型制备室 Emotional disease model preparation room	主要用于开展情志病证啮齿类动物模型制备,统一设计成开放式笼盒便于各种应激因子开展。 It is mainly used for the preparation of emotional disease rodent model. It is uniformly designed into an open cage to facilitate the development of various stress factors.
4	情绪行为实验室 Emotional behavior lab	主要用于开展啮齿类动物情绪类行为检测,包括应用市售仪器开展抑郁焦虑类情绪行为检测和应用自主开发仪器开展非抑郁焦虑类情绪行为检测。 It is mainly used to detect the emotional behavior in rodents, including the application of commercially available instruments for depression and anxiety emotional behavior detection and the application of self-developed instruments for non-depression and anxiety emotional behavior detection.
5	学习记忆实验室 Learning & memory lab	主要用于开展啮齿类动物学习记忆类行为检测,包括基于空间和非空间的学习记忆功能测试。 It is mainly used to detect the learning and memory behavior in rodents, including spatial and non-spatial learning and memory function tests.
6	神经精神药理实验室 Neuropsychopharmacology lab	主要用于开展啮齿类动物微透析取样及检测、抗炎镇痛、镇静催眠、脑立体定位注射、中枢毁损等神经精神药理类实验。 It is mainly used to carry out neuropsychopharmacological experiments in rodents such as microdialysis sampling and detection, anti-inflammatory and analgesic, sedation and hypnosis, brain stereotactic injection, central damage, etc.
7	运动成瘾行为实验室 Locomotor & addictive behavior lab	主要用于开展啮齿类动物抗疲劳、睡眠剥夺、运动训练、骨骼肌松弛、中枢神经抑制、药物成瘾等神经精神药理类实验。 It is mainly used to carry out neuropsychopharmacology experiments in rodents such as anti-fatigue, sleep deprivation, exercise training, skeletal muscle relaxation, central nerve inhibition, drug addiction, etc.
8	复杂精细行为实验室 Complicated & elaborated behavior lab	主要用于开展啮齿类动物步态分析、操作行为训练、触屏认知等复杂精细行为实验。 It is mainly used to carry out complex and elaborated behavior experiments in rodents such as gait analysis, operation behavior training and touch screen cognition, etc.
9	神经内分泌实验室 Neuroendocrine lab	主要用于开展神经生化指标检测及分子生物学实验等。 It is mainly used for the detection of neurobiochemical indexes and molecular biology experiments.
10	神经电生理实验室 Neuroelectrophysiology lab	主要用于开展单细胞和脑片膜片钳、多通道电生理实验等。 It is mainly used for single cell and brain slice patch clamp, multi-channel electrophysiological experiments, etc.
11	神经成像实验室 Neuroimaging lab	主要用于开展双光子显微镜、光纤光度、光遗传实验等。 It is mainly used for two-photon microscope, optical fiber photometry, optogenetic experiments, etc.
12	神经显微成像实验室 Neuromicroscopic imaging lab	主要用于开展啮齿类动物的微型光纤显微成像实验。 It is mainly used for micro optical fiber microscopic imaging experiments in rodents.
13	配套功能区室 Supporting functional area & room	包括资料室、管理室、缓冲间、试剂耗材仓库、取材室、纯水间、样本处理及储存室等。 Including reference room, management room, buffer room, reagent consumables warehouse, execution & sampling room, pure water room, sample processing and storage room, etc.

3.2 小动物神经行为学实验平台配套设备

平台下设主要功能实验室包括如下几间, 分别

配备不同专属仪器并提供不同实验服务, 具体见表 2。

表 2 小动物神经行为学实验平台各功能实验室仪器配置表

Table 2 Instrument configuration of each functional laboratory of small animal neurobehaviour experiment platform

序号 Serial number	实验室名称 Laboratory name	仪器名称 Instrument name
1	小动物代谢实验室 Small animal metabolism lab	小动物行为与代谢系统 Small animal behavior and metabolism system
2	情志病证模型制备室一室 Emotional disease model preparation room 1	频闪仪、白噪声发生器、旋转仪、水平振荡仪、小动物口鼻吸入式染毒系统等。 Stroboscope, white noise generator, rotator, horizontal oscillator, small animal oral and nasal inhalation poisoning system, etc.
3	情志病证模型制备室二室 Emotional disease model preparation room 2	颅脑损伤仪、大小鼠密集型鼠笼、旁观电击实验系统、睡眠剥夺实验系统等。 Brain injury instrument, mouse and rat environmental enrichment cage, bystander electric shock experiment system, sleep deprivation experiment system, etc.
4	学习记忆实验室二室 Learning & memory lab 2	三箱社交实验系统、物体识别系统、跳台实验系统、主动回避系统(穿梭)、被动回避系统(避暗)等。 Three-box social interaction experiment system, object recognition system, step-down experiment system, active avoidance system (step through), passive avoidance system (dark avoidance), etc.
5	神经精神药理实验室一室 Neuropsychopharmacology lab 1	微透析取样系统、HPLC-ECD 检测分析系统、全自动动物多功能生化分析仪、五分类动物血液分析仪等。 Microdialysis sampling system, HPLC-ECD detection and analysis system, automatic animal multifunctional biochemical analyzer, five-category animal blood analyzer, etc.
6	情绪行为实验室二室 Emotional behavior lab 2	啮齿类攻击行为测试系统、自由探索箱、焦虑行为测试复合装置、等级焦虑测试装置等。 Rodent aggressive behavior test system, free exploration box, anxiety behavior integration apparatus, grade anxiety test device, etc.
7	学习记忆实验室一室 Learning & memory lab 1	Morris 水迷宫系统、巴恩斯迷宫系统、T 迷宫系统、Y 迷宫系统、八臂迷宫系统等。 Morris water maze system, Barnes maze system, T maze system, Y maze system, 8-arm maze system, etc.
8	情绪行为实验室一室 Emotional behavior lab 1	旷场实验系统、悬尾强迫游泳装置、习得性无助系统、EZM 实验系统、EPM 实验系统、洞板实验系统、明暗箱实验系统等。 Open field experiment system, tail suspension and forced swimming device, learned helplessness system, EZM experiment system, EPM experiment system, hole board experiment system, light-dark box experiment system, etc.
9	神经精神药理实验室二室 Neuropsychopharmacology lab 2	动物无创血压分析系统、小动物尾部编号仪、冷热板测痛仪、鼠尾光照测痛仪、足趾容积测量仪、大小鼠抓力测量仪、热刺痛仪、啮齿类阴道电阻仪、疼痛自动分析系统、生理药理电刺激仪、清醒动物无创心电图分析系统、小动物无线遥测系统、大小鼠脑电图记录监测系统。 Animal non-invasive blood pressure analysis system, small animal tail numbering instrument, cold and hot plate pain meter, rat tail light pain meter, toe volume meter, mouse and rat grasp force meter, sting thermal pain meter, rodent vaginal resistance meter, automatic pain analysis system, physiological and pharmacological electric stimulation instrument, waking animals non-invasive ECG analysis system, small animal wireless telemetry system, mouse and rat EEG and EMG recording and monitoring system, etc.
10	手术操作室 Operating room	小动物呼吸机、小动物麻醉机、手术器械包、小动物脑立体定位注射系统、动物手术台等。 Small animal ventilator, small animal anesthesia machine, surgical instrument set, small animal brain stereotactic injection system, animal operating table, etc.

续表 2

序号 Serial number	实验室名称 Laboratory name	仪器名称 Instrument name
11	运动成瘾行为实验室 Locomotor & addictive behavior lab	条件性位置偏爱实验系统、大小鼠轮棒式疲劳仪、小鼠转轮式疲劳仪、小动物跑台、大小鼠成瘾测试分析系统、大小鼠爬杆实验系统、平衡杠实验系统、大小鼠斜坡实验系统、大小鼠被动转轮实验系统、大小鼠圆筒测试系统、大小鼠活动节律系统、小鼠琴键式运动行为分析系统等。 Conditioned place preference experiment system, mouse and rat rotarod test instrument, mouse running-wheel instrument, small animal treadmill, mouse and rat addiction test and analysis system, mouse and rat pole-climbing experiment system, balance bar experiment system, mouse and rat slope experiment system, mouse and rat passive running-wheel experiment system, mouse and rat cylinder test system, mouse and rat activity rhythm system, mice ladder movement behavior analysis system, etc.
12	复杂精细行为实验室一室 Complicated & elaborated behavior lab 1	恐惧制约与振惊反射实验系统、操作行为实验装置、大小鼠触屏实验系统等。 Fear conditioning and startle experiment system, operation behavior experiment device, mouse and rat touch screen experiment system, etc.
13	复杂精细行为实验室二室 Complicated & elaborated behavior lab 2	啮齿类步态分析系统、小动物无线遥测系统、精细行为测序仪等。 Rodent gait analysis system, small animal wireless telemetry system, elaborated behavior sequencer, etc.
14	神经电生理实验室 Neuroelectrophysiology lab	单细胞和脑片膜片钳实验系统、64 通道神经信号采集与分析系统、4096 通道离体电生理平台等。 Single-cell and brain slice patch-clamp experimental system, 64-channel neural signal acquisition and analysis system, 4096-channel in vitro electrophysiology platform, etc.
15	神经内分泌实验室 Neuroendocrine lab	多功能酶标仪、PCR 仪、电泳仪、倒置荧光显微镜、化学发光成像系统、恒温培养摇床等。 Multifunctional microplate reader, PCR instrument, electrophoresis instrument, inverted fluorescence microscope, chemiluminescence imaging system, constant temperature incubation shaker, etc.
16	神经成像实验室 Neuroimaging lab	双光子荧光显微镜、虚拟实景行为系统、单通道光纤记录系统、多通道光纤记录系统、双色光纤记录系统、光遗传实验系统、拉针仪等。 Two-photon fluorescence microscope, virtual reality behavior system, single-channel optical fiber recording system, multi-channel optical fiber recording system, two-color optical fiber recording system, optogenetic experiment system, needle pulling instrument, etc.
17	神经显微成像实验室 Neuromicroscopicimaging lab	大规模脑神经网络成像及光遗传操控系统、真空抽吸机、微透镜埋植准直仪等。 Large-scale brain neural network imaging and optogenetic manipulation system, vacuum suction machine, microlens implantation collimator, etc.
18	取材室 Execution & sampling room	动物手术台、小动物麻醉机、全自动振动切片机、全自动冰冻染色机、全自动冰冻切片机等。 Animal operating table, small animal anesthesia machine, automatic vibrating microtome, automatic cryo-staining machine, automatic cryostat microtome, etc.
19	样本室 Specimen room	液氮罐、-80℃超低温冰箱、4℃和-20℃冰箱、配药台等。 Liquid nitrogen tank, -80℃ ultra-low temperature refrigerator, 4℃ and -20℃ refrigerator, dispensing table, etc.

4 小动物神经行为学实验平台施工建设具体要求

满足小动物神经行为学实验平台规划设计一般原则前提下,饲养室及各功能实验室施工建设中还应注意以下具体要求:

(1) 饲养室及各功能实验室走廊宽度不应少于

1.5 m, 门宽度不少于 1.0 m。功能实验室净空要求达到 2.5 m 以上, 最好 2.8 m, 便于安装行为设备宫体支架。

(2) 动物饲养区及实验区保持环境条件一致, 进行严格功能区分, 饲养区内不应开展小动物神经行为检测实验。

(3)实验过程中禁止实验人员或其他人员于实验室内或实验室门外频繁进出,避免同一间实验室内同时进行两项或两项以上的实验,去除实验人员对实验动物的影响。

(4)各功能实验室配置仪器设备尽量不要移动位置,每套电脑工作站应单独控制一套设备为宜。

(5)实验室最好配置恒定白噪音发生器,避免外界和动物间的声音干扰。

(6)饲养区及实验区地面铺设淡黄色亚光 PVC 地板,颜色与动物垫料颜色接近,符合动物生活环境,避免对行为检测实验影响和干扰。

5 总结

动物行为是指动物个体和动物社群为适应环境变化所做出的反应,是对内部和外界条件间的关系予以调整及对周围的生物和非生物环境的动态适应。动物的行为是一个运动、变化的动态过程,并与其生存环境相适应^[17-18]。大多数的生理学家、遗传学家和心理学家等多从实验室进行动物行为学观测,因而小动物神经行为学实验室的建设是从事神经行为学实验的基本条件。

动物神经行为学测试方法和技术的不断发展导致观测仪器设备也不断升级换代^[19-21],虽方便了神经行为学的观察和记录,但对神经行为学实验的条件建设提出了相应要求。为了更全面的观察记录小动物神经行为学测试中的表现,进行神经行为学实验室建设时,注意房间的布局和设计是得到真实可靠的实验数据的前提和保障。由于科学实验追求的是真实实验情况的观察和真实实验结果的采集,所以小动物神经行为学实验中更要求观察到的现象是动物本身的真实反应,尽可能减少干扰对实验结果的影响。从不被动物察觉的情况下进行观察,实验动物拥有舒适的居住环境和合理的实验顺序等是小动物神经行为学实验的必须条件。相应地,进行小动物神经行为学观测的实验室就要满足以上这些条件,因而改造或建设神经行为学实验室时必须要注意以上几个方面的问题。

正如前文中所讨论,制约国内小动物神经行为学实验平台设计和建设的关键因素一是动物神经行为检测理论薄弱,二是动物神经行为检测技术落后。相应地,要提升小动物神经行为学实验平台设计和建设水平的关键环节则是一要注意广泛吸收借鉴国外相关学科的前沿成果,提升我国有关领域

的理论水平和知识储备。二要组建一支联合药理学、行为学、计算机软件等专家的仪器设备开发队伍,获得具有自主知识产权的产品,掌握核心技术,不再受制于国外厂商,提升我国技术竞争力。

本文立足本单位多年建设实践,根据屏障环境建设标准和神经行为学实验特殊要求详细论述了小动物神经行为学实验平台设计建设一般原则,提出了对光照、温湿度、通风、隔音等具体要求。按照神经科学与脑科学学科特点科学合理地进行了小动物神经行为学实验平台布局及功能区划并列出了平台相应配套洗消设施和实验设备。结合具体平台建设施工问题罗列了小动物神经行为学实验平台工程建设中具体要求。通过对以上平台设计及建设问题的细致说明和讨论以期小动物神经行为学专业化实验室建设提供可资借鉴的规划设计参考及施工建设规范。

随着“中国脑计划”的正式启动,作为神经科学与脑科学领域最基本支撑条件的小动物神经行为学实验室建设越来越引起更多神经科学工作者的广泛关注,相信随着脑计划的深入开展,我国的小动物神经行为学实验室设计和建设会越来越科学,越来越规范。

参考文献:

- [1] Carter M, Shieh JC. Guide to research techniques in neurosciences [M]. Pittsburgh: Academic Press, 2015.
- [2] 郝文字, 高云周, 赵惠敏, 等. 行为学平台在屏障系统动物实验室中的应用 [A]. 第十届中国北方实验动物科技年会论文集 [C]. 长春: 中国实验动物学会; 2012.
- [3] Van Meer P, Raber J. Mouse behavioural analysis in systems biology [J]. Biochem J, 2005, 389(3): 593-610.
- [4] Spruijt BM, Peters SM, De Heer RC, et al. Reproducibility and relevance of future behavioral sciences should benefit from a cross fertilization of past recommendations and today's technology: "Back to the future" [J]. J Neurosci Methods, 2014, 234: 2-12.
- [5] Panadeiro V, Rodriguez A, Henry J, et al. A review of 28 free animal-tracking software applications: Current features and limitations [J]. Lab animal, 2021, 50(9): 246-254.
- [6] 张玉楼. 基于机器视觉的动物交互行为与认知状态分析系统 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- [7] Würbel H. Behavioral phenotyping enhanced - beyond (environmental) standardization [J]. Genes Brain Behav, 2002, 1(1): 3-8.
- [8] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物设施建筑技术规范. 非书资料: GB50447-2008 [S]. 2008.

- [9] 蒙少鹏. 实验动物设施自动控制系统的应用问题及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 72-75.
- [10] 张文慧, 王芳. 实验动物设施的建设与管理 [J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(11): 183-186.
- [11] Wei S, Li Z, Ren M, et al. Social defeat stress before pregnancy induces depressive-like behaviours and cognitive deficits in adult male offspring; correlation with neurobiological changes [J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 61.
- [12] Liu C, Ying Z, Li Z, et al. Danzhi Xiaoyao powder promotes neuronal regeneration by downregulating notch signaling pathway in the treatment of generalized anxiety disorder [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 772576.
- [13] Wei S, Geng X, Li Z, et al. A forced swim-based rat model of premenstrual depression: effects of hormonal changes and drug intervention [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 24357-24370.
- [14] 欧少华, 周斌, 刘吉宏. 某 GLP 实验动物设施空调及通风系统设计研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 110-116.
- [15] 周庆生. GLP 实验动物房的节能与优化-南京中医药大学唐仲英科技楼实验动物房设计 [J]. 江苏建筑, 2015, 2: 11-17.
- [16] 程水生, 滕颖. 北美国家大动物生物安全实验室的建设与管理 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 170-172.
- [17] Imanaka A, Morinobu S, Toki S, et al. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors [J]. Behav Brain Res, 2006, 173(1): 129-137.
- [18] Sawamura T, Shimizu K, Nibuya M, et al. Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats [J]. Neurosci Lett, 2004, 357(1): 37-40.
- [19] Zheng J, Tian Y, Xu H, et al. A standardized protocol for the induction of specific social fear in mice [J]. Neurosci Bull, 2021 37(12): 1708-1712.
- [20] Von Ziegler L, Sturman O, Bohacek J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling [J]. Neuropsychopharmacology, 2021, 46(1): 33-44.
- [21] Bohoslav JP, Wimalasena NK, Clausing KJ, et al. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels [J]. Elife, 2021, 10: e63377.

〔收稿日期〕2021-12-28

(上接第 59 页)

- [19] John RR, Malathi N, Ravindran C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. Indian J Dent Res, 2017, 28: 187-192.
- [20] Huang H, Han Y, Yang X, et al. HNRNPK inhibits gastric cancer cell proliferation through p53/p21/CCND1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(61): 103364-103374.
- [21] Gallardo M, Lee H, Zhang X, et al. hnRNPK is a haploinsufficient tumor suppressor that regulates proliferation and differentiation programs in hematologic malignancies [J]. Cancer Cell, 2015, 28(4): 486-499.
- [22] Carpenter B, McKay M, Dundas SR, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 95(7): 921-927.

〔收稿日期〕2021-07-05

邸冉,刘佩琳,杨海龙,等. 实验动物从业人员培养体系调查分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 116-119.

Di R, Liu PL, Yang HL, et al. Investigation and analysis on the training system of laboratory animal employees [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 116-119.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 016

实验动物从业人员培养体系调查分析

邸冉*, 刘佩琳, 杨海龙, 石英杰

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 实验动物学是生命科学、医学与药学等诸多领域发展的支撑学科,实验动物从业人员的水平,不但关系到实验动物行业规范发展,还影响到生物医药等行业的科技创新与产业发展,甚至涉及生物安全与社会文明,因此对从业人员培养与资格的认定体系十分重要。本文作者调研了欧洲、美国、日本和我国实验动物从业人员的培养现状,包括从业人员标准、分类、等级、培训内容及水平评价现状等,分析发现当前国内外实验动物技术人员和医师培养体系较为成熟,国内实验动物管理人员培训体系有待建立,国际普遍缺乏实验动物研究人员培养与评价体系。在此基础上,对建立适合实验动物研究人员自我发展的评价体系进行了分析与建议。

【关键词】 实验动物;从业人员;研究人员;培养体系

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0116-04

Investigation and analysis on the training system of laboratory animal employees

DI Ran*, LIU Peilin, YANG Hailong, SHI Yingjie

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Laboratory animal science is a supporting discipline for many fields such as life science, medicine and pharmacy. The level of employees from laboratory animal science is not only related to the standardized development of laboratory animal industry, but it also affects the scientific and technological innovation and industrial development of biomedicine and other fields and is involved in biosafety and social civilization. Therefore, the training and qualification system of employees in laboratory animal science is very important. We investigated the training processes of laboratory animal employees in Europe, the United States, Japan and China, including the standards, classification, grade, training content and level evaluation. The training system for laboratory animal technicians and doctors is relatively developed, while the training system of domestic laboratory animal managers needs to be established. However, there is a general lack of training and evaluation systems for laboratory animal researchers worldwide. Therefore, the establishment of an evaluation system suitable for the self-development of laboratory animal researchers is analyzed and suggested.

【Keywords】 laboratory animal; employee; researcher; training system

实验动物学科是一门支撑性的基础学科,为生命科学、医学、药学、食品安全、环境、农业、生物安全、航空航天、军事等领域提供规范化的研究材料。在卫生健康领域,实验动物是认识人类疾病、检测

药物毒副作用和治疗效果必需的材料和转化技术,被誉为药物和疫苗的“试金石”、医学研究“活的天平”^[1]。以实验动物为基础的动物实验是科学研究的主要实验内容之一,它涉及到实验动物法律法

规、饲养管理、实验动物医师、动物实验技术、动物福利伦理等各个层面,每个层面均涵盖系统、精准的技术环节,任何环节出现问题,会出现科学研究结果不规范、无法重复、违反动物福利伦理、威胁生物安全等风险,可能会影响科学研究、药品质量和从业人员职业健康,甚至动物福利问题还会影响社会文明形象^[2]。

围绕各行业对实验动物从业人员的需求,针对实验动物从业人员特点,依据《实验动物管理条例》关于从事实验动物工作各类人员的规定,以及《实验动物质量管理办法》和《国家职业标准制定技术规程》,参考美国、欧盟等国的情况,全国实验动物标准化技术委员会审批通过了《实验动物从业人员要求》的团体标准,该标准将实验动物从业人员分为实验动物技术人员、实验动物管理人员、实验动物医师、实验动物研究人员、实验动物辅助人员和实验动物阶段性从业人员六大类,并制定了从业人员的资格要求^[3]。该标准成为我国实验动物从业人员继续教育和水平评价的主要依据之一,促进了从业人员培养体系的发展。然而,由于交叉学科的自身特点和生命科学技术日新月异发展的冲击,实验动物研究与技术人员的培养与评价,存在创新研究范畴界定难、与现有职称体系接轨难、成果与评价体系不对称等难题,成为建立实验动物专业技术人员培养体系的障碍^[4-5]。

针对上述问题,本文综述了欧美和日本等发达国家实验动物从业人员的培养现状,分析了我国实验动物从业人员继续教育工作取得的成绩和存在的主要问题,并对未来完善实验动物从业人员培养体系提出了意见和建议。

1 国际实验动物从业人员培养状况调查

以美国为代表的发达国家,在实验动物管理师、实验动物医师和实验动物技术人员等从业人员培训与资质认定方面建立了相对成熟的体系,本章主要综述了欧洲、美国和日本的培养体系发展情况。

1.1 欧洲实验动物从业人员培养现状

欧洲开展实验动物从业人员培训的首要原因是遵守相关法律法规。国际上关于实验动物的立法主要集中在两个方面:一是保障实验动物

福利,二是保障科研工作对高质量实验动物的需求。英国是最早关注动物福利,且立法保护动物的国家,并提出了“3R”原则,其法规涵盖了实验动物购买、育种、饲养条件和科研使用等层面,管理部门则是欧洲实验动物学会联合会(the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA),主要发布相关科学政策、指导方针和建议,培训方式包括现场教学、布置解决实际问题的任务、现场演示教学、指导学生操作等,其主旨则是在实验过程中保护动物福利,该体系得到了实验动物学及相关研究领域人士的基本认可^[6-9]。

1.2 美国实验动物从业人员培养现状

美国是实验动物较早进入法制化管理的国家,科研院所和大学的动物实验必须遵守美国的系列法律和法规,包括《动物福利法》等^[6]。美国科研院所和大学的实验动物设施实行准入制,博士后或者实验人员必须完成相应的培训和办理相关手续后,才能开展动物实验,例如生物安全、在线实验动物培训和考核、实地操作培训等^[10]。除了机构内部的培训外,最常规、也是最被社会认可的培训是由美国实验动物科学协会(American Association of Laboratory Animal Science, AAALAS)举办的从业人员培训,其将实验动物从业人员分为技术人员、管理人员和兽医师3类,经过培训和考核后,分别给予初级、中级和高级的资质。与欧洲相同,动物福利伦理制度与操作规范的学习是开展动物实验前必须要进行的首要内容^[11]。

1.3 日本实验动物从业人员培养现状

日本实验动物技术者协会的成立主要是对实验动物技术人员进行知识和技术的培训,从而提高人员的资质和水平,并提高实验动物学科水平^[12]。日本实验动物从业人员分为实验动物技术人员、实验动物研究人员和实验动物技术专家3种,其中技术人员又分为初级、中级和高级3个等级,由日本实验动物技术者协会进行培训,培训内容与欧美国家大同小异,包括相关法律法规、动物实际操作技术等。在技术人员之外,实验动物研究人员和实验动物技术专家则由日本的高校承担培养任务,毕业的硕士和博士主要从事实验动物学的研究和教育工作^[13]。

2 国内实验动物从业人员培养现状调查

2.1 我国实验动物从业人员继续教育现状

根据《实验动物管理条例》与《实验动物从业人员要求》标准,中国实验动物学会完成了关于实验动物从业人员分类别、分等级的继续教育体系规划,2017 年制定了《实验动物从业人员专业水平评价管理办法》,随后陆续制定了《实验动物技术人员专业水平评价实施细则(试行)》、《实验动物技术人员水平评价考试大纲》、《实验动物医师专业水平评价考试实施细则(试行)》、《实验动物医师水平评价考试大纲》。截止到 2021 年,中国实验动物学会依据上述培养体系,在全国认证了 9 家继续教育基地,每年完成 700 余名从业人员的分类别、分等级的继续教育培训和水平评价,覆盖 18 个省市与自治区,一方面提高了从业人员水平,另一方面为实验动物及相关行业聘用实验动物科技人才提供了依据。

2.2 实验动物从业人员培养与评价存在的问题

国际上,欧美与日本等发达国家建立了较为成熟的实验动物从业人员培养与资格认定体系,为高等院校、科研院所与企业的实验动物中心规范化运转奠定了基础,并向生命科学、医学、药学等行业输送了大量的从业人员。然而,从发达国家对实验动物从业人员培养内容来看,其偏重于实验动物设施的管理、动物繁育饲养、动物疾病预防、动物福利伦理保障、动物实验技术等^[9,13],培养内容映射了科学界主流思想对实验动物从业人员的定位是科研辅助人员,对实验动物学与比较医学专业研究人员的培养重视程度不足。

我国缺乏实验动物学与比较医学的学历教育,目前仅少数高校开展了实验动物学本科教育,个别院校开设了实验动物学与比较医学的研究生教育。我国实验动物从业人员的继续教育刚刚起步,尚存在继续教育基地数量少、培训人员数量有限、对实验动物管理师培训能力有待提高、尚未制定实验动物研究人员培养与水平评价办法、从业人员等级证书有待与专业技术人员职称体系挂钩等不足,这些不足需要在培养体系不断发展中进行弥补。

3 关于完善实验动物从业人员培养体系的分析

科技人员是社会活动中创造和发展科技生产

力的人力资源,科学研究与技术创新是学科发展的根本,实验动物学科的创新能力和技术水平,关系到生命科学、疾病与健康、生物安全与传染病防控、药物创新、食品安全、航空航天、农业、环境安全等领域的发展速度和成果转化效率^[14],在发展好实验动物技术人员、管理人员和医师的基础上,应该更加注重研究人员的培养。实验动物学基础研究是学科创新与技术进步的基础。实验动物遗传育种学、实验动物医学、实验动物微生物学、比较医学等是重要的研究领域,实验动物新品种及动物模型的培育或创制、动物模型研制与分析技术研发、动物实验设备与试剂研发等是重要的技术创新领域,在这些领域的研究能力高低,影响到国家的生物医学科技创新能力和药物原创能力^[14]。实验动物研究人员是学科创新与技术进步的主体,然而,当前国内外均缺乏针对研究人员的实验动物从业人员培养与资格认定体系。

对科研人员研究成果准确的进行考核与评价,是激发研究人员发展内因的主要途径之一。实验动物学科作为基础学科,其职能定位是产出实验动物与动物模型资源、实验动物技术等成果,并将成果应用于生命科学、医学与药学等领域。因此,技术成果的产出与应用是社会对从业研究人员的主要需求,也应该成为评价与激励的主要手段。当前,推动科技成果转化、支撑高质量发展已经成为科技领域改革的主流^[15],实验动物学科的性质也决定了成果转化将成为研究人员的主要评价方式。针对科技成果转化的特点及主要形式,行业主管部门可放开对高等院校与科研院所内实验动物研究人员开展技术服务的限制,鼓励研究人员以技术服务的形式实施成果转化,并根据成果转化管理办法享受相关收益,从而以与学科使命吻合的方式提升研究人员的积极性,促进研究人员良性发展。同时,通过技术服务方式开展的成果转化具有单一成果多次转化的特点,重复进行单一成果的多次转化活动,其行为本身不属于研究与创新的范畴,不应成为研究人员的主体工作,因此有关管理部门可考虑技术成熟度和市场需求等,适时推动技术成果向企业的转移,将研究人员工作重心转移到新成果的研发上。

管理、医师、技术、研究四类实验动物从业人员

并重,是完善实验动物从业人员培养体系的前体条件。因此,不但要继续发扬实验动物技术人员与医师培养体系的基础优势,又要发展好实验动物管理人员的培养体系,更要创造有利于研究人员发展的考核与评价环境,促进实验动物从业人员的全面发展。

参考文献:

- [1] 秦川,孔琪,钱军,等.实验动物科学技术是生命科学和健康中国建设的基础支撑条件[J].科技导报,2017,35(11):10-14.
- [2] 邵奇鸣,窦木林.实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J].中国比较医学杂志,2018,28(8):1-6.
- [3] 孔琪,郑志红,魏强,等.中国实验动物从业人员标准的编制[J].中国比较医学杂志,2016,26(10):85-90.
- [4] 胡娟峰,战大伟,江其辉,等.实验动物从业人员培训的思考与展望[J].中国比较医学杂志,2006,16(12):785-787.
- [5] 陈振文,王钜,王承利,等.我国实验动物专业人才培养的回顾与展望[J].中国比较医学杂志,2004,14(6):62-63.
- [6] 巩和凌子,孔琪,刘江宁.国内外实验动物法制化管理现状比较[J].中国比较医学杂志,2020,30(9):71-75.
- [7] Crettaz von Roten F. Laboratory animal science course in Switzerland: participants' points of view and implications for organizers[J]. Lab Anim, 2018, 52(1): 69-78.
- [8] Carlsson HE, Hagelin J, Höglund AU, et al. Undergraduate and postgraduate students' responses to mandatory courses (FELASA category C) in laboratory animal science[J]. Lab Anim, 2001, 35(2): 188-193.
- [9] Gyger M, Berdoy M, Dontas I, et al. FELASA accreditation of education and training courses in laboratory animal science according to the Directive 2010/63/EU[J]. Lab Anim, 2019, 53(2): 137-147.
- [10] 汪思应.美国大学的动物实验的准入制管理[J].中国比较医学杂志,2010,20(8):76-78.
- [11] 师长宏.美国比较医学中心实验动物管理与保障工作介绍[J].中国比较医学杂志,2016,26(1):86-88.
- [12] 坂本雄二.实验动物技术者对“优化”和“减少”的贡献及有关日本的实验动物技术者的教育·资格认定[A].第九届中国实验动物科学年会(2010 新疆)论文集[C];2010.
- [13] 杨果杰.日本实验动物技术者的教育和认定制度[J].实验动物科学与管理,1998,15(4):54-56.
- [14] 秦川.中国实验动物学科发展的关键问题与对策的思考[J].科学通报,2017,62(30):3413-3419.
- [15] 王志刚.推动科技成果转化,支撑高质量发展[N].科技日报.2021-12-02.

[收稿日期]2022-01-11

谢清华,张永斌,师长宏. 去甲基化酶 JARID1D 在前列腺癌侵袭和转移中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 120-125.

Xie QH, Zhang YB, Shi CH. Research progress of the JARID1D demethylase in the invasion and metastasis of prostate cancer [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 120-125.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 017

去甲基化酶 JARID1D 在前列腺癌侵袭和转移中的研究进展

谢清华^{1,2}, 张永斌^{1*}, 师长宏^{2*}

(1.广州中医药大学动物实验中心,广州 510405;2.空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 前列腺癌(prostate cancer, PCa)是全球男性第二大恶性肿瘤,发病率呈逐年升高趋势。高度异质性是其的主要临床特征,其不仅表现在不同患者之间肿瘤组织学的特征差异,还表现在同一患者不同肿瘤细胞在生长、侵袭、转移速度上的差异。近年来,研究发现,编码于 Y 染色体上的去甲基化酶 JARID1D 可特异性结合侵袭转移相关基因,如 MMP1、MMP2、MMP3 等,并通过 H3K4 这样一种基因激活标记,在启动子处进行去甲基化,抑制某些侵袭性化合物的产生,从而降低前列腺癌的侵袭能力。同时,敲低去甲基化酶 JARID1D 的表达会提高前列腺癌的转移潜能,甚至促发包括骨转移在内的多器官转移。因此,本文将结合最新的文献报道,从去甲基化酶 JARID1D 的结构基础、酶属种类以及调控机制等方面探讨其在前列腺癌侵袭和转移中的研究进展,期望为 PCa 的治疗探索出新的干预靶点。

【关键词】 前列腺癌;去甲基化酶 JARID1D;侵袭;转移;基因表达

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0120-06

Research progress of the JARID1D demethylase in the invasion and metastasis of prostate cancer

XIE Qinghua^{1,2}, ZHANG Yongbin^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Animal Experiment Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.

2. Laboratory Animal Center, the Air Force Medical University, Xi'an 710032)

【Abstract】 Prostate cancer (PCa) is the second most common malignant tumor among men worldwide and has an increasing incidence. The main characteristic of PCa is heterogeneity, which includes not only variations of tumor histological characteristics among patients, but also differences in growth, invasion and metastasis speed of tumor cells in the same patient. Recent studies showed that the JARID1D demethylase, which is encoded from the Y chromosome, specifically binds to the promoters of genes related to invasion and metastasis, such as MMP1, MMP2 and MMP3, and demethylate at the promoter through a gene activation marker such as H3K4, so as to inhibit the production of some invasive compounds and reduce the invasive ability of prostate cancer. Meanwhile, knocking down the expression of demethylase

【基金项目】 国家自然科学基金(32070532)。

【作者简介】 谢清华(1994—),男,硕士研究生,研究方向:中西医结合肿瘤学方向。E-mail:2544562746@qq.com

【通信作者】 师长宏(1973—),男,博士生导师,教授,研究方向:肿瘤模型的制备与评价。E-mail:changhong@fmmu.edu.cn

张永斌(1973—),男,正高级实验师,硕士生导师,研究方向:动物模型研究。E-mail:yongbinzhang@gzucm.edu.cn

* 共同通信作者

JARID1D will improve the metastatic potential of prostate cancer and even promote multiple organ metastasis, including bone metastasis. In this review, we summarize the recent progression on the research on the JARID1D demethylase. We discuss its structure and the enzymatic and regulatory mechanisms, and we review the role of JARID1D in the invasion and metastasis of prostate cancer. We also explore novel intervention targets for PCa therapy.

【Keywords】 prostate cancer; JARID1D demethylase; invasion; metastasis; gene expression

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是全球男性第二大恶性肿瘤, 异质性是其最为主要的临床特征, 也是影响其治疗效果的主要因素^[1]。虽然雄激素剥夺可有效控制肿瘤生长, 但大部分会形成去势抵抗性前列腺癌 (castrate-resistant prostate cancer, CRPC)^[2]。若进一步使用雄激素受体 (androgen receptor, AR) 靶向抑制剂治疗, 在延长患者生存期的同时会诱导神经内分泌性前列腺癌 (neuroendocrine prostate cancer, NEPC) 和侵袭变异性前列腺癌 (aggressive variant prostate cancer, AVPC), 出现特征性转移, 导致临床上的难以治愈^[3]。因此, 开展前列腺癌侵袭和转移的相关机制研究, 探索新的治疗靶点, 对前列腺癌的临床治疗具有重要意义。

近年来, 针对前列腺癌新兴治疗靶点的研究开展了大量工作。不少研究者开始关注前列腺癌的性别特异性, 亦即它的生物学性上的特征, 并由此将探索思路进一步延续到了 Y 染色体上的相关蛋白。根据已有文献的报道, 在 Y 染色体上表达的雄性特异性蛋白可起到抑制肿瘤侵袭的作用^[3]。其中, 作用比较明确是组蛋白去甲基化酶 JARID1D, 它的表达变化极有可能促发前列腺癌发生包括骨转移在内的一系列转移表型。2016 年 Li 等^[4]通过细胞学实验和动物实验发现, 去甲基化酶 JARID1D 能通过抑制细胞侵袭相关基因的表达程序, 从而达到抑制前列腺肿瘤侵袭与转移的效果。基于此, 本文将从去甲基化酶 JARID1D 的结构基础、酶属种类以及调控机制等方面探讨其在抑制前列腺癌侵袭与转移中的研究进展。

1 去甲基化酶 JARID1D 的简介

1.1 JARID1D 的本质与属性

去甲基化酶 JARID1D 最初被报道为 Y 染色体上的一种组织相容性抗原, 是被研究得最少的一种异构体。近年来, 随着实验研究的不断深入, JARID1D 的结构和功能不断被解析。它是组蛋白 H3 赖氨酸 4 (H3K4) 结构上的一种去甲基化酶, 其同类尚有 Paralogs UTY、KDM6C 等其它的去甲基

化酶。值得一提的是, JARID1D 是一种男性特异性蛋白, 学界又常称之为 kdm5d 或者 smcy。该表观遗传调节剂可通过去甲基化 H3K27me3 和 H3K4me3 来调节染色质的酶活性, 从而对基因表达产生深远的影响^[5-7]。据 Isensee 等^[8]在 2008 年的研究发现, JARID1D 作为一种性别特异性基因, 在雄性小鼠的心脏和心肌中均有特异性表达, 其能降低心血管疾病的发病率。2016 年, Li 等^[4]提出, JARID1D 能通过抑制与细胞侵袭相关基因的表达, 从而达到抑制前列腺癌细胞侵袭与转移的作用, 因此, JARID1D 与前列腺癌的关系不断被深入研究。

关于癌细胞侵袭与转移之间的发展关系, 肿瘤学研究普遍认为, 增强癌细胞的侵袭能力对于其转移能力的强化是必不可少的, 而无论是癌细胞的侵袭还是转移, 均是在表观遗传的调控下进行的^[5-7]。因此, 主导表观调控的基因, 其所表达的组蛋白甲基化修饰物与肿瘤的侵袭和转移有着或正或负的相关性^[8]。

截至目前, 已有多项明确的研究结果支持上述观点。例如, Harmeyer 等^[9]于 2017 年发现 H3K27 甲基转移酶 EZH2 可以通过抑制抑癌蛋白的表达而诱导前列腺肿瘤的发生和转移; 又如, 该团队在胃癌的研究之中发现, JARID1D 在癌细胞中的过度表达可以明显降低癌细胞的活力, 表明它具有直接的抑制肿瘤生长的作用^[9]。除了上述促进转移的组蛋白修饰物的过度表达之外, 抑制转移的组蛋白甲基化修饰剂的丢失还可能促进癌细胞的转移。正如 Komura 等^[10]在 2016 年的研究中提出, JARID1D 在许多转移性前列腺癌中存在表达下调甚至缺失的情况。

因此, 系统性归纳和总结 JARID1D 在前列腺癌中的已知功能, 并探索该去甲基化酶在染色质调控靶向性方面的作用, 将为前列腺癌的临床治疗提供更多的潜在靶点。

1.2 JARID1D 的结构基础与抑癌功能

表观遗传是指由非 DNA 序列改变引起的、可遗传的基因表达水平的改变, 包括 DNA 甲基化、组蛋

白修饰、RNA 调控和染色质重塑等。组蛋白乙酰化、磷酸化、泛素化、甲基化、sumo 化及 ADP 核糖糖基化等组蛋白修饰发生在多种、特异的位点上,且相互之间,调控影响,进而产生多种组合,构成了复杂的调控网络,该过程被称之为“组蛋白密码”。长期以来,由于未发现组蛋白去甲基化酶,因此,组蛋白甲基化被认为是不可逆的、稳定的表观遗传标志^[11]。直到 2006 年,Chen 等^[12]发现了第一个组蛋白去甲基化酶 LSD1 (lysine specific demethylase1),继而组蛋白去甲基化酶被大量发现,并据此论证了组蛋白去甲基化是一个可逆的过程,使得表观遗传学的研究更为宽广和深入。相关文献证实,组蛋白去甲基化酶的作用位点在组蛋白赖氨酸或精氨酸残基上。截止到目前,已发现两类组蛋白赖氨酸去甲基化酶,包括 LSD1 和含有 JmjC 结构域的组蛋白赖氨酸去甲基化酶^[5-7]。

JARID1D 就是这样一种含有 JmjC 结构域的组蛋白赖氨酸去甲基化酶。它作为 JARID 1 家族的重要成员之一,与该家族的其它 3 个成员一样,也包含多个保守结构域,这些结构域定义了它们的活性和底物特异性。其中,JmjC 结构域是它的催化核心,该结构域由包括组蛋白脱乙酰酶在内的多种蛋白质构成,并可调控多种基因的转录,进而影响到细胞的周期进程,参与癌症的发生发展^[13]。

去甲基化酶不仅能调节正常细胞的命运,而且具有致癌和抑癌的双重功能^[14]。但在前列腺癌的研究之中,讨论得最多的是去甲基化酶 JARID1D 在调节肿瘤恶性转化的谱系可塑性方面的能力,亦即其抑癌的功能^[15]。Komura 等^[10]在体外和体内实验中均发现 JARID1D 能特异性抑制前列腺癌侵袭相关基因,如 MMP1、MMP2、MMP3、MMP7 等,并通过 H3K4 这样一种基因激活物,在启动子处进行去甲基化从而发挥抑癌功能。

近年来,人们对 JARID1D 蛋白抑癌功能的认识越来越深入,越来越细化,更进一步认识到这些功能的发挥是建立在其结构基础之上的。由于 JARID1D 蛋白在抑制肿瘤侵袭性方面具有重要作用,研究者开始关注 JARID1D 抑制剂的开发,例如临床上所常用的一种抑制剂——组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACs),它对某些恶性肿瘤具有部分疗效,其治疗靶点便与 JARID1D 所在的 JARID1 家族密切相关。有证据表明,JARID 1 蛋白可以直接与

HDACs 相互作用,以介导其抑制作用。这些作用为评估包括 HDACs 在内的抑制剂的疗效提供了理论基础。目前,基于 HDACs 已经建立起了一系列的临床用药^[16-17]。

2 去甲基化酶 JARID1D 的酶属种类

2.1 JARID1D 的上游酶——H3K4 系列酶

去甲基化酶的功能发挥主要依赖于其结构基础,结构基础决定了它对不同底物结合的亲和性。保持酶活性的空间结构是维持其酶活性功能所必备的环节。一种酶只作用于一类化合物或一定的化学键,以促进一定的化学变化,并生成一定的化学产物,这种现象称之为酶的特异性或专一性。而酶的这种特异性,很大程度上取决于与其从属酶之间的调控关系。去甲基化酶 JARID1D 的上游酶称之为单体化组蛋白 H3 赖氨酸 4 (H3K4me1)^[18-20],该组蛋白是一种活性基因,它可以作为基因激活标记,在启动子处参与多种转录复合物的抑制,通过影响转录的起始,最终导致某些复合物的转录抑制。

2.2 JARID1D 的核心阻遏子——ZMYND 8

H3K4 作为一种组蛋白系列酶,其单体结构的种类较多^[21]。其中,与 JARID1D 相关的两个单体结构分别是 H3K14ac 和 H3K4me1。此二者均为单体化的组蛋白,亦为一种活性基因,具备基因激活功能。然而,以之为结构基础的合体——双组蛋白修饰标记 H3K4me1-H3K14ac,功能则与之相反^[22]。研究发现,H3K4me1-H3K14ac 能被 ZMYND 8 (又称 RACK 7)所识别和捕捉,并抑制基因的功能表达^[23]。

而在该过程中,ZMYND 8 发挥了核心阻遏子的作用,能拮抗转移相关基因的表达。例如,Harmeyer 等^[9]在 2017 年即证实,敲除该基因会增强肿瘤细胞的体外和体内侵袭能力,从而反向证明了 ZMYND 8 的抑制侵袭与转移的能力。

作为 JARID1D 在 H3K4 去甲基化酶上的转录核心阻遏子,ZMYND8 的这种拮抗能力亦延续到了 JARID1D 上面,因此,JARID1D 也具备了类似的抑癌功能。同时,Harmeyer 等^[9]也发现,ZMYND 8 发挥抑制侵袭和转移功能的结构基础,便是 ZMYND 8 中的同源结构域 (PHD) 和溴域盒,此二者介导了 ZMYND 8 对 H3K4me1-H3K14ac 的组合识别。这些发现揭示了 H3K4me1-H3K14ac 在抑制转移的基因表达中所起的重要作用,并通过这种潜在的联系,深层次揭示了 JARID1D 在与肿瘤转移相关的基

因下调中,所延续的一种表观遗传机制^[24-26]。

3 JARID1D 在前列腺癌中的生物学性及其抑制侵袭的功能

3.1 JARID1D 在前列腺癌生物学性中的体现

生物学性即为男女性别相关因素的差异,其对生物体的生长发育和生理活动有着深远的影响,尤其是在细胞信号、新陈代谢和免疫反应等方面。它们产生于激素暴露中特定性别的差异,以及与 XX 染色体补体和 XY 染色体补体相关的内在遗传和表观遗传差异。近年来,生物学性被认为是多种癌症的发病率、临床表现和疗效预后的决定性因素,包括与男女性别相关的癌症如前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌等等^[27-29]。例如,据 Jangravi 等^[30]在 2015 年的研究指出,男性特异性 Y 染色体的全部或部分缺失与前列腺癌的发生密切,而 JARID1D 正是 Y 染色体上发挥抑制前列腺肿瘤侵袭作用的男性特异性基因。这一发现可以被认为是生物学性在前列腺癌病程发展之中的一个具体体现,也侧面论证了 JARID1D 这样一种雄性特异性蛋白在前列腺癌发展过程中的重要性与其独特性。

3.2 JARID1D 抑制前列腺癌的侵袭

2015 年 Jangravi 等^[30]的研究发现,Y 染色体上特有的去甲基化酶 JARID1D 具有抑制前列腺癌侵袭和转移的作用。其中一个关键性证据就是,在高达 52% 的前列腺癌患者中,Y 染色体存在完全和部分缺失,而位于 Y 染色体上的去甲基化酶 JARID1D 的敲低,可以提高上皮-间质转化(EMT)的关键调节分子如 N-Cadherin 和 Slug 的表达,从而达到抑制前列腺癌侵袭的作用。公共数据库分析亦表明,该基因的缺失通常发生在转移性前列腺癌而非原发性前列腺癌。在转移性前列腺癌中,JARID1D 的表达通常极低甚至缺失,且它的表达高低与前列腺癌患者的预后良莠密切相关,亦为确凿之佐证。

上述发现表明,编码于 Y 染色体上的表观遗传修饰物 JARID1D,具有抑制前列腺癌进展的抗侵袭作用,这些证据也强调了使用 JARID1D 作为晚期前列腺癌预后指标的可行性和可信度。

4 JARID1D 在前列腺癌临床预后和异种移植中的情况

4.1 JARID1D 作为前列腺癌的预后指标

分析临床宏观数据发现,与正常前列腺组织和原发性前列腺癌相比,在转移性前列腺癌中,JARID1D 的表达水平明显偏低,而低水平的

JARID1D 与前列腺癌患者的预后不良密切相关。因此,临床上常常使用 JARID1D 作为晚期前列腺癌预后疗效的一项观察指标。

正如 Li 等^[4]在 2016 的研究发现,为了确定 JARID1D 水平是否与前列腺癌患者的临床表现有关,作者对 39 例前列腺癌患者进行了 Kaplan-Meier 生存分析,并对其进行了免疫组化评估。结果表明,低水平的 JARID1D 与前列腺癌患者的整体生存状况密切相关。为了确定 JARID1D 在原发性和转移性前列腺肿瘤中的表达差异,研究者采用免疫组化的方法比较了 JARID1D 在正常前列腺癌组织、原发性前列腺肿瘤和转移性前列腺肿瘤中的表达水平。结果发现,与正常组织(10%,2/21)相比,转移性前列腺肿瘤中 JARID1D 的蛋白水平显著降低(100%,6/6),原发性前列腺肿瘤中 JARID1D 蛋白水平亦明显降低(41%,28/68)。此外,低水平 JARID1D mRNA 组的前列腺癌患者总体生存率较差^[30-32]。上述结果均提示,使用 JARID1D 作为前列腺癌新的预后指标是切实可行的。

4.2 JARID1D 在前列腺癌异种移植模型中的表达

去甲基化酶 JARID1D 在前列腺癌的异种移植模型中有着极为明确的表达方式——调控肿瘤的发生与转移。2015 年,Jangravi 等^[30]用 shJARID1D 和对照组 shRNA 处理前列腺癌细胞系 DU145-Luc2,将处理后的细胞注入小鼠的尾静脉。结果发现,在这种异种移植模型中,癌细胞通过血液系统侵入远端器官,并在转移部位(主要是肺)以肿瘤的形式生长。实验结果显示,该种癌细胞注射之后,shJARID1D 组小鼠($n=15$)的荧光素酶信号显著高于对照组($n=9$)。随后,作者分别使用 HE 染色和免疫组化染色的方法,进一步证实了 shJARID1D 组小鼠肿瘤的形成,无论是肿瘤的大小还是转移的范围均显著高于对照组,提示 JARID1D 具备抑制前列腺癌细胞系 DU145 侵袭的能力。

5 展望

去甲基化酶 JARID1D 是抑制前列腺癌侵袭和转移的重要驱动基因,其表达水平的高低多少、缺失与否,均与前列腺癌的病情发展密切相关。前列腺癌的发病率、临床表现以及预后等因 JARID1D 的表达水平而存在较大差异^[33-35]。这些发现揭示了 JARID1D 与转移相关基因之间的一种表观遗传机

制,该去甲基化酶 JARID1D 的发现,对研究前列腺癌如何利用染色质调节酶机制发挥调控疾病进展等方面提供了新的思路,为前列腺癌的临床治疗,提供了潜在的治疗靶点^[36-38]。

但是,临床研究和实验研究均已证实,前列腺癌的发生发展主要受 AR 信号的调控^[6]。然则, JARID1D 是否也受 AR 信号的调控? 前列腺癌临床常发的骨转移是否亦受 JARID1D 的调控,其具体促发骨转移的机制又是什么^[39-41]? JARID1D 的表达与前列腺癌的激素依赖以及与 AVPC/NEPC 的转化之间又有何具体关系^[42-43]? 上述问题的解答清楚,则尚需要一系列的转化模型,进行验证。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] Shigeta K, Kosaka T, Hongo H, et al. Castration-resistant prostate cancer patients who had poor response on first androgen deprivation therapy would obtain certain clinical benefit from early docetaxel administration [J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(5): 546-553.
- [4] Li N, Dhar SS, Chen TY, et al. JARID1D is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis [J]. Cancer Res, 2016, 76(4): 831-843.
- [5] Chen X, Liu J, Cheng L, et al. Inhibition of noncanonical Wnt pathway overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer [J]. Prostate, 2020, 80(3): 256-266.
- [6] Davies AH, Wang Y, Zoubeidi A. Patient-derived xenografts: A platform for accelerating translational research in prostate cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 462: 17-24.
- [7] Lawrence MG, Obinata D, Sandhu S, et al. Patient-derived models of abiraterone and enzalutamide-resistant prostate cancer reveal sensitivity to ribosome-directed therapy [J]. Eur Urol, 2018, 74(5): 562-572.
- [8] Isensee J, Witt H, Pregla R, et al. Sexually dimorphic gene expression in the heart of mice and men [J]. J Mol Med (Berl), 2008, 86(1): 61-74.
- [9] Harmeyer KM, Faconpre ND, Herlyn M, et al. JARID1 histone demethylases; emerging targets in cancer [J]. Trends Cancer, 2017, 3(10): 713-725.
- [10] Komura K, Jeong SH, Hinohara K, et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(22): 6259-6264.
- [11] Shi C, Chen X, Tan D. Development of patient-derived xenograft models of prostate cancer for maintaining tumor heterogeneity [J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(5): 519-528.
- [12] Chen Y, Yang Y, Wang F, et al. Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(38): 13956-13961.
- [13] Wu JB, Yin L, Shi C, et al. MAOA-Dependent activation of Shh-IL6-RANKL signaling network promotes prostate cancer metastasis by engaging tumor-stromal cell interactions [J]. Cancer Cell, 2017, 31(3): 368-382.
- [14] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(7): 2891-2908.
- [15] Inoue T, Terada N, Kobayashi T, et al. Patient-derived xenografts as *in vivo* models for research in urological malignancies [J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(5): 267-283.
- [16] Chen R, Dong X, Gleave M. Molecular model for neuroendocrine prostate cancer progression [J]. BJU Int, 2018, 122(4): 560-570.
- [17] Lee AR, Gan Y, Xie N, et al. Alternative RNA splicing of the GIT1 gene is associated with neuroendocrine prostate cancer [J]. Cancer Sci, 2019, 110(1): 245-255.
- [18] Nadal R, Schweizer M, Kryvenko ON, et al. Small cell carcinoma of the prostate [J]. Nat Rev Urol, 2014, 11(4): 213-219.
- [19] Beltran H, Rickman DS, Park K, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets [J]. Cancer Discov, 2011, 1(6): 487-495.
- [20] Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer [J]. Nat Med, 2016, 22(3): 298-305.
- [21] Vlachostergios PJ, Puca L, Beltran H. Emerging variants of castration-resistant prostate cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2017, 19(5): 32.
- [22] Lange T, Oh-Hohenhorst SJ, Joosse SA, et al. Development and characterization of a spontaneously metastatic Patient-Derived xenograft model of human prostate cancer [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17535.
- [23] Yoshikawa T, Kobori G, Goto T, et al. An original patient-derived xenograft of prostate cancer with cyst formation [J]. Prostate, 2016, 76(11): 994-1003.
- [24] Nguyen HM, Vessella RL, Morrissey C, et al. LuCaP prostate cancer patient derived xenografts reflect the molecular heterogeneity of advanced disease and serve as models for evaluating cancer therapeutics [J]. Prostate, 2017, 77(6): 654-671.
- [25] Young SR, Saar M, Santos J, et al. Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts [J]. Prostate, 2013, 73(12): 1251-1262.
- [26] Hao J, Ci X, Xue H, et al. Patient-derived Hormone-naive prostate cancer xenograft models reveal growth factor receptor bound protein 10 as an androgen receptor-repressed gene driving the development of castration-resistant prostate cancer [J]. Eur Urol, 2018, 73(6): 949-960.

- [27] Terada N, Shimizu Y, Kamba T, et al. Identification of EP4 as a potential target for the treatment of castration-resistant prostate cancer using a novel xenograft model [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1606–1615.
- [28] Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Androgen deprivation of the PC-310 correction of prohormone convertase-310 human prostate cancer model system induces neuroendocrine differentiation [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(3): 741–748.
- [29] Russell PJ, Russell P, Rudduck C, et al. Establishing prostate cancer patient derived xenografts: lessons learned from older studies [J]. *Prostate*, 2015, 75(6): 628–636.
- [30] Jangravi Z, Tabar MS, Mirzaei M, et al. Two splice variants of Y chromosome-located lysine-specific demethylase 5D have distinct function in prostate cancer cell line (DU-145) [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(9): 3492–3502.
- [31] van Weerden WM, Bangma C, de Wit R. Human xenograft models as useful tools to assess the potential of novel therapeutics in prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(1): 13–18.
- [32] Kosugi M, Otani M, Kikkawa Y, et al. Mutations of histone demethylase genes encoded by X and Y chromosomes, Kdm5c and Kdm5d, lead to noncompaction cardiomyopathy in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 291(20): 30311–30319.
- [33] Wang Y, Xue H, Cutz JC, et al. An orthotopic metastatic prostate cancer model in SCID mice via grafting of a transplantable human prostate tumor line [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(11): 1392–1404.
- [34] Lam HM, Nguyen HM, Labrecque MP, et al. Durable response of enzalutamide-resistant prostate cancer to supraphysiological testosterone is associated with a multifaceted growth suppression and impaired DNA damage response transcriptomic program in patient-derived xenografts [J]. *Eur Urol*, 2020, 77(2): 144–155.
- [35] Zhang C, Zhao Y, Zhang H, et al. The application of heptamethine cyanine dye DZ-1 and indocyanine green for imaging and targeting in xenograft models of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1332.
- [36] Sun H, Zhang L, Shi C, et al. TOPK is highly expressed in circulating tumor cells, enabling metastasis of prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(14): 12392–12404.
- [37] Wu X, Gong S, Roy-Burman P, et al. Current mouse and cell models in prostate cancer research [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2013, 20(4): 155–170.
- [38] Castaneres MA, Copeland BT, Chowdhury WH, et al. Characterization of a novel metastatic prostate cancer cell line of LNCaP origin [J]. *Prostate*, 2016, 76(2): 215–225.
- [39] Tricarico R, Nicolas E, Hall MJ, et al. X- and Y-Linked chromatin-modifying genes as regulators of sex-specific cancer incidence and prognosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21): 5567–5578.
- [40] Mokou M, Klein J, Makridakis M, et al. Proteomics based identification of KDM5 histone demethylases associated with cardiovascular disease [J]. *EBioMedicine*, 2019, 41: 91–104.
- [41] Lin D, Wyatt AW, Xue H, et al. High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1272–1283.
- [42] Li ZG, Mathew P, Yang J, et al. Androgen receptor-negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(8): 2697–2710.
- [43] Wu P, Xu R, Chen X, et al. Establishment and characterization of patient-derived xenografts for hormone-naïve and castrate-resistant prostate cancers to improve treatment modality evaluation [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3848–3861.

[收稿日期] 2021-07-02

蔡晓雯, 赖惠芹, 梁开勇, 等. TAAR1, CNS 单胺神经元调控新靶点 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 126-132.

Cai XW, Lai HQ, Liang KY, et al. Trace amine-associated receptor 1 is a new regulating target of monoamine neurons in the central nervous system [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 126-132.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.04.018

TAAR1, CNS 单胺神经元调控新靶点

蔡晓雯^{1#}, 赖惠芹^{3#}, 梁开勇¹, 黄泳^{1,2*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 南方医院门诊针灸科, 广州 510515;
3. 广州中医药大学附属中山中医院肿瘤科, 广东 中山 528400)

【摘要】 痕量胺相关受体 1 (TAAR1) 是神经精神疾病研究的新信号, 在中枢神经系统 (CNS) 功能中具有重要的生理作用。研究发现, TAAR1 的作用发挥除了跟传统配体痕量胺有关, 还与单胺类神经递质有密切关联。本文从 TAAR1 的表达、相关配体、作用机制通路和与单胺类神经递质的关系几个方面, 介绍了 TAAR1 在 CNS 中通过多巴胺能、5-羟色胺能、谷氨酸能神经元, 从而影响细胞内外相关物质水平来调节中枢神经系统功能, 且其激动剂在药理实验中也表现出巨大潜能。TAAR1 的研究在神经精神类疾病上展现的优势越来越明显, 具有较好的研究前景。

【关键词】 痕量胺相关受体 1; 痕量胺; 单胺类神经递质; 中枢神经系统

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0126-07

Trace amine-associated receptor 1 is a new regulating target of monoamine neurons in the central nervous system

CAI Xiaowen^{1#}, LAI Huiqin^{3#}, LIANG Kaiyong¹, HUANG Yong^{1,2*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.
2. Department of Acupuncture, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515. 3. Department of Oncology, Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 528400)

【Abstract】 Trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) is a new signal in neuropsychiatric research and plays an important physiological role in the central nervous system. Various reports have shown that the role of TAAR1 is closely related to trace amines and monoamine neurotransmitters. We discuss the research on TAAR1 in recent years from the aspects of TAAR1 expression, related ligands, mechanism pathway and the relationship with monoamine neurotransmitters. TAAR1 regulates dopaminergic, serotonergic and glutamatergic neurons in the central nervous system and thus affects the levels of related substances inside and outside the cell. TAAR1 agonists also show great potential for promoting the cognitive function in pharmacological experiments. Targeting this receptor shows increasing advantages and potential for use in neuropsychiatric diseases.

【Keywords】 trace amine-associated receptor 1; trace amines; monoamine neurotransmitter; central nervous system

【基金项目】 国家自然科学基金 (81873359, 82074519); 南方医科大学大学生创新创业训练项目 (201912121041); 广东省第二批中医临床优秀人才研修项目 (粤中医办 2017-267); 深圳市“医疗卫生三名工程”项目资助 (SZZYSM202108013)。

【作者简介】 蔡晓雯 (1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 针灸推拿学。E-mail: cxw0922@126.com;

赖惠芹 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医肿瘤学。E-mail: lhq2646592073@163.com # 共同第一作者

【通信作者】 黄泳, 女, 医学博士、博士后, 教授、主任医师, 研究方向: 针刺效应的机制研究。E-mail: nanfanglihuang@163.com

痕量胺相关受体 (trace amine-associated receptors, TAARs) 于 2001 年被发现, 属于 G 蛋白偶联受体 (G-protein couple receptors, GPCRs) 家族, 是聚集在染色体 6q23 的一个 108 kb 的小基因组区域, 通过连锁分析, 一直被认为是精神分裂症和情感障碍的易感性位点^[1]。人体 TAARs 家族主要包括 6 个基因型, 分别为 TAAR1、TAAR2、TAAR5、TAAR6、TAAR8 和 TAAR9, 其中 TAAR1 通过与 CNS 单胺神经元传统靶点单胺类物质受体、转运体等发生相互作用, 参与调节神经递质释放。TAAR1 最初在大脑中被发现, 在哺乳动物的大脑中, TAAR1 可以有效地调节 CNS 单胺能神经元的信息传递, 这一发现为 TAAR1 及其配体的功能和治疗意义的研究注入了活力。近年来 TAAR1 在学术和药物研发中越发亮眼的表现让其有可能成为 CNS 单胺神经元调控新靶点^[2-4]。接下来, 结合最新的研究报道, 我们将从 TAAR1 的表达、相关配体、作用机制通路和与单胺类神经递质的关系几个方面, 阐述 TAAR1 可能作为 CNS 单胺神经元调控新靶点的潜在作用。

1 TAAR1 表达

TAAR1 是一种细胞内受体, 主要表达于多个外周器官和细胞 (如胃、小肠、十二指肠和白细胞)、星形胶质细胞和突触前内的胞内环境 (如单胺神经元的轴突末端)^[5-6]。

在人体中, TAAR1 存在于中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 以及脂肪组织、血管、心脏、肾、肝、肺、睾丸中^[7]。在 CNS 中, TAAR1 主要表达于边缘系统和单胺能神经分布的区域, 包括多巴胺 (dopamine, DA) 能区的腹侧被盖区 (ventral tegmental area, VTA)、黑质 (substantia nigra, SN) 和 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 能区的中缝背侧核 (dorsal raphe nucleus, DRN)^[8-10], 以及蓝斑 (locus ceruleus, LC)、尾状核、壳核、伏隔核 (nucleus accumbens, NAc)、海马、下丘脑和杏仁核。除此以外, TAAR1 也在皮层区域表达, 特别是在前额叶皮层 (prefrontal cortex, PFC) V 层锥体神经元^[11]。

在哺乳动物体内, TAAR1 分布广泛。在小鼠中, TAAR1 mRNA 存在于大脑多个区域, 包括小脑、下丘脑、杏仁核、海马和背根神经节等, 同时存在于单胺能神经元区域, 包括 SN、VTA、LC 和 DRN 等^[12]。在大鼠中, TAAR1 的 mRNA 在胃、肾、肺等周围组织

中的含量为中低等水平, 在大脑中则含量低^[13]。

1.1 VTA

VTA 是 DA 能区, 对学习过程以及动机性和成瘾性行为至关重要^[14]。中脑-边缘 DA 神经系统中的 DA 受体 2 (D2R) 不仅介导精神病阳性症状, 还参与大脑的奖赏系统功能调节, 特别是在被认为是大脑快乐中枢的 NAc 中发挥作用^[15]。TAAR1 的 mRNA 和蛋白被证实在整个 DA 能投射区, 如 VTA、腹侧背侧纹状体、黑质均有表达^[16]。在小鼠大脑切片上进行的电生理实验中显示, TAAR1 在 VTA 和 DRN 中均具有功能活性^[17]。还有报道发现 VTA 和黑质致密部 (substantia nigra compact, SNc) 中 TAAR1 mRNA 水平明显高于其他脑区^[18]。有实验表明, 抗抑郁药 trananylcypromine (TCP) 能够减少野生型小鼠 SN 内谷氨酸 (Glu) 的释放, 但在 TAAR1 基因敲除 (TAAR1-KO) 小鼠上没有效果。此外, 用 TCP 处理的自由运动动物的 Glu 测量结果表明, TAAR1 可以阻止在超运动状态下 Glu 在 SN 的积累^[19]。其机制可能与 TAAR1 调节 Glu 转运体 EAAT2 的功能, 从而导致 Glu 清除的改变有关, TAAR1 过表达以及 TAAR1 激动剂甲基安非他命都会降低 Glu 清除^[20]。

1.2 PFC

有药理研究表明, TAAR1 激动剂具有促进认知的作用^[21], 而 PFC 是认知功能的主导脑区。目前已发现一种新的 TAAR1-KO 大鼠模型在 TAAR1 启动子的控制下表达红色荧光蛋白, 可以证明 TAAR1 在 PFC V 层神经元中选择性表达。与这种表达模式一致的是, TAAR1-KO 小鼠 V 层锥体神经元中天冬氨酸 (NMDA) 介导电流的功能缺陷和 NMDA 受体亚基组成的改变, 并在行为上表现为冲动和持续性的异常的认知行为。由此可见, TAAR1 在 PFC 中调节 NMDA 受体介导的认知的某些方面发挥着重要作用^[12]。最近在一项使用氯胺酮干预 BALB/cJ 小鼠的研究发现, 内侧前额叶皮层 (medial prefrontal cortex, mPFC) 中 5-HT 神经传递激活, 与氯胺酮阻断位于 mPFC 中 γ -氨基丁酸 (GABA) 释放中间神经元上的 NMDA-R 子集的假设相一致。Glu 和 GABA 是大脑中主要的抑制性神经递质, 减少 GABA 的释放, 从而促进 Glu 释放和诱导长时程增强样突触可塑性, 在治疗焦虑和抑郁中发挥关键作用^[22]。也有证据称致幻剂 LSD 通过 5-HT_{2A}/AMPA 受体和

mTOR 信号通路增强 mPFC 兴奋性传递,能够选择性地增强社会行为。LSD 在 mPFC 中激活 5-HT_{2A}/AMPA/mTORC1,可用于自闭症谱系障碍、社交焦虑障碍等具有社会行为损伤的精神疾病的治疗^[23]。除此以外,急性口服作用于 TAAR1 靶点的新型精神药物 SEP-363856 后的大鼠立早基因(immediate early genes, IEGs)表达在 PFC 强烈上调,在海马体腹侧也有轻度上调,表明这些区域被激活,与此相呼应的是 SEP-363856 急性给药纠正了亚慢性苯环己哌啶(PCP)给药引起的认知缺陷^[24]。

1.3 DRN

DRN 属于 5-HT 区,参与认知、奖励、疼痛敏感性和昼夜节律的调节^[14]。TAAR1 受体在大脑中密集表达,特别是在 DRN 和 VTA 中^[25]。TAAR1 活性可以影响 DRN 中 5-HT 神经元的兴奋性。有实验证明,TAAR1 的激动剂 RO5256390 和 RO5166017 可以抑制脑中的 5-HT 和 DA 神经元的体外兴奋性,而 TAAR1-KO 小鼠 5-HT 和 DA 神经元的体外兴奋性降低^[26]。但在最近的研究中,与之相矛盾的是 TAAR1 部分激动剂 RO5263397 剂量依赖地增加 VTA 中 DA 神经元和 DRN 神经元 5-HT 的放电率^[27]。目前来看可能还需要更多的研究去探讨 TAAR1 激动剂在这个区域对 5-HT 的影响。

1.4 其他

相关实验证实 TAAR1 在以下脑区分布,值得进一步的研究:下丘脑和视前区,已知调节睡眠和能量消耗^[28-29];NAc,是产生快乐情绪的脑区,有研究发现 TAAR1-KO 小鼠的 NAc 中儿茶酚胺浓度增加,且有数据表明在 NAc 内其特发性、遗传或药物诱导的 Glu 高状态是甲基苯丙胺成瘾易感性的中介^[25,30],此外 NAc 内 DA 水平的升高与海洛因成瘾也密切相关^[31]。

2 TAAR1 配体

TAAR1 可被内源性或外源性单胺类物质激活,但主要激活配体为痕量胺(trace amines, TAs)。TAs 作为一种与生物胺神经递质(例如 DA、5-HT 和去甲肾上腺素 NE)密切相关的内源性物质,自 20 世纪早期就被认为具有生理和神经作用^[8]。目前 TAAR1 已被证明能够与内源性 TAs 结合^[12]。TAs 指的是在生理状态下,一类组织浓度低于 100 ng/g 的胺类物质,经典的 TAs 包括酪胺(tyramine, TYR)、β-苯基

乙胺(β-phenylethylamine, β-PEA)、色胺、3-甲氧基酪胺(3-methoxytyramine, 3-MT)和甲状腺素(如 3-碘甲状腺素。这些单胺类物质是在芳香氨基酸(分别是酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸)的脱羧过程中产生的,由芳香氨基酸脱羧酶催化^[32]。生物胺神经递质稳态失常是多数神经精神性疾病发病的机制之一, TAs 与生物胺神经递质的密切联系,使其在神经精神性疾病发病和治疗中发挥潜在作用^[8]。近年来 DA 代谢物 3-MT 和甲状腺激素代谢物 3-碘甲状腺素胺(3-Iodothyronamine, 3-T1AM)被发现是 TAAR1 的高亲和力和内源性激动剂^[7]。

2.1 TYR

有研究表明,TAAR1-KO 小鼠对 TCP 的抗抑郁反应增强。在 TCP 给药时纹状体酪氨酸大量积累,与野生型小鼠相比,TAAR1-KO 小鼠的 TYR 积累更高,表明 TAAR1 在感知 TYR 水平时存在负反馈机制^[19]。在微生物体内,酪氨酸被酪氨酸转运体(tyrP)吸收并由酪氨酸的酶脱羧产生 TYR,最后通过 tyrP 运输到细胞外空间。有趣的是, TYR 已被证明能刺激回肠快速收缩和神经肽 Y 的释放、以及增加单胺神经递质的合成和分泌并进入循环,这跟最近新兴的研究领域脑-肠道-微生物组轴,即胃肠道微生物参与若干神经精神疾病相关。粪便代谢组学研究也发现,与其他帕金森病(Parkinson's disease, PD)患者相比,需要更高频率的左旋多巴(L-dopa)日剂量的 PD 患者中,酪氨酸脱羧酶基因及其携带细菌肠球菌的相对丰度更高,因此有学者建议将 TYR 作为 PD 的早期生物标记物^[33]。

2.2 β-PEA

β-PEA 在人类 TAAR1 激活中表现出高效力^[34]。β-PEA 有内源性安非他命之称,在大脑中增加可以促进神经可塑性的变化,例如增加神经营养生长因子、转化为减少应激诱导的促肾上腺皮质激素释放因子的高分泌,并在动物抑郁症研究中试验阳性^[35]。在 TAs 中,β-PEA 和酪胺是 TAAR1 有效的激活剂,但在人和小鼠 TAAR1 中,β-PEA 比酪胺激活效力更强,在大鼠 TAAR1 中则相反^[11]。早期实验就发现,β-PEA 能显著抑制了猕猴和野生型小鼠纹状体中 DA 和 5-HT、以及丘脑突触体中 NE 的摄取和外泄,证明 TAAR1 被 β-PEA 激活后显著抑制了转染细胞中单胺类物质的吸收和诱导流出^[36]。还有证据表明 β-PEA 增加了星形胶质细胞内 cAMP

水平,而 TAAR1 敲低后的 β -PEA 反应的细胞内 cAMP 水平显著降低^[20]。

2.3 3-T1AM

甲状腺激素及其衍生物是近年来精神疾病研究的一个新分支。已知 TAAR1 可以被甲状腺激素衍生物 3-T1AM 激活,并通过 TAAR1 刺激腺苷酸环化酶信号。在用 10 μ mol/L 3-T1AM 刺激 TAAR1 转染的细胞实验中,环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 积累显著高于基础信号传导^[37]。近年来还有研究表明,基于 CaMKII 和蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的细胞内级联, T1AM 通过 TAAR1 促进背侧纹状体细胞的磷酸化和功能性,增加了野生型小鼠纹状体 DA 释放,而 TAAR1-KO 小鼠和 EPPTB (TAAR1 抑制剂) 则减弱了这种作用,从而支持对 DA 传递的调节影响^[18]。此外,有研究发现侧脑室内注射外源性 T1AM 可产生促学习和抗遗忘作用,降低痛阈,减少非快速眼动睡眠,调节 LC 肾上腺素能神经元的放电率^[34]。

3 TAAR1 的作用通路、途径

TAAR1 作为 CNS 单胺神经元调控的潜在新靶点,通过与传统单胺类物质受体、转运体等发生相互作用,从而展现新的研究潜力。研究表明,TAAR1 可能在细胞质内和质膜上都发挥作用,有证据显示 GPCRs 在核内体腔室和核膜中发出信号^[12]。TAAR1 的激活可触发细胞内 cAMP 的积累,调节 PKA 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 信号通路,并通过 G 蛋白独立机制干扰 β -arrestin2 依赖通路^[11]。这种 TAAR1 激活后的下游效应使突触前细胞 cAMP 水平提高^[38],从而产生多种细胞内反应。有研究证实, cAMP 的主要功能可能是上调细胞胞浆内 TAs 的表达^[39],从而激活细胞内的 TAAR1。此外有研究发现, TAAR1 激动剂甲基安非他命使星形胶质细胞内 cAMP 水平提高,而 TAAR1 敲低显著降低了甲基安非他命的细胞内 cAMP 水平,表明信号通过星形胶质细胞 TAAR1 传递^[20]。

目前, TAAR1 已被证明能够直接控制 DA 和 5-HT 神经元活动和神经递质释放^[11]。细胞内 TAs 与 TAAR1 的结合有助于其与 D2R 的异源二聚,从而导致 TAAR1-D2R 复合物移位到细胞膜上,并在 DA 能神经元中转运到膜上,降低 DA 神经元的放电速率。TAAR1 抑制了 DA 神经传递,可能是通过调节

DA 转运体(dopamine transporter, DAT)或与 D2R 相互作用或激活内向性 K^+ 通道来实现,可见 TAAR1 和 D2R 调节之间存在密切的相互作用^[40]。最近文献报道,只转染 TAAR1 的 HEK-293 细胞中, TAAR1 的激活增加了细胞外调节蛋白激酶 ERK 和环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 CREB 的磷酸化水平。在表达 DAT 的 HEK293 细胞中, TAAR1 可介导安非他命诱导的下游 RhoA 蛋白和 cAMP 信号的激活,而不表达 DAT 的细胞则不能,由此可见在 DA 神经元中, TAAR1 是安非他命的直接胞内靶点。有趣的是,在两种不同的 G 蛋白 G13、GS 调节的 TAAR1 激活中,使用安非他命诱导的 TAAR1-G13-RhoA 和 TAAR1-Gs-PKA 信号的激活都依赖于 DAT^[41-42]。

4 TAAR1 与单胺神经递质释放关系

除了 TAs 外,经典单胺神经递质 DA、5-HT 和 NE 与 TAAR1 的关系密切。TAAR1 是传统靶点单胺神经递质的重要调节物,特异性激动剂激活 TAAR1 可以调节大脑中的经典单胺能系统,且数据表明 TAAR1 大脑过表达在体内导致单胺能神经传递的改变^[43-44]。早期报道发现单胺自身受体(例如 D2R、突触前 $\alpha 2$ 和突触前 5-HT1A)与 TAAR1 作用相反,两类受体共同调节单胺神经递质的释放^[45]。对于两者的关系,也有人提出了突触前受体平衡的概念,即 TAAR1 和单胺自身受体平衡单胺神经递质活性,前者抑制摄取,后者促进摄取,从而维持单胺神经递质释放平衡的状态^[11]。但 TAs 对 TAAR1 具有高结合亲和性,对单胺自身受体不具有高结合亲和性^[5]。在影像学方面,还有研究证据表明,安非他命和 TAs 抑制单胺再摄取依赖于相关单胺神经元中 TAAR1 共定位的存在^[45]。在恒河猴中已经观察到 TAAR1 与 DAT 的共定位,但 TAAR1 与 NE 转运体(norepinephrine transporter, NET)和 5-HT 转运体(serotonin transporter, SERT)的共定位仅体现于 mRNA 表达层面^[45]。

4.1 DA

在具有共定位 TAAR1 的神经元中, TAAR1 激动剂提高了突触间隙中相关单胺的浓度,从而增加了突触后受体的结合^[45]。通过直接激活 G 蛋白偶联的内向整流钾通道, TAAR1 可以降低 DA 神经元的放电率,进而阻止高 DA 能状态^[10]。安非他命和 TAs 可通过 DAT 重摄取或直接扩散进入突触前神

神经元^[45]。TAAR1 被 TAs 激活后,通过 PKA 和 PKC 信号,引起 DAT 磷酸化。两种蛋白激酶的磷酸化均可导致 DAT 内化(非竞争性再摄取抑制)^[45]。TAAR1 转基因小鼠身上也表现了相同的情况,数据表明,NAc 内 TAAR1 过表达小鼠的细胞外 DA 和 NE 以及 mPFC 的 5-HT 水平增加,在体外则与异位表达导致的 VTA、DRN 和 LC 单胺能神经元自发电率升高,尽管在基线条件下没有表现出明显的行为异常,但这些数据再次证实 TAAR1 可以降低安非他命的敏感性和改变单胺能神经传递^[43]。此外,TAAR1 可以对 D2R 进行抑制性转录调节,而 D2R 是目前药物成瘾治疗研究最广泛的靶点^[17]。

4.2 5-HT

TAAR1 和 SERT 主要在纹状体共表达^[46]。目前正在 III 期临床研究中的 SEP-363856,不作用于 D2 受体,但在 TAAR1 和 5-HT_{1A} 受体上具有激动剂活性,在治疗精神分裂症的随机试验中表现了比安慰剂更大的精神分裂症评估量表总分基线下降,展现 TAAR1 与 5-HT 可能作为精神分裂症患者的治疗靶点的巨大潜力,已被证明通过 TAAR1 和 5-HT_{1A} 介导的 DRN 和 VTA 神经元放电抑制来调节 DA 能和 5-HT 能神经传递^[47]。同时研究还发现使用 SEP-363856 治疗的精神分裂症患者的睡眠质量得到了改善,对于与睡眠障碍有关的一些神经精神疾病的治疗以及对睡眠造成不同的影响的抗精神病药物的使用无疑又提供了新的方向^[48]。

有趣的是,5-HT 能系统和其他神经递质系统(如 DA、NE、Glu 和 GABA)之间的相互作用控制着纹状体神经元的活动,对于理解 PD 的病理和生理学上也值得更多的思考^[49]。例如 LSD 以多效性作用机制作用于脑不同区域的不同位点,涉及 DRN 内 5-HT_{1A}、5-HT_{2A}、5-HT_{2C}; VTA 内 D2 受体、TAAR1 受体;LC 内 5-HT_{2A} 等。这 3 个位点效力共同投射到 PFC,增强或抑制神经递质的释放,最终治疗精神类效应和认知变化^[15]。有趣的是,低剂量(5~20 μg/kg,静脉注射) LSD 通过 5-HT_{2A} 和 D2R 能够显著降低 DRN 内 5-HT 的激发活性,而高剂量 LSD 对 DA 中边缘神经元的活性则不依赖于 5-HT 的作用^[50]。

4.3 NE

TAAR1 和 NET 主要在丘脑共表达^[46]。有研究发现纹状体对安非他命的反应分析是研究 NE 能神

经元的有用工具。使用 6-羟基多巴胺(6-OHDA)模型的研究显示,NE 和 5-HT 消耗都会导致 PD 模型动物的基底节功能失调。此外,NE 在中枢神经系统中还负责警觉性、注意力和能量等,而疲劳和注意力难以集中是抑郁症的常见症状^[25]。NE 能 PFC 的神经传递在一些精神和神经疾病中常发生改变,而目前最广泛使用的抗抑郁药物是 5-HT 和 NE 抑制剂,由此可见,其与 TAAR1 的联系能够为精神疾病的治疗提供更多的方向^[49]。

5 结语

综上所述,TAAR1 在动物模型、药品、人体随机临床试验已经展现了它在 CNS 中发挥着显著的作用,与精神分裂症、帕金森病精神病等神经精神疾病有着密切联系,可能作为 CNS 单胺能神经元信息调控的新靶点。同时,TAAR1 的作用与传统靶点三大神经递质的释放相互作用,TAAR1 起效可能主要基于对 DA 能系的影响,5-HT 能、NE 能和 Glu 能信号也可能起着重要作用。事实上,这种多模式的作用与 TAAR1 激动剂在改善药物副作用(运动失调、体重增加)、滥用成瘾可能性(特别是 DA 能药物)等方面有关。其激动剂和抑制剂在多种精神类疾病中的作用日益凸显,具有较好的研究价值和前景,为神经精神疾病的治疗提供新思路。

参考文献:

- [1] Rutigliano G, Zucchi R. Molecular variants in human trace amine-associated receptors and their implications in mental and metabolic disorders [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(2): 239-255.
- [2] Asif-Malik A, Hoener MC, Canales JJ. Interaction between the trace amine-associated receptor 1 and the dopamine D₂ receptor controls cocaine's neurochemical actions [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13901.
- [3] Espinoza S, Salahpour A, Masri B, et al. Functional interaction between trace amine-associated receptor 1 and dopamine D2 receptor [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 80(3): 416-425.
- [4] Leo D, Mus L, Espinoza S, et al. TAAR1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: role of D2 dopamine autoreceptors [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 81: 283-291.
- [5] Grandy DK, Miller GM, Li JX. "TAAR getting addiction"-the alamo bears witness to another revolution: an overview of the plenary symposium of the 2015 behavior, biology and chemistry conference [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2016, 159: 9-16.

- [6] Bonner TI, Davenport AP, Foord SM, et al. Trace amine receptor (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database [EB/OL]. [2019 - 08]. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F64/2019.4>.
- [7] Gainetdinov RR, Hoener MC, Berry MD. Trace amines and their receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(3) : 549-620.
- [8] Grandy DK. Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3) : 355-390.
- [9] Bradaia A, Trube G, Stalder H, et al. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1 - mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(47) : 20081-20086.
- [10] Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(20) : 8485-8490.
- [11] Pei Y, Asif-Malik A, Canales JJ. Trace amines and the trace amine-associated receptor 1: pharmacology, neurochemistry, and clinical implications [J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 148.
- [12] Lam VM, Espinoza S, Gerasimov AS, et al. *In-vivo* pharmacology of trace-amine associated receptor 1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 763: 136-142.
- [13] Borowsky B, Adham N, Jones KA, et al. Trace amines; identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(16) : 8966-8971.
- [14] Zhao H, Zhang BL, Yang SJ, et al. The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 277: 89-98.
- [15] De Gregorio D, Comai S, Posa L, et al. D-lysergic acid diethylamide (LSD) as a model of psychosis: mechanism of action and pharmacology [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11) : 1953.
- [16] Liu JF, Li JX. TAAR1 in addiction: looking beyond the tip of the iceberg [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 279.
- [17] Kostrzewa RM, Wydra K, Filip M, et al. Dopamine D₂ receptor supersensitivity as a spectrum of neurotoxicity and status in psychiatric disorders [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2018, 366(3) : 519-526.
- [18] Zhang X, Mantas I, Alvarsson A, et al. Striatal tyrosine hydroxylase is stimulated via TAAR1 by 3-iodothyronamine, but not by tyramine or β -phenylethylamine [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 166.
- [19] Mantas I, Vallianatou T, Yang Y, et al. TAAR1-dependent and-independent actions of tyramine in interaction with glutamate underlie central effects of monoamine oxidase inhibition [J]. *Biol Psychiatry*, 2021, 90(1) : 16-27.
- [20] Cisneros IE, Ghorpade A. Methamphetamine and HIV-1-induced neurotoxicity: role of trace amine associated receptor 1 cAMP signaling in astrocytes [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 85: 499-507.
- [21] Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, et al. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight [J]. *Mol Psychiatry*, 2013, 18(5) : 543-556.
- [22] Pham TH, Gardier AM. Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 199: 58-90.
- [23] De Gregorio D, Popic J, Enns JP, et al. Lysergic acid diethylamide (LSD) promotes social behavior through mTORC1 in the excitatory neurotransmission [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(5) : e2020705118.
- [24] Begni V, Sanson A, Luoni A, et al. Towards novel treatments for schizophrenia: molecular and behavioural signatures of the psychotropic agent SEP-363856 [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8) : 4119.
- [25] Grinchii D, Dremencov E. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs in mood disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24) : 9532.
- [26] Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, et al. TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and hypoglutamatergic activity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(20) : 8485-8490.
- [27] Goonawardena AV, Morairty SR, Dell R, et al. Trace amine-associated receptor 1 agonism promotes wakefulness without impairment of cognition in *Cynomolgus* macaques [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(8) : 1485-1493.
- [28] Chung S, Weber F, Zhong P, et al. Identification of preoptic sleep neurons using retrograde labelling and gene profiling [J]. *Nature*, 2017, 545(7655) : 477-481.
- [29] Coborn JE, DePorter DP, Mavanji V, et al. Role of orexin-A in the ventrolateral preoptic area on components of total energy expenditure [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2017, 41(8) : 1256-1262.
- [30] Szumlinski KK, Lominac KD, Campbell RR, et al. Methamphetamine addiction vulnerability: the glutamate, the bad, and the ugly [J]. *Biol Psychiatry*, 2017, 81(11) : 959-970.
- [31] 俞发荣, 李建军, 俞鑫, 等. 干预措施对精神依赖药物成瘾生理生化机制的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(6) : 799-803.
- [32] Berry MD. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators [J]. *J Neurochem*, 2004, 90(2) : 257-271.
- [33] Bugda Gwilt-K, González DP, Olliffe N, et al. Actions of trace amines in the brain-gut-microbiome axis via trace amine-associated receptor-1 (TAAR1) [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(2) : 191-201.
- [34] Rutigliano G, Accorroni A, Zucchi R. The case for TAAR1 as a

- modulator of central nervous system function [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 987.
- [35] Ricken R, Ulrich S, Schlattmann P. Tranlycypromine in mind (Part I): Review of pharmacology [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2017, 27(8): 714–731.
- [36] Xie Z, Miller GM. Beta-phenylethylamine alters monoamine transporter function via trace amine-associated receptor 1: implication for modulatory roles of trace amines in brain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325(2): 617–628.
- [37] Bräunig J, Dinter J, Höfig CS, et al. The trace amine-associated receptor 1 agonist 3-iodothyronamine induces biased signaling at the serotonin 1b receptor [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 222.
- [38] Lindemann L, Ebeling M, Kratochwil NA, et al. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors [J]. *Genomics*, 2005, 85(3): 372–385.
- [39] Xie Z, Miller GM. A receptor mechanism for methamphetamine action in dopamine transporter regulation in brain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(1): 316–325.
- [40] Leo D, Mus L, Espinoza S, et al. Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission; role of D2 dopamine autoreceptors [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 81: 283–291.
- [41] Liu J, Wu R, Li JX. TAAR1 and psychostimulant addiction [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(2): 229–238.
- [42] Underhill SM, Hullihen PD, Chen J, et al. Amphetamines signal through intracellular TAAR1 receptors coupled to $G\alpha_{13}$ and $G\alpha_s$ in discrete subcellular domains [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(4): 1208–1223.
- [43] Revel FG, Meyer CA, Bradaia A, et al. Brain-specific overexpression of trace amine-associated receptor 1 alters monoaminergic neurotransmission and decreases sensitivity to amphetamine [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37(12): 2580–2592.
- [44] Xu Z, Li Q. TAAR Agonists [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(2): 257–272.
- [45] Miller GM. The emerging role of trace amine-associated receptor 1 in the functional regulation of monoamine transporters and dopaminergic activity [J]. *J Neurochem*, 2011, 116(2): 164–176.
- [46] Xie Z, Westmoreland SV, Miller GM. Modulation of monoamine transporters by common biogenic amines via trace amine-associated receptor 1 and monoamine autoreceptors in human embryonic kidney 293 cells and brain synaptosomes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 325(2): 629–640.
- [47] Koblan KS, Kent J, Hopkins SC, et al. A Non-D2-receptor-binding drug for the treatment of schizophrenia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1497–1506.
- [48] Hopkins SC, Dedic N, Koblan KS. Effect of TAAR1/5-HT_{1A} agonist SEP-363856 on REM sleep in humans [J]. *Transl Psychiatry*, 2021, 11(1): 228.
- [49] Muñoz A, Lopez-Lopez A, Labandeira CM, et al. Interactions between the serotonergic and other neurotransmitter systems in the basal ganglia; role in Parkinson's disease and adverse effects of L-DOPA [J]. *Front Neuroanat*, 2020, 14: 26.
- [50] De Gregorio D, Posa L, Ochoa-Sanchez R, et al. The hallucinogen d-lysergic diethylamide (LSD) decreases dopamine firing activity through 5-HT_{1A}, D₂ and TAAR₁ receptors [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 113: 81–91.

[收稿日期]2021-06-10

张钊,葛乃嘉,马新月,等. 细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 133-136.
Zhang Z, Ge NJ, Ma XY, et al. Research progress on the role of pyroptosis in the microenvironment of liver injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 133-136.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 019

细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用研究进展

张 钊,葛乃嘉,马新月,刁佳雯,全吉淑*

(延边大学医学院,吉林 延吉 133002)

【摘要】 细胞焦亡(pyroptosis)是一种新型细胞程序性死亡方式,其特征是活化的消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)在细胞膜上形成微孔,使细胞内外的渗透压发生改变,最终细胞肿胀破裂,并释放大量的炎症因子及胞质内容物,从而参与机体免疫炎症反应。研究表明,细胞焦亡与肝损伤的发生发展有着密切的关系,过度的细胞焦亡将会导致肝损伤的加剧,危害机体的健康。本文主要对细胞焦亡的不同激活途径及其在肝损伤微环境中的作用机制加以综述。

【关键词】 细胞焦亡;肝损伤;炎症小体;GSDMD;分子机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0133-04

Research progress on the role of pyroptosis in the microenvironment of liver injury

ZHANG Zhao, GE Naijia, MA Xinyue, DIAO Jiawen, QUAN Jishu*

(College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, China)

【Abstract】 Pyroptosis is a novel type of programmed cell death characterized by the formation of micropores in the cell membrane by activated gasdermin D, which changes the osmotic pressure between the inside and outside of the cell. This eventually swells and ruptures the cell, and releases a large number of inflammatory factors and cytoplasmic contents, thereby participating in the inflammatory immune response. Studies have shown that pyroptosis is closely related to the occurrence and development of liver damage, and excessive pyroptosis aggravates liver damage. This article mainly reviews the different activation pathways of pyroptosis and its mechanisms of action in the liver injury microenvironment.

【Keywords】 pyroptosis; liver injury; inflammasome; GSDMD; molecular mechanism

细胞焦亡(pyroptosis)是一种新型的细胞程序性死亡机制,其分子机制及形态学特征与凋亡、坏死、自噬等其他形式的细胞死亡机制有着显著的差别^[1]。细胞焦亡以形成细胞微孔、细胞肿胀、胞膜破裂、最终导致炎症因子和细胞内容物的释放为主要特征。细胞焦亡激活后细胞内产生焦亡相关炎症因子及炎症小体,最终引发局部或全身的炎症反

应^[2]。一方面,细胞焦亡可以协助机体免疫系统及时清除病原体^[3]。另一方面,过度的炎症小体激活可引起强烈的炎症反应,并最终导致疾病的加剧^[3]。肝作为人体最大的腺器官,在维持机体代谢和免疫稳态中发挥着极其重要的作用^[4]。而肝组织中的许多细胞均能发生细胞焦亡,从而参与肝的免疫防御反应,但是细胞焦亡的过度发生将会导致

【基金项目】 国家自然科学基金(82060113)。

【作者简介】 张钊(1996—),男,硕士研究生,研究方向:天然成分的活性研究。E-mail:896940691@qq.com

【通信作者】 全吉淑(1968—),女,博士,教授,研究方向:天然成分的活性研究。E-mail:quanjs@ybu.edu.cn

肝损伤的加剧,危害机体的健康^[5]。本文主要就细胞焦亡的分子机制及其对肝损伤微环境中的多种细胞如免疫细胞、肝细胞、肝星状细胞的影响加以综述。

1 细胞焦亡的激活途径

细胞焦亡依赖于半胱天冬氨酸蛋白酶(caspase),细菌感染以及细胞应激反应均能够激活炎症小体而引起细胞焦亡^[6],其特征是 caspase-1/4/5/11 被激活后,其下游蛋白如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)随之释放,并诱导打孔蛋白消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)的活化成熟,使细胞膜微孔形成,细胞快速肿胀破裂,细胞内容物及炎症因子释放,从而参与机体的免疫炎症反应^[7]。细胞焦亡主要分为依赖 caspase-1 激活的经典途径,以及依赖 caspase-4/5/11 激活的非经典途径^[8]。

1.1 经典途径

细胞焦亡的经典途径大多是由胞内多聚蛋白复合物炎症小体(inflammasome)介导完成^[9],其起始于炎症小体识别各种外源性和内源性危险信号,包括病原相关分子模式(PAMPs)和损伤相关分子模式(DAMPs)^[10]。炎症小体系统的受体成分是由核苷酸结合寡聚结构域(NOD)样受体(NLRs)形成的,根据不同的胞质模式识别受体(PRR)蛋白,NLRs 可分为 NLRP1(NLR family pyrin domain containing 1)、NLRP3(NLR family pyrin domain containing 3)、NAIPs(NLR family apoptosis inhibitory proteins)、NLRC4(NOD-like receptor containing a caspase activating and recruitment domain 4)或黑色素瘤缺乏因子-2(absent in melanoma 2, AIM2)。这些受体蛋白与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domains, ASCs)相结合,ASC 包含两个结构域:分别是与 PRR 相互作用的 pyrin 结构域(PYD),以及与 caspase-1 相互作用的 caspase 招募结构域(CARD)^[11]。通过这两个结构域,ASC 可以与 PRR 和 caspase 前体蛋白相互结合,最终组成炎症小体^[12]。

其中 caspase-1 是目前唯一确认的参与细胞焦亡经典途径的 caspase 蛋白,而 NLRP3 炎症小体由 NLRP3 蛋白、ASC 和 caspase-1 组成^[13],是目前研究较为深入,且能够接收病原体、毒素等多种刺激信

号的一种炎症小体。NLRP3 炎症小体激活 caspase-1 导致 IL-1 β 前体和 IL-18 前体的裂解,并使其产生成熟的、具有生物活性的细胞因子^[13]。此外,活化的 caspase-1 也将 GSDMD 切割成具有活性的片段,并使其转移到细胞膜磷脂层,在胞膜上形成大小不等的蜂窝状孔洞,继而引起细胞肿胀破裂,最终导致 IL-1 β 、IL-18、乳酸脱氢酶(LDH)及其他可溶性胞质内容物的大量释放,引起细胞发生焦亡^[14]。因此,这证明了细胞焦亡是由炎症小体激活并通过 GSDMD 介导的细胞炎症性坏死。

1.2 非经典途径

与典型的焦亡相比,焦亡的非经典途径是由 caspase-4/5(小鼠中的 caspase-11)激活介导的,它可以直接被脂多糖(LPS)激活^[15]。LPS 的 lipidA 部分可以识别并与 CARD 结构域结合,然后促进 caspase-4/5/11 寡聚和激活,使其切割并激活 GSDMD,这一过程类似于焦亡经典途径^[16]。caspase-4/5/11 也可以激活泛连接通道蛋白 1(pannexin-1),随后打开膜通道 P2X7,导致细胞膜上形成微孔。此外,激活的 pannexin-1 可以通过 K⁺ 外排激活 NLRP3 炎症小体,导致 caspase-1 活化及 IL-1 β 的产生和释放^[16]。通过 GSDMD 和 pannexin-1,细胞焦亡的经典与非经典途径将协同发挥作用。

细胞膜上的 GSDMD 孔对细胞是有害的,但如果质膜中的孔隙数量较少,细胞正常的修复能力可以填补这些孔道。然而,如果 GSDMD 孔的数量超过细胞的自我修复能力,Na⁺ 和水将进入细胞,细胞体积将逐渐增大,最终引起细胞的肿胀破裂^[14]。此外,通过 GSDMD 孔释放的 IL-18 与 IL-1 β ,可以招募免疫细胞至炎症部位,IL-18 可以刺激 T 细胞增殖,加强 NK 细胞活性,诱导细胞因子的生成并触发炎症急性期信号反应^[17]。而 IL-1 β 能够引起肝中主要的促纤维化细胞肝星状细胞(HSCs)的增殖和反分化,导致肝纤维化组织的积累^[18]。

2 细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用

肝是机体抵御血液循环系统中各种病原微生物及毒素的第一道防线,而炎症小体作为焦亡的受体,在肝中的免疫细胞、肝细胞、肝星状细胞等多种细胞中均高表达^[5]。这些细胞的焦亡途径激活后,可以及时发挥肝正常的免疫防御反应,也可以直接或间接导致肝损伤的进一步加剧。

2.1 免疫细胞

肝组织中的免疫细胞主要包括巨噬细胞和粒

细胞,其中巨噬细胞可以第一时间检测到肝中存在的危险信号^[19],因此巨噬细胞的焦亡是导致肝病发展的重要原因之一。Pelegrin 等^[20]研究表明 LPS 与 ATP 协同作用可以诱导 J774a.1 巨噬细胞焦亡,并激活 P2X7 受体,使其快速释放大量的 IL-1 β 。库普弗细胞(Kupffer cell)是肝组织中可以自我更新的一种巨噬细胞,它可以清除内毒素,并释放 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子以维持肝组织微环境的免疫稳态^[21]。Mirshafiee 等^[22]研究表明稀土氧化物可以引起 NLRP3 炎症小体和 caspase-1 的激活,导致库普弗细胞及其他巨噬细胞系,如 J774A.1 和 RAW264.7 细胞的焦亡。因此,肝组织中巨噬细胞焦亡对肝损伤微环境的影响主要表现在两方面:一是巨噬细胞的焦亡可以影响免疫防御系统及时对病原体、内毒素等危险信号作出应答;另一方面,巨噬细胞焦亡产生的 IL-1 β 等炎症因子可以进一步加深肝损伤的程度。

研究表明许多慢性肝损伤疾病的明显特征是免疫反应失调和肝细胞死亡^[23]。Palacios-Macapagal 等^[24]的体内模型研究发现坏死肝细胞能够诱导嗜酸性粒细胞的募集,使其分泌 IL-1 β 和 IL-18,并伴有脱颗粒和细胞死亡现象,而 caspase-1 抑制剂能够阻断所有这些反应。进一步研究表明曼氏血吸虫感染小鼠肝窦中的曼氏菌卵可导致肝细胞死亡、炎症和进行性肝纤维化,从中可以分离出大量嗜酸性粒细胞,并证实其发生了由 caspase-1 介导的细胞焦亡。这表明,细胞焦亡是嗜酸性粒细胞用来应对大规模肝细胞死亡的一种重要途径。

2.2 肝实质细胞

除免疫细胞外,细胞内在炎症小体的激活可以引起肝细胞焦亡并加剧肝组织炎症及纤维化^[25]。Lebeauin 等^[26]用 LPS 诱导内质网应激,引起 NLRP3 炎症小体的激活,从而导致肝细胞焦亡及炎症的发生。而 Chen YL 用盲肠结扎穿孔术诱导小鼠肝脓毒症模型,引起 NLRP3 及 caspase-1 上调,进而使肝细胞发生焦亡,并且其研究表明肝损伤程度与焦亡相关蛋白如 NLRP3、caspase-1 表达量等呈正相关^[27]。肝细胞可以感知循环系统中的 PAMPs,如 LPS,随后将高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1, HMGB1)释放到细胞外结合 LPS,并通过晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)内化到巨噬细胞和内皮细胞的溶酶体中。随后 HMGB1 在溶酶体的酸性环境中使

磷脂双分子层通透性增强,导致 LPS 泄漏到细胞质中引起 caspase-11 的激活,继而引起肝损伤的进一步恶化^[28]。这一结果也证实了肝细胞焦亡在肝损伤微环境中发挥着重要作用。

2.3 肝星状细胞

肝星状细胞中炎症小体的激活在肝纤维化的发展中起着重要作用^[29]。肝纤维化的特征是细胞外基质的沉积,而肝星状细胞是主要储存细胞外基质的细胞^[30]。Boaru 等^[31]研究表明 NLRP3 炎症小体激活后释放的促炎细胞因子(IL-1 β 和 IL-18)可以在体外激活肝星状细胞和组织成纤维细胞的焦亡。Watanabe 等^[32]研究证实从损伤的肝细胞和巨噬细胞中释放的细胞因子和 DAMPs 可以激活肝星状细胞的焦亡并诱导肝纤维化。Wree 等^[25]的体内实验表明, NLRP3 突变小鼠高表达的 NLRP3 诱导肝星状细胞发生焦亡,使其结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和基质金属蛋白酶组织抑制剂 1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1, TIMP1)表达增高,致肝组织胶原沉积增多,引起较为严重的肝炎及肝纤维化。因此,肝组织中肝星状细胞焦亡的激活是肝炎、肝纤维化发生、发展的关键环节。

3 总结与展望

综上所述,细胞焦亡对肝组织在抵御病原体及各种危险信号时发挥的免疫防御作用极其重要,但过度的焦亡会促进肝损伤的进一步加剧。然而细胞焦亡过程复杂,其在肝多种细胞中的详细分子机制以及不同细胞间的串扰作用有待进一步研究。近年来,抗细胞焦亡药物以及针对焦亡的靶点治疗在肝损伤的治疗上有着非常可观的发展前景。我们可以通过阻断相关分子(如 NLRP3、caspases 和 IL-1 等)来抑制焦亡对肝损伤的影响,这对于肝病来说是一种潜在的治疗方法。但是细胞焦亡是抵御病原体及危险信号的一道重要防线,抑制焦亡可能影响机体正常的免疫反应,进而增加机会性感染的风险。因此,如何在维持机体正常免疫的情况下,抑制细胞焦亡的发生,并达到动态的平衡,仍需要更多的研究。所以,对于细胞焦亡机制的进一步探索将有助于抗细胞焦亡药物与细胞焦亡相关靶点治疗的研究与利用。

参考文献:

- [1] Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death

- and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2): 99–109.
- [2] 王烁, 卿笃信. 炎性小体激活与细胞焦亡及其在酒精性肝病中的研究进展 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2020, 45(8): 999–1004.
- [3] Man SM, Karki R, Kanneganti TD. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 61–75.
- [4] 郭笑潇, 陈明泉. 细胞焦亡在脓毒症肝损伤中的分子机制和研究进展 [J]. *肝脏*, 2021, 26(3): 321–323.
- [5] Knorr J, Wree A, Feldstein AE. Pyroptosis in steatohepatitis and liver diseases [J]. *J Mol Biol*, 2021, 27: 167271.
- [6] Jorgensen I, Zhang Y, Krantz BA, et al. Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(10): 2113–2128.
- [7] Loveless R, Bloomquist R, Teng Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 264.
- [8] Wright SS, Vasudevan SO, Rathinam VA. mechanisms and consequences of noncanonical inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *J Mol Biol*, 2021, 16: 167245.
- [9] Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages [J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(11): 1812–1825.
- [10] Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265(1): 130–142.
- [11] 王子, 王雪峰, 吴振起. 清肺透邪汤介导 NLRP3 炎性小体抑制 NF- κ B 信号通路改善肺炎支原体小鼠炎症反应 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 470–477.
- [12] Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions [J]. *Cell*, 2016, 165(4): 792–800.
- [13] 丁世彬, 高丽云, 李玉春, 等. 慢性 PM_{2.5} 暴露对 C57BL/6J 小鼠肺组织炎症和 NLRP3 炎性小体活性的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(4): 444–449.
- [14] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4 [J]. *Science*, 2013, 341(6151): 1246–1249.
- [15] Ji J, Ye W, Sun G. LncRNA OIP5-AS1 knockdown or miR-223 overexpression can alleviate LPS-induced ALI/ARDS by interfering with miR-223/NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *J Gene Med*, 2021, 4: e3385.
- [16] Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666–671.
- [17] 金萍, 邵勇. IL-18 在肝细胞损伤中的作用机制研究进展 [J]. *中华内分泌外科杂志*, 2013, 7(2): 171–173.
- [18] Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(1): 156–167.
- [19] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 306–321.
- [20] Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL- β in mouse macrophage [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7147–7157.
- [21] Dixon LJ, Barnes M, Tang H, et al. Kupffer cells in the liver [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(2): 785–797.
- [22] Mirshafiee V, Sun B, Chang CH, et al. Toxicological profiling of metal oxide nanoparticles in liver context reveals pyroptosis in kupffer cells and macrophages versus apoptosis in hepatocytes [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(4): 3836–3852.
- [23] McDonald B, Kubes P. Innate immune cell trafficking and function during sterile inflammation of the liver [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(6): 1087–1095.
- [24] Palacios-Macapagal D, Connor J, Mustelin T, et al. Cutting edge: eosinophils undergo caspase-1-mediated pyroptosis in response to necrotic liver cells [J]. *J Immunol*, 2017, 199(3): 847–853.
- [25] Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 59(3): 898–910.
- [26] Lebeaupin C, Proics E, de Bievill CH, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(9): e1879.
- [27] Chen YL, Xu G, Liang X, et al. Inhibition of hepatic cells pyroptosis attenuates CLP-induced acute liver injury [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12): 5685–5695.
- [28] Deng M, Tang Y, Li W, et al. The endotoxin delivery protein hmgbl mediates Caspase-11-dependent lethality in sepsis [J]. *Immunity*, 2018, 49(4): 740–753.
- [29] Wang H, Wang Z, Wang Y, et al. miRNA-130b-5p promotes hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis by suppressing SIRT4 expression [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15): 7381–7394.
- [30] Wu J, Lin S, Wan B, et al. Pyroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(5): 1094–1108.
- [31] Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L, et al. Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2012, 9(1): 49.
- [32] Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(6): 1248–1257.

[收稿日期] 2021-11-15

陈柳,邱敏,代解杰. 病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 137-144.

Chen L, Qiu M, Dai JJ. Research progress on the mechanism and animal models of keratitis caused by pathogen infection [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 137-144.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 020

病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展

陈 柳¹,邱 敏²,代解杰^{1*}

(1.中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所,昆明 650118;2.昆明医科大学,昆明 650500)

【摘要】 感染性角膜炎是世界范围内的眼科常见疾病,是导致视力丧失和失明的重要原因。对微生物性角膜炎发病机制的全面认识、建立相关疾病的动物模型在研究宿主感染的免疫应答和感染机制、药物研发等方面扮演着重要作用,为临床治疗策略选择及基础研究提供了科学依据。随着医学研究的深入,我们对感染性角膜炎动物模型及致病机制进行归纳总结,期望对此有一个全面了解。

【关键词】 感染性角膜炎;发病机制;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0137-08

Research progress on the mechanism and animal models of keratitis caused by pathogen infection

CHEN Liu¹, QIU Min², DAI Jiejie^{1*}

(1. Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College Institute of Medical Biology, Kunming 650118, China.

2. Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】 Microbial keratitis is a common ocular disease worldwide and is an important cause of vision loss and blindness. A comprehensive understanding of the pathogenesis of microbial keratitis is required for the establishment of animal models of related diseases. These models play an important role in studying the immune response and infection mechanism of host infections and drug development, and provide a scientific evidence for the selection of clinical treatment strategies and pursuing basic research. Here we summarize the animal models and the pathogenic mechanism of infectious keratitis to provide comprehensive understanding of the current research on these models.

【Keywords】 infectious keratitis; pathogenesis; animal models

角膜是眼球最先接触外界的部分,易受外伤,容易与各类微生物接触,继而引发感染性角膜炎^[1]。完整的眼表屏障抵制了大多数微生物的入侵,但一旦解剖屏障被打破,宿主对病原体的防御就不足以抵制感染,可引起角膜炎症,严重时导致失明。感染性角膜炎是一种潜在的威胁视力的眼

部疾病,由细菌、真菌、病毒、原生生物等病原体引起。由致病病原体引起的角膜炎,能侵入角膜基质引起炎症,并最终破坏这些结构^[2-3]。探索其发病机制,是目前研究的焦点,实验动物模型的建立有助于感染机制及防治的研究。本文就近年来病毒、真菌和细菌感染的动物模型建立及相关的发病

【基金项目】 NSFC-云南联合基金重点支持项目(U1702282);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019);昆明市科技创新团队(2019-1-R-2483)。

【作者简介】 陈柳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制研究。E-mail: chenliu19950623@163.com

【通信作者】 代解杰(1961—),男,研究员,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型建立及机制研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

机制进行归纳总结,为开展该领域研究的相关人员提供帮助。

1 病毒感染性动物模型

1.1 单纯疱疹病毒感染及动物模型

在发达国家,单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus, HSV-1)是感染性失明的主要原因。HSV-1 感染可发生在眼睛的任何部位;最常见的表现是上皮性或树突状角膜炎。对兔眼部接种病毒证实 HSV-1 感染也可诱发角膜内皮炎^[4]。宿主细胞对 HSV-1 的应答在眼内 HSV-1 感染的发病机制中起着重要作用^[5]。

原发性 HSV 感染可发生在儿童或青年通过粘膜直接接触,常表现为结膜炎伴眼睑囊泡。大多数眼部 HSV 是由三叉神经节潜伏的 HSV 感染再激活引起的,并伴有角膜内的病毒脱落。HSV 的再激活是由各种环境因素引发的,包括压力、发烧、紫外线照射以及激光治疗或外用糖皮质激素等医源性因素^[6]。Li 等^[7]研究了眼部接种后树鼩三叉神经节中的 HSV-1 感染,证实 HSV-1 潜伏感染三叉神经元。并且发现与小鼠相比,树鼩三叉神经节的病毒急性感染更微弱,没有来自感觉神经元的可检测的传染性病毒。其轻度感染可能与人类感染更相似,树鼩可能是研究 HSV-1 潜伏感染的很好的模型。夏丽坤等^[8]用雌性 NIH 小鼠成功地先建立了 HSV-1 潜伏感染的动物模型,再通过中波长紫外线照射小鼠角膜建立起了复发性单纯疱疹性角膜炎的实验模型。

感染期间,HSV-1 病毒在角膜上皮细胞中复制,并形成巨大的合胞体结构。这些细胞最终以坏死的方式破裂,并在周围组织中释放 HSV-1 病毒粒子,导致在角膜的不同层(上皮细胞、间质和内皮细胞)形成较大的角膜炎病变^[9]。单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)是由 HSV 感染的角膜细胞与浸润的炎症细胞相互作用引起的,在 24 h 内,炎症细胞(主要是中性粒细胞)涌入,但也有 NK 细胞、树突状细胞和巨噬细胞,它们在这一阶段的功能是限制病毒在组织内的传播。在感染后 7 d 开始,CD4⁺T 细胞到达角膜,产生各种细胞因子,如 IFN- γ 和 IL-17,这些细胞因子促进第二波中性粒细胞的浸润和激活,本质上更具致病性。这些中性粒细胞在角膜并被 CD4⁺T 细胞激活,脱粒并分泌炎症介质、蛋白酶和自由基,这是 HSK 中观察到的大部分组织损伤的原

因。有报道称,原发性 HSK 小鼠角膜中 IFN- γ 、IL-2 和 TNF α / β 的水平显著升高,提示病毒感染后眼内 CD4⁺T 细胞均为 Th1 细胞^[10]。又有研究小组证明 CD8⁺T 细胞在小鼠单纯疱疹病毒潜伏感染中起旁观者作用^[11]。

Mott 等^[12]用 FMS 样酪氨酸激酶 3 配体(Flt3L)免疫 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠,其中 Flt3L 是体内 DCs(CD11⁺CD8 α ⁺)的强刺激因子,发现 CD11⁺CD8 α ⁺细胞数量的增加与 HSV-1 潜伏期的增加有关。此外,CD11c⁺CD8 α ⁺树突状细胞的过继转移与 HSV-1 潜伏期的降低有关。Bryant-Hudson 等^[13]已经证明,抑制程序性死亡 1 配体(PD-L1)与其受体 PD-1 的相互作用阻碍了 DCs 的激活和病毒滴度的升高。此外,研究还发现,HSV-1 感染过程中树突状细胞失活与多种树突状细胞命令性分子的下调有关,如 CD80、CD86、CD54、CCR7、CXCR4 和 MHC1^[14]。

在 HSV-1 感染期间,角膜上皮细胞显示出 toll 样受体(TLRs)的不同表达动态,TLR-4,7,8,9 在活动性角膜炎中显著上调^[15]。在小鼠模型中,敲除 TLR-2 已被证明是抑制角膜炎损伤的有效策略。相反,TLR-4 敲除小鼠出现严重角膜炎病变的速度更快^[16]。虽然 TLR-9 与 HSV-1 DNA 的连接启动了清除 HSV-1 的强烈免疫反应,但它也促进了导致角膜破坏的炎症过程^[17]。因此,通过分子模拟技术阻断 TLR-2 和 TLR-9 并激活 TLR-4 可能是一种新的、有效的策略来避免先天免疫介导的角膜损伤。

1.2 巨细胞病毒感染及动物模型

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是 β -疱疹病毒家族的成员,是世界范围内先天性感染的主要原因之一^[18]。Zhang 等^[19]建立了大鼠巨细胞病毒角膜炎动物模型,发现 CMV 可在体内广泛感染前段组织,包括角膜内皮、虹膜和小梁网,诱发相应的临床表现。Kandori 等^[20]的一项研究显示巨细胞病毒倾向于角膜内皮炎,而不是上皮性或基质性角膜炎。

虽然不像 HSK 那么频繁,但 CMV 引起的角膜炎由于确诊的角膜炎患者数量急剧增加而在最近引起了人们的关注^[21]。使用小鼠中的鼠巨细胞病毒(mouse cytomegalovirus, MCMV)作为模型系统,结果表明持续性 MCMV 同时存在于慢性活动状态和潜伏状态中^[22]。病毒对 CD34⁺髓系祖细胞(主要表现为 CMV 潜伏期)和其他存在于肺、角膜、视网膜和唾液组织中的细胞的嗜性使其成为最普遍和适

应性最强的病原体之一。因此,在免疫缺陷和免疫抑制的宿主中,机会性巨细胞病毒感染会出现广泛的症状;从无症状的病毒血症到巨细胞病毒综合征和组织侵袭性疾病,主要是由于 1 型免疫激活^[23]。

在 CMV 诱导的角膜炎期间,病毒在离开宿主细胞感染邻近细胞之前有策略地在伪 G1 期复制和组装^[24]。CMV 的这种复制现象已被证明与上皮性角膜炎、基质角膜炎和伴有不透明、分支、非溃疡性上皮病变的内皮炎有关^[25]。但是目前对于 CMV 如何导致病毒性角膜炎的机理仍不明确,只有相关动物模型的建立。CMV 导致角膜炎发生的具体途径仍在研究,尚无文献说明。

目前有关 CMV 感染的关键分子研究较多,可能会对 CMV 导致角膜炎机制研究提供有效靶点。比如,Puttur 等^[26]利用转基因小鼠,CD11c⁺ 树突状细胞中的 TLR9/MyD88 信号通路通过促进 NK 细胞 CD69 的表达和 IFN- γ 的产生,增强了 MCMV 的清除。同时,在浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cells, pDCs)缺失的情况下,常规树突状细胞(conventional dendritic cells, cDCs)可通过 TLR9/MyD88 依赖的方式促进健壮的 NK 细胞效应细胞功能和 MCMV 的清除。同时, cDCs 来源的 IL-15 通过不依赖 TLR9/MyD88 的机制调控 NK 细胞脱颗粒。Szomolanyi-Tsuda 等^[27]发现在 TLR2 KO 小鼠中, MCMV 复制的早期控制受损,第 4 天在脾和肝中发现病毒滴度升高, TLR2 对 MCMV 的清除作用是由 NK 细胞介导的。以上研究发现 TLR2、TLR9 和 DC 与 CMV 感染有关,但病毒性角膜炎的潜在机制需要进一步研究。

2 真菌性感染动物模型

2.1 茄病镰刀菌感染及动物模型

镰刀菌属丝状真菌的成员,是最常引起人类角膜真菌病的病原体之一。镰刀菌角膜炎在炎热、潮湿、热带或亚热带气候地区的农业工人中最常见。镰刀菌病最常见的是角膜局部感染,但在不同国家经培养证实的真菌性角膜炎病例中,镰刀菌的发病率不同。在许多调查中,镰刀菌是主要的角膜真菌病病原,而曲霉属和念珠菌属则以其他研究为主,报道最多的病原体是茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)^[28]。

所有主要的真菌病原体都产生无性孢子(分生孢子),从环境中引入泪膜和眼表。Pinnock 等^[29]用

手术刀伤法或注射法均成功诱导了兔和人角膜的感染,对于茄病镰刀菌,感染后的体内培养组织学与临床感染的组织学相似,有致密的白色真菌斑块、角膜混浊、角膜浸润、水肿、溃疡形成、附着物病变、角膜新生血管和细胞减少。在兔和人的角膜中观察茄病镰刀菌的分生孢子粘附在基质上,一段时间后,菌丝穿透基质。镰刀菌分生孢子的细胞表面覆盖着一层保护性的疏水蛋白和小球藻层,这有助于屏蔽高免疫原性真菌细胞表面蛋白 β -葡聚糖和 α -甘露聚糖(被称为病原体相关分子模式),使其无法被免疫细胞识别^[30]。

Mukherjee 等^[31]利用体外接触镜方法建立的小鼠模型研究发现,茄病镰刀菌和尖镰孢菌的生物膜形成能力是致病的关键因素。在小鼠模型中引起角膜炎的能力似乎与生物膜的形成有关,但与生物膜的厚度无关。另外,镰刀菌产生的多种毒素包括镰刀菌醇、T-2 毒素、脱氧镰刀菌醇、二乙酰氧环萜醇和镰刀菌酸^[32],具有抑制吞噬功能、细胞内杀伤、细胞因子、抗原呈递和巨噬细胞活性氧(ROS)的产生,此外,它们还可能发挥抑制 T 细胞功能的作用^[33]。

Jin 等^[34]用灭活的茄病镰刀菌刺激人永生角膜上皮细胞,证实了来自镰刀菌的菌丝片段增加了 TLR2、3、4 和 6 mRNA 的表达以及 IL-6 和 IL-8 的释放。TLR2 和 TLR4 蛋白的表达也通过暴露菌丝片段得到增强。抗 TLR2 和抗 TLR4 单克隆抗体预处理也能抑制 IL-6 和 IL-8 的释放,结果表明 TLR2 和 TLR4 都参与了镰刀菌暴露后的信号响应。苗雨润等^[35]用茄病镰刀菌感染树鼩角膜,发现树鼩角膜上皮与角膜内皮经真菌刺激后表达 Dectin-1 与甘露糖受体(MR),但并不能产生 IL-1 β ,提示真菌性角膜炎的发生可能仍需要免疫系统的参与调节。其建立的真菌性角膜炎树鼩模型,病理表现与人类真菌性角膜炎症状接近,甘露糖受体可能参与调控机体对真菌感染的免疫应答反应,机体自身的免疫能力可能对角膜炎病的发生与转归有重要作用,提示树鼩是角膜炎适合的动物模型。此外,角膜上皮细胞中表达的 Dectin-1、Dectin-2 可通过激活 Syk-MAPK 通路,促进细胞因子 IL-2、IL-10 和 TNF- α 的分泌,进而发挥抗真菌免疫功能^[36-37]。

2.2 白色念珠菌感染及动物模型

白色念珠菌(*Monilia albican*)是温带地区真菌性角膜炎的最常见原因。慢性眼表疾病和长期或

全身性使用皮质类固醇激素,似乎是念珠菌性角膜炎的主要诱因^[38]。酵母样及相关真菌引起的角膜炎可能类似细菌性角膜炎,具有上皮组织缺损、离散浸润和缓慢进展等特征^[39]。

酵母细胞壁的外层纤维由甘露聚糖或甘露蛋白组成,黏附性甘露蛋白在真菌与角膜组织的结合中发挥重要作用。这些凝集素样蛋白识别角膜上皮细胞表面的甘露糖或甘露糖蛋白。角膜损伤导致角膜表面上的甘露糖蛋白上调,因此,它可能在真菌性角膜炎的粘连和发病机制中起重要作用^[40]。形态发生是真菌病原体从酵母形态转变为菌丝形态的能力。虽然病原体在酵母阶段可以更有效地传播,菌丝形式却可以很好地适应入侵和破坏组织^[41]。菌丝能够生长并通过上皮细胞,进入间质,如果不减少菌丝,将最终进入前房。Sheppard 等^[42]证明念珠菌和丝状真菌通过胞吞作用侵入角膜上皮,胞吞作用由入侵蛋白介导,并通过蛋白水解酶破坏上皮细胞的紧密连接。

对真菌的先天和适应性免疫反应主要是由信号 c 型凝集素受体(CLR)介导的,其中 Dectin-1 在真菌感染的背景下是最典型的^[43]。对于真菌感染,先天和适应性免疫反应主要由 CLR 调节。Dectin-1 可以识别 β -葡聚糖,并通过其胞质信号域诱导多种细胞功能,在小鼠和人类对白色念珠菌和其他真菌的保护性免疫应答中至关重要。Marakalala 等^[44]利用小鼠模型发现,控制白色念珠菌对 Dectin-1 的要求是菌株特异性的,因为不同的白色念珠菌菌株在其细胞壁的组成和性质上存在差异,只有在体内感染时才会明显。Dectin-1 介导的对白色念珠菌感染的保护最近也被认为是由于肾浸润 DC 产生 I 型 IFN,这需要 Syk、CARD9 和 IRF5^[45]。其他起重要作用的信号 CLR 包括 Dectin-2、Mincle、DC-SIGN 和 MR^[43]。另外,邹嫣丽^[46]选用 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠,用角膜基质注射法注射白色念珠菌孢子建立了真菌性角膜炎模型,结果显示感染早期两种品系小鼠血浆及受染角膜组织中均有较高水平 IL-17 的表达,中后期 IL-17 的表达下降,IFN- γ 的表达量明显升高。

3 细菌性感染动物模型

3.1 铜绿假单胞菌感染及动物模型

细菌性角膜炎约占所有微生物性角膜炎病例的 90%,其中铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)最常见^[47]。其起病急、发展迅速,若

未及时治疗,极易形成角膜溃疡,严重时可致盲。

假单胞菌的角膜感染与隐形眼镜的使用有关,在隐形眼镜出现之前很少被报道为一个问题。其菌毛与鞭毛以及细胞表面的疏水性都可以帮助其隐形眼镜的黏附^[47]。一些研究报道了使用戴隐形眼镜的动物模型来研究隐形眼镜相关的微生物角膜炎的发病机制,例如建立铜绿假单胞菌性角膜炎兔模型,研究中性粒细胞浸润和严重程度的关系^[48],铜绿假单胞菌性角膜炎大鼠模型研究细胞因子和趋化因子的变化^[49]。但这些动物模型有一些局限性,兔需要眼睑闭合或立膜手术来保留眼镜^[48],大鼠尽管反复进行细菌接种,但没有发生或低水平明显的微生物性角膜炎^[49]。Metruccio 等^[50]成功地建立了小鼠隐形眼镜佩戴模型,该模型在小鼠身上忠实地复制了几种与晶体相关的现象。通过佩戴隐形眼镜感染铜绿假单胞菌的小鼠模型,发现其与人类配戴隐形眼镜时对机会性微生物的感染风险是一致的。还发现在其他健康的角膜中,未接种铜绿假单胞菌的隐形眼镜佩戴可导致嗜中性粒细胞募集的副炎症反应发生,这一反应依赖于 MyD88 和 IL-1R。除此之外多种动物模型已被运用。例如,Pinnock 等^[29]发现,角膜基质注射法和角膜损伤法相比,前者角膜感染后表面覆盖的细菌更多,而兔和人的角膜感染结果相似,在感染 24 或 48 h 后测定菌落形成单位(CFU),尽管每种模型的细菌和处理技术存在差异,但 CFU 的变化很小。与 Pinnock 等^[29]人的观点一致,Okurowska 等^[51]采用两种不同菌株的铜绿假单胞菌,证实了在体外感染的猪和兔的角膜 24 h 后,细菌活细胞计数没有显著差异。这些动物模型已广泛应用于细菌性角膜炎诸多的研究。

当铜绿假单胞菌粘附于宿主表面时,细菌可以向胞外分泌粘性物质,将形成的微菌落包裹,逐渐形成生物膜^[52]。生物膜除了可以牢固粘附于宿主细胞表面之外,还可以分泌胞外聚合物和毒力因子,不但使生物膜具有自身的空间结构,保护细菌免受宿主的免疫攻击,还能改变菌体结构或表型,逃避免疫识别。生物膜特异性免疫逃避的机制包括机械保护、屏蔽免疫识别、改变基因表达和抑制免疫细胞功能^[53-55]。

铜绿假单胞菌能够分泌至少 7 种不同的蛋白酶,其中一些在角膜炎的发病机制中发挥潜在作用。例如基质金属蛋白酶,特别是弹性蛋白酶 B (Las B)和碱性蛋白酶(AP),在角膜炎中起着相当重要的作用,因为将 Las B 注射到角膜基质中会导

致严重的角膜损伤。铜绿假单胞菌小蛋白酶 (PASP) 能够破坏胶原蛋白, 其是角膜基质的主要构成部分, 因此 PASP 可能在角膜损伤中发挥重要作用。将纯化的 PASP 注射到兔角膜中, 会导致角膜上皮细胞的破坏, 并可进一步损伤基质^[56]。

Cole 等^[57]证明 IL-6 在铜绿假单胞菌感染的角膜组织中快速上调, IL-6 基因缺陷型小鼠与野生型相比, 病程延长, 炎症反应更重, 预后更差。IL-1、IL-6 等可以趋化多核中性粒细胞 (polymorphonuclear, PMN) 向病变部位集中, 募集的 PMN 浸润于感染角膜, 引起炎症反应以清除细菌。机体抵抗铜绿假单胞菌的特异性免疫主要是由 CD4⁺ T 细胞介导。在相关的研究中表明, 倾向于 Th1 型反应的 C57BL/6 小鼠角膜感染 PA 后在感染早期即可出现角膜混浊, 角膜基质及前房有大量炎性细胞浸润, 病情较重、发展迅速, 极易导致角膜穿孔。BALB/c 小鼠更倾向于 Th2 型反应, 感染后比 C57BL/6 小鼠的病程更长, 但角膜溃疡或穿孔的发生率却明显更低^[58]。因此 Th1 和 Th2 型免疫应答的促炎与抗炎平衡对角膜炎的病程发展起到重要作用。

3.2 金黄色葡萄球菌感染及动物模型

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是细菌性角膜感染的常见原因, 其进展迅速, 导致角膜瘢痕形成、穿孔和严重的视力丧失。它在免疫功能低下、糖尿病和艾滋病患者中更常见, 使用隐形眼镜的人也更容易出现这种问题^[59]。

Hume 等^[60]建立金黄色葡萄球菌感染角膜炎小鼠模型, 研究表明葡萄球菌蛋白酶通过增加纤维连接蛋白的结合而增加了角膜细胞的粘附和侵袭, 其抑制对金黄色葡萄球菌在角膜炎中的致病性有显著影响。不同动物的感染模型具有其局限性。例如, 使用间质内注射细菌的兔角膜炎模型技术简单、可控, 重复率高^[61], 但该模型并没有复制人类细菌性角膜炎的发展过程, 而且它绕过了感染过程中的重要步骤; 与人类的感染不同, 一些小鼠模型无需治疗就能清除感染。对小鼠角膜上皮进行清创后接种细菌^[59], 也不是人类角膜在感染前受损的最精确模型, 除非有化学或机械创伤造成的大伤口。迄今为止, 划痕模型的假单胞菌和金黄色葡萄球菌角膜炎研究中使用的模型相似^[62], 与人类角膜炎发生的情况非常接近。

使用角膜炎兔模型最重要的发现是金黄色葡萄球菌分泌的 α -溶血素是导致疾病严重程度的主要细菌毒力因子, α -溶血素免疫对金黄色葡萄球菌

角膜炎具有保护作用^[63]。兔角膜注射纯化 α -毒素可引起角膜和虹膜显著的、剂量依赖的炎症反应^[64]。这些结果在角膜划痕术后的小鼠角膜炎模型中得到了证实。Putra 等^[59]在体外使用划痕试验和体内使用小鼠上皮清创模型证实了金黄色葡萄球菌对角膜上皮伤口愈合的抑制作用很大程度上归因于 α -溶血素。结果表明, 金黄色葡萄球菌定植的患者更容易出现角膜上皮伤口愈合延迟, 而 α -溶血素是这一过程的主要因子。在建立的小鼠金黄色葡萄球菌角膜炎也证实金黄色葡萄球菌的侵袭力依赖于 α -溶血素。此研究中使用的感染模型涉及角膜上皮细胞的彻底清创, 以促进细菌侵入基质。金黄色葡萄球菌相关 α -溶血素导致角膜上皮细胞溶解暴露底层基质, 增加中性粒细胞密度。细菌性角膜炎的角膜浸润是中性粒细胞的聚集, 其聚集是为了清除入侵的病原体及其抗原。主要是浸润的白细胞、角膜组织和角膜缘血管内皮之间的细胞间连接决定了中性粒细胞的募集^[65]。

在动物研究中, 中性粒细胞快速募集是通过激活感染部位的 Th1 细胞来驱动宿主的先天免疫应答。中性粒细胞长期募集可能会触发细胞外溶酶体酶的释放, 从而导致角膜进一步损伤。巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2), 也被称为 CXCL2, 是一个强有力的嗜中性粒细胞化学诱导物。基因敲除 (gene knockout) 和转基因小鼠角膜感染过程中炎症介质的恢复表明, 许多受体例如 CXCR2, TLR4, TLR9 与 IL-1 β 蛋白共同介导 MIP-2 的释放和活性^[66]。例如, 在小鼠研究中发现, CXCR2 受体与 MIP-2 结合是必要的, 可以有效地使中性粒细胞趋化并渗出到金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌角膜炎的部位^[67-68]。尽管在 CXCR2 敲除小鼠的角膜感染后 MIP-2 水平高, 中性粒细胞仍局限于外缘区域。CXCR2 的缺失破坏了 MIP-2 驱动的中性粒细胞迁移到感染部位, 阻碍了细菌清除, 导致角膜炎进展甚至穿孔^[67-68]。

4 总结与展望

所有的角膜炎动物模型都有其局限性。兔和小鼠, 已经被证明是研究微生物性角膜炎的有用模型。然而, 当使用具有不同于人类特征的物种时, 也存在一些缺点。大多数用作模型的小鼠都是近交系, 其优点是保证实验的一致性; 然而, 近交系动物并不像远交系动物能真实代表人类的症状。各种实验动物和人类的解剖特征、组织组成和眼部成分的各种功能差异明显。例如, 人类的角膜直径约

为 11 mm,而兔和小鼠的角膜大小分别为 13 mm 和 2.2~3.5 mm^[69-70];人类角膜厚度比兔和小鼠更大;人类眨眼的时间间隔大约是 2.8 s,而兔和小鼠眨眼的时间间隔超过 30 s^[69];兔有瞬态膜,而人类和小鼠没有;兔、小鼠和人类的角膜胶原蛋白^[69]和角膜上皮细胞^[71]的排列方式不同,这可能导致角膜对入侵的病原体产生不同的反应。同样,人类的角膜上皮基膜是由纤维组成的网状结构,类似于鸟窝,而兔的角膜上皮基膜是直而平的。所有这些解剖上的差异,以及眨眼间隔时间,都对细菌粘附和可能的入侵、对细菌酶和其他毒力因子的易感性以及泪膜中宿主防御分子的可利用性有影响。由于它们是啮齿类动物,在进化上与灵长类动物距离较远,在免疫方面也存在差异,因此在感染和发病机制上与人类显著不同^[72-73]。

即便如此,大多数动物模型都能提供有用的信息。动物模型不仅让我们了解了启动感染的过程,而且还有助于研究宿主对感染的免疫反应,这是细胞或组织培养模型中缺失的一个重要角色^[74]。通过开发和使用与生理更相关的模型,并接近病原微生物感染人眼的环境和机制,将促进对疾病的发生发展有更全面的理解。

寻找一种接近人类但成本效益适中的合适动物作为疾病研究的模型是一项长期追求的任务。由于非人灵长类模型成本太高,难以进行大规模的模型建立。所以在非人灵长类动物中寻找一种合适的、且成本较低动物模型是十分重要的。小鼠的角膜较小,且结构与人类角膜存在差异,但是由于近年来转基因小鼠发展迅速,可以用其对某些特定的因子进行研究,这个是其他的动物模型难以替代的优点。并且我们常用的 BALB/c 小鼠对细菌感染的敏感性较好,可以作为细菌性角膜炎良好的实验动物模型^[75]。而在真菌感染导致的角膜炎中,兔模型和实际情况感染中的人表现出了相同的症状,具有较好的参考价值。而且由于兔角膜相对于小鼠较大,易于观察其病变情况,所以在真菌感染角膜炎模型的建立中,兔模型有其独有的优势^[30]。而目前角膜炎动物模型中,树鼯模型得到了更多的关注。树鼯是我国自主研发的实验动物新品种,在基因组和转录组水平上比啮齿动物更接近灵长类动物^[76]。树鼯有一个非常发达的视觉系统,它的视觉功能与人类相似。从解剖学上讲,树鼯角膜的 5 层结构(角膜上皮层,前弹力层,基质层,后弹力层和角膜内皮层)、角膜厚度和形态排列等与人类的

极为相似,相似率接近 98%^[77],相比非人灵长类动物价格昂贵、繁殖周期长、研究周期长等原因,树鼯是研究角膜炎、近视弱视等视觉系统疾病发生发展机制与治疗研究的理想适合的动物。

参考文献:

- [1] Santacruz C, Linares M, Garfias Y, et al. Expression of IL-8, IL-6 and IL-1 β in tears as a main characteristic of the immune response in human microbial keratitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 4850-4864.
- [2] Ansari Z, Miller D, Galor A. Current thoughts in fungal keratitis: diagnosis and treatment [J]. *Curr Fungal Infect Rep*, 2013, 7(3): 209-218.
- [3] Wong RL, Gangwani RA, Yu LW, et al. New treatments for bacterial keratitis [J]. *J Ophthalmol*, 2012, 2012: 831502.
- [4] Zheng X, Yamaguchi M, Goto T, et al. Experimental corneal endotheliitis in rabbit [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(2): 377-385.
- [5] Lobo AM, Agelidis AM, Shukla D. Pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation [J]. *Ocul Surf*, 2019, 17(1): 40-49.
- [6] Pavan-Langston D. Herpes simplex of the ocular anterior segment [J]. *Curr Clin Top Infect Dis*, 2000, 20: 298-324.
- [7] Li L, Li Z, Wang E, et al. Herpes simplex virus 1 infection of tree shrews differs from that of mice in the severity of acute infection and viral transcription in the peripheral nervous system [J]. *J Virol*, 2016, 90(2): 790-804.
- [8] 夏丽坤, 高殿文, 张劲松. 复发性单疱病毒性角膜炎实验模型的研究 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2001, 19(9): 706-709.
- [9] Toriyama K, Inoue T, Suzuki T, et al. Necrotizing keratitis caused by acyclovir-resistant herpes simplex virus [J]. *Case Rep Ophthalmol*, 2014, 5(3): 325-328.
- [10] Niemialtowski MG, Rouse BT. Predominance of Th1 cells in ocular tissues during herpetic stromal keratitis [J]. *J Immunol*, 1992, 149(9): 3035-3039.
- [11] Thomas J, Gangappa S, Kanangat S, et al. On the essential involvement of neutrophils in the immunopathologic disease: herpetic stromal keratitis [J]. *J Immunol*, 1997, 158(3): 1383-1391.
- [12] Mott KR, Underhill D, Wechsler SL, et al. Lymphoid-related CD11c⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are involved in enhancing herpes simplex virus type 1 latency [J]. *J Virol*, 2008, 82(20): 9870-9879.
- [13] Bryant-Hudson KM, Carr DJ. PD-L1-expressing dendritic cells contribute to viral resistance during acute HSV-1 infection [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 924619.
- [14] Novak N, Peng WM. Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142(3): 405-410.
- [15] Jin X, Qin Q, Chen W, et al. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea [J].

- Cornea, 2007, 26(7): 847–852.
- [16] Sarangi PP, Kim B, Kurt-Jones E, et al. Innate recognition network driving herpes simplex virus-induced corneal immunopathology: role of the toll pathway in early inflammatory events in stromal keratitis [J]. J Virol, 2007, 81(20): 11128–11138.
 - [17] Takeda S, Miyazaki D, Sasaki S, et al. Roles played by toll-like receptor-9 in corneal endothelial cells after herpes simplex virus type 1 infection [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(9): 6729–6736.
 - [18] Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, et al. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(1): 86–102.
 - [19] Zhang S, Zang Y, Lu Q, et al. Establishing an animal model of cytomegalovirus keratouveitis in rats: broad infection of anterior segment tissue by cytomegalovirus [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(13): 22.
 - [20] Kandori M, Inoue T, Takamatsu F, et al. Prevalence and features of keratitis with quantitative polymerase chain reaction positive for cytomegalovirus [J]. Ophthalmology, 2010, 117(2): 216–222.
 - [21] Carmichael A. Cytomegalovirus and the eye [J]. Eye (Lond), 2012, 26(2): 237–240.
 - [22] Yuhasz SA, Dissette VB, Cook ML, et al. Murine cytomegalovirus is present in both chronic active and latent states in persistently infected mice [J]. Virology, 1994, 202(1): 272–280.
 - [23] Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, 325: 297–313.
 - [24] Angelova M, Zvezdaryk K, Ferris M, et al. Human cytomegalovirus infection dysregulates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(10): e1002959.
 - [25] Alfawaz A. Cytomegalovirus-related corneal endotheliitis: A review article [J]. Saudi J Ophthalmol, 2013, 27(1): 47–49.
 - [26] Putturu F, Francozo M, Solmaz G, et al. Conventional dendritic cells confer protection against mouse cytomegalovirus infection via TLR9 and MyD88 signaling [J]. Cell Rep, 2016, 17(4): 1113–1127.
 - [27] Szomolanyi-Tsuda E, Liang X, Welsh RM, et al. Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus *in vivo* [J]. J Virol, 2006, 80(9): 4286–4291.
 - [28] Dóczi I, Gyetvai T, Kredics L, et al. Involvement of *Fusarium* spp. in fungal keratitis [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(9): 773–776.
 - [29] Pinnock A, Shivshetty N, Roy S, et al. *Ex vivo* rabbit and human corneas as models for bacterial and fungal keratitis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255(2): 333–342.
 - [30] Aimaniananda V, Bayry J, Bozza S, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores [J]. Nature, 2009, 460(7259): 1117–1121.
 - [31] Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, et al. Characterization of *Fusarium keratitis* outbreak isolates: contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(8): 4450–4457.
 - [32] Raza SK, Mallet AI, Howell SA, et al. An *in-vitro* study of the sterol content and toxin production of *Fusarium* isolates from mycotic keratitis [J]. J Med Microbiol, 1994, 41(3): 204–208.
 - [33] Cusumano V, Costa GB, Seminara S. Effect of aflatoxins on rat peritoneal macrophages [J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(11): 3482–3484.
 - [34] Jin X, Qin Q, Tu L, et al. Toll-like receptors (TLRs) expression and function in response to inactivate hyphae of *Fusarium solani* in immortalized human corneal epithelial cells [J]. Mol Vis, 2007, 13: 1953–1961.
 - [35] 苗雨润, 贾杰, 黎晓慧, 等. 树鼩真菌性角膜炎模型的建立及甘露糖受体和 TNF- α 对炎症的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 752–759.
 - [36] Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity [J]. Cell Microbiol, 2014, 16(2): 185–194.
 - [37] Marakalala MJ, Graham LM, Brown GD. The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections [J]. Clin Dev Immunol, 2010, 2010: 567571.
 - [38] Tanure MA, Cohen EJ, Sudesh S, et al. Spectrum of fungal keratitis at Wills Eye Hospital, Philadelphia, Pennsylvania [J]. Cornea, 2000, 19(3): 307–312.
 - [39] Sun RL, Jones DB, Wilhelmus KR. Clinical characteristics and outcome of *Candida keratitis* [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(6): 1043–1045.
 - [40] Clarke DW, Niederkorn JY. The pathophysiology of *Acanthamoeba keratitis* [J]. Trends Parasitol, 2006, 22(4): 175–180.
 - [41] Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, et al. Engineered control of cell morphology *in vivo* reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection [J]. Eukaryot Cell, 2003, 2(5): 1053–1060.
 - [42] Sheppard DC, Filler SG. Host cell invasion by medically important fungi [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(1): a019687.
 - [43] Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity [J]. Nat Immunol, 2012, 13(9): 817–822.
 - [44] Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, et al. Differential adaptation of *Candida albicans* *in vivo* modulates immune recognition by dectin-1 [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(4): e1003315.
 - [45] del Fresno C, Soulat D, Roth S, et al. Interferon- β production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans* [J]. Immunity, 2013, 38(6): 1176–1186.
 - [46] 邹嫣丽. 不同品系小鼠诱导实验性白色念珠菌性角膜炎的研究 [D]. 泰安: 泰山医学院, 2012.

- [47] Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses [J]. Mol Vis, 2012, 18: 14–21.
- [48] Wei C, Zhu M, Petroll WM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infectious keratitis in a high oxygen transmissible rigid contact lens rabbit model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(9): 5890–5899.
- [49] Szliter EA, Morris CA, Carney F, et al. Development of a new extended-wear contact lens model in the rat [J]. CLAO J, 2002, 28(3): 119–123.
- [50] Metruccio MME, Wan SJ, Horneman H, et al. A novel murine model for contact lens wear reveals clandestine IL-1R dependent corneal parainflammation and susceptibility to microbial keratitis upon inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Ocul Surf, 2019, 17(1): 119–133.
- [51] Okurowska K, Roy S, Thokala P, et al. Establishing a porcine *ex vivo* cornea model for studying drug treatments against bacterial keratitis [J]. J Vis Exp, 2020, 159: e61156.
- [52] Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal [J]. Folia Microbiol (Praha), 2018, 63(4): 413–432.
- [53] Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, et al. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010, 59(3): 292–305.
- [54] Campoccia D, Mirzaei R, Montanaro L, et al. Hijacking of immune defences by biofilms: a multifront strategy [J]. Biofouling, 2019, 35(10): 1055–1074.
- [55] de Vor L, Rooijackers SHM, van Strijp JAG. *Staphylococci evade* the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms [J]. FEBS Lett, 2020, 594(16): 2556–2569.
- [56] Lakhundi S, Siddiqui R, Khan NA. Pathogenesis of microbial keratitis [J]. Microb Pathog, 2017, 104: 97–109.
- [57] Cole N, Bao S, Willcox M, et al. Expression of interleukin-6 in the cornea in response to infection with different strains of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infect Immun, 1999, 67(5): 2497–2502.
- [58] 王岚, 李妍, 孙子雯, 等. 铜绿假单胞菌性角膜炎发病机制的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2020, 20: 1916–1919.
- [59] Putra I, Rabiee B, Anwar KN, et al. *Staphylococcus aureus* α -hemolysin impairs corneal epithelial wound healing and promotes intracellular bacterial invasion [J]. Exp Eye Res, 2019, 181: 263–270.
- [60] Hume EB, Cole N, Khan S, et al. The role of staphopain a in *Staphylococcus aureus* keratitis [J]. Exp Eye Res, 2020, 193: 107994.
- [61] O'Callaghan RJ. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* eye infections [J]. Pathogens, 2018, 7(1): 9.
- [62] Kwon B, Hazlett LD. Association of CD4⁺ T cell-dependent keratitis with genetic susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection [J]. J Immunol, 1997, 159(12): 6283–6290.
- [63] Marquart ME. Animal models of bacterial keratitis [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 680642.
- [64] O'Callaghan RJ, Callegan MC, Moreau JM, et al. Specific roles of α -toxin and β -toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection [J]. Infect Immun, 1997, 65(5): 1571–1578.
- [65] Hazlett LD. Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(1): 1–30.
- [66] Shrestha GS, Vijay AK, Stapleton F, et al. Understanding clinical and immunological features associated with *Pseudomonas* and *Staphylococcus keratitis* [J]. Cont Lens Anterior Eye, 2021, 44(1): 3–13.
- [67] Cole N, Hume EB, Khan S, et al. The role of CXCL chemokine receptor 2 in *Staphylococcus aureus* keratitis [J]. Exp Eye Res, 2014, 127: 184–189.
- [68] Huang X, Barrett RP, McClellan SA, et al. Silencing Toll-like receptor-9 in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(11): 4209–4216.
- [69] Hayes S, Boote C, Lewis J, et al. Comparative study of fibrillar collagen arrangement in the corneas of primates and other mammals [J]. Anat Rec (Hoboken), 2007, 290(12): 1542–1550.
- [70] Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(8): 3648–3654.
- [71] Jester JV, Budge A, Fisher S, et al. Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and *in vitro* light-scattering [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(7): 2369–2378.
- [72] Dasgupta G, BenMohamed L. Of mice and not humans: how reliable are animal models for evaluation of herpes CD8⁺-T cell-epitopes-based immunotherapeutic vaccine candidates? [J]. Vaccine, 2011, 29(35): 5824–5836.
- [73] Stuart PM, Keadle TL. Recurrent herpetic stromal keratitis in mice: a model for studying human HSK [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 728480.
- [74] Astley RA, Coburn PS, Parkunan SM, et al. Modeling intraocular bacterial infections [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 54: 30–48.
- [75] Maksimenko OG, Deykin AV, Khodarovich YM, et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems [J]. Acta Naturae, 2013, 5(1): 33–46.
- [76] Fan Y, Yu D, Yao YG. Tree shrew database (TreeshrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7145.
- [77] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. Mol Vis, 2011, 17: 2283–2291.

[收稿日期] 2021-05-27

刘继红,邵思迈,赵振荣,等. Nrf2-ARE 信号通路在帕金森病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 145–150.

Liu JH, Shao SM, Zhao ZR, et al. The role of the Nrf2-ARE pathway in Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 145–150.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 021

Nrf2-ARE 信号通路在帕金森病中的作用

刘继红¹, 邵思迈¹, 赵振荣¹, 史 洛¹, 郝 莉¹, 张紫娟^{1,2}, 张振强^{1,2*}

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

【摘要】 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2 related factor2, Nrf2)/抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 信号通路是一种受氧化还原信号调节的重要抗氧化通路,其通路的激活在调控氧化应激、维持线粒体功能、抑制多巴胺能神经元铁死亡及恢复神经元功能等方面发挥重要作用,已逐渐成为近几年来帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 研究的热点。本文通过对近些年有关 Nrf2-ARE 通路的结构、功能及其在 PD 治疗中作用机制的实验结论进行分析、总结,为进一步明确其与氧化应激在 PD 发生发展中的关系、开发新的靶向 Nrf2-ARE 通路的 PD 相关治疗药物提供思路。

【关键词】 帕金森病;氧化应激;Nrf2-ARE

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0145-06

The role of the Nrf2-ARE pathway in Parkinson's disease

LIU Jihong¹, SHAO Simai¹, ZHAO Zhenrong¹, SHI Ming¹, HAO Li¹, ZHANG Zijuan^{1,2}, ZHANG Zhenqiang^{1,2*}

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

2. College of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 The nuclear factor erythroid-2-related factor2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway is an essential antioxidant pathway regulated by redox. Activation of this pathway plays an important role in regulating oxidative stress, maintaining mitochondrial function, inhibiting ferroptosis in dopaminergic neurons and protecting them against oxidative damage. Targeting this pathway for the treatment of Parkinson's disease (PD) has become a research focus. In this review, we summarize and analyze the current research on the Nrf2-ARE pathway, including the mechanisms, function and relation with PD. These insights may help further clarify the relationship between Nrf2-ARE pathway and PD and aid in developing new ideas for new PD drugs targeting the Nrf2-ARE pathway.

【Keywords】 Parkinson's disease; oxidative stress; Nrf2-ARE

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是目前除阿尔茨海默病以外的第二大常见中枢神经系统退行性疾病,其主要以上肢静止性震颤伴有运动迟缓、僵硬和步态困难为主要临床症状。随着老龄化人口的增加,65 岁以上老年人的 PD 发病率急剧上升,

已成为全球增长最快的老年神经退行性疾病。预计到 2040 年,PD 患者将超过 1200 万^[1]。PD 引起的高致残率给病人、家庭和社会带来了巨大的经济损失。

PD 的主要病理特征是中脑黑质致密部多巴胺

【基金项目】 河南省科技创新领军人才项目 (204200510022); 河南省科技攻关项目 (202102310078, 212102310828, 172102310286, 222102310280); 河南省高校重点科研项目 (19A310012)。

【作者简介】 刘继红 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: ljh15736783819@163.com

【通信作者】 张振强 (1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治脑病。E-mail: zhang_zhenqiang@126.com

能神经元的丢失及纹状体中多巴胺递质的丢失^[2]。迄今为止,还没有可以阻止 PD 进展的有效药物。虽然抗胆碱能药、多巴胺类药和多巴胺受体激动剂已用于治疗 PD,但其疗效不好,副作用也较明显,因此对于 PD 有效药物的探求迫在眉睫。

PD 的发病机制涉及多种学说,如神经炎症学说,线粒体功能障碍学说和氧化应激学说等,其中氧化应激学说得到广泛认可,抗氧化疗法逐渐成为近些年来攻克帕金森病的重要研究方向。在神经元对抗氧化应激的过程中,抗氧化信号通路发挥了重要作用。Nrf2-ARE (nuclear factor erythroid-2 related factor2, Nrf2/antioxidant response element, ARE) 信号通路是一条重要的抗氧化通路,可通过调控下游抗氧化蛋白的表达进而逆转机体的氧化损伤,降低多巴胺能神经元的丢失,已成为研究帕金森病抗氧化疗法的重要靶点。本文从抗氧化应激的角度探讨了 Nrf2-ARE 通路在帕金森病治疗中的作用。

1 氧化应激与帕金森病

正常人体中脑黑质致密部的多巴胺能神经元通过分泌多巴胺(dopamine, DA)控制运动的灵活和平衡^[3]。当黑质致密部的 DA 水平降至 70%~80% 以下时,会出现包括运动迟缓、静止性震颤、僵硬和姿势不稳等帕金森病的症状^[4]。黑质致密部的氧化应激是导致多巴胺能神经元丢失的重要机制^[5-8]。

氧化应激是细胞内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)的代谢失衡即 ROS 产生过多而清除减少,它通过对不同的生物分子造成不可逆转的损伤和改变不同的信号通路而导致毒性^[9]。Angelova 等^[10]认为氧化应激使得脂质过氧化的产物代谢失衡,触发了神经元的坏死和凋亡。Musgrove 等^[6]利用体内、外实验证实了 ROS 的聚集会引起迷走神经背核的 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)向中脑的转移并在中脑神经元中异常聚集,触发神经元的凋亡,因此 ROS 的代谢失衡是 PD 重要的致病机制。而神经元高氧量的需求和高能量的产生,使它成为了 ROS 产生的重要场所,也使 PD 患者中脑黑质致密部成为氧化应激的主要场所^[10-11]。因此抗氧化疗法成为研究治疗 PD 的重要方向。

虽然抗氧化剂在 PD 的体内外模型中显示出重

要的保护作用,但在临床试验中几乎没有一种抗氧化剂被证明是有效的^[10]。因此科学家们将研究的重点放在了抗氧化过程的重要信号通路上,如 Nrf2-ARE 信号通路,因此探究 Nrf2-ARE 信号通路在生命活动中的抗氧化作用对于阻断帕金森病的进行性脑损伤具有巨大的研究价值。

2 Nrf2-ARE 信号通路与氧化应激

2.1 Nrf2-ARE 信号通路的调节机制

核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是真核生物中一个重要的抗氧化转录因子,属于碱性亮氨酸拉链(cap 'n' collar-basic leucine zipper, CNC-bZip) 转录因子家族^[12]。Nrf2 由 605 个氨基酸组成,可分为七个功能结构域(Neh1-7),其 N 端的 Neh2 结构域是抑制蛋白 E3 泛素连接酶复合物底物(cullin 3/ring-box1)接头蛋白 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)的结合位点,通常情况下,同源二聚体 Keap1 通过两个基序(低亲和力的 DLG 基序和高亲和力的 ETGE 基序)与一个 Nrf2 分子的 Neh2 结构域结合,一旦结合, Nrf2 就被 Cullin3 精确定位于两个基序之间的七个赖氨酸残基上进行泛素化降解,因此在细胞内的浓度较低^[13-14]。Nrf2 的 Neh1 结构域具有其基本的 CNC-bZip 基序,在氧化和亲电应激条件下,由于 Keap1 中的半胱氨酸残基的化学修饰(例如氧化和烷基化)改变了 Keap1 的底物适配器功能,使其不能针对 Nrf2 进行降解,但是 Nrf2 仍然能够与 Keap1 结合,使可用的 Keap1 同源二聚体饱和,并允许新结合的 Nrf2 移位到细胞核中,同小分子肌动蛋白(small Maf proteins, sMaf)进行二聚化,并与细胞核中的抗氧化反应元件 ARE 序列结合,促进了抗氧化物的转录和表达^[15]。

抗氧化反应元件 ARE 是 Nrf2 的结合靶点,存在于细胞保护基因的启动子调控区。在正常情况下, ARE 被 sMaf 蛋白阻断, sMaf 没有转录激活结构域,即使与 ARE 结合,其靶基因的表达仍不能被激活^[16]。而在亲电体和活性氧的刺激下, Nrf2 入核与 sMaf 形成异构二聚体,其形成的二聚体与 ARE 结合才能激活靶基因的转录^[17]。因此在一般情况下, Nrf2 不能入核进行其下游靶蛋白的表达,但在氧化应激条件下 Nrf2 可入核并激活下游靶基因的转录。

2.2 Nrf2-ARE 信号通路调控的下游靶蛋白

Nrf2-ARE 通路激活后可调节一系列细胞保护

蛋白基因的表达,这些蛋白参与了许多细胞过程,包括活性氧的清除、异物代谢、谷胱甘肽和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(又称还原性辅酶 II, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD(P)H)的稳态以及自噬等^[18-19]。我们将这种保护途径称为解毒系统,其所包含的物质包括氧化还原因子(第一阶段),结合酶(第二阶段),药物外排转运体(第三阶段)。其中第一阶段包括 500 多种产物,包括氧化还原平衡因子、应激反应蛋白、解毒酶和代谢酶的编码基因,如醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GSR)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)以及巯基还原酶等等。代谢物在此之后经历第二相代谢,在那里它们与大的极性基团(如葡萄糖醛酸、谷胱甘肽、硫酸盐或甘氨酸)结合,以增加它们的水溶性并促进它们的排泄^[20]。

3 Nrf2-ARE 信号通路的激活与帕金森病

为探究 PD 与 Nrf2 之间的相关性, Petrillo 等^[21]采集了 45 名 PD 患者的外周血并对其进行检测,发现 Nrf2 及其下游靶基因 NQO1、谷氨酸半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)、GSR 在 PD 患者外周血白细胞中表达上调,表明 PD 患者 Nrf2 通路被激活,并且对细胞的氧化应激产生了良性调节作用。Nakano-Kobayashi 等^[22]在 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的 PD 小鼠模型中,检测到抗氧化药物可使 PD 小鼠纹状体中 Nrf2 及其下游转录蛋白 NAD(P)H、NQO1 和 HO-1 均高表达。MPTP 是一种神经毒性药物,对多巴胺能神经元具有定向破坏性,可造成实验小鼠的类 PD 运动功能障碍,已被证实是一种重要的帕金森小鼠模型药物^[23-24]。因此, Nrf2-ARE 信号通路的激活对于 PD 中神经元的抗氧化具有重要意义。

3.1 Nrf2-ARE 信号通路促进 PD 中抗氧化应激

氧化应激是导致 PD 发病的重要机制, Nrf2-ARE 作为一条重要的抗氧化调节通路,在 PD 的抗氧化中发挥了重要作用,虽然其具体机制尚未完全阐明,但研究者们已通过建立多种 PD 体内、外模型,来探究 Nrf2-ARE 信号通路在 PD 中的抗氧化应激作用。

3.1.1 Nrf2 调控 NQO1 的表达

越来越多的证据表明,在 PD 患者中 DA 的氧化及随之而来的醌修饰所产生的多巴胺醌(dopamine quinones, DAQ)具有高度的神经毒性,是造成多巴胺能神经元丢失及 PD 运动障碍的重要机制^[25]。NQO1 是 II 相解毒酶家族的成员,它可防止环化醌类化合物在氧化还原循环过程中产生的破坏作用和氧化应激。Luo 等^[26]证实了 NQO1 在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中通过抑制 ROS 来降低黑质神经元的神经毒性。Kaji 等^[27]用鱼藤酮诱导的 PD 小鼠模型进行实验观察到 Nrf2 的核转位与 NQO1 的表达密切相关。此研究被 Monir 等^[28]证实,即在鱼藤酮诱导的 PD 大鼠模型中,通过观察大鼠纹状体中 Nrf2 与 HO-1 和 NQO1 表达上调的一致性,建立起三者之间的密切相关性。因此,多方面的研究表明了 NQO1 为 Nrf2 通路下游靶蛋白产物之一。

3.1.2 Nrf2 调控 HO-1 的表达

HO-1 是血红素加氧酶家族的一员,在体内介导有毒的血红素分解代谢,使之分解为具有清除自由基能力的胆绿素和胆红素来为细胞提供保护作用^[29]。除此之外,在氧化应激条件下,HO-1 还可通过保护氧化损伤,调节炎症来调节细胞凋亡以促进血管生成^[30]。据报道,HO-1 对多巴胺能神经元的保护也可通过激活胶质细胞源性和脑源性神经营养因子的合成来实现。因此,HO-1 在 PD 氧化损伤的修复发挥着重要作用。

多种证据已经表明 HO-1 的表达受到 Nrf2 的调控。Kim 等^[31]在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中,通过 Nrf2 激活剂上调 Nrf2 的表达,观察到 HO-1 与之正相关性表达,这种高表达减轻了小鼠黑质中多巴胺能神经元的变性以及运动障碍。Kwon 等^[32]用 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的神经毒性和氧化应激在体外细胞模型中模拟 PD 的神经病理症状,并用金丝桃苷作为治疗药物,观察到了依赖于 Nrf2 的 HO-1 的强表达,并且抑制了 6-OHDA 诱导的氧化应激引起的神经元死亡。而柳雪蕾等^[33]在通过艾灸治疗 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠模型中观察到,在纹状体中检测到 Nrf2 的激活及 HO-1 表达的增加。这一点也在其它 PD 的体内模型被证实,张辉等^[34]在鱼藤酮塑造的 PD 小鼠模型中,用银杏叶提取物有效地激活了其脑内 Nrf2-ARE 抗氧化通路,诱导 HO-1 的高表达,改善其脑内的氧化应激,保护黑质中的多巴胺能神经元,进而改善

其运动障碍。因此,多方面的证据表明了 HO-1 即为 Nrf2 通路下游靶蛋白,在 PD 中发挥了积极作用。

3.2 Nrf2-ARE 促进了 PD 中线粒体功能的正常运行

线粒体通常被称作“能量工厂”,这归结于它们在 OXPHOS 过程中合成的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)为细胞的生命环节提供能量^[35]。氧化磷酸化的过程对于神经细胞来说至关重要,因神经元中的神经代谢较为旺盛,需要高水平的 ATP 来进行神经传递和维持跨膜细胞的离子梯度^[36]。但同时,线粒体也是细胞内源性 ROS 的主要来源^[37]。线粒体中电子传递链(electron transport chain, ETC)复合物 I 和 II 处的电子泄露、复合物 I 的损伤及线粒体的分裂都会导致氧的不完全还原,从而形成超氧化物,对神经元造成不可逆的损伤^[38]。Petrillo 等^[21]的临床研究证实了 Nrf2 在 PD 患者外周血白细胞中高表达,且参与细胞线粒体中氧化应激的防御。

Nrf2 不仅可以通过其下游抗氧化蛋白的表达来抑制线粒体内膜上所发生的氧化损伤,还可通过影响线粒体动力相关蛋白来影响线粒体的发生,这主要是通过抑制线粒体的异常分裂来完成的^[39]。Zhang 等^[40]在鱼藤酮诱导的 PD 大鼠模型中,使用岩藻糖胶激活 Nrf2 通路,改善线粒体形态和呼吸能力,提高线粒体复合体 I 的活性,降低了 PD 模型鼠纹状体中神经元的死亡。

Martinez 等^[41]利用鱼藤酮和 MPTP 诱导了 PD 小鼠模型,并通过抑制 ETC 而诱发了 PD 的相关运动障碍。Holmström 等^[42]利用 Nrf2-KO(Nrf2 基因敲除)小鼠胚胎成纤维细胞与野生型小鼠的成纤维细胞对比发现,Nrf2-KO 细胞中的线粒体膜电位显著降低并观察到线粒体去极化,ATP 水平降低及呼吸功能受损,而 Nrf2 基因激活增加了线粒体膜电位和 ATP 水平,提高了线粒体的呼吸速率和氧化磷酸化的效率。

因此,Nrf2 除了通过上调其下游抗氧化蛋白的表达进行抗氧化应激之外,还可提高线粒体膜电位,上调线粒体呼吸作用,氧化磷酸化和 ATP 的合成,并且在维持线粒体动态平衡等方面都发挥了重要作用。

3.3 Nrf2-ARE 信号通路抑制了 PD 中的铁死亡

铁死亡是一种铁依赖性的、与氧化密切相关的、非凋亡形式的细胞死亡。铁是一种在生物圈中

普遍存在的过渡金属,由于其参与电子转移反应的作用,对于正常的细胞功能必不可少。但过量的铁可以产生有毒的 ROS,对细胞造成不可逆的损伤^[43]。Zucca 等^[44]对这一现象做出了更加详细的解释,即当含有神经黑色素的细胞器在衰老过程中积累了大量毒素和铁时,神经退化过程就会被触发。这个过程具体来说主要包括:多巴胺可以被铁氧化形成多巴胺醌,此过程跟与铁依赖发生的芬顿反应(H_2O_2 被亚铁还原生成羟自由基-OH,导致的强氧化应激反应)密切相关,多巴胺醌可以进入细胞的毒性途径,与不同蛋白质的氨基酸残基(主要是半胱氨酸残基)形成加合物,对蛋白质造成损伤。

Nrf2 途径可通过挽救细胞氧化损伤进而抑制 PD 中多巴胺能神经元的铁死亡。Han 等^[45]通过对比发现,老龄鼠中脑黑质和纹状体中铁含量明显高于青年小鼠,而在过表达 Nrf2 的 PD 模型鼠中,铁沉积显著减少,同时该过表达组的 ROS 的生成和氧化应激水平被显著减少。这项研究直接证明了 Nrf2 通过减少氧化应激来降低 PD 中脑神经元的铁死亡。而 Sun 等^[46]做了更加细致的研究,他们在体内斑马鱼和体外多巴胺能细胞系(SH-SY5Y 细胞)模型中通过上调 Nrf2-ARE 信号通路,观察到促进 Nrf2 核移位和上调抗氧化蛋白血红素加氧酶-1(HO-1)的表达对 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的多巴胺能细胞铁死亡具有保护作用。

因此,在 PD 中,神经黑色素的积累导致了细胞内铁的沉积,进而促进了细胞过量的活性氧的生成,触发了细胞死亡,但是 Nrf2-ARE 信号通路可通过促进下游抗氧化蛋白的表达来抑制细胞的这种铁依赖性死亡。

3.4 Nrf2 其它途径的神经保护作用

值得注意的是,虽然广泛的研究集中于 Nrf2-ARE 通路的抗氧化作用,但其抗炎和抗凋亡作用也值得深入研究。

核转录调节因子 κB (nuclear factor kappa B, NF- κB)是细胞中重要的炎症反应调节因子,对具有神经毒性的炎症介质的产生发挥了关键作用^[47-48]。Wardyn 等^[49]认为 Nrf2 的缺失会提高 NF- κB 的活性,导致细胞炎症因子产生增加,而 NF- κB 通路又可反向调节 Nrf2 的转录和活性,对其靶基因表达有双重影响,但其相互作用机制尚待进一步研究。

此外,Lim 等^[50]通过使用 Nrf2 激动剂观察到

MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中线粒体凋亡蛋白的表达下调从而逆转了线粒体凋亡。推测, Nrf2-ARE 通路的激活可通过调节凋亡蛋白进而减轻多巴胺能神经元的死亡。因此 Nrf2-ARE 通路不仅在 PD 中发挥了重要的抗氧化作用, 而且在抗炎和抗凋亡途径中也发挥了不可忽视的作用, 但其具体作用机制尚不清楚。

4 结语

帕金森病的发病机制至今尚未完全探明, 但氧化损伤已被认为是重要的发病机制, 抗氧化疗法已成为治疗帕金森病的重要研究方向。本文从分子角度结合近几年的实验研究探究了 Nrf2-ARE 通路在 PD 中的抗氧化作用; 从 Nrf2-ARE 通路的结构, 分析其通过促进下游抗氧化酶的生成, 进而逆转了线粒体功能, 降低了细胞的铁死亡途径。除了抗氧化作用的调节之外, Nrf2 还可通过抗炎和抗凋亡途径, 实现对 PD 的正向保护调节。Nrf2-ARE 通路在 PD 中的抗氧化作用提示我们在日后对 PD 的研究中, 可通过探究此通路中相关蛋白的表达来研究药物对于 PD 的神经保护作用, 同时, Nrf2-ARE 通路在抗炎与抗凋亡途径的作用机制尚未完全清楚, 具有较大的研究潜力, 相信通过日后对调节此通路的药物的相关研究将会为帕金森病患者带来希望。

参考文献:

- [1] Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, et al. The emerging evidence of the parkinson pandemic [J]. J Parkinsons Dis, 2018, 8(1): S3-S8.
- [2] Puspita L, Chung SY, Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease [J]. Mol Brain, 2017, 10(1): 53-65.
- [3] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 101-121.
- [4] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of parkinson disease: a review [J]. JAMA, 2020, 323(6): 548-560.
- [5] Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease [J]. Front Neuroanat, 2015, 9: 91.
- [6] Musgrove RE, Helwig M, Bae EJ, et al. Oxidative stress in vagal neurons promotes parkinsonian pathology and intercellular α -synuclein transfer [J]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3738-3753.
- [7] Chang K, Chen C. The role of oxidative stress in Parkinson's disease [J]. Antioxidants, 2020, 9(7): 597-608.
- [8] Konovalova J, Gerasymchuk D, Parkkinen I, et al. Interplay between MicroRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 6055.
- [9] Michalska P, León R. When it comes to an end; oxidative stress crosstalk with protein aggregation and neuroinflammation induce neurodegeneration [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(8): 740-774.
- [10] Angelova PR, Esteras N, Abramov AY. Mitochondria and lipid peroxidation in the mechanism of neurodegeneration: Finding ways for prevention [J]. Med Res Rev, 2021, 41(2): 770-784.
- [11] Puspita L, Chung SY, Shim JW. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease [J]. Mol Brain, 2017, 10(1): 53.
- [12] Sykietis GP, Bohmann D. Stress-activated cap ' n ' collar transcription factors in aging and human disease [J]. Sci Signal, 2010, 3(112): 3.
- [13] Chowdhry S, Zhang Y, McMahon M, et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity [J]. Oncogene, 2013, 32(32): 3765-3781.
- [14] Stefansson AL, Bakovic M. Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals [J]. Nutrients, 2014, 6(9): 3777-3801.
- [15] Keum YS, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. Molecules, 2014, 19(7): 10074-10089.
- [16] Blank V. Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? [J]. J Mol Biol, 2008, 376(4): 913-925.
- [17] Misra JR, Lam G, Thummel CS. Constitutive activation of the Nrf2/Keap1 pathway in insecticide-resistant strains of Drosophila [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2013, 43(12): 1116-1124.
- [18] Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, et al. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease [J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1362(1): 77-86.
- [19] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(4): 295-317.
- [20] Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Cerebrovascular and neurological disorders: protective role of NRF2 [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3433-3463.
- [21] Petrillo S, Schirinzi T, Di Lazzaro G, et al. Systemic activation of Nrf2 pathway in Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2020, 35(1): 180-184.
- [22] Nakano-Kobayashi A, Fukumoto A, Morizane A, et al. Therapeutics potentiating microglial p21-Nrf2 axis can rescue neurodegeneration caused by neuroinflammation [J]. Sci Adv, 2020, 6(46): eabc1428.
- [23] 杨东明, 杨利峰, 赵德明, 等. 帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 397-404.
- [24] 蒙健林, 梁健芬, 张兴博, 等. 帕金森病实验动物模型的研究进展及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 399-404.

- [25] Drukarch B, Van Muiswinkel FL. Drug treatment of Parkinson's disease. Time for phase II [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(9): 1023-1031.
- [26] Luo S, Kang SS, Wang ZH, et al. Akt phosphorylates NQO1 and triggers its degradation, abolishing its antioxidative activities in Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(37): 7291-7305.
- [27] Kaji H, Matsui-Yuasa I, Matsumoto K, et al. Sesaminol prevents Parkinson's disease by activating the Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Heliyon*, 2020, 6(11): e05342.
- [28] Monir DM, Mahmoud ME, Ahmed OG, et al. Forced exercise activates the Nrf2 pathway in the striatum and ameliorates motor and behavioral manifestations of Parkinson's disease in rotenone-treated rats [J]. *Behav Brain Funct*, 2020, 16(1): 9-21.
- [29] Schipper HM, Song W, Tavittian A, et al. The sinister face of heme oxygenase-1 in brain aging and disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2019, 172: 40-70.
- [30] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 332(17): 3221-3247.
- [31] Kim S, Indu Viswanath AN, Park JH, et al. Nrf2 activator via interference of Nrf2-Keap1 interaction has antioxidant and anti-inflammatory properties in Parkinson's disease animal model [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 167: 107986.
- [32] Kwon SH, Lee SR, Park YJ, et al. Suppression of 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by hyperoside via activation of Nrf2/HO-1 signaling in dopaminergic neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5832.
- [33] 柳雪蕾, 芦娟, 田叶, 等. 艾灸激活 Nrf2/ARE 通路抗帕金森病模型大鼠氧化应激损伤的机制研究 [J]. *中国针灸*, 2020, 40(8): 857-862.
- [34] 张辉, 马惠清, 王晓娟. 银杏叶提取物通过激活 Nrf2-ARE 信号通路对帕金森病大鼠发挥脑保护作用 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2018, 35(8): 675-679, 695.
- [35] Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1145-1159.
- [36] Kann O, Kovács R. Mitochondria and neuronal activity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(2): C641-C657.
- [37] Díaz-Moreno I, De la Rosa MA. IUBMB focused meeting/FEBS workshop: Crosstalk between nucleus and mitochondria in human disease (CrossMitoNus) [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(3): 489-491.
- [38] Lopez-Fabuel I, Martin-Martin L, Resch-Beusher M, et al. Mitochondrial respiratory chain disorganization in Parkinson's disease-relevant PINK1 and DJ1 mutants [J]. *Neurochem Int*, 2017, 109: 101-105.
- [39] Kang TC. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and mitochondrial dynamics/mitophagy in neurological diseases [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(7): 617.
- [40] Zhang L, Hao J, Zheng Y, et al. Fucoidan protects dopaminergic neurons by enhancing the mitochondrial function in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease [J]. *Aging Dis*, 2018, 9(4): 590-604.
- [41] Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(9): 920-934.
- [42] Holmström KM, Baird L, Zhang Y, et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration [J]. *Biol Open*, 2013, 2(8): 761-770.
- [43] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [44] Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, et al. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 155: 96-119.
- [45] Han K, Jin X, Guo X, et al. Nrf2 knockout altered brain iron deposition and mitigated age-related motor dysfunction in aging mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 592-602.
- [46] Sun Y, He L, Wang T, et al. Activation p62-Keap1-Nrf2 pathway protects 6-hydroxydopamine-induced ferroptosis in dopaminergic cells [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(11): 4628-4641.
- [47] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 years of NF- κ B: A blossoming of relevance to human pathobiology [J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [48] Flood PM, Qian L, Peterson LJ, et al. Transcriptional factor NF- κ B as a target for therapy in Parkinson's disease [J]. *Parkinsons Dis*, 2011, 2011: 216298.
- [49] Wardyn JD, Ponsford AH, Sanderson CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(3): 621-626.
- [50] Lim HS, Moon BC, Lee J, et al. The insect molting hormone 20-hydroxyecdysone protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159: 23-36.

[收稿日期] 2021-06-28