

余雯惠, 杨晨波, 丛喆, 等. PDCD2 促进 TRAIL 刺激下 T 细胞及 HIV 潜伏感染 T 细胞的凋亡 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 1-6.

Yu WH, Yang CB, Cong Z, et al. PDCD2 promotes apoptosis of T cells and HIV latent-infected T cells induced by TRAIL [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 1-6.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 001

PDCD2 促进 TRAIL 刺激下 T 细胞及 HIV 潜伏感染 T 细胞的凋亡

余雯惠, 杨晨波, 丛喆*, 薛婧*

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 研究程序性细胞死亡蛋白 2(programmed cell death protein 2, PDCD2) 过表达对 T 淋巴细胞株 Jurkat 及 HIV 潜伏感染 T 细胞株 ACH2 凋亡的影响。**方法** 用 T 淋巴细胞株 Jurkat 及 HIV 潜伏感染 T 细胞株 ACH2 作为细胞模型, 采用慢病毒转染技术分别在上述细胞株过表达 PDCD2 基因, 在未刺激和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 刺激 24 h 后, 经 PE-Annexin V、7-AAD 检测细胞凋亡的情况。**结果** 在无刺激剂的情况下, Jurkat 和 ACH2 细胞的凋亡率并未因细胞内 PDCD2 表达量的增加而改变; 在 TRAIL 刺激下, 与对照组相比, 高表达 PDCD2 基因的 Jurkat 和 ACH2 细胞凋亡率显著增高, 有统计学差异($P < 0.05$)。**结论** PDCD2 能促进 TRAIL 刺激下 T 细胞及 HIV 潜伏感染 T 细胞的凋亡水平。

【关键词】 程序性细胞死亡 2; T 细胞; HIV 潜伏感染; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0001-06

PDCD2 promotes apoptosis of T cells and HIV latent-infected T cells induced by TRAIL

YU Wenhui, YANG Chenbo, CONG Zhe*, XUE Jing*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models; State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate apoptosis after PDCD2 overexpression in Jurkat and ACH2 cell lines. **Methods** Jurkat and ACH2 cell lines were used in this study. PDCD2 was stably expressed in the cell lines by lentivirus infection. Apoptosis was determined by flow cytometry after 24 hours of TRAIL treatment. **Results** Apoptosis was not significantly increased in Jurkat or ACH2 cells stably expressing PDCD2 compared with untransfected control cells. However, compared with the control group without PDCD2 overexpression, apoptosis was significantly higher in PDCD2-Jurkat and PDCD2-ACH2 cells induced by TRAIL ($P < 0.05$). **Conclusions** PDCD2 promotes apoptosis of T cell and HIV latent-infected T cells induced by TRAIL.

【Keywords】 PDCD2; T cell; HIV latent infection; apoptosis

【基金项目】 国家自然科学基金(81971944); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2021-I2M-1-037)。

【作者简介】 余雯惠(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物病毒学研究。E-mail: 995396063@qq.com

【通信作者】 丛喆(1972—), 女, 副主任技师, 研究方向: 实验动物病毒学和模型研究。E-mail: congz@cnilas.org

薛婧(1983—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 艾滋病动物模型研究。E-mail: xuejing@cnilas.org * 共同通信作者

程序性细胞死亡蛋白 (programmed cell death protein, PDCD) 是一类与程序性细胞死亡相关的蛋白质分子, 普遍存在于各种生物体内, 是维持正常生长所必需的^[1]。其中程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 在艾滋病研究领域研究较广泛。多项研究表明 HIV-1 感染者体内 T 细胞上高表达 PD-1 分子^[2-4], 大量 PD-1 的表达能抑制 HIV-1 感染者 T 细胞的功能, 使其功能衰竭, 增殖能力降低, 从而促进了疾病进展^[5]。目前 PD-1 还被认为可能是 HIV-1 潜伏库的标志物^[6-7], 在 HIV-1 潜伏库的建立和维持中起一定的作用, 因此 PD-1 也被认为是一个潜在的治疗靶点^[8-9]。

除 PD-1 以外, 其他程序性细胞死亡蛋白在 HIV-1 中的研究较少。程序性细胞死亡蛋白 2 (programmed cell death protein 2, PDCD2) 又称为 RP8, 该基因表达一种高度保守的真核蛋白^[10-11], 在人体的多种组织中都有表达。PDCD2 目前被认为在促进细胞凋亡中发挥着重要的调节作用^[12-14], 也有研究发现其在调控细胞增殖^[15]、抑制肿瘤细胞生长^[13]以及维持胚胎干细胞发育^[16-17]等多种细胞功能中有一定的作用。本研究中, 我们对 PDCD2 能否调节 T 细胞及 HIV-1 潜伏感染 T 细胞的凋亡水平进行了初步探索, 以期 HIV-1 潜伏感染细胞的清除提供一个新的方向和实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞

人胚肾细胞系 293T (中国医学科学院医学实验动物研究所本实验室保存); T 淋巴细胞株 Jurkat (ATCC); HIV 潜伏感染 T 细胞株 ACH2 (中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心马丽英研究员馈赠)。

1.2 主要试剂与仪器

Anti-PDCD2 antibody [EPR7159] (Cat. ab126614) 购自 Abcam; PDCD2 Antibody (Cat. LS-C169493) 购自 LSBio; β -Tubulin (D2N5G) Rabbit mAb (Cat. 15115) 购自 Cell Signaling Technology; PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (Cat. 559763) 购自 BD Pharmingen 公司; TRAIL/Apo2L Protein, Human (Cat. HY-P7306) 购自 MCE 公司; pWPXL、pMD2.G、psPAX2 慢病毒转染质粒 (由 Dr. Didier Trono 馈赠); 转染试剂-VigoFect (Cat. T001) 购自 Vigorous 公司; 聚乙烯感染/转染试剂 (Cat. TR-

1003) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 人/猴 PDCD2 全长质粒购自金斯瑞生物科技公司; PrimeScriptTM RT Reagent Kit (Cat. RR037A)、TB Green Premix EX TaqTM (Cat. RR820A) 购自 TaKaRa 公司; TaqManTM RNA-to-CTTM 1-步法试剂盒 (Cat. 4392938) 购自 Applied Biosystems 公司; QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat. 52906) 购自 QIAGEN 公司。荧光定量 PCR 仪 7500 型购自 ABI 公司; 荧光倒置显微镜 Nikon ECLIPSE Ti 购自 Nikon 公司; 化学发光成像仪 ChemiDoc XRS⁺ 购自 Bio-rad 公司; 流式细胞仪 BD Accuri C6 购自 BD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 慢病毒包装及感染 Jurkat、ACH2 细胞

将慢病毒包装质粒 pWPXL、pMD2.G、psPAX2 以 2:1:2 的比例与 VigoFect 溶液配置成转染工作液。将该工作液逐滴加入 293T 培养皿中, 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 6~8 h 后更换新鲜培养基, 再继续培养 36 h。收集的上清与新鲜的完全培养基 1:1 混合后, 用于感染 Jurkat 及 ACH2 细胞, 12 h 后更换新鲜培养基, 此步骤重复两次后收集细胞用于后续实验。PDCD2(H) 及 PDCD2(RM) 表示过表达人/猴 PDCD2 的稳定细胞株。

1.3.2 RT-PCR 检测细胞内 PDCD2 mRNA 的表达水平

收取 2×10^6 个细胞并提取其 RNA。根据 NCBI 上人和猴 PDCD2 基因和 GAPDH 序列, 利用软件 DNAMAN 进行 PDCD2 和 GAPDH 引物的设计。引物序列为: PDCD2-F: 5'-ACCCTAGACTGGAGATTGGGACATA-3'; PDCD2-R: 5'-CAACCTCAGGCATAATCTCATCTTC-3'; GAPDH-F: 5'-CTGTTTCGAGAGTCAGCCGCA-3'; GAPDH-R: 5'-AGGCGCCCAATACGACCAAA-3'。数据结果通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.3.3 Western blot 检测细胞内 PDCD2 蛋白表达情况

收集 5×10^6 个细胞, 裂解后取上清液进行电泳、电转及封闭, 4℃ 过夜孵育一抗 (Anti-PDCD2), 室温 1 h 孵育二抗 (β -Tubulin), 使用 ECL 法曝光, 蛋白条带的相对密度通过 ImageJ 软件进行分析^[18]。同样分析内参。

1.3.4 重组蛋白 TRAIL 刺激 Jurkat、ACH2 细胞

取生长旺盛的 Jurkat 和 ACH2 细胞 5×10^5 个, 加入终浓度为 0、25、50、100、150、300 ng/mL 的 TRAIL, 混匀后置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 24 h

后取细胞进行凋亡检测,最终选择 25 ng/mL 的 TRAIL 蛋白浓度用于后续刺激实验。

1.3.5 细胞凋亡的检测

收集 5×10^5 个细胞,预冷的 PBS 及 $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 洗 3 遍后,加入 5 μ L PE-Annexin V 和 5 μ L 7-AAD,室温下避光孵育 15 min,过滤后流式检测细胞凋亡情况^[19]。Annexin V 阳性率的总和表示细胞的凋亡率。

1.3.6 细胞上清病毒载量的检测

取细胞上清提取病毒 RNA,使用实时荧光定量 PCR 检测细胞上清病毒载量^[20-21]。探针序列:FAM-5'-AAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAA-3'-TAMRA;引物序列:HIV gag-F:5'-GGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAG-3';HIV gag-R:5'-AGCTCCCTGCTTGCCCAT-3'。

1.4 统计学方法

通过 FlowJo V10 对细胞凋亡流式的数据进行分析,各项数据的统计与作图选用 GraphPad Prism8 软件,平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示实验结果, $P < 0.05$ 为界限值,表示组间数据有显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度 TRAIL 对 Jurkat 及 ACH2 细胞凋亡的影响

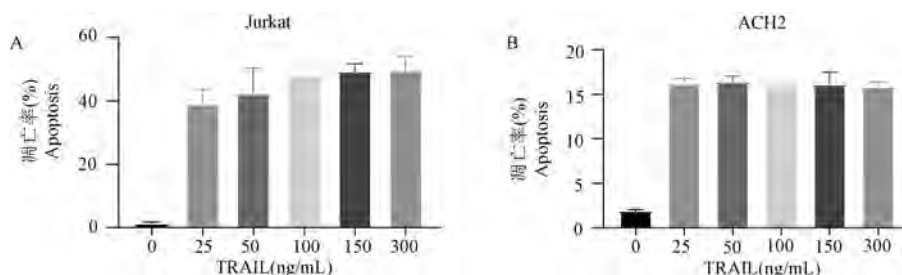
Jurkat 细胞在没有 TRAIL 刺激条件下,凋亡率为 $(1.29 \pm 0.53)\%$,随着 TRAIL 浓度的增加,凋亡率也逐渐增高。从 25 ng/mL 的 $(38.86 \pm 4.83)\%$ 逐渐增加至 300 ng/mL 时的 $(49.44 \pm 4.79)\%$ (图 1A)。ACH2 细胞在上述不同浓度的 TRAIL 刺激下,凋亡率变化与 Jurkat 细胞一致,分别为 $(1.83 \pm 0.25)\%$ 、

$(16.14 \pm 0.69)\%$ 、 $(16.36 \pm 0.78)\%$ 、 $(16.10 \pm 0.63)\%$ 、 $(16.09 \pm 1.57)\%$ 、 $(15.79 \pm 0.67)\%$ (图 1B)。最终确定使用 25 ng/mL 的 TRAIL 用于后续实验。

2.2 过表达 PDCD2 的 Jurkat 细胞在 TRAIL 刺激下凋亡增加

本研究将人 PDCD2 和猴 PDCD2 成功克隆到 pWPXL 载体中,由于 pWPXL 载体本身带有 EGFP 标签,pWPXL 空载体与病毒包装质粒产生的病毒成功感染 Jurkat 细胞(Jurkat-mock)后,可见细胞内绿色荧光蛋白表达,其 GFP 的阳性率达 98.6% (图 2A)。在 RNA 水平上,与 Jurkat 组细胞相比,Jurkat-PDCD2(H) 组及 Jurkat-PDCD2(RM) 组细胞内 PDCD2 mRNA 表达量分别增加了 4.67 倍和 3.53 倍(图 2B)。在蛋白水平上,PDCD2 相对表达量在 Jurkat-PDCD2(H) 为 1.26 ± 0.07 ,在 Jurkat-PDCD2(RM) 中为 1.12 ± 0.39 。Jurkat-PDCD2(H) ($P < 0.001$) 与 Jurkat-PDCD2(RM) 相对表达量显著高于 Jurkat 及 Jurkat-mock,有统计学差异($P < 0.05$,图 2C)。

在不含刺激剂的情况下,对照组凋亡率为 $(1.56 \pm 0.24)\%$,Jurkat-PDCD2(H) 及 Jurkat-PDCD2(RM) 细胞凋亡率分别为 $(1.51 \pm 0.22)\%$ 、 $(1.61 \pm 0.10)\%$,3 组细胞间凋亡率无显著性差异($P > 0.05$)。在 TRAIL 的刺激下,对照组、Jurkat-PDCD2(H) 及 Jurkat-PDCD2(RM) 细胞凋亡率分别为 $(21.59 \pm 1.45)\%$ 、 $(26.59 \pm 0.57)\%$ 、 $(28.08 \pm 1.51)\%$ 。与对照组相比,Jurkat-PDCD2(H) 组 ($P < 0.05$) 及 Jurkat-PDCD2(RM) 组 ($P < 0.01$) 凋亡率明显增加,有显著性差异(图 2D)。



注:A:不同浓度的 TRAIL 刺激 24 h 后,Jurkat 细胞凋亡水平的变化;B:不同浓度的 TRAIL 刺激 24 h 后,ACH2 细胞凋亡水平的变化。

图 1 不同浓度的 TRAIL 诱导 Jurkat 及 ACH2 细胞凋亡情况

Note. A, Apoptosis rate of Jurkat cells after 24 hours of TRAIL treatment with different concentrations. B, Apoptosis rate of ACH2 cells after 24 hours of TRAIL treatment with different concentrations.

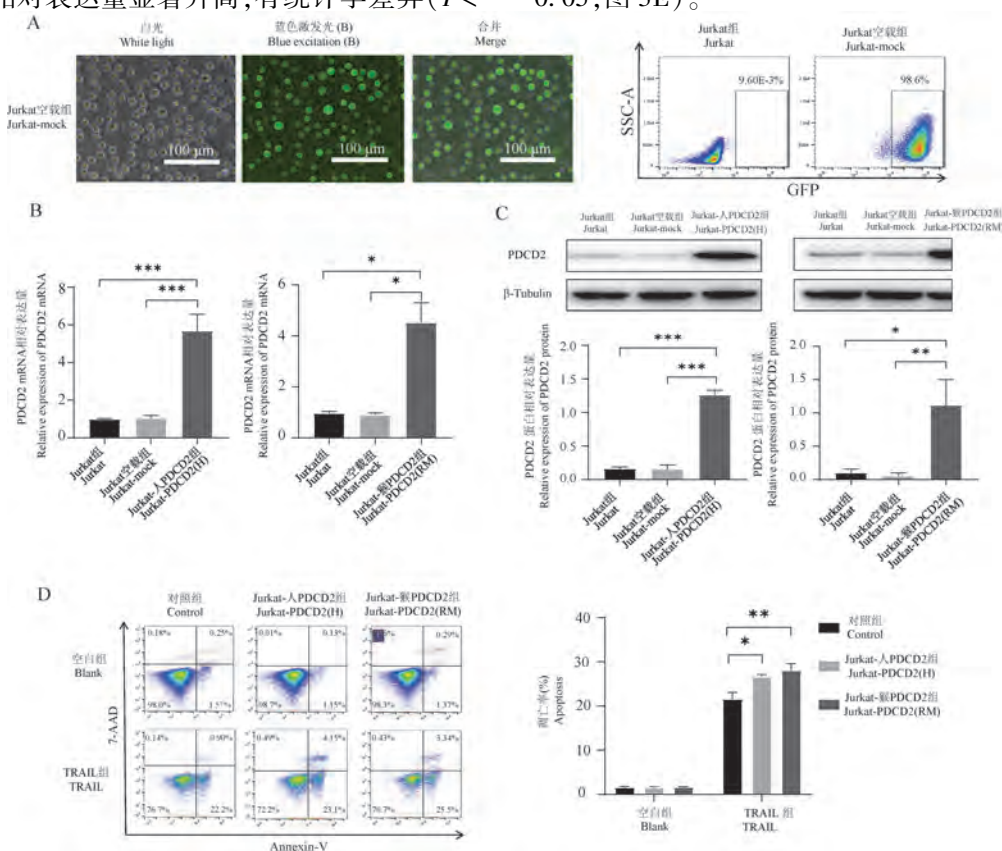
Figure 1 Apoptosis of Jurkat and ACH2 cells induced by TRAIL at different concentrations

2.3 过表达 PDCD2 的 ACH2 细胞在 TRAIL 刺激下凋亡增加

本研究再次将克隆有人 PDCD2 和猴 PDCD2 的 pWPXL 空载体与包装质粒产生的病毒成功感染 ACH2 细胞 (ACH2-mock), 该细胞内表达有绿色荧光蛋白, 其 GFP 的阳性率为 73.5% (图 3A)。在 RNA 水平上, ACH2-PDCD2 (H) 组细胞及 ACH2-PDCD2(RM) 组细胞内 PDCD2 mRNA 表达量分别比 ACH2 组细胞多 5.49 倍和 4.02 倍 (图 3B)。在蛋白水平上, ACH2-PDCD2 (H) 及 ACH2-PDCD2 (RM) 细胞 PDCD2 相对表达量为 0.68 ± 0.19 、 0.63 ± 0.16 。与 ACH2 及 ACH2-mock 细胞相比, ACH2-PDCD2(H) 细胞 ($P < 0.01$) 和 ACH2-PDCD2(RM) 细胞 PDCD2 相对表达量显著升高, 有统计学差异 ($P <$

0.01, 图 3C)。

在不含 TRAIL 的情况下, 对照组、ACH2-PDCD2 (H) 及 ACH2-PDCD2 (RM) 细胞凋亡率分别为 $(1.22 \pm 0.27)\%$ 、 $(1.41 \pm 0.16)\%$ 、 $(1.47 \pm 0.25)\%$, 3 组细胞间的凋亡率无显著性差异 ($P > 0.05$); 在 TRAIL 的刺激下, 对照组凋亡率为 $(11.5 \pm 0.93)\%$, ACH2-PDCD2(H) 及 ACH2-PDCD2(RM) 细胞凋亡率为 $(15.87 \pm 1.39)\%$ 、 $(17.81 \pm 1.40)\%$ 。与对照组相比, ACH2-PDCD2(H) 组 ($P < 0.01$)、ACH2-PDCD2 (RM) 组凋亡率显著高于对照组, 有统计学差异 ($P < 0.01$, 图 3D)。TRAIL 刺激下, ACH2-PDCD2(H) 组 ($P < 0.01$) 与 ACH2-PDCD2 (RM) 组细胞上清 HIV 病毒载量明显高于 ACH2 组, 有统计学差异 ($P < 0.05$, 图 3E)。

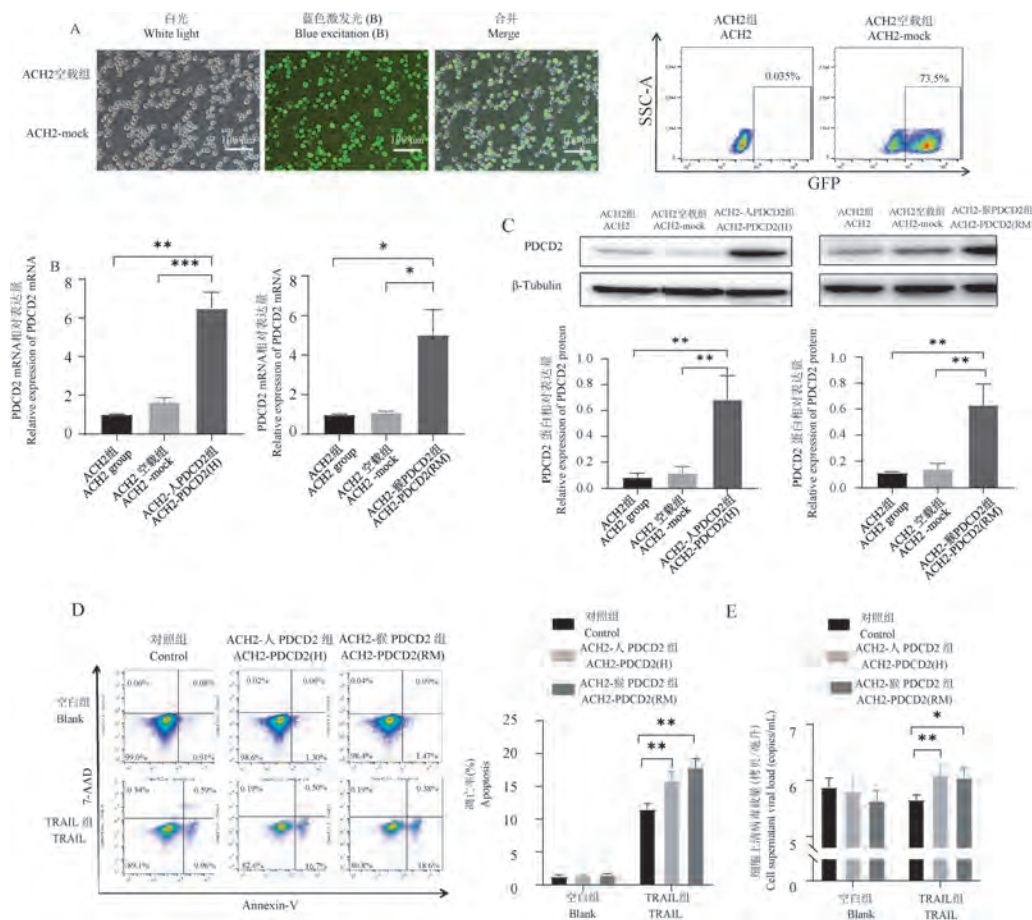


注: A: Jurkat-mock 细胞 GFP 表达情况; B: 荧光定量 PCR 检测 Jurkat、Jurkat-mock、Jurkat-PDCD2 (H)、Jurkat-PDCD2 (RM) 细胞株内人/猴 PDCD2 mRNA 的表达水平; C: Western blot 检测 Jurkat、Jurkat-mock、Jurkat-PDCD2 (H)、Jurkat-PDCD2 (RM) 细胞株内人/猴 PDCD2 蛋白表达水平; D: 对照组、Jurkat-PDCD2 (H) 及 Jurkat-PDCD2 (RM) 在有 TRAIL 刺激下的凋亡水平。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 Jurkat、Jurkat-mock、Jurkat-PDCD2 (H)、Jurkat-PDCD2 (RM) 细胞株内 PDCD2 的表达情况及细胞凋亡水平

Note. A, Levels of GFP in Jurkat-mock cells. B, Levels of human /macaque PDCD2 mRNA in Jurkat, Jurkat-mock, Jurkat-PDCD2 (H) and Jurkat-PDCD2 (RM) cells were detected by qPCR. C, Expression levels of human /macaque PDCD2 protein in Jurkat, Jurkat-mock, Jurkat-PDCD2 (H) and Jurkat-PDCD2 (RM) cells were detected by Western blot. D, Apoptosis rate of Jurkat-PDCD2 (H), Jurkat-PDCD2 (RM) and the control cells with or without TRAIL treatment. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 2 Expression levels of PDCD2 and apoptosis rate in Jurkat, Jurkat-mock, Jurkat-PDCD2 (H) and Jurkat-PDCD2 (RM) cells



注:A:ACH2-mock 细胞 GFP 表达情况;B:荧光定量 PCR 检测 ACH2、ACH2-mock、ACH2-PDCD2(H)、ACH2-PDCD2(RM) 细胞内人/猴 PDCD2 mRNA 的表达水平;C:Western blot 检测 ACH2、ACH2-mock、ACH2-PDCD2(H)、ACH2-PDCD2(RM) 细胞内人/猴 PDCD2 蛋白表达水平;D:ACH2-PDCD2(H)、ACH2-PDCD2(RM) 及对照组在未刺激及 TRAIL 刺激下的凋亡水平;E:荧光定量 PCR 检测未刺激及 TRAIL 刺激下 ACH2、ACH2-PDCD2(H)、ACH2-PDCD2(RM) 细胞上清 HIV 病毒载量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 ACH2、ACH2-mock、ACH2-PDCD2(H)、ACH2-PDCD2(RM) 细胞内 PDCD2 的表达情况及细胞凋亡水平

Note. A, GFP expression in ACH2-mock cells. B, Expression levels of human/macaque PDCD2 mRNA in ACH2, ACH2-mock, ACH2-PDCD2(H) and ACH2-PDCD2(RM) cells were detected by qPCR. C, Expression levels of human/macaque PDCD2 protein in ACH2, ACH2-mock, ACH2-PDCD2(H) and ACH2-PDCD2(RM) cells were detected by Western blot. D, Apoptosis rate of ACH2-PDCD2(H), ACH2-PDCD2(RM) and the control cells with or without TRAIL treatment. E, RT-PCR was used to detect viral load in the supernatant of ACH2, ACH2-PDCD2(H) and ACH2-PDCD2(RM) cells stimulated by TRAIL. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Expression levels of PDCD2 and apoptosis rate in ACH2, ACH2-mock, ACH2-PDCD2(H) and ACH2-PDCD2(RM) cells

3 讨论

据目前文献报道,PDCD2 在调节细胞凋亡中起重要作用,有研究者认为 PDCD2 可以通过激活 caspase 通路来促进人髓系白血病细胞的凋亡^[12],也有研究者发现 PDCD2 可通过 p53 途径诱导胃癌细胞的凋亡^[22]。本研究中我们发现,在不含刺激剂的情况下,PDCD2 的表达水平不能影响 T 细胞的凋亡,但在 TRAIL 介导下,PDCD2 的高表达可以有效调节 T 细胞的凋亡,说明 PDCD2 需要在一定的刺激条件下才能充分发挥其促进 T 细胞凋亡的功能。

T 细胞是人体重要的免疫细胞,CD4⁺T 细胞则是艾滋病病毒难以根除的重要潜伏库细胞之一。为了探讨 PDCD2 在 HIV-1 潜伏感染 T 细胞中的作用,我们利用 ACH2 细胞株,构建了稳定转染 PDCD2 的 HIV-1 潜伏感染 T 细胞株,证实了 PDCD2 可以促进 TRAIL 刺激下 HIV-1 潜伏感染细胞的凋亡以及 HIV 病毒的释放,提示 PDCD2 在诱导 HIV-1 潜伏感染细胞的凋亡及 HIV 病毒活化的过程中扮演重要角色。对 PDCD2 促进 TRAIL 诱导细胞凋亡的作用通路及其调控分子进行深入研究,有助于了解 HIV-1 潜伏感染细胞凋亡的作用机制,为寻找清除病毒潜伏库

的方法和策略提供理论依据。

人和恒河猴的 PDCD2 在 CDS 序列上有 21 个碱基的差异,共引起 12 个氨基酸的改变。本研究还比较了人和猴这两种生物 PDCD2 在 T 细胞株中的表达和诱导凋亡情况。本研究中分别构建了人 PDCD2-Jurkat/ACH2 和猴 PDCD2-Jurkat/ACH2 稳定细胞株,qPCR 和 Western blot 结果显示人和猴 PDCD2 的表达量基本相同,在人和猴 PDCD2 表达量基本一致的情况下,它们的表达增高均可以促进 TRAIL 刺激下 T 细胞的凋亡,且两者介导的凋亡无显著差异。这些结果说明,尽管人和猴的 PDCD2 在氨基酸序列上存在一定差异,但这些差异不影响 PDCD2 的表达和其介导的 T 细胞凋亡。综上,人和猴 PDCD2 对 T 细胞及 HIV-1 潜伏感染 T 细胞的凋亡均具有促进作用。

参考文献:

- [1] Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 333-340.
- [2] Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction [J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1198-1202.
- [3] Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(10): 2281-2292.
- [4] Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, et al. Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade [J]. *Blood*, 2011, 118(4): 965-974.
- [5] Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(12): 2205-2213.
- [6] Llewellyn GN, Seclén E, Wietgreffe S, et al. Humanized mouse model of HIV-1 latency with enrichment of latent virus in PD-1⁺ and TIGIT⁺ CD4 T cells [J]. *J Virol*, 2019, 93(10): e02086-e02104.
- [7] Evans VA, van der Sluis RM, Solomon A, et al. Programmed cell death-1 contributes to the establishment and maintenance of HIV-1 latency [J]. *AIDS*, 2018, 32(11): 1491-1497.
- [8] Fromentin R, Bakeman W, Lawani MB, et al. CD4⁺ T cells expressing PD-1, TIGIT and LAG-3 contribute to HIV persistence during ART [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(7): e1005761.
- [9] D'Souza M, Fontenot AP, Mack DG, et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4⁺ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3): 1979-1987.
- [10] Kawakami T, Furukawa Y, Sudo K, et al. Isolation and mapping of a human gene (PDCD2) that is highly homologous to Rp8, a rat gene associated with programmed cell death [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 71(1): 41-43.
- [11] Baron BW, Anastasi J, Thirman MJ, et al. The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(5): 2860-2865.
- [12] Baron BW, Hyjek E, Gladstone B, et al. PDCD2, a protein whose expression is repressed by BCL6, induces apoptosis in human cells by activation of the caspase cascade [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45(2): 169-175.
- [13] Wang W, Song XW, Bu XM, et al. PDCD2 and NCoR1 as putative tumor suppressors in gastric gastrointestinal stromal tumors [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(2): 129-137.
- [14] Vaux DL, Häcker G. Cloning of mouse RP-8 cDNA and its expression during apoptosis of lymphoid and myeloid cells [J]. *DNA Cell Biol*, 1995, 14(3): 189-193.
- [15] Kokorina NA, Granier CJ, Zakharkin SO, et al. PDCD2 knockdown inhibits erythroid but not megakaryocytic lineage differentiation of human hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Exp Hematol*, 2012, 40(12): 1028-1042.
- [16] Kramer J, Granier CJ, Davis S, et al. PDCD2 controls hematopoietic stem cell differentiation during development [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(1): 58-72.
- [17] Mu W, Munroe RJ, Barker AK, et al. PDCD2 is essential for inner cell mass development and embryonic stem cell maintenance [J]. *Dev Biol*, 2010, 347(2): 279-288.
- [18] 傅春燕, 蒋虹, 薛婧, 等. 90K/Mac-2BP 基因沉默增强 HIV-1 感染的单核巨噬细胞凋亡 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(5): 10-14.
- [19] 王永芳, 彭卓颖, 李想, 等. Galectin 家族成员对 HIV-1 感染巨噬细胞凋亡的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(6): 65-71.
- [20] Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, et al. HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells [J]. *Nature*, 2002, 417(6884): 95-98.
- [21] 张京京, 童玲, 陆佳涵, 等. CD32 在艾滋病潜伏感染恒河猴模型的表达特征 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(5): 15-21.
- [22] Zhang J, Wei W, Jin HC, et al. Programmed cell death 2 protein induces gastric cancer cell growth arrest at the early S phase of the cell cycle and apoptosis in a p53-dependent manner [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(1): 103-110.

(收稿日期)2022-01-14

李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 等. 血清剥夺反应因子 (*Sdpr*) 敲除及转基因小鼠的建立与表型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 7-15.

Li XY, Shi GY, Lei XP, et al. Establishment and phenotypic analysis of *Sdpr*-knockout mice and transgenic mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 7-15.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 002

血清剥夺反应因子 (*Sdpr*) 敲除及转基因小鼠的建立与表型分析

李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 黄艺滢, 李珂雅, 侯丽雅, 王凯瑜, 汤家鸣, 白琳*

(国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 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)

【摘要】目的 建立 *Sdpr* 基因敲除小鼠及 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 为 *Sdpr* 基因功能的研究提供小鼠模型。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Sdpr* 基因敲除小鼠, 利用过表达质粒构建 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 利用 PCR 鉴定小鼠基因型, 利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 mRNA 和蛋白表达情况, 获取小鼠组织进行组织病理学分析, 利用流式细胞术对小鼠免疫细胞比较分析。**结果** 获得 *Sdpr* 基因敲除及转基因小鼠模型。与野生型小鼠相比, 基因敲除小鼠 *Sdpr* 基因表达降低; 组织多处出现炎性灶, 肺、脂肪有炎性细胞浸润; 肝出现脂肪变性, 中央静脉周围可见髓外造血; 脾组织红髓出现髓外造血; 骨髓中 T 细胞比例降低, 胸腺中 CD4⁺CD8⁻ 细胞增多, CD4⁺CD8⁺ 细胞减少。转基因小鼠 *Sdpr* 基因表达增加; 肝组织轻微脂肪变性; 肺泡间隔增宽; 脾组织淋巴细胞增生, 红髓细胞增多; 外周血中 B 细胞比例增加, M 细胞、T 细胞比例降低, 胸腺 CD4⁺ 细胞增多, CD4⁺CD8⁺ 细胞减少。**结论** 建立和鉴定了 *Sdpr* 敲除和转基因小鼠, 可以为研究 SDPR 蛋白及其相关胞膜蛋白在不同组织器官中的作用机理提供模型。

【关键词】 血清剥夺反应蛋白因子; *Sdpr*; 基因敲除; 转基因; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0007-09

Establishment and phenotypic analysis of *Sdpr*-knockout mice and transgenic mice

LI Xinyue, SHI Guiying, LEI Xuepei, HUANG Yiyong, LI Keya, HOU Liya, WANG Kaiyu, TANG Jiaming, BAI Lin*
(NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, CAMS&PUMC; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】Objective To establish *Sdpr*-gene-knockout and *Sdpr* transgenic mouse models to provide suitable models for studying *Sdpr* gene function. **Methods** *Sdpr*-knockout mice were constructed by CRISPR/Cas9 technology, while *Sdpr* transgenic mice were constructed using plasmid overexpression. We identified mouse genotypes by PCR. The mRNA and protein expression levels were determined by qRT-PCR and Western blot. Mouse tissues were obtained for histopathological analysis. We analyzed the immune cells of the knockout mice and transgenic mice by flow cytometry. **Results** *Sdpr*-gene-knockout and transgenic mouse models were obtained. Compared with that in the wild-type mice, the *Sdpr* gene expression level was decreased in the knockout mice. Meanwhile, inflammatory foci appeared in many tissues,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (31672374); 北京自然科学基金面上项目 (5202024); 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332020051)。

[作者简介] 李欣悦 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: lxy415@126.com

[通信作者] 白琳 (1984—), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 干细胞转化。E-mail: bailin49@163.com

such as inflammatory cells infiltrated into the lungs and fat. Hepatic steatosis can be observed, and extramedullary hematopoiesis can be seen around the central hepatic vein. Extramedullary hematopoiesis can be observed in the red pulp of the spleen. The proportion of T cells in bone marrow of the knockout mice decreased, the number of $CD4^+CD8^-$ T cells in the thymus increased, while $CD4^+CD8^+$ T cells decreased. In terms of the findings in the transgenic mice, the expression level of the *Sdpr* gene increased. In addition, their liver cells showed slight fatty degeneration and widening of alveolar septa. Moreover, spleen lymphocytes exhibited hyperplasia and red pulp cells increased. The proportion of B cells in the peripheral blood of the transgenic mice increased while the proportions of myeloid and T cells decreased. Finally, thymus $CD4^+$ T cells increased while $CD4^+CD8^+$ T cells decreased. **Conclusions** *Sdpr*-knockout and transgenic mice were successfully established and identified, which can provide models for studying the mechanisms of action of SDPR protein and its related caveolin protein in different tissues and organs.

【**Keywords**】 serum deprivation-response protein; *Sdpr*; gene knockout; transgenic; mice

胞膜窖 (caveolae) 是细胞表面内陷的结构, 陷窝由脂质筏形成并通过小窝蛋白 (caveolin) 聚合, 在细胞内吞、细胞膜组装、细胞内运输、胆固醇稳态调节、信号传导及肿瘤生成等生物学活动中具有重要作用^[1-2]。

Cavin 家族是调节胞膜窖形成和功能的家族^[3-4], 包括了 Cavin-1、Cavin-2、Cavin-3、Cavin-4 4 个成员^[5]。其中 Cavin-2 也称血清剥夺反应因子 (serum deprivation-response protein, SDPR), 为胞膜窖调节蛋白家族成员, 位于人 2 号染色体的 q32-q33 位, 由 418 个氨基酸组成, 在不同物种中具有高度的同源性。SDPR 是最初人血小板中纯化为磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合蛋白^[6], 并在体外被证明是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 异构体的底物^[7], 被发现在血清饥饿的细胞中高表达^[8]。近年来对其功能的研究发现, SDPR 直接参与胞膜窖生物发生和形态, 是形成胞膜窖时膜内陷所必需的, 且其功能可能一部分独立于胞膜窖^[9], 另一方面可以调节胞膜窖的形态, 诱导微管形成的动力学过程^[10]。近几年来对 SDPR 的研究主要集中在肿瘤学的研究, 已发现在多种肿瘤如前列腺癌、乳腺癌和肾癌中 *Sdpr* 基因表达下调, 提示 *Sdpr* 可能为作为抑癌基因影响肿瘤的发生发展^[11-13]。*Sdpr* 可通过阻断转化生长因子- β 信号通路抑制乳腺癌的进展^[14], 也通过促进细胞凋亡作为乳腺癌转移的抑制因子, 降低肿瘤迁移和内侵/外渗能力^[15]。

现有对 *Sdpr* 基因的研究中大多利用细胞系或肿瘤患者组织样本, 为深入研究 *Sdpr* 基因的相关功能及其相关胞膜窖蛋白在不同组织器官中的作用机理, 本研究中我们利用 CRISPR/Cas9 技术和过表达载体建立了 *Sdpr* 基因敲除小鼠和 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 为该基因生物学功能的研究及在多种疾病

致病机制及不同疾病进程发展的体内研究中提供有效动物模型。同时, 通过对该模型的初步检测分析中发现 *Sdpr* 基因对小鼠免疫系统具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所需动物为 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雌性, 15 只, 3~4 周龄, 体重 7~12 g; 雄性, 30 只, 6~8 周龄, 体重 18~25 g) 及 ICR 小鼠 (雌性, 4 只, 8~10 周, 体重 27~30 g; 雄性, 2 只, 10 周龄, 体重 35~38 g), 购入于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0008], 长期饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 [SYXK (京) 2019-0014] SPF 级动物屏障环境动物设施。饲养环境: 温度 20℃~26℃, 湿度 40%~70%, 光照周期明暗比 12 h/12 h。饲养期间动物可自由进食饮水, 饲料、水瓶、垫料、鼠盒均经过高温高压灭菌处理。实验中涉及动物的操作程序已通过本所实验动物使用与管理委员会审批 (BL17001), 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

MEGAshortscript™ T7 转录试剂盒 (Invitrogen, Am1354); 鼠尾直接 PCR 试剂盒 (Bimake, B45012); DL2000 DNA Marker (TaKaRa); PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) TB Green® Premix Ex Taq™ (TaKaRa); RIPA 裂解液 (Beyotime, P0013B); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beyotime, P0009); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%) (雅酶, PG112); 一抗: SDPR Polyclonal Antibody (proteintech, 12339-1-AP), β -actin (Bioss, bs-0061R); 二抗: 山羊抗兔 (中杉金桥, ZB-5301); 红细胞裂解液 (BD, 555899); 流式抗体 CD3、CD4、CD8、B220、CD11b、NK1.1 (Invitrogen)。

PCR 仪 (Hema); StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪 (applied biosystems, 美国); 多样品研磨珠均质仪 (OMNI, Bead Ruptor 24 Elite); 垂直电泳仪 (Bio-Rad, 美国); 组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (Leica, 德国); 流式细胞仪 (BD FACS Aria, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 *Sdpr* 基因敲除小鼠制备

利用 CRISPR/Cas9 技术进行 *Sdpr* 基因敲除小鼠的建立。小鼠 *Sdpr* 基因 (Gene ID: 20324) 位于第一号染色体的 1 C1.1 区段 (ENSMUSG00000045954)。针对 *Sdpr* 基因选择两个 sgRNA 靶点 (靶点 1: GGCCATCCGAGACAACCTCGCAGG 及靶点 2: GGTA CTTGGAGAGCTTGGTGAGG), 合成两对寡聚核苷酸链 (Mice-*Sdpr*-1-gRNA up: TAGGCCATCCGAGACAACCTCGC 和 Mice-*Sdpr*-1-gRNA down: AAACGCGAGTTGTC TCGGATGG; Mice-*Sdpr*-2-gRNA up: TAGGTACTTGAGAGCTTGGTG 和 Mice-*Sdpr*-2-gRNA down: AAACCACC AAGCTCTCCAAGTA)。将合成的 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段, 插入经 Bsa I 酶切线性化的 pUC57-sgRNA 表达载体, 并将构建完成的 sgRNA 载体通过 MEGAshortscript™ T7 转录试剂盒体外转录成为可注射的 sgRNA。

将 3~4 周龄 C57BL/6 雌鼠注射 PMSG 和 HCG 激素进行超数排卵, 与成年 C57BL/6 小鼠交配后获得受精卵用于注射。Cas9 载体通过体外转录成为可注射的 Cas9-RNA (30 ng/μL), 与转录后的 sgRNA (10 ng/μL) 混合后注射到小鼠受精卵中。采用 8~10 周龄 ICR 雌鼠与结扎的雄鼠交配后选取见栓的雌鼠作为受体鼠, 将注射后的受精卵移植到受体鼠输卵管壶腹部, 等待小鼠出生后鉴定基因型。

1.3.2 *Sdpr* 基因转基因小鼠制备

用 PCR 扩增的小鼠 *Sdpr* (Gene ID: 20324) 基因全长克隆至 pUBC-SBase 表达载体, 将扩增片段插入 pUBC 载体的 UBC 启动子下游, 由 PvuII (TaKaRa) 对载体线性化后获得转基因 DNA 片段, 经过 Sephadex G50 柱纯化并调整浓度为 5 ng/μL, 通过显微注射技术将线性化的转基因载体注射到 SPF 级 C57BL/6J 小鼠受精卵中, 将注射后的受精卵移植至假孕受体 ICR 小鼠体内, 等待小鼠出生后鉴定基因型。

1.3.3 基因型鉴定

小鼠出生后编号并剪取尾尖, 利用鼠尾直接

PCR 试剂盒裂解鼠尾提取基因组 DNA。根据序列信息设计检测引物 (上海英潍捷基)。敲除检测引物为: Mice-*Sdpr* KO-F: 5'-GCTCACTTCAG ACCAACCAGCC-3' 和 Mice-*Sdpr* KO-R: 5'-GGACTGAGCTCAAGTAGGTGGAGG-3' (野生条带为 612 bp, 敲除条带为 451 bp); 转基因检测引物为: *Sdpr*-F1: 5'-ATCCAGAACGACCTCACCAAG-3' 和 *Sdpr*-R1: 5'-TATCGACTTCTTGAGGCTGGAT-3' (条带为 445 bp) PCR 反应体系为 20 μL。反应程序为 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s) × 30 个循环; 72℃ 10 min。采用浓度 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳并成像。

1.3.4 qRT-PCR 检测 *Sdpr* mRNA 表达情况

Sdpr 敲除小鼠及同窝野生型小鼠各 3 只, *Sdpr* 转基因小鼠及同窝野生型小鼠各 3 只。脱颈处理后, TRIzol 法提取肝、脾、胸腺总 RNA, 利用反转录试剂盒获得 cDNA。根据 *Sdpr* 序列信息设计检测引物 (上海英潍捷基) *Sdpr*-sense: 5'-CATCCAGAACGACCTCACCA-3' 和 *Sdpr*-anti-sense: 5'-GGGAAGTGGCTCCTTCACAA-3'。以 β -actin 为参照基因合成引物 β -actin-sense: TGCTGTCCCTGTATGCCTCT 和 β -actin-anti-sense: TTGATGTCACGCACGATTTTC。采用 SYBR Green 法对不同样本中的 *Sdpr* 基因表达进行分析, 计算 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.3.5 Western blot 检测各组织中 SDPR 蛋白表达

取后续繁育的 6 月龄雄性 *Sdpr* 基因敲除小鼠 (*Sdpr*^{-/-}) 及其同窝野生型小鼠 (*Sdpr*^{+/+}) 各 3 只; 6 月龄雄性 *Sdpr* 基因转基因小鼠 (*Sdpr*-Tg) 及其同窝野生型小鼠 (WT) 各 3 只。安乐死后取小鼠心、肝、脾、肺、胸腺组织置于含研磨珠的研磨管中, 加入 RIPA 裂解液, 使用 OMNI 均质仪研磨后, 冰上裂解 30 min, 12000 r/min 4℃ 离心 20 min 后取上清为组织总蛋白, 经 BCA 试剂盒浓度测定后调整蛋白浓度。制备 10% PAGE 凝胶, 上样量为每孔 30 μg。一抗: SDPR (1: 1000)、 β -actin (1: 2000), 4℃ 孵育过夜。二抗: 山羊抗兔 (1: 5000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后使用 ECL 发光液显影。

1.3.6 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色

取 6 月龄的 *Sdpr* 基因敲除小鼠和其同窝野生型小鼠, *Sdpr* 转基因小鼠和其同窝野生型小鼠。取材固定: 脱颈后取心、肝、脾、肺、肾等新鲜组织置于

10%福尔马林中固定 48 h 以上。经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片贴片后,进行常规 HE 染色,封片后于光学显微镜下进行组织病理学变化观察。

1.3.7 免疫细胞流式分析

小鼠眼眶静脉丛采集外周血 100 μ L,加入红细胞裂解液混匀后室温静置 5 min,离心后加入 PBS 缓冲液重悬细胞备用。小鼠脱颈椎法处死,取胸腺、脾置于预冷的 PBS 缓冲液中。用载玻片磨砂端沾取 PBS 后将胸腺、脾研磨成细胞悬液备用;取小鼠双侧后肢骨,使用研钵将骨髓压出,分两次加入 6 mL 预冷 PBS 缓冲液反复吹打直至骨髓组织发白。将细胞悬液经 300 目尼龙膜过滤后,1500 r/min 离心 5 min。加入 PBS 重悬细胞,调整细胞浓度后取 10^6 个细胞荧光抗体标记。

免疫细胞分析采用如下抗体标记:FITC CD4、PE CD45、PerCP-cy5.5 CD3、PE-Cy7 B220、APC CD8、APC-Cy7 CD11b。细胞悬液离心后,加入 PBS 稀释(1:200)的荧光抗体标记,4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min, PBS 洗 1 次,2500 r/min 离心 5 min,200 μ L PBS 重悬细胞,经 300 目尼龙膜过滤后上机。FlowJo 计算标记阳性细胞比率。

1.4 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 8.4.0 和 IBM SPSS Statistics 26 进行统计分析,实验中所有数据均以平

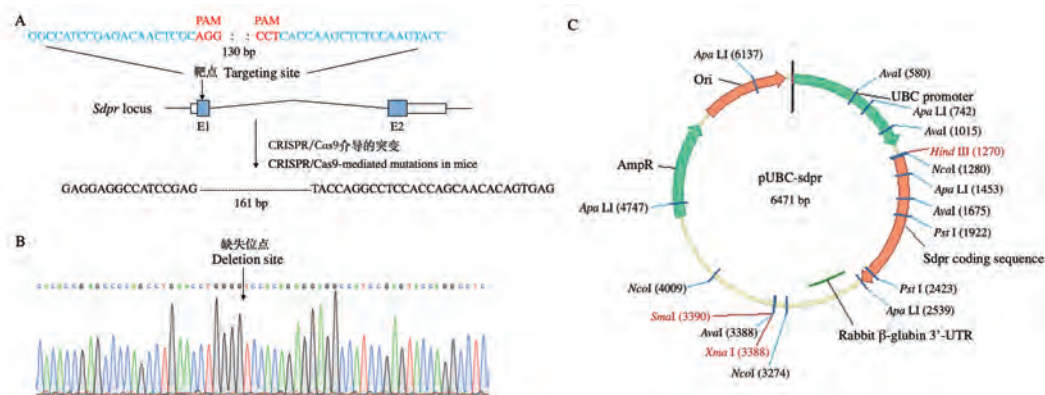
均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间数据分析采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠的构建

我们利用 CRISPR/Cas9 的技术构建了 *Sdpr* 基因敲除小鼠,针对 *Sdpr* 基因设计了两个 sgRNA 作用靶点,sgRNA 表达载体经线性化形成粘性末端,退火后与 pUC57-sgRNA 链接(图 1A),测序验证序列结果正确(图 1B)。sgRNA 使 Cas9 可在 sgRNA 作用下识别含有 PAM 的序列,实现 DNA 双链断裂。将成功构建的 sgRNA 表达载体和 Cas9 表达质粒经 T7 RNA 聚合酶体外转录为可注射的 sgRNA 和 Cas9 mRNA,混合后注射到小鼠受精卵中,移植入假孕受体 ICR 小鼠中,待小鼠出生后与野生型小鼠交配繁殖。在后续繁育中剪取小鼠尾尖提取 DNA 进行基因型鉴定,经 PCR 扩增野生条带为 612 bp,敲除条带为 451 bp。同时在 612 bp、451 bp 处有两条带,为杂合子小鼠(图 2A)。

同时将 *Sdpr* 基因插入过表达质粒 UBC 启动子下游,构建得到 *Sdpr* 转基因过表达载体 pUBC-*Sdpr*(图 1C)。利用显微注射将线性化的载体注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵,移植入假孕受体 ICR 小鼠中,待小鼠出生后与野生型小鼠交配获得 *Sdpr* 全身过表达的转基因小鼠,后续可稳定传代。转基因阳性小鼠



注:A:利用 CRISPR/Cas9 建立 *Sdpr* 敲除小鼠构建示意图,在第一外显子处设计作用靶点,蓝色为 sgRNA 对应的两靶点,红色为 PAM 基序,Cas9/sgRNA 介导的基因打靶产生移码突变,产生 *Sdpr* 缺失的表达载体;B:*Sdpr* 敲除片段测序结果;C:pUBC-*Sdpr* 表达载体构建。

图 1 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠建立方案

Note. A, Schematic diagram of *Sdpr* knockout mice with CRISPR/Cas9 technology. The target was designed on the first exon, the blue was the two targets corresponding to sgRNA, whereas the red was the PAM motif. The Cas9/sgRNA-mediated gene targeting generates frame-shift mutation resulting in *Sdpr*-deficient expression vector was established. B, Chromatographs from *Sdpr* knockout sequences of truncated PCR products. C, Construct of pUBC-*Sdpr* expression vector.

Figure 1 Establishment of *Sdpr* knockout mice and transgenic mice

DNA 扩增片段经电泳后在 445 bp 处可见条带,野生型 C57BL/6J 小鼠在 445 bp 处无条带(图 2B)。

2.2 *Sdpr* 基因敲除和转基因小鼠各组织中的表达

通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *Sdpr* 在基因敲除小鼠和转基因小鼠各组织中 mRNA 表达水平和蛋白表达水平。结果显示在肝、胸腺和脾组织中 *Sdpr* 基因敲除小鼠 mRNA 表达水平显著低于野生型小鼠(图 3A),在肝、肺、胸腺、脾组织中 SDPR 蛋白表达显著低于野生型小鼠(图 4A、4C);*Sdpr* 转基因小鼠的肝、胸腺、脾组织的 mRNA 相对表达水平高于野生型小鼠(图 3B),在转基因小鼠的心、肝、胸腺、脾组织中 SDPR 蛋白的表达均明显高于野生型小鼠(图 4B、4D)。

2.3 组织病理学变化

在小鼠饲养繁殖过程中发现 *Sdpr* 敲除小鼠和转基因小鼠在寿命、生殖能力等方面与野生型小鼠没有明显差异。

通过在光学显微镜下对 6 月龄的小鼠进行组织的病理学观察,发现与野生型小鼠相比,*Sdpr* 敲除小鼠肝细胞出现脂肪变性,多处可见肉芽肿形成,中央静脉周围可见明显髓外造血;肺局部血管周围炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽;脾红髓出现髓外造血;骨髓中细胞形态出现变化,淋巴细胞比例减少,粒细胞比例增加;脂肪存在多处炎性细胞浸润;心脏、肾、胸腺病理未发现异常。

Sdpr 转基因小鼠肝有轻微脂肪变性;小鼠肺中肺泡间隔轻微增宽;脾动脉淋巴鞘周围淋巴细胞增生,红髓细胞增多;骨髓中淋巴细胞比例增多,粒细

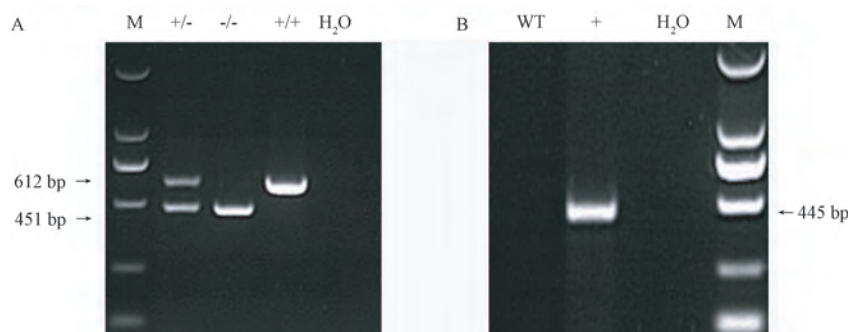
胞比例减少;心脏、肾、胸腺、脂肪未发现病理变化(图 5)。

2.4 *Sdpr* 对免疫细胞的影响

为了解 *Sdpr* 对小鼠免疫细胞的影响,我们选取了 *Sdpr* 基因敲除小鼠、*Sdpr* 转基因小鼠与野生型小鼠每组各 9 只,分别取外周血、骨髓、脾及胸腺中的免疫细胞进行荧光抗体染色标记后利用流式细胞仪进行分析,检测免疫细胞的比例。结果显示与野生型小鼠对照相比,在外周血中 *Sdpr* 转基因小鼠的 B 细胞(B220⁺)比例明显增加,粒细胞(CD11b⁺)和 T 细胞(CD3⁺)比例降低(图 6A);在骨髓中 *Sdpr* 基因敲除小鼠 T 细胞比例降低(图 6B);在脾中 *Sdpr* 敲除小鼠、*Sdpr* 转基因小鼠免疫细胞均没有明显变化(图 6C);T 细胞在胸腺中经历几个阶段发育成熟,结果分析发现在 *Sdpr* 基因敲除小鼠胸腺中 CD4⁻CD8⁻双阴性细胞增多,CD4⁺CD8⁺双阳性细胞减少。*Sdpr* 转基因小鼠胸腺 CD4⁺T 细胞显著增多,CD4⁺CD8⁺双 A 阳性细胞减少(图 6D)。上述结果表明 *Sdpr* 基因对小鼠免疫系统有着重要的影响。

3 讨论

SDPR 在多种组织细胞中广泛表达^[8],在胞膜窖形成中发挥重要作用^[9]。胞膜窖是脂肪细胞表面大量存在结构域,参与胰岛素信号传导、膜运输和脂质稳态^[16-18]。因此,caveolin 蛋白和 Cavin 蛋白家族的转录控制机制对脂肪细胞生物学具有重要意义^[4],该领域的研究可能有助于深入了解胰岛素抵抗和糖尿病。在脂代谢的研究中发现,在脂肪生

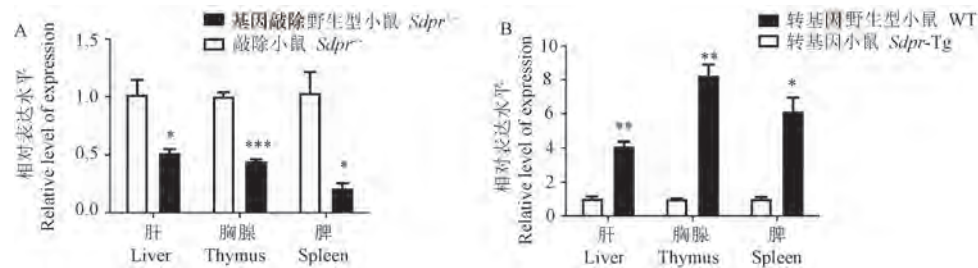


注:A:PCR 鉴定 *Sdpr* 敲除小鼠的基因型;B:PCR 鉴定 *Sdpr* 转基因小鼠的基因型;M:Marker DL2000 (TaKaRa);H₂O:水;+/+:野生型对照;+/-:*Sdpr* 杂合子小鼠对照;-/-:*Sdpr* 敲除纯合小鼠;+:阳性小鼠;WT:野生型小鼠。

图 2 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠的鉴定

Note. A, Identify the genotype of *Sdpr* knockout mice by PCR. B, Identify the genotype of *Sdpr* transgenic mice by PCR. M, DNA molecular weight marker DL2000 (TaKaRa). H₂O, Water. +/+, Wild-type mice. +/-, *Sdpr* heterozygous mice. -/-, *Sdpr* knockout homozygous mice. +, Positive mice. WT, Wild type.

Figure 2 Identification of *Sdpr* knockout mice and transgenic mice

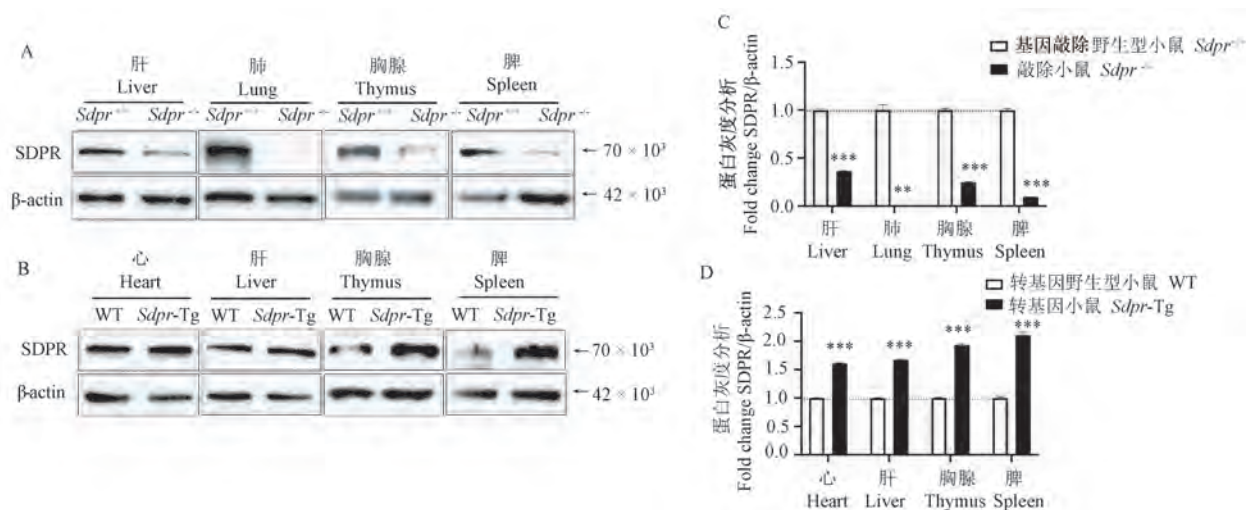


注:A:基因敲除小鼠肝、胸腺、脾组织中 mRNA 相对表达水平; $Sdpr^{+/+}$:基因敲除野生型小鼠; $Sdpr^{-/-}$:敲除小鼠;B:转基因小鼠肝、胸腺、脾组织中 mRNA 相对表达水平;WT:转基因野生型小鼠; $Sdpr-Tg$:转基因小鼠。与基因敲除野生型小鼠相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与转基因野生型小鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图3 Real-time PCR 检测 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠组织中 mRNA 表达水平

Note. A, Relative level of mRNA expression in liver, thymus and spleen of knockout mice. $Sdpr^{+/+}$, Knockout wild-type mice. $Sdpr^{-/-}$, Knockout mice. B, Relative level of mRNA expression in liver, thymus and spleen of transgenic mice. WT, Transgenic wild-type mice. $Sdpr-Tg$, Transgenic mice. Compared with $Sdpr^{+/+}$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with WT, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 *Sdpr* mRNA expression level of knockout mice and transgenic mice in different tissues detected by Real-time PCR



注:A:Western blot 检测 SDPR 蛋白在基因敲除小鼠肝、肺、胸腺、脾中的表达; $Sdpr^{+/+}$:基因敲除野生型小鼠; $Sdpr^{-/-}$:*Sdpr* 基因敲除纯合小鼠, β -actin 为内参;B:Western blot 检测 SDPR 蛋白在转基因小鼠心、肝、胸腺、脾中的表达; $Sdpr-Tg$:*Sdpr* 转基因小鼠;WT:转基因野生型小鼠, β -actin 为内参;C:敲除小鼠各组织蛋白表达灰度分析;D:在转基因小鼠各组织蛋白表达灰度分析。与基因敲除野生型小鼠相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与转基因野生型小鼠相比, *** $P<0.001$ 。

图4 SDPR 蛋白在敲除及转基因小鼠各脏器中的蛋白表达

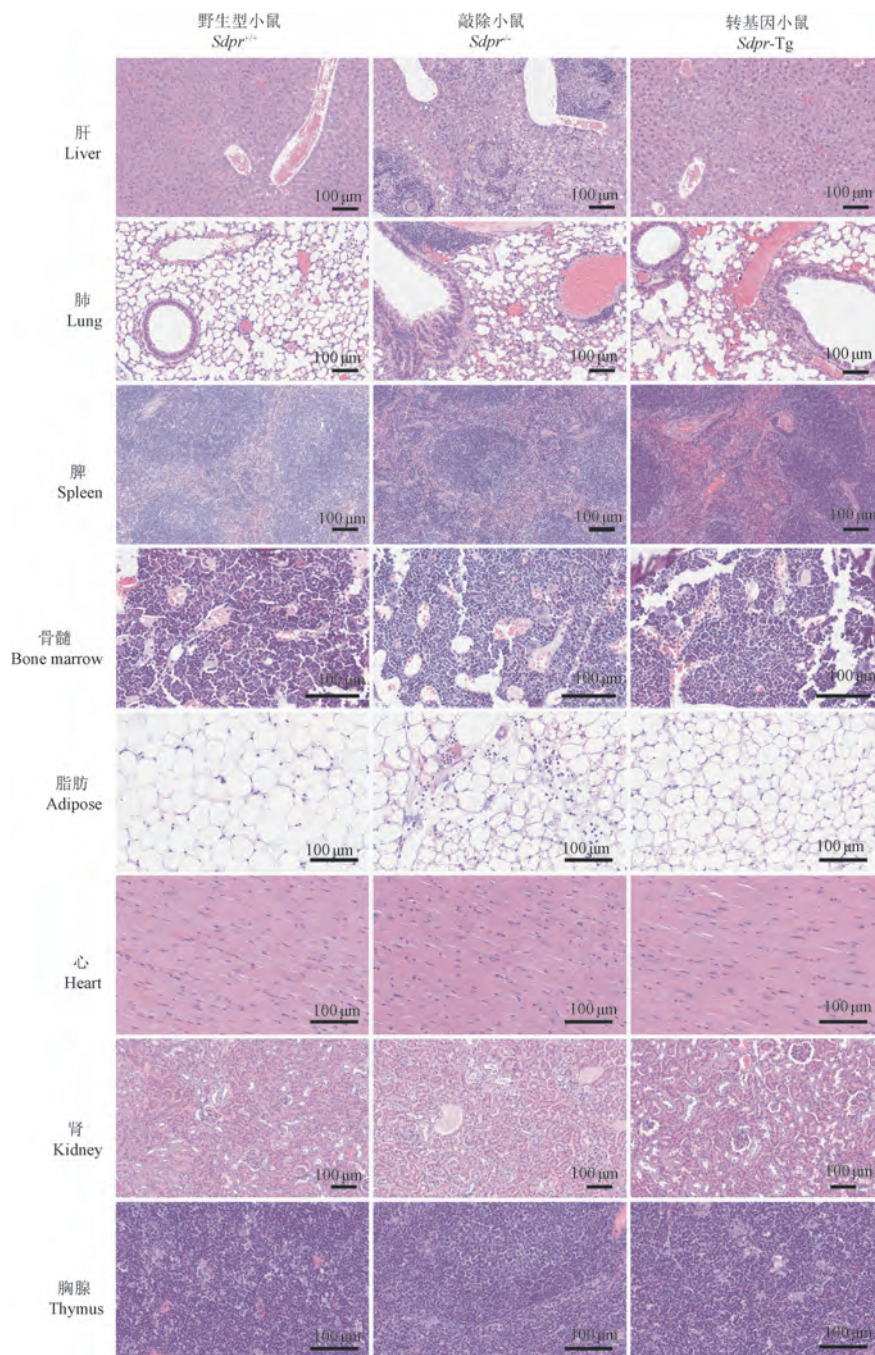
Note. A, Expression level of SDPR protein in liver, lung, thymus and spleen of knockout mice detected by Western blot. $Sdpr^{+/+}$, Knockout wild-type mice. $Sdpr^{-/-}$, *Sdpr* knockout homozygous mice, β -actin as internal reference. B, Expression level of SDPR protein in the heart, liver, thymus and spleen of transgenic mice detected by Western blot. WT, Transgenic wild-type mice. $Sdpr-Tg$, *Sdpr* transgenic mice, β -actin as internal reference. C, Normalization of protein expression levels in tissues of knockout mice. D, Normalization of protein expression levels in tissues of transgenic mice. Compared with $Sdpr^{+/+}$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with WT, *** $P<0.001$.

Figure 4 The SDPR protein expression level of knockout mice and transgenic mice in different tissues

成的过程中,CEBP α (CEBPA)和PPAR γ (PPARG)是两个关键转录因子,通过相互诱导表达并共同靶向脂肪生成中的关键基因^[19-20],而*Sdpr*可在脂肪细胞分化过程中与CEBP α 和PPAR γ 平行上调,并且CEBP α 和PPAR γ 的激活可诱导原代脂肪细胞及其前体中的SDPR表达,可能表明了脂肪细胞中CEBP α /PPAR γ 介导的*Sdpr*的重要转录控制机

制^[21]。近期一项研究利用Cavin-2 KO小鼠和Cavin-2敲低的3T3-L1细胞发现,SDPR通过结合胰岛素受体(IR β)增强其稳定性并调节胰岛素信号传导,该结果强调了*Sdpr*在脂肪生成和脂质代谢中的关键作用,有助于开发治疗病理性肥胖和脂肪生成疾病的新疗法^[22]。

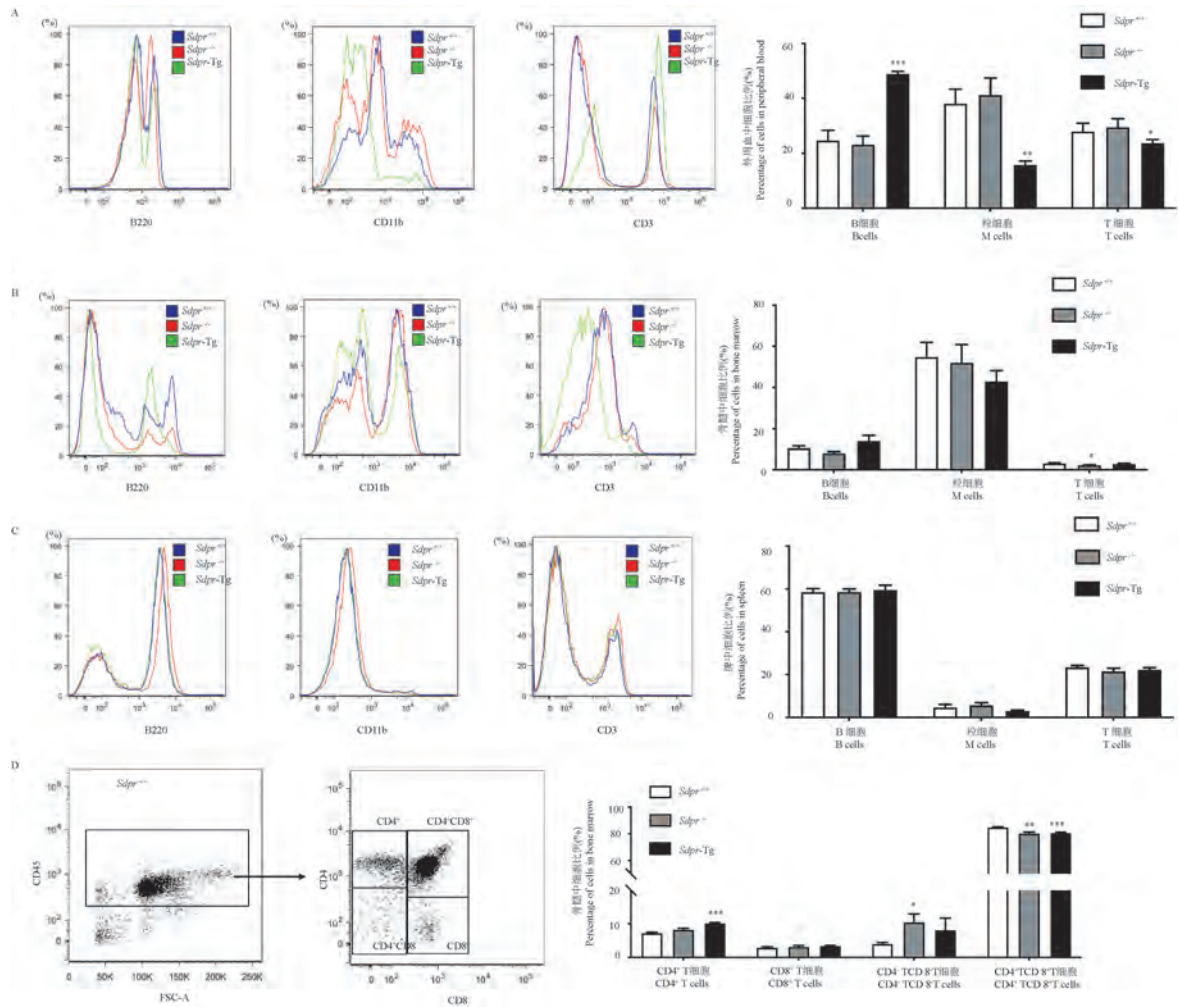
在肿瘤的研究中发现,*Sdpr*在前列腺癌、乳腺

图 5 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠主要脏器组织 HE 染色**Figure 5** Histology of the major organs of *Sdpr* knockout and transgenic mice (HE staining)

癌和肾癌中表达均是降低的^[23]。*Sdpr* 已成为肝癌和胃癌等癌症的潜在诊断指标^[24-26]。比较基因组分析显示在 PC3 细胞中加入促进细胞存活的细胞因子 IL-6、IGF-1 和 TGFβ1 后 *Sdpr* 的 mRNA 水平表达降低,说明 *Sdpr* 参与了 IL-6、IGF-1 和 TGFβ-1 诱导激活的下游信号通路^[27]。在肺癌的研究中发现 *Sdpr* 在肺腺癌细胞和组织中的表达下调,且低表达 *Sdpr* 与免疫系统抑制之间存在相关性,对其调控机

制的研究发现 *Sdpr* 与免疫检查点分子 (PD-L1、TNFRSF18、TNFRSF9 和 TDO2) 之间存在负相关,有可能成为肺癌尤其是非小细胞肺癌 (NSCLC) 和 KRAS 突变肺癌治疗及预后的潜在靶点^[28]。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术和 pUBC 过表达质粒及显微注射技术构建了 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠全身过表达小鼠模型,该模型与野生型小鼠在寿命、生殖能力等方面无明显差异,且可



注:A:外周血中B细胞、粒细胞、T细胞的比例;B:骨髓中B细胞、粒细胞、T细胞的比例;C:脾中B细胞、粒细胞、T细胞的比例;D:胸腺中CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁻及CD4⁺CD8⁺T细胞的比例。与基因敲除野生型小鼠相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图6 外周血、骨髓、脾及胸腺中免疫细胞的比例

Note. A, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in peripheral blood. B, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in bone marrow. C, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in spleen. D, Proportion of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ and CD4⁺CD8⁺T cells in thymus. Compared with *Sdpr*^{+/+}, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Percentages of immune cells in the peripheral blood, bone marrow, spleen and thymus

以稳定传代。通过在DNA、mRNA、蛋白水平上对该模型进行鉴定,并在组织病理学和免疫细胞比例变化上与野生型C57BL/6J小鼠进行了比较。

研究结果发现,*Sdpr*基因的缺失导致小鼠长期处于炎症状态,在敲除小鼠的肺局部血管周围及脂肪组织多处出现炎性细胞浸润,骨髓中细胞形态与比例出现变化,肝、脾可见髓外造血,流式结果显示敲除小鼠骨髓中T细胞比例降低;在转基因小鼠肝细胞有轻微脂肪变性,脾有淋巴细胞增生,红髓细胞增多;骨髓中淋巴细胞比例增多,粒细胞比例减少,流式结果显示粒细胞和T细胞比例降低,B细胞比例增加,与HE染色结果一致。胸腺是小鼠T细

胞发育成熟的场所当来自胎肝或骨髓的T细胞进入胸腺后,可经历不同的发育阶段。通过对胸腺组织中免疫细胞进行CD4/CD8抗体标记,流式分析发现敲除小鼠胸腺中CD4⁻CD8⁻双阴性细胞增多,CD4⁺CD8⁺双阳性细胞减少,证明*Sdpr*缺失影响胸腺中T细胞成熟,使T细胞的发育大量停留在早期;*Sdpr*转基因小鼠胸腺CD4⁺T细胞增多,CD4⁺CD8⁺双阳性细胞减少,可推断*Sdpr*促使双阳性T细胞经正负选择更多分化发育为具有免疫功能的成熟CD4⁺T细胞。因此可推断*Sdpr*基因对小鼠免疫系统及胸腺发育过程有着重要的影响。

免疫细胞的调控与造血系统中造血干/祖细胞

的发育密不可分,造血干细胞的增殖、分化等过程直接影响到机体免疫系统的调控。且在研究结果中发现,缺失 *Sdpr* 基因的小鼠出现髓外造血的现象,可推测 *Sdpr* 基因对血液细胞发育可能存在影响,因此 *Sdpr* 基因对造血系统发育的调控仍需进一步研究。通过本研究建立了血清剥夺反应因子 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠模型,为 *Sdpr* 在生物学过程中的功能、作用机制的研究提供基础,同时为胞膜窖及胞膜窖调节蛋白相互作用的研究提供了模型支持。

参考文献:

- [1] Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(2): 98–112.
- [2] Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Caveolae and signalling in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(4): 225–237.
- [3] McMahon KA, Zojicek H, Li WP, et al. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function [J]. EMBO J, 2009, 28(8): 1001–1015.
- [4] Jagan M, Björn M, Elin L, et al. Cavin3 interacts with cavin1 and caveolin1 to increase surface dynamics of caveolae [J]. J Cell Sci, 2015, 128(5): 979–991.
- [5] Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(4): 177–186.
- [6] Burgener R. Purification and characterization of a major phosphatidylserine-binding phosphoprotein from human platelets [J]. Biochem J, 1990, 269(3): 729–734.
- [7] Mineo C, Y-S Y, Chapline C, et al. Anderson. Targeting of protein kinase C α to caveolae [J]. J Cell Biol, 1998, 141(3): 601–610.
- [8] Gustincich S, Vatta P, Goruppi S, et al. The human serum deprivation response gene (SDPR) maps to 2q32-q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein [J]. Genomics, 1999, 57(1): 120–129.
- [9] Hansen CG, Bright NA, Howard G, et al. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 807–814.
- [10] Ivan RN. Cavin fever: regulating caveolae [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 789–791.
- [11] Wang QX, Chen ED, Cai YF, et al. Serum deprivation response functions as a tumor suppressor gene in papillary thyroid cancer [J]. Clin Genet, 2019, 96(5): 418–428.
- [12] Luo YH, Wu JH, Wu QY, et al. miR-577 regulates TGF- β induced cancer progression through a SDPR-modulated positive-feedback loop with ERK-NF- κ B in gastric cancer [J]. Mol Ther, 2019, 27(6): 1166–1182.
- [13] Li Y, Wu CH. LINC00261/microRNA-550a-3p/SDPR axis affects the biological characteristics of breast cancer stem cells [J]. IUBMB Life, 2020, 73(1): 188–201.
- [14] Tian Y, Yu Y, Hou LK, et al. Serum deprivation response inhibits breast cancer progression by blocking transforming growth factor- β signaling [J]. Cancer Sci, 2016, 107(3): 274–280.
- [15] Ozturk S, Papageorgis P, Wong CK, et al. SDPR functions as a metastasis suppressor in breast cancer by promoting apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(3): 638–643.
- [16] Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, et al. Cavin family proteins and the assembly of caveolae [J]. J Cell Sci, 2015, 128(7): 1269–1278.
- [17] Hiram T, Das R, Yang Y, et al. Phosphatidylserine dictates the assembly and dynamics of caveolae in the plasma membrane [J]. J Biol Chem, 2017, 292(34): 14292–14307.
- [18] Strålfors P. Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 729: 111–126.
- [19] Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 124.
- [20] Haakonsson AK, Stahl Madsen M, Nielsen R, et al. Acute genome-wide effects of rosiglitazone on PPAR γ transcriptional networks in adipocytes [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(9): 1536–1549.
- [21] Björn H, Catarina R, Dorota K, et al. Rosiglitazone drives cavin-2/SDPR expression in adipocytes in a CEBP α -dependent manner [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173412.
- [22] Higuchi Y, Ogata T, Nakanishi N, et al. Requirement of cavin-2 for the expression and stability of IRB in adequate adipocyte differentiation [J]. Mol Metab, 2022, 55: 101416.
- [23] Li X, Jia ZY, Xhen YQ, et al. Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate [J]. Cancer Sci, 2008, 99(7): 1326–1333.
- [24] Wang Y, Song Z, Leng P, et al. A systematic analysis reveals gene expression alteration of serum deprivation response (SDPR) gene is significantly associated with the survival of patients with cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(3): 1161–1172.
- [25] Luo Y, Wu J, Wu Q, et al. miR-577 regulates TGF- β induced cancer progression through a SDPR-modulated positive-feedback loop with ERK-NF- κ B in gastric cancer [J]. Mol Ther, 2019, 27(6): 1166–1182.
- [26] Jing W, Luo P, Zhu M, et al. Prognostic and diagnostic significance of SDPR-cavin-2 in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(3): 950–960.
- [27] Tenta R, Katopodis H, Chatziioannou A, et al. Microarray analysis of survival pathways in human PC-3 prostate cancer cells [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2007, 4(4): 309–318.
- [28] Luo X, Peng S, Ding S, et al. Prognostic values, ceRNA network, and immune regulation function of SDPR in KRAS-mutant lung cancer [J]. Cancer Cell International, 2021, 21(1): 49.

[收稿日期] 2022-02-14

孙尚, 邹达, 赵振达, 等. 基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (5): 16-22.

Sun S, Zou D, Zhao ZD, et al. Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.003

基于大鼠 OVX 模型研究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响

孙尚¹, 邹达², 赵振达², 蒋媛¹, 杨子欢¹, 陈龙艇¹, 李危石², 宋纯理³, 冷慧杰^{1*}

(1. 北京大学第三医院骨科, 北京 100191; 2. 骨与关节精准医学工程研究中心, 北京 100191;
3. 脊柱疾病研究北京市重点实验室, 北京 100191)

【摘要】目的 探究雌激素缺乏对终板软骨细胞退变的影响。**方法** 选取 6 月龄大鼠 40 只, 分为两组: 双侧卵巢切除实验组 (OVX) 和假手术对照组 (SHAM)。术后 9 周取材, 分别进行软骨终板组织的提取和原代终板软骨细胞的培养。免疫组化实验对比 SHAM 组和 OVX 组的软骨终板组织 II 型胶原 (COL-II) 的表达情况。倒置相差显微镜和甲苯胺蓝细胞染色观察细胞形态来鉴定终板软骨细胞。CCK-8 法对比两组终板软骨细胞的活力情况。罗丹明标记的鬼笔环肽荧光染色观察 OVX 后终板软骨细胞 F-actin 的改变情况。细胞免疫荧光检测终板软骨细胞在雌激素缺乏后 COL-II 的改变情况。RT-qPCR 法对比两组的 *SOX9*、*ACAN*、*ADAMTS-5*、*MMP13* 和 *COL-X* 的表达有无差异。**结果** 与对照组相比较, OVX 组的软骨终板的 COL-II 蛋白表达减低。终板软骨细胞的形态大多呈多角形和梭形, 铺路石样排列。OVX 的终板软骨细胞活力降低, 细胞骨架更加紊乱, 应力纤维增多, 迁移能力下降, COL-II 表达降低。与对照组相比, OVX 组的终板软骨细胞 *SOX9* 和 *ACAN* 表达降低, *MMP13*、*ADAMTS-5* 和 *COL-X* 表达升高。**结论** 雌激素缺乏会使终板软骨细胞发生退变。OVX 后的终板软骨细胞活力下降、迁移能力降低、软骨合成减低伴随细胞外基质的降解和细胞肥大分化增加。

【关键词】 终板; 退变; 雌激素缺乏; 软骨细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0016-07

Degeneration of chondrocytes in cartilage endplate due to estrogen deficiency based on rat OVX model

SUN Shang¹, ZOU Da², ZHAO Zhenda², JIANG Ai¹, YANG Zihuan¹, CHEN Longting¹, LI Weishi²,
SONG Chunli³, LENG Huijie^{1*}

(1. Peking University Third Hospital, Department of Orthopaedics, Beijing 100191, China. 2. Engineering Research Center of Bone and Joint Precision Medicine, Beijing 100191. 3. Beijing Key Laboratory of Spinal Disease Research, Beijing 100191)

【Abstract】Objective To investigate the effect of estrogen deficiency on the degeneration of spinal endplate chondrocytes. **Methods** Forty 6-month-old rats were divided into ovariectomy (OVX) and sham operation groups. All of the rats were sacrificed at week 9 after operation. The cartilage endplate tissue was extracted, and endplate chondrocytes were cultured. The expression of COL-II in the cartilage endplate tissue was evaluated by immunohistochemistry. The cells

【基金项目】 国家自然科学基金 (12172011, 11872076, 11472017)。

【作者简介】 孙尚 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 终板退变机制。E-mail: sun_shang11@163.com

【通信作者】 冷慧杰 (1975—), 男, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 骨与关节生物学与力学。E-mail: lenghj@bjmu.edu.cn

were stained by toluidine blue to identify endplate chondrocytes. The viability of endplate chondrocytes was detected by CCK-8. Fluorescence staining of rhodamine-labeled phalloidin was used to observe the changes of F-actin after OVX. Cellular immunofluorescence was performed to detect the changes of COL-II of endplate chondrocytes. The expression levels of *SOX9*, *ACAN*, *ADAMTS-5*, *MMP13* and *COL-X* were compared between the two groups by RT-qPCR. **Results** After OVX, the expression of COL-II protein in the cartilage endplates was decreased. Most of the chondrocytes in the endplates were polygonal and fusiform, arranged like paving stones. Endplate chondrocytes of OVX demonstrated more disordered cytoskeleton, decreased viability, increased stress fibers, decreased migration ability, and lower COL-II expression. For the OVX group, the expression of *SOX9* and *ACAN* in the endplate chondrocytes was decreased, while that of *ADAMTS-5*, *MMP13* and *COL-X* was increased. **Conclusions** Estrogen deficiency can cause degeneration of endplate chondrocytes.

【Keywords】 endplate; degeneration; estrogen deficiency; chondrocyte

内源性雌激素缺乏是导致更年期妇女各种健康问题的重要原因之一^[1-2]。妇女绝经后,不仅骨质疏松高发,并且骨关节炎和椎间盘退变的发生率也高于同龄的男性^[3-5]。雌激素不仅影响骨组织重建,对关节软骨、纤维环以及髓核组织的代谢同样有重要的影响。雌激素缺乏带来的脊柱病变(椎体骨质疏松和椎间盘退变等)可以导致患者严重疼痛和残疾^[6]。软骨终板位于椎骨和椎间盘之间,是脊柱重要的组成部分。软骨终板可以承担和分散脊柱压力,具有防止椎间盘突入相邻椎骨的重要作用^[7]。除此之外,椎间盘作为无血管组织,营养运输和物质代谢需要依赖软骨终板^[7]。软骨终板的退变会影响椎间盘的正常形态,阻碍椎间盘的营养和代谢,是椎间盘退变的前驱因素^[8]。而椎间盘退变会降低其承重能力和活动性,导致腰痛和坐骨神经痛,造成患者的严重疼痛和残疾。研究软骨终板的退变机制可能是寻找治疗椎间盘退变方法的一把钥匙,而雌激素缺乏影响软骨终板退变的影响还有待研究。

多项研究发现雌激素可以减轻终板软骨细胞的变性,并上调 COL-II 以促进软骨细胞分化^[9]。雌激素可以参与调节软骨细胞的老化,而细胞老化是细胞退变的一个重要标志^[10]。软骨细胞是软骨终板的主要细胞类型,软骨终板退变的过程主要取决于软骨细胞的变化,而雌激素缺乏时,终板软骨细胞的变化还未有报道。本研究探讨雌激素缺乏对终板软骨细胞变化的影响,这有助于帮助人们认识绝经妇女软骨终板退变的机制,并可能为雌激素缺乏引起脊柱疾病提供一种新的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

采用 SPF 级 6 月龄 SD 雌性大鼠 40 只,体重为

290~320 g,购买自北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2021-0013],饲养于北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2021-0064]。大鼠饲养环境湿度 40%~50%,温度(23±2)℃,12 h 光照/12 h 黑暗交替,自由饮食和活动。实验动物符合 3R 原则,经北京大学实验动物伦理委员会审查(LA2019209),符合动物伦理。

1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛溶液(中国 Servicebio 公司,批号:CR2106101);EDTA 脱钙液(中国 Coolaber 公司,批号:SL31131120);兔抗大鼠 collagen II(美国 Abcam 公司,批号:GR3395339-1);DMEM 低糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号:AG29820714);胎牛血清(中国美仑公司,批号:J0101A);CCK-8 检测试剂盒(日本同仁公司,批号:TH531);TRIzol(美国 Sigma 公司,批号:BCCD7547);DEPC 处理水(中国碧云天公司,批号:R0022);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:00987373);SYBR Select Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号:00722083);戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司,批号:20170308)。

石蜡切片机(Lecia,德国)倒置荧光显微镜(Nikon,日本);酶标仪(Thermo,美国),实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,美国);Nanodrop 2000C(滨松,日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、造模与处理

手术当天测量体重后,随机选择分组,20 只为双侧卵巢切除实验组(OVX),其余 20 只为假手术组(SHAM)。大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 进行麻醉。在大鼠背外侧行 1.5 cm 的切口来暴露卵巢,在输卵管或子宫远端结扎去除两侧完整卵巢组织并闭合伤口。手术后肌肉注射抗生素(青霉素,40 kU/kg)。术后第 9 周,过量腹腔注射 2%戊巴

比妥钠(120 mg/kg)安乐死。取腰椎组织进行后续实验。

1.3.2 提取和培养原代终板软骨细胞

将腰椎组织浸泡于 75%乙醇消毒 15 min,在超净台内分离软组织,取出软骨终板,剪碎,使用 0.2% II 型胶原酶 37℃ 消化 4~6 h,软骨组织被消化成沫状,加入完全培养基终止消化后,立即 800 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 DMEM 低糖培养基(加入 10%胎牛血清+2%双抗)种于 5 cm 培养瓶内。待终板软骨细胞长满后,用胰酶消化传代,采用 P2 细胞。

1.3.3 CCK-8 实验检测细胞活力

将终板软骨细胞以 5×10^3 密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,避光,以换液形式每孔加入 100 μ L 含 CCK-8 增强型溶液的完全培养基,不可产生气泡,置于 37℃ 培养箱孵育 1 h,使用酶标仪检测每个孔在 450 nm 波长下的吸光度值。

1.3.4 罗丹明标记的鬼笔环肽染色

将终板软骨细胞以 3×10^4 密度置于 24 孔板,弃培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛室温固定 20 min,弃固定液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,按 1:200 加入鬼笔环肽染色液避光室温孵育 1 h,弃染色液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 DAPI 染色剂避光孵育 3 min 后置于荧光显微镜观察。

1.3.5 COL-II 免疫荧光染色

将终板软骨细胞以 3×10^4 密度置于 24 孔板,待细胞长满后,弃培养基,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛固定细胞 20 min,弃固定液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入细胞通透液通透 5 min,弃通透液,加入细胞封闭液封闭 20 min,弃封闭液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,按 1:100 加入 II 型胶原一抗 4℃ 过夜孵育,弃一抗,PBS 洗 3 次,每次 3 min,1:200 加入二抗室温避光孵育 1 h,弃染色液,PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 DAPI 染色剂避光孵育 3 min 后置于荧光显微镜观察。

1.3.6 RT-qPCR 实验检测基因表达

使用 TRIzol 从终板软骨细胞中提取总 RNA。RNA 的浓度和纯度通过 Nanodrop 2000C 测量。使用逆转录试剂盒将 1 μ g RNA 用于逆转录,最终反应体积为 20 μ L。ABI QuantStudio5 Q5 实时荧光定量 PCR 仪用于实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法将终板软骨基因的相对转录水平标准化,例如 *SOX9*、*ACAN*、*ADAMTS-5*、*MMP-13* 和 *COL-X*。使用 GAPDH 为内参。引物序列见表 1。

1.3.7 COL-II 免疫组化检测

腰椎标本用 10 倍体积的 4%多聚甲醛固定。标本固定后在 EDTA 脱钙液中脱钙至少 4 周。将脱钙样品嵌入石蜡中并切成 4 μ m 厚的切片。用 COL II 抗体在 4℃ 下孵育切片过夜,之后二抗孵育,最后用 DAB 显色。使用全自动全景扫描仪对切片进行拍照,并使用 Image Pro Plus 6 分析软件进行免疫组化切片的半定量分析。

1.4 统计学方法

所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 24.0 软件(SPSS, Chicago, 美国)进行数据分析。使用 *t* 检验(1 个变体,两组)来计算统计差异。*P*<0.05 具有统计意义。

2 结果

2.1 软骨终板的 COL-II 表达的比较

COL-II 是软骨组织重要的组成部分。在术后 9 周观察发现,相比较于 SHAM 组,OVX 组的软骨终板的 COL-II 表达降低(图 1)。

2.2 终板软骨细胞形态及鉴定结果

终板软骨细胞于 5 d 左右从组织块中爬出,形态以多角形、梭形为主,以铺路石样形态爬满瓶底。甲苯胺蓝染色可见细胞核呈深蓝色,胞质为浅蓝色,内有少量蓝紫色异染颗粒,与软骨细胞的特征一致^[11](图 2)。

表 1 引物设计
Table 1 Primer design

目的基因 Primers	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>SOX9</i>	GAAGAATGGGCAAGCAGAGG	CTTGACGCTCTGTTTGGGAG
<i>ACAN</i>	CGAGTGAACAGCATCTACC	GAGTCATTGGAGCGAAGG
<i>MMP-13</i>	GATGATGCTAACACAGACTATG	ATGCGATTACTCCAGATACT
<i>ADAMTS-5</i>	GCAAATCTTTCCGCCACGAG	GCCCTTAGCTCTGCACGTAA
<i>COL-X</i>	GATGCCTCTTGTCAGTGCTAA	GTGCTGCTGCCTGTTGTA
<i>GAPDH</i>	TCTCTGCTCCTCCCTGTTT	GGCTCTGCTCCTCCCTCC

2.3 终板软骨细胞的细胞活力改变的情况

采用 CCK-8 实验检测 SHAM 组和 OVX 组终板软骨细胞的细胞活力,结果显示与 SHAM 组相比,72 h 内不同时间点,OVX 组终板软骨细胞的活力均显著低于 SHAM 组(图 3)。

2.4 OVX 后终板软骨细胞的细胞骨架 F-actin 改变的情况

采用罗丹明标记的鬼笔环肽进行细胞染色,观察两组终板软骨细胞细胞骨架 F-actin 的改变。实验发现,OVX 组的终板软骨细胞中的分布在细胞质膜周围的 F-actin 出现荧光增强,F-actin 的重排加剧,形成较多的应力纤维(图 4)。

2.5 终板软骨细胞 COL-II 改变的情况

COL-II 免疫荧光染色后被荧光波段激发,细胞

质出现绿色荧光为阳性。实验结果显示 OVX 组荧光强度显著低于 SHAM 组,终板软骨细胞表达的 COL-II 明显减少(图 5)。

2.6 终板软骨细胞 SOX9、ACAN、MMP13、ADAMTS-5 和 COL-X 的基因表达

SOX9 和 ACAN 是代表软骨细胞合成情况的标志物,MMP13 和 ADAMTS-5 是代表软骨细胞分解代谢的标志物,COL-X 是软骨细胞肥大的代表性标志物。如图 6 所示,对比 SHAM 组,OVX 组的终板软骨细胞的 SOX9 和 ACAN 表达发生差异性降低,其合成能力下降;MMP13 和 ADAMTS-5 表达发生差异性升高,说明其软骨细胞外基质降解加剧;COL-X 的表达发生差异性增高,说明肥大钙化增强。

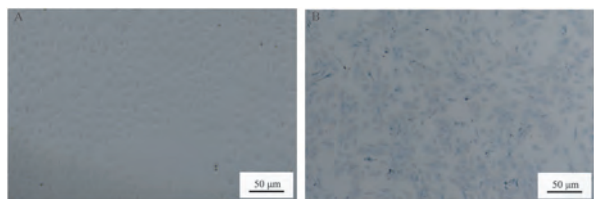


注:A;COL-II 在 SHAM 组软骨终板中的表达;B;COL-II 在 OVX 组软骨终板中的表达;C:各组大鼠软骨终板 II 型胶原定量比较。与 SHAM 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 SHAM 组和 OVX 组软骨终板 COL-II 的表达

Note. A, Expression of COL-II in cartilage endplates in SHAM group. B, Expression of COL-II in cartilage endplates in OVX group. C, Quantitative comparison of COL-II of cartilage endplates in rats in each group. Compared with SHAM group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Expression of COL-II in cartilage endplates between SHAM and OVX groups

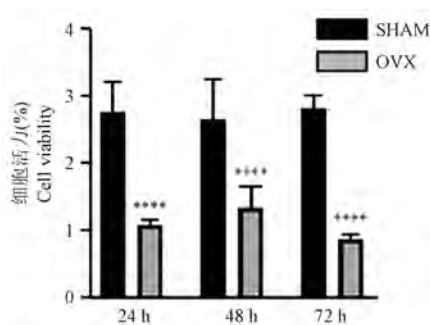


注:A;第 2 代终板软骨细胞,为多角形和梭形,呈铺路石样排列;B;甲苯胺蓝染色显示胞核为深蓝色,胞质为浅蓝色。

图 2 终板软骨细胞形态和鉴定

Note. A, Second generation endplate chondrocytes are polygonal and fusiform, arranged like paving stones. B, Toluidine blue staining shows the dark blue nucleus and the light blue cytoplasm.

Figure 2 Morphology and identification of endplate chondrocytes

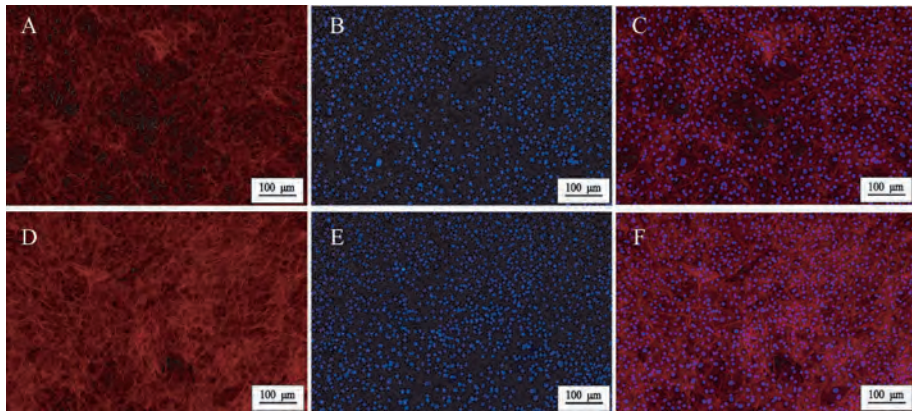


注:与 SHAM 组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 3 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞活力的对比

Note. Compared with SHAM group, **** $P < 0.0001$.

Figure 3 Comparison of the cell viability of endplate chondrocytes between SHAM and OVX group

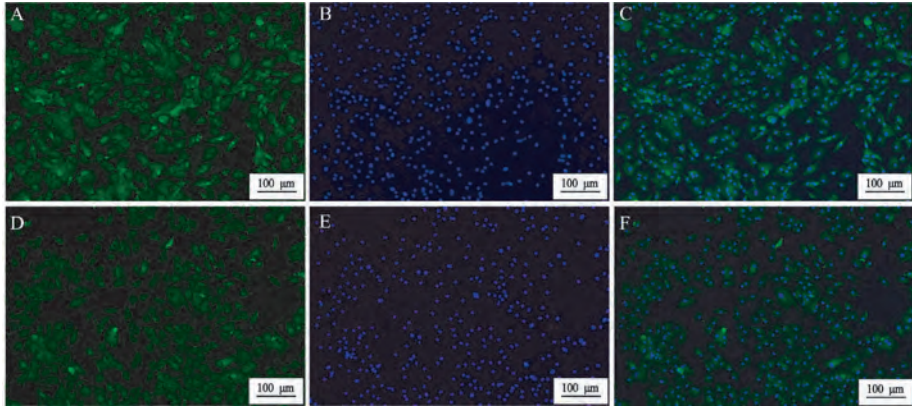


注:A~C;SHAM 组大鼠终板软骨细胞 F-actin 的表达(F-actin、DAPI、Merge);D~F:OVX 组大鼠终板软骨细胞 F-actin 的表达(F-actin、DAPI、Merge)。

图 4 细胞免疫荧光检测 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞的 F-actin 的表达情况

Note. A~C, Expression of F-actin (F-actin, DAPI, Merge) of rats in the SHAM group. D~F, Expression of F-actin (F-actin, DAPI, Merge) of rat endplate chondrocytes in the SHAM group (F-actin, DAPI, Merge).

Figure 4 Cellular immunofluorescence detection of expression of F-actin in rat endplate chondrocytes in SHAM and OVX groups

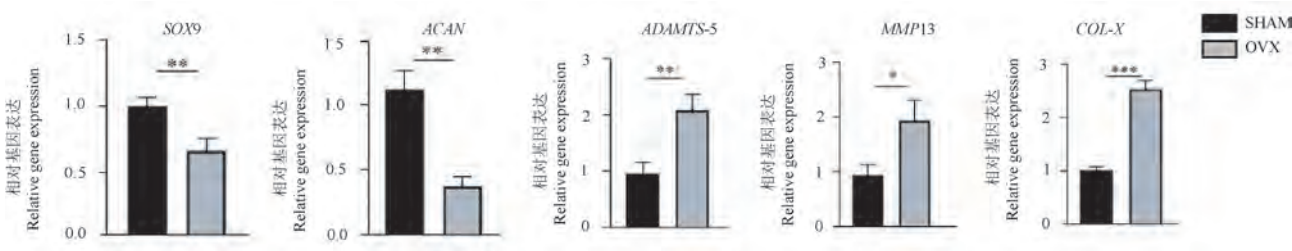


注:A~C;SHAM 组大鼠终板软骨细胞 COL-II 的表达(COL-II、DAPI、Merge);D~F:OVX 组大鼠终板软骨细胞 COL-II 的表达(COL-II、DAPI、Merge)。

图 5 细胞免疫荧光检测 SHAM 组和 OVX 组大鼠终板软骨细胞的 COL-II 的表达情况

Note. A~C, Expression of COL-II in endplate chondrocytes in the SHAM group (COL-II, DAPI, Merge). D~F, expression of COL-II in rat endplate chondrocytes in the SHAM group (COL-II, DAPI, Merge).

Figure 5 Cellular immunofluorescence detection of expression of COL-II in rat endplate chondrocytes in SHAM and OVX groups



注:SHAM 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 6 对比两组终板软骨细胞基因 SOX9、ACAN、ADAMTS-5、MMP13 和 COL-X 表达

Note. Compared with SHAM group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Comparison of the gene expressions of SOX9, ACAN, MMP13, ADAMTS-5 and COL-X in the endplate chondrocytes of the two groups

3 讨论

雌激素是一种重要的类固醇激素。作为一种全身性激素,雌激素可以调节细胞增殖、分化、衰老和死亡,对生育功能、神经功能、心血管健康、免疫系统和骨软骨系统等产生重要作用^[12]。雌激素水平的迅速下降加速了全身器官组织的老化,绝经后妇女患相关疾病的概率增大,导致糖尿病、阿尔茨海默症、肌肉力量下降、骨质疏松和关节痛等多种病症^[12-15]。既往研究发现雌激素缺乏与软骨退变息息相关。雌激素缺乏会抑制关节软骨细胞增殖和分化,加速关节骨-软骨转化^[16-17]。雌激素缺乏时终板软骨细胞的变化还未见报道。细胞活力是软骨细胞状态与功能的首要体现。过往的研究中发现补充雌激素后,生长板软骨细胞的活力增强^[18]。本研究结果发现,雌激素缺乏会降低终板软骨细胞的活力,显示了雌激素在软骨细胞活力方面作用的一致性。

COL-II 是软骨终板的主要组成之一,作为软骨组织含量最丰富的胶原蛋白,其在软骨终板和髓核的含量对维持正常的椎间盘形态起到至关重要的作用。Jiang 等^[19]实验采用 6 月龄 SD 大鼠进行去卵巢手术,3 个月后发现 OVX 组的 COL-II 的表达相较于 SHAM 组发生显著性减低。Xiao 等^[20]研究发现 8 周 C57BL/6J 小鼠 OVX 后,12 周后 OVX 的 COL-II 的表达发生显著性降低。我们的研究采用的是 6 月龄 SD 大鼠进行去卵巢手术,9 周后观察到 OVX 组的软骨终板中 II 型胶原的表达出现差异性降低。虽然采用的实验动物的种类、年龄和处理时间与过往的研究不同,但是实验结果皆表明雌激素缺乏会显著性降低软骨终板组织的 II 型胶原流失。Shi 等^[18]研究发现,补充雌激素后的生长板软骨细胞 II 型胶原的免疫荧光强度增强,证明其表达增高。我们的免疫荧光实验发现,OVX 组的终板软骨细胞的 II 型胶原表达降低,这与动物组织染色实验的结果一致。

本研究发现在雌激素缺乏下,终板软骨细胞骨架 F-actin 重排加剧,应力纤维增加,细胞骨架更加紊乱。细胞肌动蛋白细胞骨架能为细胞迁移提供动力,同时也与细胞间粘附、细胞表面的机械特性和细胞生理学息息相关^[21-22]。细胞间粘附作用可以影响软骨细胞分化过程,例如,细胞外基质蛋白通过整合素和其他细胞外基质受体发出的粘附信

号影响正常软骨细胞的增殖和肥大^[23-24]。而肌动蛋白细胞骨架对细胞间粘附有重要作用。由此可见,肌动蛋白细胞骨架也可对软骨细胞分化产生重要影响。除此之外,有研究发现,软骨细胞的细胞骨架的紊乱会导致其损伤难以修复,有序的细胞骨架有助于软骨细胞的迁移和修复^[25]。多种刺激可以影响到软骨细胞的细胞骨架。促炎因子信号可以促进肌动蛋白聚合或交联进而促进应力纤维的形成^[26]。机械刺激会导致软骨细胞肌动蛋白聚合^[27]。激素也可以调节软骨细胞肌动蛋白,例如,卵泡刺激素可以通过促进其重组来促进软骨细胞的退变^[28]。我们的研究结果显示,雌激素缺乏使终板软骨细胞细胞骨架重排,抑制其分化和迁移,造成软骨终板的损伤。其机制是复杂的,可能涉及激素本身、力学传导信号以及促炎因子信号等多种通路。

本研究发现雌激素缺乏后,终板软骨细胞表型发生了改变。SOX9 是重要的促进软骨形成的转录因子。有研究发现生长板软骨中的肥大软骨细胞中 SOX9 的表达被抑制,但是在健康关节软骨中的永久性软骨细胞中正常表达^[29]。ACAN 是终板软骨细胞的重要组成部分,它和 SOX9 是代表终板软骨细胞合成代谢的重要指标。我们的研究发现,雌激素缺乏会抑制二者的表达,进而抑制软骨终板合成。软骨终板的 MMP13 和 ADAMTS-5 会对软骨终板细胞外基质的降解产生重要影响,二者会导致 II 型胶原表达的减少和糖胺聚糖的流失^[30],除此之外,还会引起 X 型胶原的表达增加。作为软骨细胞的肥大标志物,X 型胶原的增多已被发现是软骨终板发生钙化的重要特征之一。本研究结果显示,雌激素缺乏会导致终板软骨细胞 MMP13、ADAMTS-5 和 COL-X 的基因表达上调,促进软骨终板的基质降解和肥大分化。

综上所述,雌激素缺乏会使终板软骨细胞活力降低,细胞骨架发生重排紊乱,抑制终板软骨细胞合成,促进细胞外基质降解和细胞肥大分化,其中机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wilkinson HN, Hardman MJ. The role of estrogen in cutaneous ageing and repair [J]. *Maturitas*, 2017, 103: 60-64.
- [2] Trenti A, Tedesco S, Boscaro C, et al. Estrogen, angiogenesis, immunity and cell metabolism: solving the puzzle [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 859.

- [3] Muscat BY. Menopause and the intervertebral disc [J]. Menopause, 2017, 24(10): 1118–1121.
- [4] Hussain SM, Cicuttini FM, Alyousef B, et al. Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review [J]. Climacteric, 2018, 21(2): 132–139.
- [5] Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2012, 41(3): 475–486.
- [6] Pizzato S, Trevisan C, Lucato P, et al. Identification of asymptomatic frailty vertebral fractures in post-menopausal women [J]. Bone, 2018, 113: 89–94.
- [7] Moore RJ. The vertebral endplate: disc degeneration, disc regeneration [J]. Eur Spine J, 2006, 15 (Suppl 3): S333–S337.
- [8] Luo L, Jian X, Sun H, et al. Cartilage endplate stem cells inhibit intervertebral disc degeneration by releasing exosomes to nucleus pulposus cells to activate Akt/autophagy [J]. Stem Cells, 2021, 39(4): 467–481.
- [9] Sun Q, Tian FM, Liu F, et al. Denosumab alleviates intervertebral disc degeneration adjacent to lumbar fusion by inhibiting endplate osteochondral remodeling and vertebral osteoporosis in ovariectomized rats [J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 152.
- [10] Breu A, Sprinzing B, Merkl K, et al. Estrogen reduces cellular aging in human mesenchymal stem cells and chondrocytes [J]. J Orthop Res, 2011, 29(10): 1563–1571.
- [11] 于斐, 曾晖, 于红燕, 等. 软骨细胞特殊染色技术的比较与应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 58–61, 75, 89.
- [12] Patel S, Homaei A, Raju AB, et al. Estrogen: the necessary evil for human health, and ways to tame it [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 403–411.
- [13] Collins BC, Laakkonen EK, Lowe DA. Aging of the musculoskeletal system: How the loss of estrogen impacts muscle strength [J]. Bone, 2019, 123: 137–144.
- [14] Rettberg JR, Yao J, Brinton RD. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body [J]. Front Neuroendocrinol, 2014, 35(1): 8–30.
- [15] Song HJ, Kim TH, Lee HH, et al. Cell therapy products in Alzheimer's disease [J]. J Menopausal Med, 2017, 23(1): 1–4.
- [16] Mei R, Lou P, You G, et al. 17 β -Estradiol induces mitophagy upregulation to protect chondrocytes via the SIRT1-mediated AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 615250.
- [17] Xu X, Li X, Liang Y, et al. Estrogen modulates cartilage and subchondral bone remodeling in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoarthritis [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 3146–3153.
- [18] Shi S, Zheng S, Li XF, et al. The effect of estradiol on the growth plate chondrocytes of limb and spine from postnatal mice *in vitro*; the role of estrogen-receptor and estradiol concentration [J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(1): 100–109.
- [19] Jiang L, Shen X, Wei L, et al. Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-CT and histomorphometric analysis [J]. J Oral Pathol Med, 2017, 46(5): 398–404.
- [20] Xiao ZF, He JB, Su GY, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice [J]. Arthritis Res Ther, 2018, 20(1): 207.
- [21] Svitkina T. The actin cytoskeleton and actin-based motility [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(1): a018267.
- [22] Svitkina TM. Ultrastructure of the actin cytoskeleton [J]. Curr Opin Cell Biol, 2018, 54: 1–8.
- [23] Rock MJ, Holden P, Horton WA, et al. Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and α V β 3 integrin [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 338(1–2): 215–224.
- [24] Woods A, Wang G, Beier F. Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions [J]. J Cell Physiol, 2007, 213(1): 1–8.
- [25] Li G, Song X, Li R, et al. Zyxin-involved actin regulation is essential in the maintenance of vinculin focal adhesion and chondrocyte differentiation status [J]. Cell Prolif, 2019, 52(1): e12532.
- [26] Lauer JC, Selig M, Hart ML, et al. Articular chondrocyte phenotype regulation through the cytoskeleton and the signaling processes that originate from or converge on the cytoskeleton: towards a novel understanding of the intersection between actin dynamics and chondrogenic function [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(6): 3279.
- [27] Killion CH, Mitchell EH, Duke CG, et al. Mechanical loading regulates organization of the actin cytoskeleton and column formation in postnatal growth plate [J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(14): 1862–1870.
- [28] Wang Y, Zhang M, Huan Z, et al. FSH directly regulates chondrocyte dedifferentiation and cartilage development [J]. J Endocrinol, 2021, 248(2): 193–206.
- [29] Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage [J]. Connect Tissue Res, 2017, 58(1): 2–14.
- [30] Wang G, Huang K, Dong Y, et al. Lycorine suppresses endplate-chondrocyte degeneration and prevents intervertebral disc degeneration by inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(3): 1252–1269.

[收稿日期] 2022-01-19

党翠, 陆佳涵, 魏强, 等. 烟酰胺(NAM)对 SIV/SHIV 感染猴 CD4⁺T 细胞中潜伏病毒的激活作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 23-28, 46.

Dang C, Lu JH, Wei Q, et al. Reactivation effect of NAM on latent reservoir in CD4⁺T cells from SIV/SHIV-infected monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 23-28, 46.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 004

烟酰胺(NAM)对 SIV/SHIV 感染猴 CD4⁺T 细胞中 潜伏病毒的激活作用研究

党 翠, 陆佳涵, 魏 强, 薛 婧*, 丛 喆*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨烟酰胺(NAM)对 SIV/SHIV 感染猴 CD4⁺T 细胞中潜伏病毒的激活效果及其机制。**方法** 采集血浆病毒载量长期阴性的 SIV/SHIV 感染猴外周血, 分选 CD4⁺T 细胞, 分别加入 NAM、GS-9620、Prostratin 等潜伏感染激活剂, 检测细胞上清病毒载量, 流式分析 CD4⁺T 细胞的表面活化分子 CD69、CD38、HLA-DR 以及辅助受体 CXCR4、CCR5 的表达情况, 蛋白质印迹法(Western blot)检测核内抗原 SIRT1 表达量的变化。**结果** NAM 对 SIV/SHIV 感染猴 CD4⁺T 细胞中潜伏病毒具有一定的激活效果, 与 GS-9620 联合使用, 可以更大程度的激活潜伏病毒。同时, 并不引起 T 细胞广泛活化, 虽小幅上调辅助受体 CXCR4 的表达, 但并不影响 CCR5 的表达, 可以显著降低细胞核内抗原 SIRT1 的表达。**结论** NAM 可以作为潜伏感染激活剂的一个选择。

【关键词】 烟酰胺; GS-9620; 潜伏感染激活剂; SIV; SHIV; 潜伏库

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0023-06

Reactivation effect of NAM on latent reservoir in CD4⁺T cells from SIV/SHIV-infected monkeys

DANG Cui, LU Jiahuan, WEI Qiang, XUE Jing*, CONG Zhe*

(Peking Union Medical College (PUMC) & Institute of Laboratory Animal Science, Comparative Medicine Center, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State administration of Traditional Chinese medicine; Beijing Key Laboratory for Animal Models of Emerging and Remerging Infectious Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the reactivation effect of nicotinamide (NAM) on latent virus in SIV/SHIV-infected monkey CD4⁺T cells. **Methods** Peripheral blood from five SIV/SHIV-infected rhesus monkeys was collected with undetectable virus loads for at least half a year. CD4⁺T cells were sorted and treated with latency-reversing agents accompanied by monitoring of viral loads in supernatants and changes in activated T cell surface markers and coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4⁺T cells. Changes in nuclear antigen SIRT1 were detected by Western blot. **Results** NAM had a good activation effect on latent virus in SIV/SHIV-infected monkey CD4⁺T cells and reached a higher level combined with GS-9620. This did not cause extensive activation of T cells and had no influence on CCR5 expression, while CXCR4 expression was slightly upregulated. NAM significantly reduced expression of nuclear antigen SIRT1. **Conclusions** NAM is a good choice for a latency-reversing agent.

【Keywords】 NAM; GS-9620; latency-reversing agent; SIV; SHIV; latent reservoir

【基金项目】 国家自然科学基金(81971944); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(2021-I2M-1-037)。

【作者简介】 党翠(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物病毒学研究。E-mail: dangcui@cnilas.org

【通信作者】 丛喆(1972—), 女, 副主任技师, 研究方向: 实验动物病毒学和模型研究。E-mail: congz@cnilas.org

薛婧(1983—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 艾滋病动物模型研究。E-mail: xuejing@cnilas.org * 共同通信作者

由于病毒潜伏库的持续存在,艾滋病迄今无法实现彻底治愈^[1-3]。“柏林病人”和“伦敦病人”的成功由于其特殊性而难以复制^[4]。而此时“圣保罗病人”的出现,给通过药物治疗实现艾滋病功能性治愈带来了希望。Jon^[5]通过施行“shock and kill”这一策略,在抗逆转录病毒治疗(antiretroviral therapy, ART)治疗同时,服用了烟酰胺(NAM),用来激活病毒潜伏库,在停药后一年时间内都未出现病毒反弹。这一结果显然是具有积极意义的。NAM 作为维生素 B3 的酰胺化合物^[6],其生物安全性较高,如果可以作为病毒潜伏感染激活剂,将是非常好的选择。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级中国恒河猴 6 只,体重 5~10 kg,年龄 5~8 岁,2 只雌性,4 只雄性,购自北京协尔鑫生物资源研究所[SCXK(京)2015-0011]。实验动物流程操作经本单位实验动物福利伦理委员会审批(XJ19007、XJ19003),在本单位生物安全三级实验室[SYXK(京)2017-0027]进行,严格遵守 3R 原则。6 只恒河猴中除 1 只正常恒河猴外,其余 5 只均曾感染 SIV 或 SHIV_{SF162P3},目前血浆病毒载量呈阴性。

1.1.2 细胞

SIV/SHIV_{SF162P3}感染恒河猴和正常恒河猴的外周血单核淋巴细胞(PBMC)。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 潜伏感染激活剂

NAM (Cat. N0636)、Prostratin (Cat. P0077) 和 PHA-P (Cat. L1668) 购自 sigma 公司;GS-9620 (Cat.

S7221) 购自 selleck 公司;IL-2 (Cat.202-IL-050) 购自 R&D 公司。

1.2.2 抗体

使用抗体详细信息见表 1。

1.2.3 其他试剂

CCK8 试剂盒 (Cat.C0038)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Cat.P0010) 和 BeyoGel™ Plus PAGE 预制胶 (Tris-Gly, 4%~15%, 10 孔) (Cat.P0645S) 购自碧云天公司;CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Cat. 130-092-144) 和 LS 柱 (Cat.130-042-401) 购自 Miltenyi Biotec 公司;PMSF (Cat. P0100)、高效 RIPA 组织裂解液 (Cat.R0010) 购自索莱宝公司。

1.2.4 仪器

美国 BD FACS Aria II 分选型流式细胞仪;美国 BD Accuri C6 Flow Cytometry 流式细胞仪;美国 ABI 7500 Real time PCR 仪;美国 Bio-Rad PowerPac™ 基础电泳仪和 ChemiDoc™ XRS⁺ 成像仪;日本 Nikon TS100 显微镜。

1.3 实验方法

1.3.1 PBMC 的分离

采集 EDTA 抗凝的猴外周血,利用 Ficoll 分离 PBMC,计数,备用^[7]。

1.3.2 CCK8 法测定药物对细胞的半数毒性浓度 (CC₅₀)

药物用 DMSO 溶解,然后稀释到起始工作浓度。NAM 为 200 mmol/L,Prostratin 为 500 μmol/L,GS-9620 为 48.6 μmol/L。然后分别用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 生长液进行 10 倍系列稀释,即原倍、1:10、1:100……,共 8 个浓度,每个浓度 4 个复孔,每孔 100 μL。每孔再加入 100 μL 浓度为每毫升 1×

表 1 抗体一览表
Table 1 List of antibodies

抗体 Antibody	克隆号 Clone	货号 Cat No.	公司 Company
BV605 Mouse Anti-human CD3	SP34-2	562994	BD
Brilliant Violet 785™ Anti-human CD4 Antibody	OKT-4	317442	Biolegend
Brilliant Violet 421™ Anti-human CD69 Antibody	FN50	310930	Biolegend
FITC Anti-human CD38 Antibody	AT-1	60131FI	Stemcell
BV510 Mouse Anti-human HLA-DR	G46-6	563083	BD
PE Mouse Anti-human CD3	SP34-2	552127	BD
FITC anti-human CD4 Antibody	OKT-4	317408	Biolegend
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD184 (CXCR4) Antibody	12G5	306516	Biolegend
Alexa Fluor® 647 anti-human CD195 (CCR5) Antibody	HEK/1/85a	313712	Biolegend
SIRT1 Monoclonal antibody	1F3	MA5-15677	Thermo Fisher
GAPDH Rabbit mAb	14C10	2118S	Cell Signaling Technology

10^7 PBMC 细胞悬液, 37°C 、5% CO_2 培养。3 d 后, 每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 培养箱内孵育 2.5 h, 测定吸光 (A) 值, 计算细胞存活率, 即: $\text{Cell viability} (\%) = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ [8-9]; 其中, $A_{\text{空白}}$ 孔含培养基和 CCK8, $A_{\text{对照}}$ 孔含细胞、CCK8, $A_{\text{实验}}$ 孔含细胞、CCK8、NAM 溶液 [8-9]。用 Graphpad Prism 8.0 计算药物的 CC_{50} , 以确定后续实验安全用药浓度。

1.3.3 CCK8 法测定细胞生长曲线

利用 1 mmol/L NAM 处理 PBMC, 分别在 0、2、4、6、8、10 d 利用 CCK8 检测吸光 (A) 值, 4 个复孔。观察细胞增殖情况, 确定后续实验培养时间 [10]。

1.3.4 CD4^+ T 细胞的分选

取出所需数量的 PBMC, 加入 CD4^+ T cell Biotin Antibody cocktail, 4°C 孵育 10 min。加入 Anti-Biotin Microbeads, 4°C 孵育 15 min, 然后将 LS 柱吸附于 MACS 分选器上, 将细胞过柱进行分选。

1.3.5 不同组合的潜伏感染激活剂刺激细胞

将分选得到的 CD4^+ T 细胞, 用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 生长液稀释为每毫升 2×10^6 个细胞, 每孔加入 500 μL 。之后加入稀释好的潜伏感染激活剂 500 μL , 同时设立不加潜伏感染激活剂的空白对照。最终药物浓度分别为: NAM (1 mmol/L)、PHA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、IL-2 (20 ng/mL)、GS-9620 (24.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、Prostratin (250 nmol/L)。培养时间为 6 d。第 6 天收取细胞培养上清, 测定病毒载量。此外, 在 0、2、4、6 d 收取细胞, 进行后续的流式实验。另外, NAM 刺激 2 d 后, 收取细胞, Western blot 检测 CD4^+ T 细胞核内抗原 SIRT1 的表达。

1.3.6 病毒载量的测定

从上清中提取病毒 RNA, 使用 Real time RT-PCR 法测定病毒载量 [11]。

1.3.7 流式方法检测 CD4^+ T 细胞表面活化分子的变化 [7]

在流式管管底加入细胞, 然后加入 CD69-BV421、CD3-BV605、CD38-FITC、CD4-BV785、HLA-DR-BV510, 4°C 孵育 30 min 后, 1% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 重悬, 过滤, 上机检测。

1.3.8 流式方法检测 T 细胞表面 CD4、CXCR4 和 CCR5 的变化

将 NAM 作用后的 CD4^+ T 细胞加入流式管中, 再加入 CXCR4-PerCP/Cy5.5、CD3-PE、CCR5-Alexa Fluor® 647、CD4-FITC, 4°C 孵育 30 min 后, PBS 重悬, 上机检测。

1.3.9 Western blot 检测 CD4^+ T 细胞核内抗原 SIRT1 的表达

收取 NAM 作用 2 d 的 CD4^+ T 后, 利用 RIPA 缓冲液和 PMSF (50:1) 提取总蛋白, 测浓度。取 20 μg 的待测样本进行 PAGE 凝胶电泳, 电转于 PVDF 膜上。封闭后, 加入 SIRT1 抗体 (1:1500) 4°C 孵育过夜, 之后加入二抗 (1:3000; ZB-2305) 室温下孵育 1 h。内参蛋白 GAPDH (1:1000) 与 SIRT1 蛋白相同条件孵育过夜, 之后加入二抗 (1:3000; ZB-2301) 室温下孵育 1 h [12]。增强发光法显色, ImageJ 软件获取图像。蛋白表达量 = 蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

流式实验分别使用 BD Arial II 和 BD Accuri C6 流式细胞仪进行样品分析, 利用 Flowjo 10 软件对数据进行处理; 本研究所有数据采用 Graphpad 8.0 进行绘图和数据统计。实验结果均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, ns 为 $P > 0.05$, 表示无统计学差异, $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$, 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 NAM 对细胞活力的影响

正常猴 PBMC 经不同浓度的 NAM 刺激 3 d 后, 细胞存活率出现了不同程度的变化。NAM 浓度 ≤ 1 mmol/L 时, 其细胞存活率均在 80% 以上, 而当 NAM 浓度 ≥ 10 mmol/L 时, 细胞存活率急速骤降至 20% 以下 (图 1A), 计算得到 NAM 的 CC_{50} 为 4.01 mmol/L, 选定最大无毒浓度 1 mmol/L 进行后续刺激实验。

利用 1 mmol/L NAM 刺激 PBMC 后, 每 2 d 检测细胞生长情况。对照组和 NAM 组细胞增殖变化趋势基本一致, 在 2 d 内都有一个升高的过程, 之后开始缓慢下降。可以看出, 1 mmol/L NAM 在 6 d 内, 对细胞增殖无抑制作用, 且 NAM 组与对照组比较, 在 2、4、6 d 增长幅度分别提高了 $(4.00 \pm 0.11)\%$ 、 $(22.15 \pm 0.10)\%$ 、 $(13.30 \pm 0.15)\%$ 。在第 6 天后, 细胞生长状况逐渐变差 (图 1B)。

2.2 不同潜伏感染激活剂对 SIV/SHIV 感染猴外周血 CD4^+ T 细胞中潜伏病毒的激活效果比较

感染猴在不同时间多次采集外周血, 分离 CD4^+ T 细胞, 经不同组合的潜伏感染激活剂作用后, 部分样本培养上清中病毒载量检测呈阳性。与此同时, 所有样本中不加潜伏感染激活剂的对照检测均为阴性, 即上清中没有检测到病毒。其中, PHA+IL-2 组阳性率最低, 只有 2 个病毒载量检测阳性, 为

14.29%, NAM 单药组为 28.57%, Prostratin 单药组为 35.71%, GS-9620 单药组最高, 达到 71.43%。NAM 和其他 3 种潜伏感染激活剂联合组中, NAM+Prostratin 组和 NAM+GS-9620 组与 Prostratin 组和 GS-9620 单药组的阳性率一致, 而 NAM+PHA+IL-2 组阳性率则提高到 35.71%, 明显高于两个单药组 28.57% 和 14.29% 的阳性率。各组之间阳性率进行卡方检验, 有显著性差异 ($P<0.001$) (表 2)。

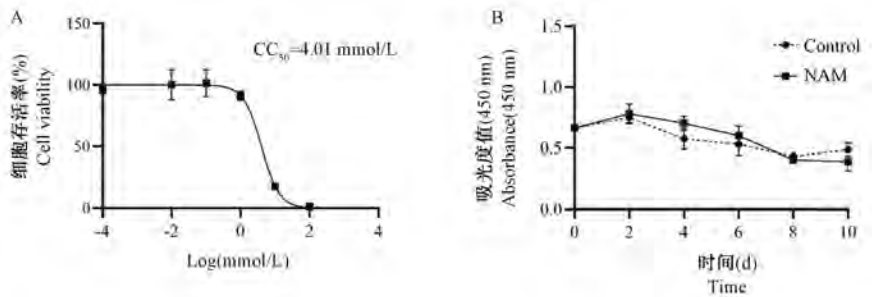
所有样本经不同潜伏感染激活剂作用后, 上清中的载量通常在 $10^2 \sim 10^4$ copies/mL 之间。其中, PHA+IL-2 组病毒载量平均值最低, 为 $1.64\text{E}+02$ copies/mL, NAM 单药组为 $2.38\text{E}+02$ copies/mL, Prostratin 单药组为 $4.02\text{E}+02$ copies/mL, GS-9620 单药组最高, 达到 $9.85\text{E}+02$ copies/mL。NAM 和其他 3 种潜伏感染激活剂联合组中, NAM+Prostratin 组与和 Prostratin 组相比变化不大, 其余两组与单药组比都有不同程度的升高。PHA+IL-2 组载量均值为 $1.64\text{E}+02$ copies/mL, 而 NAM+PHA+IL-2 组提高到 $4.12\text{E}+02$ copies/mL; GS-9620 组载量均值为

$9.85\text{E}+02$ copies/mL, NAM+GS-9620 组提高到 $2.12\text{E}+03$ copies/mL (图 2)。

2.3 NAM 对 CD4⁺T 细胞活化的影响

正常猴 PBMC 经刺激后, 流式结果显示: 对照组和 NAM 组 CD4⁺T 细胞在培养 6 d 内, 活化分子 CD69、CD38 和 HLA-DR 的表达量及变化趋势基本一致, 仅 NAM 组 CD38 在第 2 天的表达量略高于对照组, 对照组 (53.53 ± 2.96)%, NAM 组 (59.6 ± 0.37)%。PHA+IL-2 可刺激 T 细胞活化, 作为 T 细胞活化标志物的阳性对照组。样本经 PHA+IL-2 刺激后 CD69、CD38、HLA-DR 表达量均有明显上调 (图 3A)。

将作用 2 d 的 CD4⁺T 细胞表面活化分子的表达量进行组间比较发现, NAM 组与对照组 3 个活化分子 CD69、CD38 和 HLA-DR 的表达量对比, 均无统计学差异, PHA+IL-2 组与对照组对比皆有显著性差异, 其中, CD69 的表达量差异性 $P<0.01$, CD38 的表达量差异性 $P<0.01$, HLA-DR 的表达量差异性 $P<0.001$ (图 3B)。



注: A: PBMC 经不同浓度的 NAM 作用 3 d 后细胞存活率的变化; B: 1 mmol/L NAM 刺激 PBMC 后, 不同时间细胞存活率的变化。
图 1 NAM 对 PBMC 存活率的影响 ($n=4$)

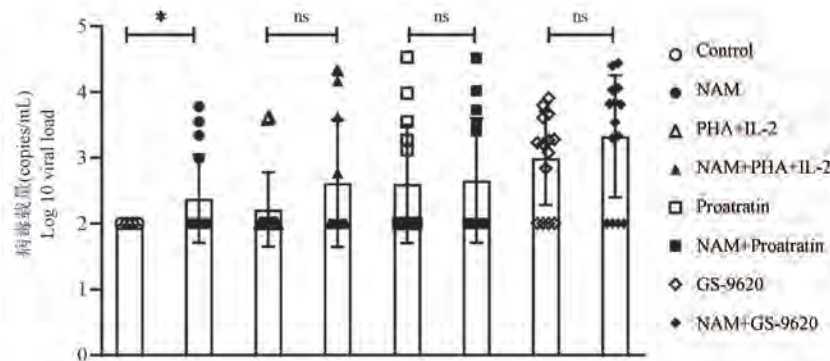
Note. A, Changes in viability after treated with different concentrations of NAM for 3 d. B, Changes in viability at different times after treated with 1 mmol/L NAM.

Figure 1 Changes of survival rate of PBMC treated with NAM

表 2 潜伏感染激活剂组阳性率比较

Table 2 Comparison of positive rate of latency-reversing agent group							
组别 Groups	合计 Total	阳性 Positive	阳性率 Ratio	χ^2	P 值 P value	组间比较 Differences among groups	P 值 P value
Control	14	0	0	26.124 ^a	<0.001	/	/
NAM	14	4	28.57%			Control vs NAM	0.098
PHA+IL-2	14	2	14.29%			Control vs PHA+IL-2	0.481
NAM+PHA+IL-2	14	5	35.71%			Control vs NAM+PHA+IL-2	<0.05 ^b
Prostratin	14	5	35.71%			Control vs Prostratin	<0.05 ^b
NAM+Prostratin	14	5	35.71%			Control vs NAM+Prostratin	<0.05 ^b
GS-9620	14	10	71.43%			Control vs GS-9620	<0.001
NAM+GS-9620	14	10	71.43%			Control vs NAM+GS-9620	<0.001

注: ^a: Pearson 卡方检验; ^b: fisher's 确切概率法。
Note. ^a, Pearson chi-square test. ^b, Fisher's exact probability method.

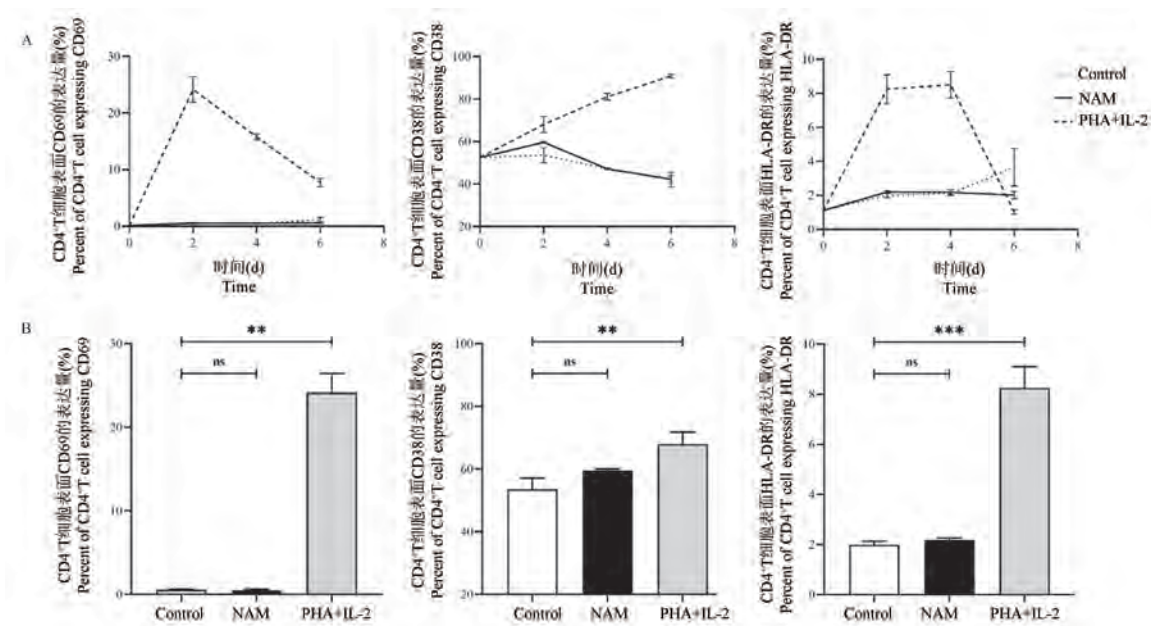


注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图2 不同潜伏感染激活剂对 SIV/SHIV 感染猴外周血 CD4⁺T 细胞中潜伏病毒的激活效果比较($n = 14$)

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

Figure 2 Comparison of reactivation effect on latent reservoir in CD4⁺T cells from SIV/SHIV-infected maceques by different LRAs



注:A:作用不同时间,CD4⁺T 细胞表面活化分子 CD69、CD38 和 HLA-DR 表达量的变化;B:作用 2 d 后,CD4⁺T 细胞表面活化分子 CD69、CD38、HLA-DR 表达量的差异分析。与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 NAM 对 CD4⁺T 细胞表面活化分子 CD69、CD38 和 HLA-DR 的影响($n = 3$)

Note. A, Expression levels of CD69, CD38 and HLA-DR on the surface of CD4⁺T cells after treated with NAM. B, Comparison of expression levels treated with NAM and PHA+IL-2. Compared with Control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Changes of activated T cell surface marker CD69, CD38 and HLA-DR on CD4⁺T cell after treated with NAM

2.4 NAM 对 CD4⁺T 细胞表面辅助受体 CXCR4、CCR5 表达的影响

对正常猴 PBMC 作用 2 d 后,阴性对照组、NAM 组和 Prostratin 组 CXCR4 表达量分别为 (25.03 ± 0.19)%、(27.33 ± 0.78)%、(7.58 ± 0.56)%; CCR5 表达量分别为 (5.00 ± 0.37)%、(5.66 ± 0.79)%、(0.31 ± 0.05)%。与对照组相比,Prostratin 显著下调辅助受体 CXCR4、CCR5 的表达 ($P < 0.001$),而

NAM 组均稍高于对照组。其中,CXCR4 的表达量的增加具有统计学差异 ($P < 0.05$) (图 4)。

2.5 NAM 对 CD4⁺T 细胞核内抗原 SIRT1 表达量的影响

正常猴 CD4⁺T 细胞经 NAM 作用 2 d 后,SIRT1 蛋白表达量明显下降 (图 5A),为对照组表达量的 (46.85 ± 22.50)%。与对照组相比,具有统计学差异 ($P < 0.05$) (图 5B)。

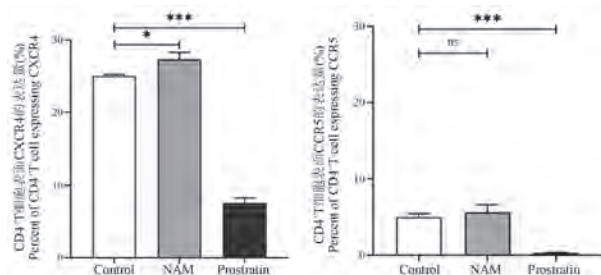


图 4 NAM 对 CD4⁺T 细胞表面辅助受体表达情况的影响 (n=3)

Figure 4 Effects of co-receptor on CD4⁺T cells treated with NAM

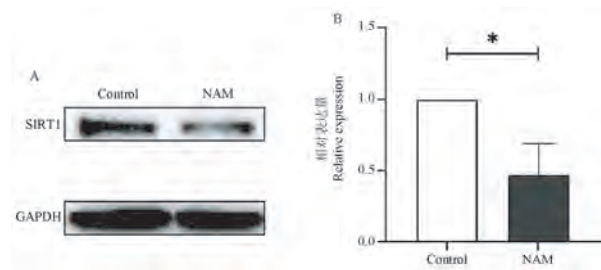


图 5 NAM 对 CD4⁺T 细胞中 SIRT1 的表达量的变化 (n=3)

Figure 5 Effects of NAM on SIRT1 expression in CD4⁺T cells

3 讨论

烟酰胺 (NAM), 是维生素 B3 的酰胺化合物, 其生物安全性较高, 体外利用 NAM 激活 HIV 潜伏库, 显示出较好的病毒激活效果^[13]。临床实验中, Diaz 团队发现在 ART 治疗同时, 加服 NAM 的 5 名艾滋病患者之一, 即“圣保罗病人”, 在停药后, 病毒反弹延迟了 66 周, 这说明烟酰胺可能激活潜伏库细胞的病毒表达, 而当这些细胞产生新的病毒时, 就会发生凋亡或者被宿主免疫系统杀伤, 从而减小了潜伏库, 进而延迟了病毒反弹^[5,14]。

本研究尝试利用病毒载量持续阴性的感染猴的 CD4⁺T 细胞来研究 NAM 对病毒潜伏库的激活作用^[15-16]。研究发现, 经 NAM 刺激后, 病毒潜伏库一定程度上被激活。虽然相较于成熟的 TLR7 激动剂 GS-9620^[17], 激活效果还有差距, 但 NAM 和 GS-9620 联用, 能够更大程度地激活病毒潜伏库, 提高培养上清中的病毒载量水平。NAM+PHA+IL-2 组相比 NAM 组和 PHA+IL-2 组, 也能看到类似的协同效应。

在激活病毒潜伏库的同时, NAM 并没有引起 T 细胞的广泛活化, 提示其具有较好的安全性。目前的潜伏感染激活剂中, 一些激活剂, 如 PKC 激动剂, 由于具有广泛的非特异性 T 细胞活化, 可引起机体的不良反应, 从而使得其难以在临床应用^[18]。此

外, 某些激活剂, 如 Prostratin 可通过下调 CD4、CXCR4 以及 CCR5 的表达来增强抗病毒活性^[19]。NAM 对 CCR5 的表达没有影响, 只略微上调 CXCR4 的表达, 这需要在应用过程中加以注意。

关于 NAM 激活潜伏库细胞病毒表达的机制, 尚未见报道。目前, 潜伏感染激活剂的药物, 主要有以下几种类型: TLR7 激动剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi)、甲基化酶抑制剂 (MTi)、蛋白酶 C 激活剂 (PKC)、T 细胞激活剂等。其中, HDACi 研究较为广泛。SIRT1 属于 HDAC III 类家族, 兼有组蛋白和非组蛋白去乙酰化酶活性^[20-21]。有文献证实, 当 SIRT1 被抑制后, 去乙酰化作用将会受到抑制, 从而导致 NF-κB 持续活化^[22], 进而活化 T 细胞激活 HIV 基因组表达^[23]。NAM 是 SIRT1 的抑制剂^[24-25], 而这也可能是 NAM 激活潜伏库病毒表达的机制, 但 NAM 激活病毒潜伏库的表达是否还有其他的作用机制, 仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Li X, Liu Z, Li Q, et al. CD161⁺ CD4⁺T cells harbor clonally expanded replication-competent HIV-1 in antiretroviral therapy-suppressed individuals [J]. mBio, 2019, 10 (5): e02121-e02140.
- [2] Elsheikh MM, Tang Y, Li D, et al. Deep latency: A new insight into a functional HIV cure [J]. EBioMedicine, 2019, 45: 624-629.
- [3] Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E. Understanding HIV latency: the road to an HIV cure [J]. Annu Rev Med, 2015, 66: 407-421.
- [4] Hutter G. More on shift of HIV tropism in stem-cell transplantation with CCR5 delta 32/delta 32 mutation [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (25): 2437-2438.
- [5] Jon Cohen. An intriguing—but far from proven—HIV cure in the ‘São Paulo Patient’ [EB/OL]. [2020-07-07]. <http://www.sciencemag.org/news/2020/07/intriguing-fair-prouen-hiv-cure-soo-paulo-patient>.
- [6] 陈兰兰, 罗丽花, 管保章, 等. 烟酰胺治疗维持性透析患者高磷血症的安全性及有效性 Meta 分析 [J]. 内科, 2016, 11 (3): 361-365.
- [7] 李国萃, 陆佳涵, 卢秋翰, 等. 诱导刺激猴外周血单核淋巴细胞亚群活化增殖研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (5): 1-6.
- [8] 蔡文涛. MTT 法和 CCK-8 法检测中药抗病毒活性成分细胞毒性的比较 [J]. 湖北大学学报 (自然科学版), 2017, 39 (3): 305-310.

(下转第 46 页)

刘俊, 孙佳, 刘维静, 等. *Apbb1* 基因对心肌细胞增殖影响的探究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 29–38.
Liu J, Sun J, Liu WJ, et al. The effect of *Apbb1* gene on cardiomyocyte proliferation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 29–38.
doi: 10. 3969/j.issn.1671–7856. 2022. 05. 005

Apbb1 基因对心肌细胞增殖影响的探究

刘俊¹, 孙佳², 刘维静³, 郝琰琰¹, 廉虹^{3*}, 王玉瑶^{1*}

(1.山西医科大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室,太原 030000;2.河北燕达陆道培医院检验科,河北 廊坊 065201;3.中国医学科学院,北京协和医学院,国家心血管病中心,动物实验中心,心血管植入材料临床前研究评价北京市重点实验室,北京 102300)

【摘要】目的 探究 β 淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白 B-1(*Apbb1*) 基因对 H9c2 心肌细胞增殖的影响。**方法** 利用小干扰 RNA 与 pcDNA3.1⁺ 质粒对 H9c2 心肌细胞系进行敲低与过表达 *Apbb1* 基因处理,通过 CCK8 实验、qPCR 实验以及细胞免疫荧光实验检测细胞增殖情况,评价 *Apbb1* 基因对心肌细胞增殖的作用;利用在线数据库 String 分析 APBB1 蛋白的互作蛋白,探究其可能发挥作用的方式。实验分为 4 组:敲低对照组、敲低 *Apbb1* 组、过表达对照组和过表达 *Apbb1* 组。**结果** 相较于敲低对照组,敲低 *Apbb1* 组 *Apbb1* 基因表达下降 52% ($P < 0.01, n = 3$),细胞增殖在 48 h 时下降 44% ($P < 0.01, n = 3$),但是在 72 h 时细胞增殖增加 86% ($P < 0.0001, n = 3$);细胞周期相关基因 *Ccnb1* 和 *Ccna2* mRNA 表达水平分别升高 80% ($P < 0.0001, n = 3$) 和 76% ($P < 0.0001, n = 3$);细胞免疫荧光实验发现 PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别增加 4.33% ($P < 0.01, n = 3$) 和 4.67% ($P < 0.05, n = 3$)。相较于过表达对照组,过表达 *Apbb1* 组 *Apbb1* 基因表达上调 119 倍 ($P < 0.001, n = 3$),细胞增殖在 48 h 与 72 h 分别降低 1.23 倍 ($P < 0.0001, n = 3$) 和 1.04 倍 ($P < 0.0001, n = 3$);细胞增殖标志分子 Ki67 和细胞周期相关基因 *Ccnb1* 和 *Ccna2* mRNA 表达水平分别降低 25% ($P < 0.01, n = 3$)、72% ($P < 0.001, n = 3$) 和 38% ($P < 0.001, n = 3$);PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别降低 3.7% ($P < 0.01, n = 3$) 和 4.36% ($P < 0.05, n = 3$)。蛋白互作网络分析结果表明 KAT5、APP 与 APLP2 是 APBB1 互作最为显著的蛋白。**结论** 敲低 *Apbb1* 基因促进 H9c2 心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制 H9c2 心肌细胞增殖,*Apbb1* 可能通过影响细胞周期 G2/M 期影响心肌细胞增殖,KAT5 蛋白可能与 APBB1 蛋白互作影响心肌细胞增殖。

【关键词】 H9c2 心肌细胞;*Apbb1*;增殖;蛋白互作网络分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0029-10

The effect of *Apbb1* gene on cardiomyocyte proliferation

LIU Jun¹, SUN Jia², LIU Weijing³, HAO Yanyan¹, LIAN Hong^{3*}, WANG Yuyao^{1*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China. 2. Department of Laboratorial Medicine, Hebei Yanda LU Dao-Pei Hospital, Langfang 065201. 3. Beijing Key Laboratory of Preclinical Research and Evaluation for Cardiovascular Implant Materials, Animal Experimental Centre, Fuwai Hospital, National Centre for Cardiovascular Disease, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 102300)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81500364,81900343);山西省重点研发计划项目(201903D321091)。

【作者简介】 刘俊(1995—),男,硕士研究生,研究方向:心脏再生。E-mail: 18131376169@163.com

【通信作者】 王玉瑶(1981—),女,博士,副教授,研究方向:心脏再生。E-mail: wyybio@163.com

廉虹(1982—),女,博士,助理研究员,研究方向:心血管疾病与心肌再生。E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the amyloid beta precursor protein binding protein B1 (*Apbb1*) gene on H9c2 cardiomyocyte proliferation and its potential mechanism. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were treated with small interfering RNA and pcDNA3.1⁺ plasmid for knockdown and overexpression of the *Apbb1* gene, and cell proliferation was detected by CCK8, qPCR and immunofluorescence assay, to evaluate the effect of this gene on cardiomyocyte proliferation. Next, the proteins interacting with the APBB1 protein were analyzed using the online database String to explore how APBB1 might function. In the experiment, four groups were established: knockdown control group, *Apbb1*-knockdown group, overexpression control group and *Apbb1*-overexpression group. **Results** Compared with that in the knockdown control group, expression of the *Apbb1* gene in the *Apbb1*-knockdown group decreased by 52% ($P < 0.05$, $n = 3$) and cell proliferation decreased by 44% at 48 h ($P < 0.01$, $n = 3$), but cell proliferation increased by 86% at 72 h ($P < 0.0001$, $n = 3$). The expression levels of *Ccnb1* and *Ccna2* mRNA were increased by 80% ($P < 0.001$, $n = 3$) and 76% ($P < 0.001$, $n = 3$), respectively. Immunofluorescence assay showed that PH3- and Aurora B-positive cells increased by 4.33% ($P < 0.01$, $n = 3$) and 4.67% ($P < 0.05$, $n = 3$). Compared with that in the overexpression control group, the expression of the *Apbb1* gene was upregulated 119-fold in the *Apbb1*-overexpression group ($P < 0.0001$, $n = 3$), and cell proliferation decreased by 1.23 times at 48 h ($P < 0.0001$, $n = 3$) and 1.04 times at 72 h ($P < 0.0001$, $n = 3$). The expression levels of *Ki67*, a marker of cell proliferation, and *Ccnb1* and *Ccna2* mRNA encoded by cell cycle-related genes were decreased by 25% ($P < 0.01$, $n = 3$), 72% ($P < 0.001$, $n = 3$), and 38% ($P < 0.001$, $n = 3$), respectively. Meanwhile, PH3- and Aurora B-positive cells decreased by 3.7% ($P < 0.01$, $n = 3$) and 4.36% ($P < 0.05$, $n = 3$), respectively. The result of protein interaction network analysis showed that KAT5, APP and APLP2 were the proteins that most significantly interacted with APBB1. **Conclusions** Knockdown of the *Apbb1* gene promotes the proliferation of H9c2 cardiomyocytes, while its overexpression inhibits their proliferation. *Apbb1* may affect the proliferation of cardiomyocytes by influencing the G2/M phase of the cell cycle and KAT5 may interact with APBB1 protein to affect cardiomyocyte proliferation.

【Keywords】 H9c2 cardiomyocyte; *Apbb1*; proliferation; protein interaction network analysis

目前,缺血性心脏病是导致人类死亡的首要病因,而心肌梗死是缺血性心脏病产生的主要原因之一^[1]。心肌梗死会导致大量的心肌细胞丢失,丢失的心肌细胞由于心肌细胞本身绝大部分都处于终末分化时期,不能通过剩余的心肌细胞增殖补充^[2]。因此,如何诱导已处于终末分化的心肌细胞增殖对于缺血性心脏病的治疗异常重要。

H9c2 心肌细胞是一种大鼠胚胎心脏来源的心肌细胞系,由于其具有与心肌细胞相似的特性,并且经济易得,所以研究人员经常用其作为研究心脏与心肌细胞相关通路的研究对象。相较于 H9c2 细胞,从小鼠与大鼠体内分离的原代心肌细胞虽然更能代表体内心肌细胞的状态,但原代心肌细胞分离过程不仅复杂,而且分离后的状态很难保证。利用状态不佳的原代心肌细胞进行研究很有可能会得出不正确的结果与结论。因此,可以将 H9c2 心肌细胞作为心肌细胞增殖研究的实验对象,用于解析心肌细胞增殖涉及的具体机制。

β 淀粉样蛋白前体蛋白结合蛋白 B-1 (APBB1) 是一种衔接蛋白,其主要在神经性疾病如阿尔兹海默症中被研究^[3]。然而, Mahmoud 等^[4]发现,在显著促进心肌细胞增殖的 Meis1 敲除小鼠心脏中,

Apbb1 mRNA 表达水平显著降低。此外, *Apbb1* 被视为心脏肥大的早期标志物^[5],而心脏肥大与心肌细胞肥大相关,心肌细胞肥大相关因子可能参与调控心肌细胞增殖^[6]。但是, *Apbb1* 是否在心肌细胞增殖过程中发挥一定的生物学功能,从而影响心肌细胞的增殖,目前无相关文献报道。

因此,本研究通过 siRNA 敲低技术与质粒过表达的方式改变了 H9c2 心肌细胞中 *Apbb1* 基因的表达量,探究了 *Apbb1* 基因对 H9c2 心肌细胞增殖的影响,并利用在线数据库 String 分析了 APBB1 蛋白的互作蛋白,发现其互作蛋白 KAT5 的转录水平与 *Apbb1* 的调控趋势变化一致。这可能为解析心肌细胞增殖的机制,促进对心脏再生的理解,以及治疗缺血性心脏病提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠胚胎心脏来源的 H9c2 心肌细胞系购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

Gibico 澳洲胎牛血清与 DMEM 高糖基础培养基均购自美国 Gibico 公司,澳洲胎牛血清货号为

10099-141C; lipo3000 转染试剂、Optimem-Medium 与 TRIzol 均购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; CCK8 增殖检测试剂盒购自博士德生物公司; qPCR 试剂盒购自北京聚合美生物公司; Aurora B 一抗购自 Abcam 公司, 货号为 Ab239837; PH3 一抗购自美国 Millipore 公司, 货号为 3377; 荧光二抗 Alexa Fluor 488 购自美国 Invitrogen 公司, 货号为 A1108; 敲低组使用的非特异性小干扰 RNA (NC) 与特异性的 si-*Apbb1* 均购自汉恒生物科技(上海)有限公司; 过表达组使用的 pcDNA3.1⁺ 空质粒与携带 *Apbb1* 基因的 pcDNA3.1⁺ 质粒均购自通用生物系统(安徽)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

用含 10% 血清与含 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基培养 H9c2 心肌细胞, 将细胞置于培养条件为 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

1.3.2 siRNA 转染及分组

取处于对数生长期的 H9c2 细胞 10⁵ 个, 接种至六孔板中, 待其生长至 70% 左右, 准备转染。转染方案确定前, 利用带荧光的 FAM siRNA 进行最佳 siRNA 转染浓度的摸索。具体摸索过程按照 siRNA 转染说明书所描述的进行, 固定 lipo3000 与 optimem-Medium 的用量, 对说明书推荐的 20、50 与 100 nmol/L 3 个浓度的 siRNA 进行转染。最终根据转染后细胞荧光强弱以及细胞状态, 确定 50 nmol/L 为最佳 siRNA 转染浓度, 50 nmol/L 在六孔板中对应的体积为 6.5 μL。正式转染时, 先分别配置转染复合物与敲低复合物。通过 6.5 μL lipo3000 与 125 μL Optimem-Medium 培养基配置转染复合物; 6.5 μL siRNA 与 125 μL Optimem-Medium 培养基配置敲低复合物。两种混合物配置完成之后, 室温静置 5 min。静置完成之后, 将两种混合物混匀, 室温再次静置 10 min, 然后再加入培养孔内, 开始转染。由于 lipo3000 对细胞生物毒性较小, 可以将转染处理时长延长至 12 h, 再将其传入 6 cm 皿中培养 36 h, 最后利用 qPCR 实验检测细胞转染效率。分组上, 将转染的组别按照所转染的 siRNA 不同分别设为 Si-NC 组、1Si-*Apbb1* 组、2Si-*Apbb1* 组和 3Si-*Apbb1* 组。Si-NC 组表示为转染非特异性小干扰 RNA 的对照组, 1Si-*Apbb1* 与 2Si-*Apbb1* 以及 3Si-*Apbb1* 组代表转染从公司购买的 3 组特异性针对 *Apbb1* 基因的 siRNA

序列的组。上述用到的 siRNA 具体序列如下(5'-3'), si-NC 正向: UUCUCCGAACGAACGUGUCACGUTT, 反向: ACGUGACACGUUCGGAGAATT; 1si-*Apbb1* 正向: CCUACGUAGCUCGAGAUAAATT, 反向: UUAUCUCGAGCUACGUAGGTT; 2si-*Apbb1* 正向: GCUCAAGUGCCACGUGUUUTT, 反向: AAACACGUGGCACUUGAGCTT; 3si-*Apbb1* 正向: CCCAGCACC AAAGAAUGAATTT, 反向: UUCAUUCUUUGGUGCU GGGTT; FAM siRNA 正向: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT, 反向: ACGUGACACGUUCGGAGAATT。

1.3.3 pcDNA3.1⁺ 质粒转染及分组

取处于对数生长期的 H9c2 细胞 10⁵ 个, 接种至六孔板中, 待其生长至 70% 左右, 准备转染。转染时, 首先配置转染复合物与过表达复合物。配置转染复合物需要加入 2 μL lipo3000 与 125 μL Optimem-Medium 培养基。配置过表达复合物需要加入 1 μg pcDNA3.1⁺ 的质粒与 2 μL P3000 以及 125 μL Optimem-Medium。配置完成之后, 先分别混匀室温静置 5 min, 然后再将两种混合物混合在一起, 室温静置 10 min。最后将混匀好的混合物分别加入相应的培养孔中, 开始转染。后续转染过程同 siRNA 转染过程, 最终利用 qPCR 实验检测细胞转染效率。根据转染的质粒不同, 将转染的组别分别设为 OE-NC 组与 OE-*Apbb1* 组, OE-NC 组代表转染 pcDNA3.1⁺ 空质粒的组, OE-*Apbb1* 组代表转染携带 *Apbb1* 基因的 pcDNA3.1⁺ 质粒的组。

1.3.4 利用 qPCR 法检测 *Apbb1* 转染效率与细胞增殖

转染完成之后, 首先利用 TRIzol 提取出 RNA, 再将 RNA 逆转录为 cDNA, 最后完成 qPCR 反应。TRIzol 提取 RNA 过程按照提取细胞 RNA 的方式进行提取, 逆转录以及 qPCR 反应的具体操作、具体条件以及具体参数均按照所用试剂对应的说明书指示进行。数据统计时, 以 *Gapdh* 为内参, 利用^{ΔΔ}CT 法定量分析 *Apbb1* 转染效率与细胞增殖相关基因的表达水平。上述实验所用相关引物序列如下(5'-3'): *Gapdh* 正向: CGCCTGGAGAAACCTGCC, 反向: GTAGGCCATGAGGTCCACCAC; *Apbb1* 正向: ACCTACTACTGGCACAATCCC, 反向: TCCTTCCTCAAAGCCTTCT; *Ccnb1* 正向: TCCCACACGGAGGAATCTCT, 反向: TCTGCAGACGAGGTAGTCCA; *Ki67* 正向: GCAAGAGGCAAATCATCCGAACCC, 反向: GAGAACCCTTGCCACTCTTCTGCCC; *PCNA* 正向: GCTGACAT

GGGACACTTA, 反向: CTCAGGTACAACTTGGTG;
Ccnd1 正向: GAGGAGCAGAAGTGCGAAGA, 反向:
 GGCGGATAGAGTTGTCTAGTGTAG; *Ccna2* 正向: AG
 CAGGAAGACCAGGAGAAT, 反向: GGTGAAGGCAG
 GCTGTTTA; *Kat5* 正向: CCTATAGCGCACTCAGCT
 CC, 反向: CGATTATCTCCCCACCTCC; *App* 正向:
 CCAACCGTGGCATCCTTTTG, 反向: GCGTCGACA
 GGCTCAACTTC; *Lrp1* 正向: GCGGTGTGACAACGA
 CAA, 反向: AACTGGGTACTGGAGCAGGA。

1.3.5 利用细胞免疫荧光法检测细胞增殖

取转染完成后的细胞按照相应组别以每孔 5×10^4 个细胞均匀铺入含爬片的 12 孔板孔中,待细胞长至 60%~70% 左右,利用细胞增殖标志物 Aurora B 与 PH3 的免疫荧光抗体对细胞进行细胞免疫荧光实验,以检测细胞增殖。实验具体过程如下:首先利用 PBS 清洗细胞 3 次,清洗后弃去废液,再用 4% 多聚甲醛对细胞进行固定 20 min。固定后,利用含 1% 的 Triton 对细胞进行通透 5 min,通透后再利用 5% BSA 封闭 1 h,封闭后利用一抗进行孵育,4℃ 过夜。孵育后利用 PBS 清洗 3 次洗去多余一抗,接着利用二抗室温孵育 1 h,注意荧光二抗操作时需要避光。孵育完二抗后,利用 PBS 洗 3 次洗去多余二抗,然后加入 DAPI 染液对细胞核进行染色,染 5~10 min。染核后,用 PBS 洗 3 次洗去多余 DAPI 染液,最后利用防荧光淬灭剂与盖玻片进行封片。

1.3.6 利用 CCK8 法检测细胞增殖

取转染完成后的细胞按照相应组别以每孔 3×10^3 个细胞每孔均匀铺入 96 孔板中。铺的孔数取决于组别与检测的时间点以及复孔数。组别主要包括 Si-NC、Si-*Apbb1*、OE-NC 与 OE-*Apbb1* 4 个组

别,检测的时间点主要包括 24、48 与 72 h 3 个时间点,每个组别的每个时间点设置 6 个复孔。具体实验过程如下:铺完细胞后,每隔 24 h 往孔中加入无血清 DMEM 高糖培养基稀释的 CCK8 试剂,稀释比例为 10:1,每孔加入 100 μ L。加完 CCK8 试剂后,在培养箱中培养 2 h,然后在酶标仪中检测其在 OD₄₅₀ 的吸光度值。数据统计上为避免偏差,对于 6 个复孔吸光度值的处理方式是去掉一个最高值与一个最低值,然后利用归一化方法按照组别与时间点进行分析。

1.3.7 蛋白互作网络分析

进入在线数据库 String (<https://cn.string-db.org/>),输入目的蛋白与种属,得到目的蛋白的互作蛋白网络。为获得可信度较高的互作蛋白,将其互作得分设置为最高的可信度 0.9。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.02 对结果进行统计分析。实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用未配对的 student's *t* 检验与单因素方差分析, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

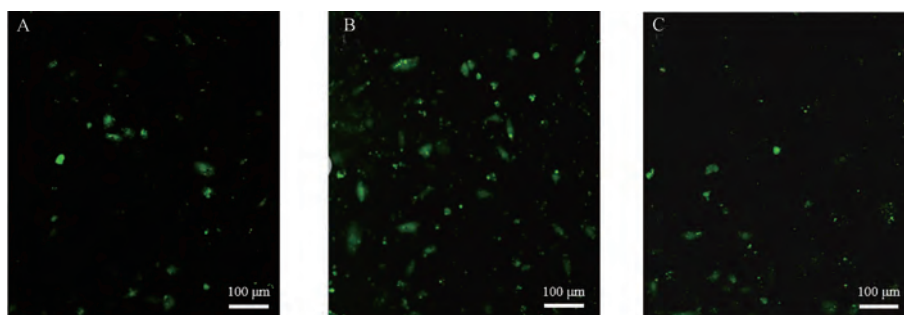
2 结果

2.1 siRNA 最佳转染浓度确定

为了探究 siRNA 最佳转染浓度,我们分别用 20、50 和 100 nmol/L 3 个浓度进行 H9c2 细胞的转染,镜下观察结果显示,siRNA 最佳转染浓度为 50 nmol/L,具体见图 1。

2.2 敲低效率最佳的 si-*Apbb1* 筛选

对从公司获得的 3 组特异性 si-*Apbb1* 进行转染,筛选敲低效率最佳的 si-*Apbb1*。qPCR 结果显



注:A:20 nmol/L siRNA 转染荧光图;B:50 nmol/L siRNA 转染转染荧光图;C:100 nmol/L siRNA 转染荧光图。

图 1 siRNA 最佳转染浓度的筛选

Note. A, Fluorescence plot of 20 nmol/L siRNA transfection. B, Fluorescence plot of 50 nmol/L siRNA transfection. C, Fluorescence plot of 100 nmol/L siRNA transfection.

Figure 1 Screening for optimal transfection concentration of siRNA

示,相较于 Si-NC 组,2Si-Apbb1 组的敲低效率最高, *Apbb1* mRNA 水平的敲低效率可以达到 51% (Si-NC 组: (1.01 ± 0.21) ; 2Si-Apbb1 组: (0.49 ± 0.03) , $P < 0.05$, $n = 3$) (见图 2), 因此,敲低实验最终选用 2si-*Apbb1*, 文章后续提到的 Si-Apbb1 组均指利用 2si-*Apbb1* 进行转染。

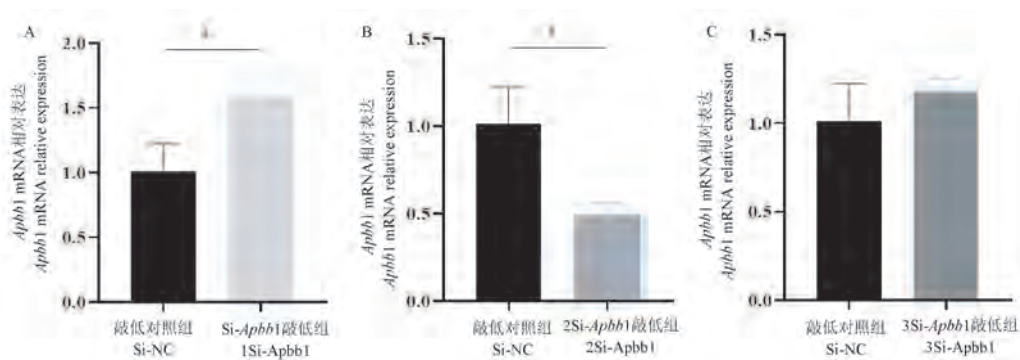
2.3 CCK8 实验检测 *Apbb1* 对 H9c2 心肌细胞增殖的影响

CCK8 细胞增殖实验中,相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组 H9c2 心肌细胞虽然在 48 h 时增殖显著下降 0.44 倍 (Si-NC 组: (3.06 ± 0.12) ; Si-Apbb1 组: (2.62 ± 0.16) , $P < 0.01$, $n = 3$), 但是在 72 h 时增殖显著增加 0.86 倍 (Si-NC 组: (5.30 ± 0.13) ; Si-

Apbb1 组: (6.16 ± 0.36) , $P < 0.0001$, $n = 3$), 见图 3A。相较于 OE-NC 组, OE-Apbb1 组 H9c2 心肌细胞在 48 h 与 72 h 增殖分别降低 1.23 倍 (OE-NC 组: (4.4 ± 0.14) ; OE-Apbb1 组: (3.17 ± 0.53) , $P < 0.0001$, $n = 3$) 和 1.04 倍 (OE-NC 组: (6.04 ± 0.22) ; OE-Apbb1 组: (5.00 ± 0.27) , $P < 0.0001$, $n = 3$), 增殖明显受到抑制, 见图 3B。

2.4 qPCR 实验检测 *Apbb1* 对细胞增殖的影响

相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组敲低效率达到 52% (Si-NC 组: (1.00 ± 0.12) ; Si-Apbb1 组: (0.48 ± 0.03) , $P < 0.01$, $n = 3$); Si-Apbb1 组典型的细胞增殖标志分子 *Ki67* 与 *PCNA* mRNA 表达水平虽然具有升高趋势, 但不具有显著差异性, 然而细胞周期标

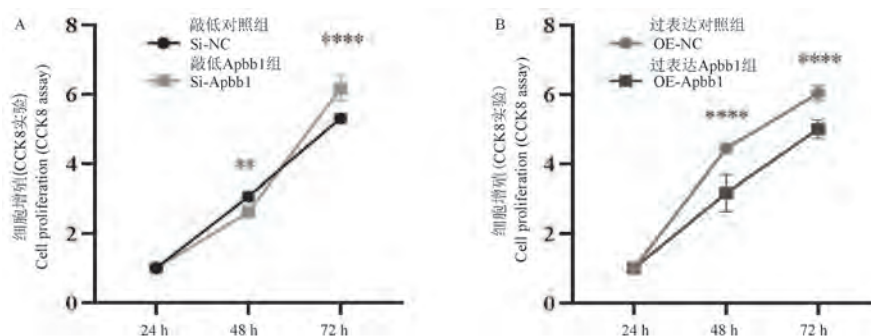


注: A: 1Si-Apbb1 组的敲低效率; B: 2Si-Apbb1 组的敲低效率; C: 3Si-Apbb1 组的敲低效率。与 Si-NC 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 2 筛选敲低效率最佳的 si-*Apbb1*

Note. A, Knockdown efficiency of 1Si-Apbb1 group. B, Knockdown efficiency of 2Si-Apbb1 group. C, Knockdown efficiency of 3Si-Apbb1 group. Compared with Si-NC group, $*P < 0.05$.

Figure 2 Screening for Si-*Apbb1* with the best knockdown efficiency



注: A: 利用 CCK8 法检测 Si-NC 组与 Si-Apbb1 组的增殖情况; B: 利用 CCK8 法检测 OE-NC 组与 OE-Apbb1 组的增殖情况。与各自的 NC 组相比, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。

图 3 CCK8 实验检测 H9C2 心肌细胞增殖结果

Note. A, Proliferation of Si-NC group and Si-Apbb1 group was detected by CCK8 assay. B, Proliferation of Si-NC group and Si-Apbb1 group was detected by CCK8 assay. Compared with their respective NC group, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$.

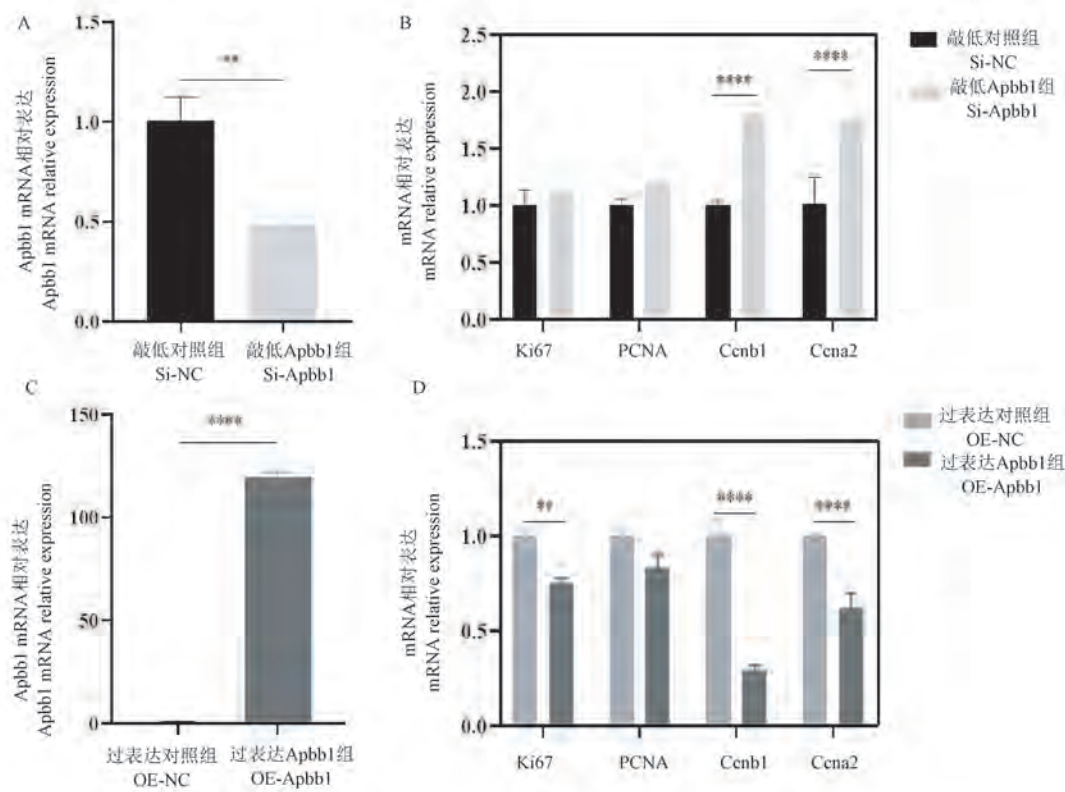
Figure 3 Determination of proliferation of H9C2 cardiomyocytes by CCK8 assay

志分子 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 表达显著增加, *Ccnb1* 和 *Ccna2* 分别增加 80% (Si-NC 组: (1.00 ± 0.05) ; Si-Apbb1 组: (1.81 ± 0.09) , $P < 0.001$, $n = 3$) 和 76% (Si-NC 组: (1.01 ± 0.22) ; Si-Apbb1 组: (1.76 ± 0.30) , $P < 0.001$, $P < 0.05$, $n = 3$), 具体见图 4A 与图 4B。相较于 OE-NC 组, OE-Apbb1 组过表达效率达到 119 倍 (OE-NC 组: (1.00 ± 0.10) ; OE-Apbb1 组: (119.33 ± 2.64) , $P < 0.001$, $n = 3$); OE-Apbb1 组细胞增殖标志分子 *Ki67* 与细胞周期标志分子 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 均发生显著下调, *Ki67*、*Ccnb1* 和 *Ccna2* 分别下调 25% (OE-NC 组: (1.00 ± 0.03) ; OE-Apbb1 组: (0.75 ± 0.02) , $P < 0.01$, $n = 3$)、72% (OE-NC 组: (1.00 ± 0.09) ; OE-Apbb1 组: (0.28 ± 0.03) , $P < 0.001$, $n = 3$) 和 38% (OE-NC 组: (1.00 ± 0.01) ; OE-Apbb1 组: (0.62 ± 0.08) , $P < 0.001$, $n = 3$), 其中另一个增殖标志分子 *PCNA* 也呈现下调趋势, 但无统计

学意义, 具体见图 4C 与图 4D。

2.5 细胞免疫荧光法检测 *Apbb1* 对细胞增殖的影响

为了进一步确定 *Apbb1* 对 H9c2 心肌细胞增殖的影响, 我们采用细胞免疫荧光实验检测了心肌细胞增殖的标志物 Aurora B 与 PH3。相较于 Si-NC 组, Si-Apbb1 组 PH3 与 Aurora B 阳性细胞增加 4.33% (Si-NC 组: $(12.00 \pm 1.00)\%$; Si-Apbb1 组: $(16.33 \pm 1.52)\%$, $P < 0.001$, $n = 3$) 和 4.67% (Si-NC 组: $(14.67 \pm 1.53)\%$; Si-Apbb1 组: $(19.33 \pm 1.53)\%$, $P < 0.001$, $n = 3$) (图 5A~5D)。相较于 OE-NC 组, PH3 与 Aurora B 阳性细胞分别降低 3.7% (OE-NC 组: $(13.00 \pm 1.02)\%$; OE-Apbb1 组: $(9.33 \pm 0.58)\%$, $P < 0.01$, $n = 3$) 和 4.36% (OE-NC 组: $(14.33 \pm 1.15)\%$; OE-Apbb1 组: $(9.67 \pm 1.52)\%$, $P < 0.05$, $n = 3$) (图 5E~5H)。

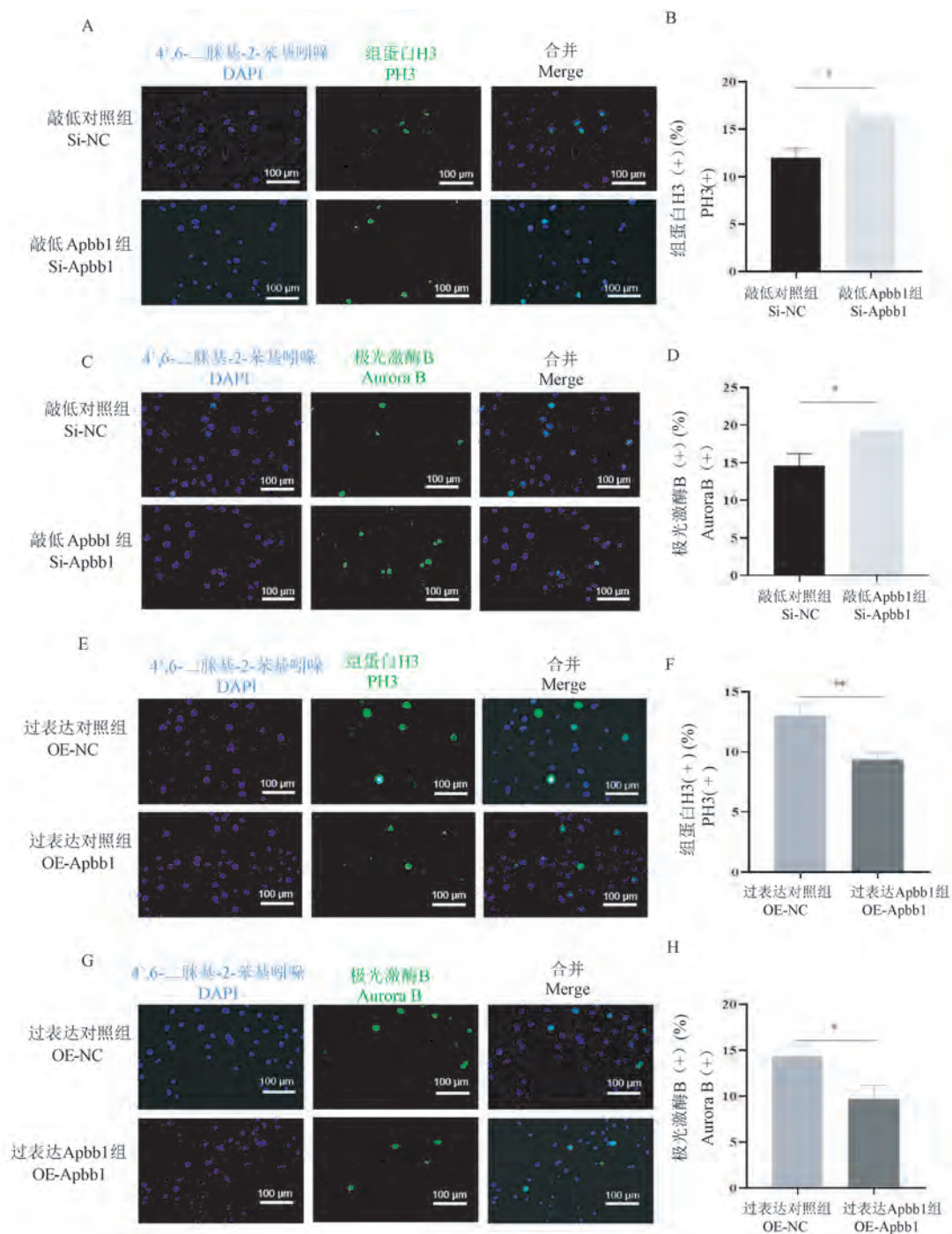


注: A, Si-Apbb1 组的敲低效率; B, Si-Apbb1 组的细胞增殖标志物与细胞周期标志物的表达变化; C, OE-Apbb1 组的过表达效率; D, OE-Apbb1 组细胞增殖标志物与细胞周期标志物的表达变化。与各自的 NC 组相比, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。

图 4 qPCR 实验检测 *Apbb1* 对 H9C2 心肌细胞增殖标志物与细胞周期标志物表达的影响

Note. A, Knockdown efficiency of Si-Apbb1 group. B, Expression changes of cell proliferation markers and cell cycle markers in OE-Apbb1 group. C, Overexpression efficiency of OE-Apbb1 group. D, Expression changes of cell proliferation markers and cell cycle markers in OE-Apbb1 group. Compared with their respective NC group, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$.

Figure 4 qPCR assay was used to detect the effects of *Apbb1* on the expression of proliferation and cell cycle markers in H9C2 cardiomyocytes



注:A:Si-Apbb1 组与 Si-NC 组的 PH3 的表达情况;B:Si-Apbb1 组相较于 Si-NC 组 PH3 的统计结果;C:Si-Apbb1 组与 Si-NC 组的 Aurora B 的表达情况;D:Si-Apbb1 组相较于 Si-NC 组 Aurora B 的统计结果;E:OE-Apbb1 组与 OE-NC 组的 PH3 的表达情况;F:OE-Apbb1 组相较于 OE-NC 组 PH3 的统计结果;G:OE-Apbb1 组与 OE-NC 组的 Aurora B 的表达情况;H:OE-Apbb1 组相较于 OE-NC 组 Aurora B 的统计结果。与各自的 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 细胞免疫荧光检测细胞增殖

Note. A, Expression of PH3 in Si-Apbb1 group and Si-NC group. B, Compared with Si-NC group, the statistic results of PH3 in Si-Apbb1 group. C, Expression of Aurora B in Si-Apbb1 group and Si-NC group. D, Compared with Si-NC group, the statistic results of Aurora B in Si-Apbb1 group. E, Expression of PH3 in OE-Apbb1 group and OE-NC group. F, Compared with OE-NC group, the statistic results of PH3 in OE-Apbb1 group. G, Expression of Aurora B in OE-Apbb1 group and OE-NC group. H, Compared with OE-NC group, the statistic results of Aurora B in OE-Apbb1 group. Compared with their respective NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Cell proliferation was detected by cell immunofluorescence

2.6 APBB1 可能通过与 KAT5 蛋白互作影响心肌细胞增殖

为了进一步确定 *Apbb1* 调控心肌细胞增殖的机制,我们利用在线数据库 String 分析了与大鼠 APBB1 蛋白相互作用的蛋白,发现赖氨酸乙酰转移酶 5(KAT5)、淀粉样前体蛋白(APP)与淀粉前体样蛋白(Aplp2)等蛋白可能是 APBB1 蛋白的互作蛋白,其中 KAT5 与 APP 蛋白相互作用最强,具体见图 6。KAT5 是一种组蛋白乙酰转移酶,下调 KAT5 影响前列腺癌细胞、乳腺癌细胞与肝癌等癌细胞增殖^[7-9]。在心肌细胞中,单敲 KAT5 能激活心肌细胞细胞周期进而影响心肌细胞增殖^[10]。KAT5 作为 APBB1 最为显著的互作蛋白,APBB1 蛋白可能通过与 KAT5 蛋白互作抑制心肌细胞增殖。

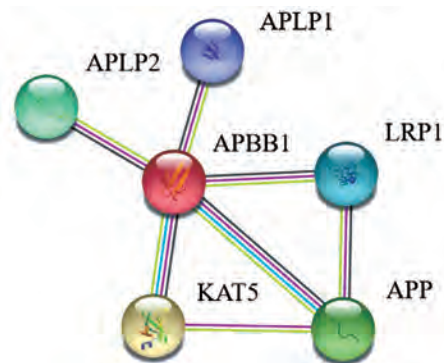
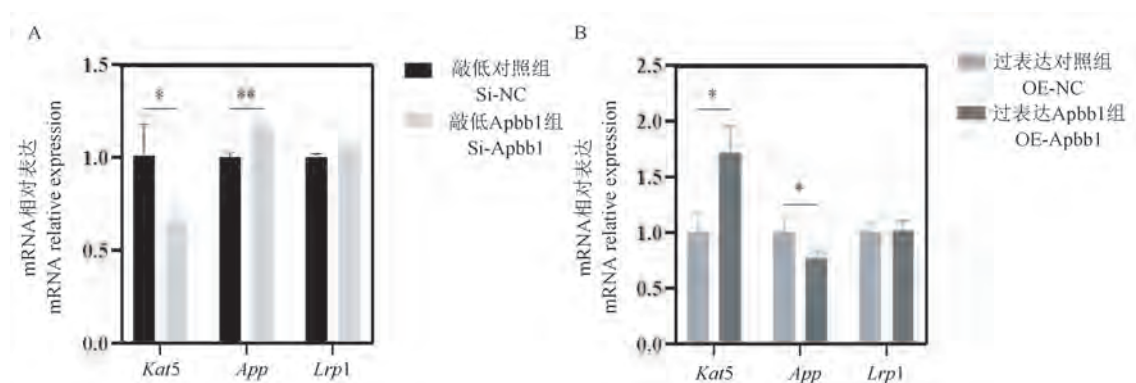


图 6 利用在线数据库 String 进行 APBB1 蛋白互作网络分析

Figure 6 APBB1 protein interaction network analysis using online database String

2.7 qPCR 实验探究与细胞增殖相关的 APBB1 互作蛋白的 mRNA 表达变化

在 APBB1 蛋白的 5 个互作蛋白中,APP 能够调控肺腺癌细胞与卵巢癌细胞增殖^[11-12];LRP1 能够调控成纤维细胞与内皮细胞增殖^[13-14];KAT5 能够调控肝癌细胞与甲状腺癌细胞增殖,并影响心肌细胞周期^[10,15-16]。为了进一步探究 APBB1 蛋白能否通过与其互作蛋白互作进而影响心肌细胞增殖,我们检测了敲低与过表达 *Apbb1* 基因对 *Kat5*、*App* 和 *Lrp1* 的 mRNA 表达变化的影响。相较于 Si-NC 组, Si-*Apbb1* 组 *Kat5* mRNA 表达水平显著降低 0.34 倍(Si-NC 组: (1.00 ± 0.14) ; Si-*Apbb1* 组: (0.66 ± 0.04) , $P < 0.05$, $n = 3$), *App* mRNA 表达水平显著上调 0.18 倍(Si-NC 组: (1.00 ± 0.02) ; Si-*Apbb1* 组: (1.17 ± 0.02) , $P < 0.05$, $n = 3$), *Lrp1* mRNA 表达水平没有发生显著变化,具体见图 7A。相较于 OE-NC 组, OE-*Apbb1* 组 *Kat5* mRNA 表达水平显著升高 0.72 倍(OE-NC 组: (1.00 ± 0.13) ; OE-*Apbb1* 组: (1.72 ± 0.20) , $P < 0.01$, $n = 3$), *App* mRNA 表达水平显著下调 0.24 倍(OE-NC 组: (1.00 ± 0.10) ; OE-*Apbb1* 组: (0.76 ± 0.05) , $P < 0.01$, $n = 3$), *Lrp1* mRNA 表达水平没有发生显著变化,具体见图 7B。*Kat5* mRNA 变化趋势与 *Apbb1* mRNA 的变化趋势一致, APBB1 蛋白可能通过与 KAT5 蛋白互作抑制心肌细胞增殖。



注:A: Si-*Apbb1* 组与 Si-NC 组的 *Kat5*、*App* 与 *Lrp1* 的表达情况; B: OE-*Apbb1* 组与 OE-NC 组 *Kat5*、*App* 与 *Lrp1* 的表达情况。与各自的 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 qPCR 实验检测与细胞增殖相关的 APBB1 互作蛋白的 mRNA 表达变化

Note. A, Expression of *Kat5*, *App* and *Lrp1* in Si-*Apbb1* group and Si-NC group. B, Expression of *Kat5*, *App* and *Lrp1* in OE-*Apbb1* group and OE-NC group. Compared with their respective NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 7 qPCR assay was used to detect the mRNA expression of APBB1 interacting protein associated with cell proliferation

3 讨论

APBB1 蛋白是一种衔接蛋白,目前主要在神经领域被研究^[3]。基于 *Apbb1* 在再生心脏中发生显著降低以及其可作为心脏肥大前期的标志物^[5-6],我们试图探究 *Apbb1* 与心肌细胞增殖之间的关系。我们的研究表明 *Apbb1* 能够影响 H9c2 心肌细胞增殖,敲低 *Apbb1* 基因促进 H9c2 心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制 H9c2 心肌细胞增殖。为了进一步了解 *Apbb1* 如何在机制上调控心肌细胞增殖,我们利用在线数据库 String 分析了 APBB1 的互作蛋白,探究 APBB1 能否通过互作蛋白影响心肌细胞增殖。此外,我们还以细胞增殖这个表型入手,查阅了目前 *Apbb1* 与细胞增殖的相关研究,试图通过了解 *Apbb1* 调控细胞增殖的机制进而明确 *Apbb1* 调控 H9c2 心肌细胞增殖的具体机制。

目前,关于 APBB1 调控细胞增殖的方式主要有 3 种可能:第 1 种可能是通过调节淀粉样前体蛋白(APP),APP 是 APBB1 的经典下游,在阿尔茨海默症的发病中发挥关键作用^[17]。有研究表明 APBB1 能通过调节 APP 进而影响 T-47D 和 ZR-75-1 乳腺癌细胞增殖^[18]。第 2 种可能是通过调节 Notch 信号,Kim 等^[19]研究表明 APBB1 能够对 Notch 信号进行双向调控,而 Notch 信号是调节脊椎动物与无脊椎动物细胞增殖的关键调节器,大量的研究表明 Notch 能够调控心肌细胞增殖^[20-23]。最后一种可能是通过与互作蛋白互作进而影响细胞增殖,Schröter 等^[24]研究表明 APBB1 与 BLM 和 MCM 蛋白的相互作用可能有助于在受阿尔茨海默病影响的大脑中的神经元细胞重新进入细胞周期。我们的 APBB1 互作蛋白网络分析结果表明 KAT5、APP 与 APLP2 等蛋白是 APBB1 的互作蛋白,在这些互作蛋白中有研究表明 KAT5 蛋白能影响心肌细胞增殖^[10]。我们的 qPCR 实验结果表明,APP 与 *Apbb1* 的变化趋势相反,两者之间可能存在负反馈调节。在敲低 *Apbb1* 基因诱导心肌细胞增殖时,*Kat5* mRNA 表达显著下调;在过表达 *Apbb1* 基因抑制心肌细胞增殖时,*Kat5* mRNA 表达显著上升。因此,APBB1 有可能通过与 KAT5 互作进而影响心肌细胞增殖。心肌细胞增殖受 Notch 信号与 APBB1 蛋白互作蛋白 KAT5 调控,那么 APBB1 能否通过调控 Notch 信号或者与 KAT5 互作进而影响心肌细胞增殖呢?这值得我们下一步进行实验探究。

对于某些因素对细胞系增殖影响的实验验证,CCK8 实验是目前常用的验证方式之一。我们的 CCK8 实验结果表明过表达 *Apbb1* 基因能够显著抑制 H9c2 心肌细胞增殖,而敲低 *Apbb1* 基因虽然在第 48 h 不能表现出促进 H9c2 心肌细胞增殖的趋势,但是在第 72 h 能显著诱导 H9c2 心肌细胞增殖。这表明 siRNA 敲低 *Apbb1* 基因后,可能需要经历较长的时间才能影响 H9c2 心肌细胞增殖。

qPCR 实验中,敲低 *Apbb1* 基因能够显著提升 *Ccnb1* 与 *Ccna2* 的表达水平,同时诱导 *Ki67* 与 *PCNA* 不显著升高;而过表达 *Apbb1* 基因能够诱导 *Ki67*、*Ccnb1* 与 *Ccna2* 显著下降,同时诱导 *PCNA* 不显著下降。*Ki67* 与 *PCNA* 作为细胞增殖的典型标志分子,为什么敲低 *Apbb1* 基因能够诱导 H9c2 心肌细胞增殖却不能诱导这两个分子同时发生显著变化呢?这可能与这两种标记分子在细胞增殖周期中发挥的作用以及 *Apbb1* 在细胞周期中发挥的作用有关。一个完整的细胞增殖周期包括 G0 期、G1 期、S 期、G2 期、M 期。*Ki67* 是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,主要在有丝分裂期即 M 期发挥作用。*PCNA* 是一种 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,与 DNA 合成显著相关,其表达量与 DNA 合成一致,在 G0/G1 期细胞中表达无明显变化,G1 晚期表达大幅度增加,S 期达到高峰,G2/M 期明显下降。*Ccnb1* 代表的是 G2/M 期转变的周期蛋白,CCNA2 代表的是控制细胞周期 G1/S 和 G2/M 过渡阶段的周期蛋白。*Ki67* 与 *PCNA* 的表达没有在敲低 *Apbb1* 基因组与过表达 *Apbb1* 基因组同时发生显著变化的原因可能在于 *Apbb1* 主要在 H9c2 心肌细胞的 G2/M 期发挥作用,所以 *PCNA* 无论是在敲低与过表达 *Apbb1* 基因组,变化趋势均不明显;*Ki67* 在敲低时可能基于 *Apbb1* 本身的表达水平不高没有非常显著的变化,但是过表达 119 倍发生显著变化,显著影响 H9c2 细胞完成 G2/M 期的过渡。

总之,本研究证明敲低 *Apbb1* 基因促进心肌细胞增殖,过表达 *Apbb1* 基因抑制心肌细胞增殖,此结论开拓了 *Apbb1* 基因在心脏领域的功能研究,提示 *Apbb1* 有可能成为诱导心肌细胞增殖的潜在靶点。此外,本研究还利用在线网络数据库 String 预测了 APBB1 的互作蛋白,qPCR 探究了其互作蛋白随 *Apbb1* 干预的变化,推测 APBB1 可能通过与 KAT5 蛋白互作进而影响心肌细胞增殖,为进一步了解 *Apbb1* 基因调控心肌细胞增殖的机制提供了思路。

参考文献:

- [1] Roth G, Mensah G, Johnson C, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [2] Bulluck H, Yellon D, Hausenloy DJH. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities [J]. Heart, 2016, 102(5): 341-348.
- [3] Xu P, Chang J, Zhou X, et al. GSAP regulates lipid homeostasis and mitochondrial function associated with Alzheimer's disease [J]. J Exp Med, 2021, 218(8): e20202446.
- [4] Mahmoud A, Kocabas F, Muralidhar S, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. Nature, 2013, 497(7448): 249-253.
- [5] Parreira R, Gómez-Mendoza D, de Jesus I, et al. Cardiomyocyte proteome remodeling due to isoproterenol-induced cardiac hypertrophy during the compensated phase [J]. Proteomics Clin Appl, 2020, 14(4): e2000017.
- [6] Nguyen N, Canseco D, Xiao F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes [J]. Nature, 2020, 582(7811): 271-276.
- [7] Kim C, Lee DJAc. KAT5 Negatively regulates the proliferation of prostate cancer LNCaP cells via the caspase 3-dependent apoptosis pathway [J]. Anim Cells Syst, 2019, 23(4): 253-259.
- [8] Li H, Liu W, Zhang X, et al. Ketamine suppresses proliferation and induces ferroptosis and apoptosis of breast cancer cells by targeting KAT5/GPX4 axis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 585: 111-116.
- [9] Yu Z, Chen T, Mo H, et al. BRD8, which is negatively regulated by miR-876-3p, promotes the proliferation and apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma cells via KAT5 [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 693: 108550.
- [10] Fisher J, Horst A, Wan T, et al. Depletion of Tip60 from *in vivo* cardiomyocytes increases myocyte density, followed by cardiac dysfunction, myocyte fallout and lethality [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164855.
- [11] Fan X, Xu S, Yang C. miR-373-3p promotes lung adenocarcinoma cell proliferation via APP [J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 1046-1050.
- [12] Fan X, Liu Y, Jiang J, et al. miR-20a promotes proliferation and invasion by targeting APP in human ovarian cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(5): 318-324.
- [13] Mao H, Lockyer P, Townley-Tilson W, et al. LRP1 regulates retinal angiogenesis by inhibiting PARP-1 activity and endothelial cell proliferation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(2): 350-360.
- [14] Chieosilapatham P, Yue H, Ikeda S, et al. Involvement of the lipoprotein receptor LRP1 in AMP-IBP5-mediated migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts [J]. J Dermatol Sci, 2020, 99(3): 158-167.
- [15] Wei X, Cai S, Boohaker R, et al. KAT5 promotes invasion and metastasis through C-MYC stabilization in ATC [J]. Endocr Relat Cancer, 2019, 26(1): 141-151.
- [16] Yu Z, Chen T, Mo H, et al. BRD8, which is negatively regulated by miR-876-3p, promotes the proliferation and apoptosis resistance of hepatocellular carcinoma cells via KAT5 [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 693: 108550.
- [17] Sabo S, Ikin A, Buxbaum J, et al. The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses *in vitro* and *in vivo* [J]. J Neurosci, 2003, 23(13): 5407-5415.
- [18] Xu J, Iwabuchi E, Miki Y, et al. FE65 in breast cancer and its clinicopathological significance [J]. Breast Cancer, 2021, 29(1): 144-155.
- [19] Kim M, Mo J, Ann E, et al. Dual regulation of notch1 signaling pathway by adaptor protein fe65 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(7): 4690-4701.
- [20] Zhao L, Borikova A, Ben-Yair R, et al. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci, 2014, 111(4): 1403-1408.
- [21] Zhao L, Ben-Yair R, Burns C, et al. Endocardial notch signaling promotes cardiomyocyte proliferation in the regenerating zebrafish heart through wnt pathway antagonism [J]. Cell Rep, 2019, 26(3): 546-54, e5.
- [22] Miao L, Lu Y, Nusrat A, et al. The spatiotemporal expression of notch1 and numb and their functional interaction during cardiac morphogenesis [J]. Cells, 2021, 10(9): 2192.
- [23] Collesi C, Zentilin L, Sinagra G, et al. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes [J]. J Cell Biol, 2008, 183(1): 117-128.
- [24] Schrötter A, Mastalski T, Nensa F, et al. FE65 regulates and interacts with the bloom syndrome protein in dynamic nuclear spheres-potential relevance to Alzheimer's disease [J]. J Cell Sci, 2013, 126: 2480-2492.

[收稿日期]2021-11-18

周丽桂, 谢清华, 巩森森, 等. 藤黄酸对不同表型前列腺癌细胞生长的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 39-46.
Zhou LG, Xie QH, Gong MM, et al. Effect of gambogic acid on the growth of prostate cancer cells with different phenotypes [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 39-46.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 006

藤黄酸对不同表型前列腺癌细胞生长的影响

周丽桂^{1,2}, 谢清华^{1,2}, 巩森森^{2,3}, 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;
3. 延安大学医学院, 陕西 延安 716000)

【摘要】 目的 研究藤黄酸(GA)对代表不同临床特征的前列腺癌(PCa)细胞的生长抑制作用。**方法** 选择雄激素依赖的PCa细胞LNCaP、雄激素抵抗的PCa细胞22RV1和神经内分泌PCa细胞PC3,分别用GA和恩杂鲁胺(Enz)处理,CCK8法检测药物作用于细胞后的IC₅₀值。qRT-PCR、Western blot和流式细胞仪检测GA处理后细胞雄激素受体(AR)、Ki67、Cleaved caspase-3和Bcl-2的表达水平以及细胞凋亡的情况。将PC3细胞植入雄性裸鼠皮下,待其荷瘤之后,随机分为3组:对照组(Control组)、恩杂鲁胺组(Enz组)和藤黄酸组(GA组)。药物处理期间测量小鼠肿瘤体积变化,给药结束后称量肿瘤重量,评价药物处理后的作用效果。**结果** 与PCa临床一线治疗药物Enz相比,LNCaP、22RV1、PC3细胞均对GA敏感,GA能广泛抑制PCa细胞的增殖和活性,且起效剂量较低。在GA的作用下,PCa细胞中Ki67、AR的表达显著下降($P<0.05$)。随着GA浓度的升高,PCa细胞凋亡数量逐渐增加,且凋亡相关蛋白Cleaved caspase-3的表达增加($P<0.001$)、Bcl-2的表达降低($P<0.001$)。体内实验显示,与Control组相比,Enz组的肿瘤体积和肿瘤重量虽有所下降,但无统计学差异,而GA组的肿瘤体积和重量显著下降($P<0.01$)。**结论** GA可在体内和体外抑制PCa细胞的生长,并可抑制PCa细胞AR、Ki67的表达,通过调节Cleaved caspase-3和Bcl-2蛋白的表达促进肿瘤细胞的凋亡。

【关键词】 藤黄酸;前列腺癌;细胞凋亡;恩杂鲁胺

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0039-08

Effect of gambogic acid on the growth of prostate cancer cells with different phenotypes

ZHOU Ligui^{1,2}, XIE Qinghua^{1,2}, GONG Miaomiao^{2,3}, ZHANG Yongbin^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Animal Laboratory Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032. 3. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of gambogic acid (GA) on the growth of prostate cancer (PCa) cells representing different clinical characteristics. **Methods** The androgen-dependent PCa cells LNCaP, androgen-resistant PCa cells 22RV1, and neuroendocrine PCa cells PC3 were treated with GA and enzalutamide (Enz). IC₅₀ values of the treated cells were determined by the CCK8 method. The expression levels of androgen receptor (AR), Ki67, Cleaved caspase-3 and Bcl-2 and the apoptosis of the different PCa cells treated with GA were determined by qRT-PCR, Western blot and flow cytometry. PC3 cells were implanted subcutaneously into male nude mice, and then the tumor-

[基金项目] 国家自然科学基金(32070532)。

[作者简介] 周丽桂(1994—)女,硕士研究生,研究方向:中西医结合基础。E-mail:739283058@qq.com

[通信作者] 师长宏(1973—)男,教授,博士生导师,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

bearing mice were divided into three groups at random: Control group, Enz group and GA group. The changes of tumor volume were measured during drug treatment, and the tumor weight was determined after treatment to evaluate the overall effect of drug treatment. **Results** Compared with Enz, GA displayed achieved better inhibitory effect for of the growth of LNCaP, 22RV1 and PC3 cells, and a lower dose of GA can could reduce the proliferation and activity of these cells. Under the effect of GA, the expression of Ki67 and AR in PCa cells was significantly decreased ($P<0.05$). With increasing GA concentration, the number of apoptotic PCa cells gradually increased, and the expression of apoptosis-related protein Cleaved caspase-3 increased ($P<0.001$) and that of bcl-2 decreased ($P<0.001$). *In vivo*, compared with those in the Control group, tumor volume and weight decreased in the Enz group, albeit not significantly, while tumor volume and weight decreased significantly in the GA group ($P<0.01$). **Conclusions** GA can inhibit the growth of PCa cells *in vivo* and *in vitro*, as well as the expression of AR and Ki67 in these cells. GA can also promote the apoptosis of tumor cells by regulating the expression of Cleaved caspase-3 and Bcl-2 proteins.

【Keywords】 gambogic acid; prostate cancer; apoptosis; enzalutamide

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性发病率居第二位的肿瘤,其死亡率位居第五位^[1]。早期的激素依赖性前列腺癌(hormone-dependent prostate cancer, HNPC)经过雄激素剥夺疗法治疗(androgen deprivation therapy, ADT)后,大部分患者从中受益^[2]。然而经过一段时间后,绝大多数 PCa 患者病情会复发,进展为去势抵抗性 PCa (castration-resistant prostate cancer, CRPC)^[3],甚至转化为更为难治的神经内分泌 PCa (neuroendocrine prostate cancer, NEPC)^[4]。PCa 的高度异质性是造成其临床治疗效果不佳的重要原因。因此,寻找广谱的、可用于不同临床阶段的药物对于 PCa 的治疗研究具有重要意义。

藤黄酸(gambogic acid, GA)是从藤黄科植物藤黄树分泌的干燥树脂中提取的最主要成分,具有多种生物活性,如抗癌、抗氧化、抗炎等^[5]。大量研究表明,GA 可以抑制多种癌细胞的生长,包括慢性髓性白血病^[6]、胰腺癌^[7]、乳腺癌^[8]、肝癌^[9]、肺癌^[10]等。已有研究表明,GA 可诱导 PTEN^{-/-}/p53^{-/-}前列腺癌细胞和 LAPC-4 细胞的凋亡^[11]以及抑制 PC3 细胞体外侵袭^[12]和血管生成^[13]。然而,目前有关 GA 对不同表型 PCa 细胞的作用效果的研究报道较少。因此,本研究旨在将 GA 作用于雄激素受体(androgen receptor, AR)阳性(AR⁺)的具有 HNPC 特征的 LNCaP 细胞、AR⁺的具有 CRPC 特征的 22RV1 细胞以及 AR 阴性(AR⁻)的具有 NEPC 特征的 PC3 细胞,研究其对不同表型 PCa 细胞是否具有广泛的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人 PCa 细胞系 LNCaP、22RV1、PC3 购自美国典

型培养物保藏中心,培养基为含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640,置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养。待细胞密度达到 80%~90%时,使用 0.25%胰酶消化进行传代培养。

1.1.2 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 BALB/c 裸鼠 18 只,体重 24~26 g,购自成都药康生物科技有限公司[SCXK(川)2020-034],饲养于空军军医大学实验动物中心屏障设施内[SYXK(陕)2017-001],环境温度 23℃~25℃,相对湿度 40%~60%,12 h/12 h 昼夜交替,饮用水经高压灭菌处理,动物自由摄食和饮水。本研究通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会审核(IACUC-20211205),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

藤黄酸(S2448)和恩杂鲁胺(S1250)购自美国 Selleckchem 公司;一抗:AR 兔抗(ab108341)购自美国 Abcam 公司, Cleaved caspase-3 兔抗(9661)和 Bcl-2 鼠抗(15071)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,β-actin 鼠抗(AT0001)购自美国 Engibody 公司;二抗:山羊抗兔(E-AB-1003)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,山羊抗鼠(EF0001)购自山东思科捷生物技术有限公司;RPMI-1640(美国 Sigma 公司);FBS 和 0.25%胰酶(美国 Gibco 公司);细胞增殖和毒性检测试剂盒(CCK8)和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海七海复泰生物科技股份有限公司);总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);逆转录试剂盒和实时荧光 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白检测试剂盒(北京康为世纪生物科技股份有限公司);蛋白酶抑制剂(北京索莱宝科技有限公司);SDS-PAGE 试剂盒(生工生物工程(上海)股份

有限公司);ECL 发光液(美国 Millipore 公司)。梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);流式细胞仪(贝克曼,美国 BD 公司);CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);多功能成像仪(美国 Syngene 公司);多功能微孔板检测仪(美国 BioTek 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞增值和毒性实验

将人 PCa 细胞 LNCaP、22RV1、PC3 以 5000 个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,并在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。待细胞贴壁后,分别用指定浓度的恩杂鲁胺(enzalutamide, Enz)、GA 处理细胞 48 h,DMSO(0.1%)和培养基分别作为载体和空白对照。每孔加入 10 μL CCK8 试剂后 37℃ 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h,然后在微孔板检测仪 450 nm 处读取吸光度值以测定细胞活力。

1.3.2 qRT-PCR

药物处理细胞 24 h 后,使用总 RNA 提取试剂盒分别提取各组细胞样本的总 RNA,使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,然后将各组样本的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR。引物序列如表 1 所示,以 β -actin 为内参基因,根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各组基因的相对表达量。

1.3.3 Western blot

药物处理细胞 24 h 后收集细胞,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度并按每孔 20 μg 蛋白进行蛋白定量。然后上样、电泳、转膜、封闭,分别加入一抗 AR(1:1000)、Cleaved caspase-3(1:1000)、Bcl-2(1:1000)和 β -actin(1:2000)4℃ 摇床过夜;TBST 洗涤 3 次后加入相应的二抗(山羊抗兔 1:4000、山羊抗鼠 1:4000)室温孵育 2 h,显影并拍照保存。采用 Image J 图像分析软件进行灰度比分析。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡

药物处理细胞 24 h 后收集各组细胞,分别用

PBS 和 buffer 溶液洗涤细胞后弃上清,加入 FITC 溶液室温避光孵育 15 min,加入 PI 溶液 4℃ 孵育 5 min,30 min 内检测细胞凋亡情况。

1.3.5 异种移植模型

将 5×10^6 个 PC3 细胞接种于裸鼠右侧背部皮下,待肿瘤体积长至 30~100 mm³ 时,将荷瘤鼠随机分为 3 组:Control 组、Enz 组和 GA 组,每组 6 只。分别用载体(2% DMSO、40% PEG300、2% Tween 80 和 56% ddH₂O,ip,2 d 1 次)、Enz(30 mg/kg,ig,2 d 1 次)和 GA(3 mg/kg,ip,2 d 1 次)处理荷瘤鼠 2 周,药物处理期间测量小鼠肿瘤体积变化。通过公式:(长×宽²)/2 计算肿瘤体积。2 周后肿瘤异种植物被移除、称重、固定、冻存。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 18.0 软件完成数据分析。结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示符合正态分布的计量资料。对符合正态分布的多组资料采用单因素方差分析进行比较。若满足方差齐性则采用 Dunnett-*t* 检验或 LSD 检验进行组间比较,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GA 抑制不同表型 PCa 细胞的增殖和活性

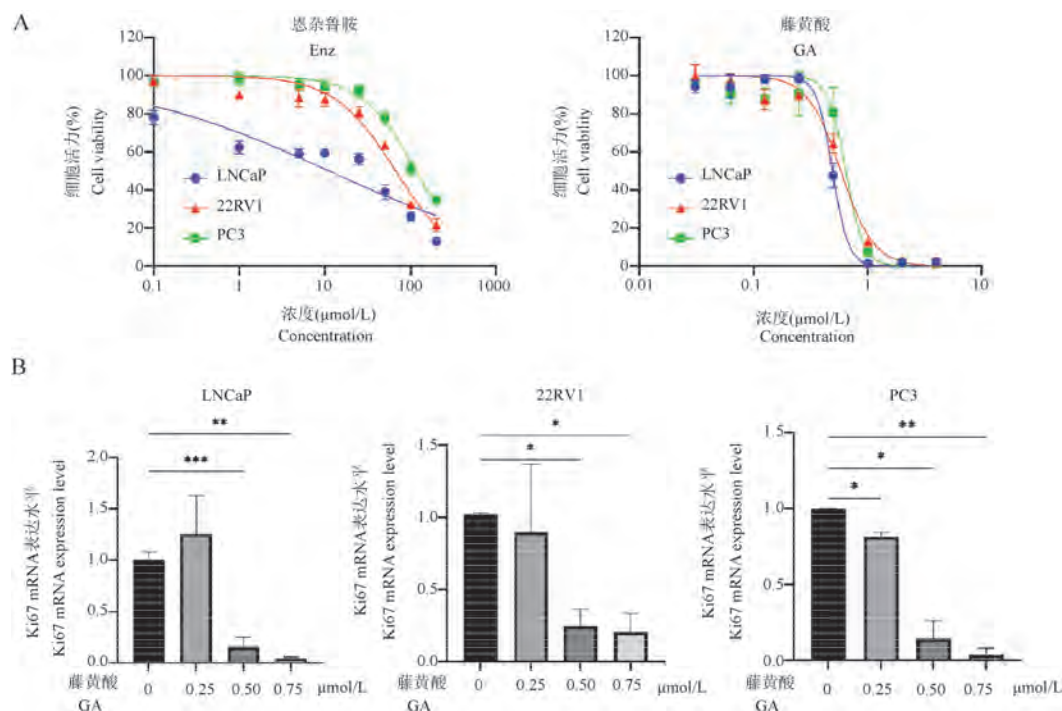
为探索 GA 对不同表型 PCa 细胞生长的影响,将代表不同 PCa 表型的 LNCaP、22RV1、PC3 细胞用不同浓度的 GA 处理 48 h,并选用临床一线治疗药物 Enz 进行对比。如图 1A 所示,Enz 作用于 PCa 细胞具有明显的选择性,对 AR⁺ 的 HNPC 细胞 LNCaP 明显有效,IC₅₀ 值为 11.15 μmol/L,而 22RV1 和 PC3 细胞均对 Enz 具有耐药性,IC₅₀ 值分别为 67.02、116.9 μmol/L。与 Enz 相比,GA 对 PCa 细胞的作用没有选择性,它可以广泛抑制 LNCaP、22RV1、PC3 3 种不同表型 PCa 细胞的增殖,且起效浓度比较低,IC₅₀ 值分别为 0.49、0.58、0.64 μmol/L。为进一步评价 GA 对 PCa 细胞增殖的抑制效果,根据 GA 对 PCa 细胞的 IC₅₀ 值结果选取 0、0.25、0.5、0.75 μmol/L 浓度的 GA 分别处理细胞 24 h,然后检测细胞增殖标志物 Ki67 的表达水平。结果如图 1B 所示,GA 以剂量依赖性方式抑制不同细胞 Ki67 的表达($P < 0.05$)。以上结果表明了 GA 可以有效抑制不同表型 PCa 细胞的增殖和活性。

2.2 GA 抑制 PCa 细胞 AR 的表达

AR 一直是临床治疗 PCa 患者的主要治疗靶

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物(5'→3') Primer(5'→3')
β -actin	Forward: CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	Reverse: CTCCTTAATGTCACGCACGAT
Ki67	Forward: GTGGTTCGACAAGTGGCCTT
	Reverse: CGACCCCGCTCCTTTTGATA
AR	Forward: AGCTCAAGGATGGAAGTGCAGTTA
	Reverse: AATGCTTCACTGGGTGTGGAATAG



注:以 β -actin 为内参基因,以 0 $\mu\text{mol/L}$ GA 组为对照组。A: 各个浓度的复孔数量 $n=6$; B: 各组的重复次数 $n=3$ 。与对照组相比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图 1 GA 抑制不同表型 PCa 细胞的增殖和活性

Note. β -actin was used as reference gene, and 0 $\mu\text{mol/L}$ GA group was used as control group. A, Number of multiple pores at each concentration, $n=6$. B, Number of repeats in each group, $n=3$. Compared with control group, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

Figure 1 GA inhibited the proliferation and activity of PCa cells with different phenotypes

点,目前提出的 CRPC 分子机制大部分主要是围绕着 AR 表达的改变和 AR 信号传导的失调^[14]。为明确 GA 对 PCa 细胞 AR 表达的影响,将 0、0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的 GA 分别作用于 AR⁺ 的 LNCaP 和 22RV1 细胞,使用 qRT-PCR、Western blot 分别从 mRNA、蛋白水平检测给药后 AR 的表达情况。结果如图 2 所示,与对照组相比,0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 GA 对 LNCaP、22RV1 细胞 AR 的表达基本没有影响,无统计学差异;但随着给药浓度的提高,AR 在 mRNA 和蛋白层面的表达逐渐降低,具有统计学差异 ($P<0.05$)。以上结果表明了 GA 可在 mRNA 和蛋白水平抑制 PCa 细胞 AR 的表达。

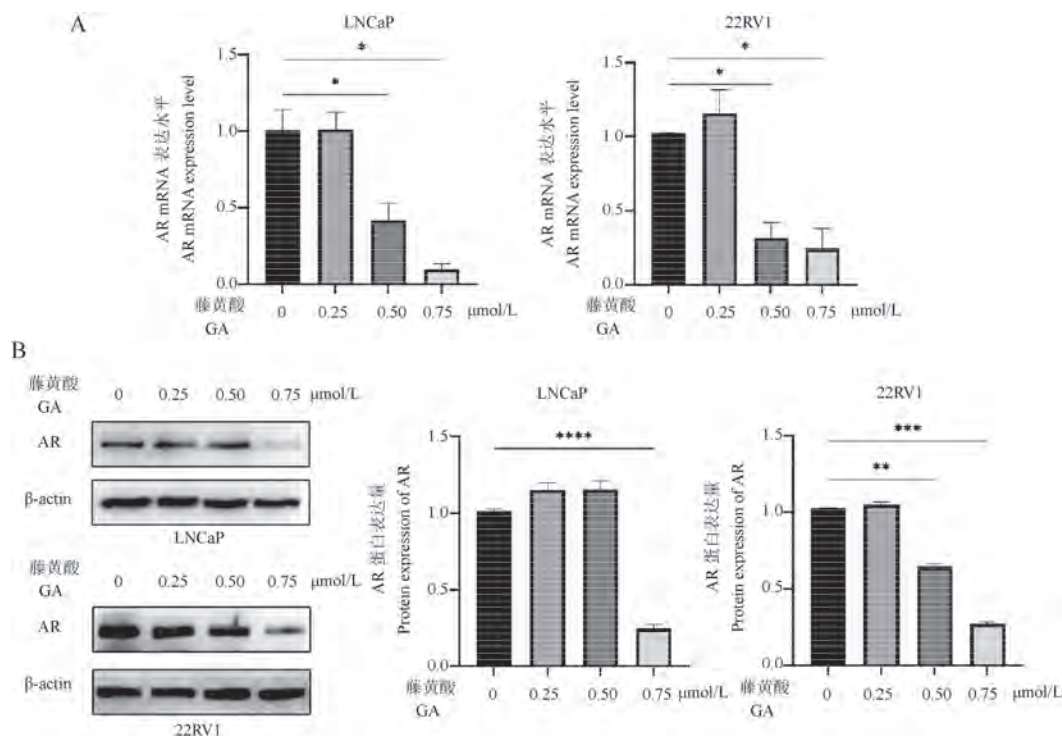
2.3 GA 诱导 22RV1、PC3 细胞的凋亡

为探究 GA 诱导 PCa 细胞死亡的能力,我们将 0、0.25、0.5、0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的 GA 作用于 22RV1、PC3 细胞 24 h 后,使用 Annexin V-PI 双染法通过流式细胞仪检测细胞凋亡的情况。我们发现 0~0.75 $\mu\text{mol/L}$ 的 GA 作用于 PC3 细胞后,细胞未见有明显的凋亡趋势,因此我们进一步将 GA 作用于 PC3 细胞的浓度调整为 0、0.75、1.0、1.25 $\mu\text{mol/L}$ 。结果

如图 3A 所示,随着 GA 作用浓度的升高,Annexin⁺PI⁻ 和 Annexin⁺PI⁺ 细胞数量逐渐增加,表明 PCa 细胞呈剂量依赖性凋亡。我们进一步检测 GA 处理后 PCa 细胞蛋白水平凋亡通路核心分子 Cleaved caspase-3 和 Bcl-2 的表达。结果如图 3B 所示,随着 GA 浓度的提高,PCa 细胞 Cleaved caspase-3 的表达显著增强 ($P<0.001$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显下降 ($P<0.001$)。这些结果表明 GA 可通过影响 Cleaved caspase-3 和 Bcl-2 的表达诱导 PCa 细胞凋亡。

2.4 GA 抑制 PCa 细胞 PC3 体内的生长

有研究表明,在动物体内以每 2 d 1 次腹腔注射 4 mg/kg 的 GA 是安全的^[15],并以 3 mg/kg 每 2 d 1 次腹腔注射 GA 对雄性裸鼠的体重变化基本没有影响^[16]。因此,对于 GA 我们选取 3 mg/kg 以每 2 d 1 次腹腔注射的方式进行给药。同时,我们以 Enz 作为阳性对照结果与 GA 的作用效果进行对比。Weyer-Czernilofsky 等^[17] 发现单独使用 Enz 30 mg/kg 可抑制 PC3 异种移植肿瘤的生长且小鼠体重保持平稳,因此对于 Enz 我们选取 30 mg/kg 每 2 d



注:以 β -actin 为内参基因和管家蛋白,以 0 $\mu\text{mol/L}$ GA 组为对照组。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 2 GA 在 mRNA、蛋白层面抑制 PCa 细胞 AR 的表达 ($n = 3$)

Note. β -actin was used as reference gene and housekeeping protein, and 0 $\mu\text{mol/L}$ GA group was used as control group. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Figure 2 GA inhibited the expression of AR in PCa cells at mRNA and protein levels

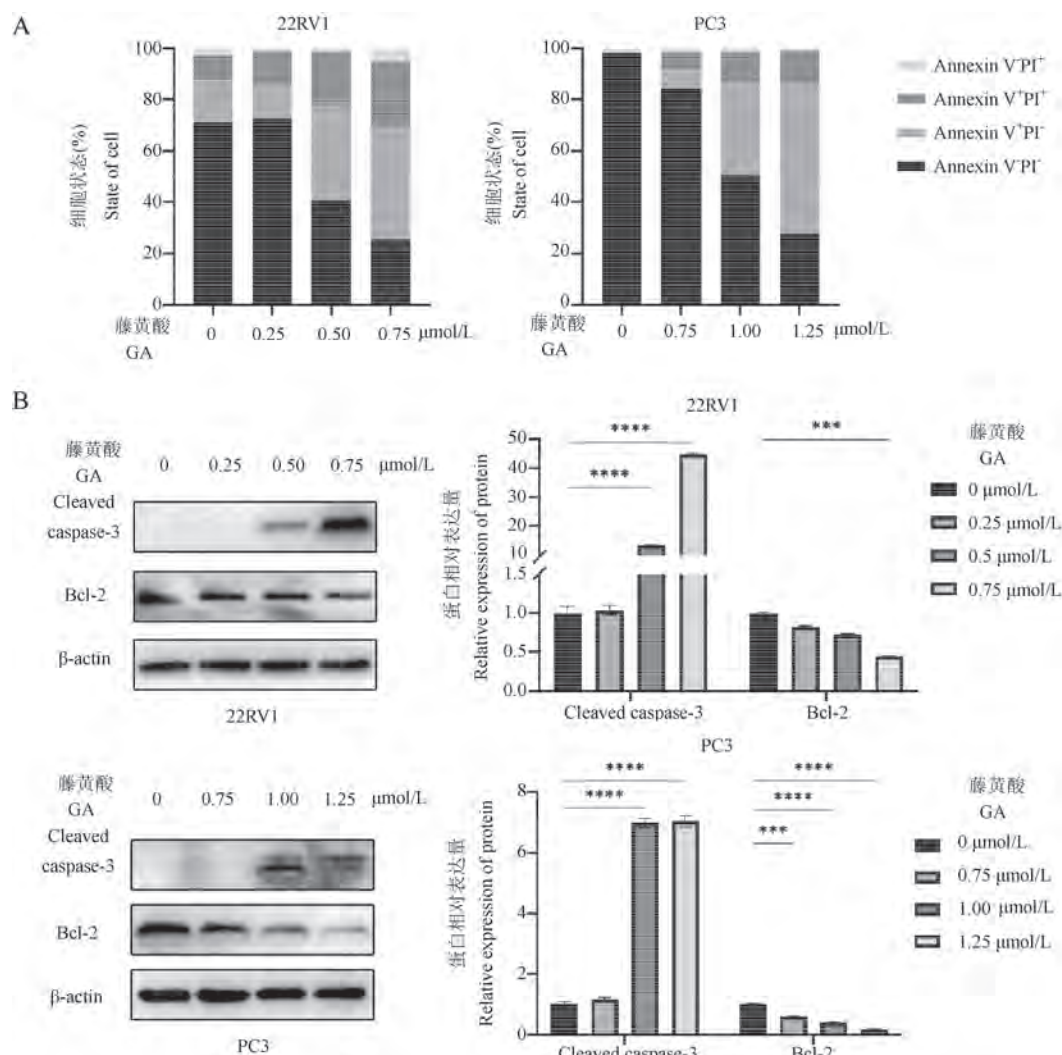
1 次灌胃的方式进行给药。整个实验过程中各组小鼠的各项体征保持相对稳定,实验结果如图 4 所示,GA 显著抑制了肿瘤的生长。与 Control 组相比,Enz 组的肿瘤重量和肿瘤体积虽然有所降低,但无统计学差异,而 GA 组的肿瘤重量和肿瘤体积显著降低 ($P < 0.01$)。与 Enz 组相比,GA 组对 PC3 异种移植肿瘤的抑制效果更加明显。

3 讨论

藤黄是一味具有消肿、攻毒、祛腐敛疮、止血、杀虫等功效的中药本草,中医古籍《不药良方》和《救生苦海》评价其可“治一切无名肿毒”。GA 是藤黄中的主要活性成分,现代医学已有报道 GA 对人类多种癌症具有抗肿瘤活性,但 GA 对高度异质性的 PCa 的研究较少。Enz 属于 AR 拮抗剂,是临床上治疗已扩散或复发的晚期 CRPC 的一线治疗药物,对 PCa 患者具有一定的选择性,且随着疾病的进展,获得性耐药的产生限制了 Enz 的治疗效果^[18]。本研究结果发现,与对 PCa 细胞具有选择性的 Enz 相比,GA 对分别代表了 PCa 进展过程中激素依赖性、去势抵抗性和神经内分泌性 3 个不同阶

段的 LNCaP、22RV1、PC3 细胞均有明显的抑制作用,并以剂量依赖性方式降低了 PCa 细胞的增殖和活性,表明 GA 对 PCa 细胞的增殖具有抑制作用。有研究表明,GA 对 PTEN^{-/-}/p53^{-/-} PCa 细胞同样具有很好的抑制作用^[11],然而该结果缺乏体内实验的研究。在本研究的体内实验中,Enz 在 30 mg/kg 的剂量下对难治性 PC3 异种移植植物具有一定的抑制效果,而 GA 组在 3 mg/kg 的剂量下已显著性抑制了肿瘤的生长,相比较 Enz 更具有明显的抑制作用。上述结果表明 GA 有望成为广谱应用于不同表型 PCa 的理想治疗药物。

此外,本研究发现 GA 可通过上调 Cleaved caspase-3 蛋白的表达和下调 Bcl-2 蛋白的表达促进 PCa 细胞的凋亡,这与 Shi 等^[6]的研究结果一致,明确了 GA 诱导 PCa 细胞凋亡与线粒体依赖性途径有关。AR 信号在 PCa 的发生发展过程中具有十分重要的作用,是 PCa 的主要驱动因子和治疗靶点^[19]。临床 ADT 处理和竞争性 AR 抑制剂治疗后 PCa 进展产生的 CRPC,其主要原因也是 AR 信号恢复的结果^[20]。本研究发现无论是代表 HNPC 还是 CRPC 的 PCa 细胞,GA 均可在 mRNA 水平和蛋白水平抑

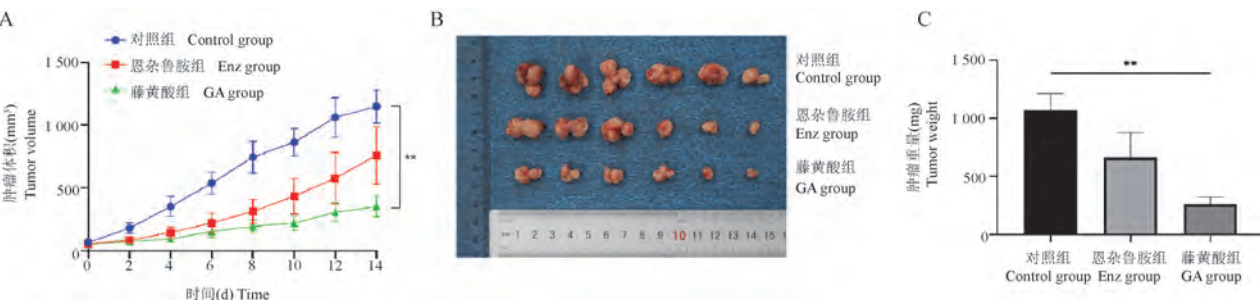


注:以 β-actin 为管家蛋白,以 0 μmol/L GA 组为对照组。与对照组相比,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图 3 GA 诱导 PCa 细胞凋亡($n=3$)

Note. β-actin was used as housekeeping protein and 0 μmol/L GA group was used as control group. Compared with control group, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 GA induced apoptosis of PCa cells



注:与 Control 组相比,** $P<0.01$;与 Enz 组相比,# $P<0.05$ 。

图 4 GA 抑制 PC3 异种植物体内的生长($n=6$)

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with Enz group, # $P<0.05$.

Figure 4 GA inhibited the growth of PC3 xenograft *in vivo*

制细胞 AR 的表达,说明 GA 对 PCa 的治疗效果与调控 AR 的水平密切相关。藤黄具有一定的毒性作用,但 GA 可能具有独特的选择性抗肿瘤机制。与正常细胞相比,癌细胞对 GA 的治疗更为敏感^[21]。本研究参照已有的文献报道,选取 3 mg/kg 的安全剂量,每 2 d 1 次腹腔注射,取得了良好的治疗效果,证实了 GA 的有效性^[16]。多项研究表明,GA 具有很好的协同作用,毒副作用低,可逆转多种癌症对临床药物产生的耐药性^[22-24],因此 GA 可能是癌细胞化学增敏的一种新药。研究报道,GA 与 Enz 或多西他赛在体外联合使用对抑制 LuCaP136 PDX 衍生的类器官培养物的生长具有良好的协同作用^[25],但 GA 和 Enz 在体内联合使用的效果尚不明确。因此,后续可以在体内实验中验证 GA 与 Enz 或其他临床药物联合使用对 PCa 的治疗效果。

综上所述,GA 可通过调控 Cleaved caspase-3 和 Bcl-2 的表达促进 PCa 细胞的凋亡进而抑制肿瘤细胞的生长,并抑制 PCa 细胞 AR 的表达。与临床一线治疗药物 Enz 相比,GA 对不同临床特征的 PCa 细胞均有治疗效果,能广泛抑制 PCa 细胞的增殖和活性,且起效剂量较低。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Singer EA, Golijanin DJ, Miyamoto H, et al. Androgen deprivation therapy for prostate cancer [J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(2): 211-228.
- [3] Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches [J]. Oncogene, 2013, 32(49): 5501-5511.
- [4] Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, et al. Clinical and genomic characterization of treatment-emergent small-cell neuroendocrine prostate cancer: A multi-institutional prospective study [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(24): 2492-2503.
- [5] Banik K, Harsha C, Bordoloi D, et al. Therapeutic potential of gambogic acid, a caged xanthone, to target cancer [J]. Cancer Lett, 2018, 416: 75-86.
- [6] Shi X, Chen X, Li X, et al. Gambogic acid induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells via inducing proteasome inhibition and caspase-dependent Bcr-Abl downregulation [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(1): 151-163.
- [7] Wang H, Zhao Z, Lei S, et al. Gambogic acid induces autophagy and combines synergistically with chloroquine to suppress pancreatic cancer by increasing the accumulation of reactive oxygen species [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 7.
- [8] Wang S, Xu Y, Li C, et al. Gambogic acid sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by promoting the crosstalk of extrinsic and intrinsic apoptotic signalings [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 119: 334-341.
- [9] Duan D, Zhang B, Yao J, et al. Gambogic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by targeting cytosolic thioredoxin reductase [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 69: 15-25.
- [10] Li X, Tang X, Su J, et al. Involvement of E-cadherin/AMPK/mTOR axis in LKB1-induced sensitivity of non-small cell lung cancer to gambogic acid [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 169: 113635.
- [11] Pan H, Lu LY, Wang XQ, et al. Gambogic acid induces cell apoptosis and inhibits MAPK pathway in PTEN^{-/-}/p53^{-/-} prostate cancer cells *in vitro* and *ex vivo* [J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(2): 109-116.
- [12] Lü L, Tang D, Wang L, et al. Gambogic acid inhibits TNF- α -induced invasion of human prostate cancer PC3 cells *in vitro* through PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(4): 531-541.
- [13] Yi T, Yi Z, Cho SG, et al. Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1843-1850.
- [14] Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(12): 701-711.
- [15] Guo Q, Qi Q, You Q, et al. Toxicological studies of gambogic acid and its potential targets in experimental animals [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 99(2): 178-184.
- [16] Wang W, Li X, Wang Z, et al. A novel "mosaic-type" nanoparticle for selective drug release targeting hypoxic cancer cells [J]. Nanoscale, 2019, 11(5): 2211-2222.
- [17] Weyer-Czernilofsky U, Hofmann MH, Friedbichler K, et al. Antitumor activity of the IGF-1/IGF-2-neutralizing antibody xentuzumab (BI 836845) in combination with enzalutamide in prostate cancer models [J]. Mol Cancer Ther, 2020, 19(4): 1059-1069.
- [18] Wang Y, Chen J, Wu Z, et al. Mechanisms of enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer and therapeutic strategies to overcome it [J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(2): 239-261.
- [19] Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer [J]. Endocr Rev, 2004, 25(2): 276-308.
- [20] Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer [J]. Pharmacol Ther, 2013, 140(3): 223-238.
- [21] Yang Y, Yang L, You QD, et al. Differential apoptotic induction of gambogic acid, a novel anticancer natural product, on hepatoma cells and normal hepatocytes [J]. Cancer Lett, 2007,

- 256(2): 259–266.
- [22] Wang T, Wei J, Qian X, et al. Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 262(2): 214–222.
- [23] Xia G, Wang H, Song Z, et al. Gambogic acid sensitizes gemcitabine efficacy in pancreatic cancer by reducing the expression of ribonucleotide reductase subunit-M2 (RRM2) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 107.
- [24] Wang LH, Li Y, Yang SN, et al. Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- κ B and MAPK/HO-1 signalling [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(2): 341–352.
- [25] Pan H, Jansson KH, Beshiri ML, et al. Gambogic acid inhibits thioredoxin activity and induces ROS-mediated cell death in castration-resistant prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77181–77194.

[收稿日期]2022-01-13

(上接第 28 页)

- [9] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 269–271.
- [10] 杜丽娜, 苏燕胜, 张武合, 等. STYK1 基因在前列腺癌中的表达及意义 [J]. *空军医学杂志*, 2021, 37(4): 308–312.
- [11] 王卫, 刘克剑, 吴芳新, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIVmac239)多次直肠暴露对机体细胞免疫的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(8): 1–6.
- [12] Chen Y, Wang D, Peng H, et al. Epigenetically upregulated oncoprotein PLCE1 drives esophageal carcinoma angiogenesis and proliferation via activating the PI-PLC ϵ -NF- κ B signaling pathway and VEGF-C/Bcl-2 expression [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 1.
- [13] Samer S, Arif MS, Giron LB, et al. Nicotinamide activates latent HIV-1 *ex vivo* in ART suppressed individuals, revealing higher potency than the association of two methyltransferase inhibitors, chaetocin and BIX01294 [J]. *Braz J Infect Dis*, 2020, 24(2): 150–159.
- [14] 陈宏, 毛华. 细菌、病毒感染与程序性细胞死亡 [J]. *国外医学(临床生物化学与检验学分册)*, 1999, 4: 175–176.
- [15] Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4⁺ T subpopulations [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(8): e1007991.
- [16] Martin GE, Frater J. Post-treatment and spontaneous HIV control [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2018, 13(5): 402–407.
- [17] Bam RA, Hansen D, Irrinki A, et al. TLR7 agonist GS-9620 is a potent inhibitor of acute HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 61(1): e01369–e01385.
- [18] 林健. PR-957 对潜伏 HIV 的激活效应及其机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [19] Rullas J, Bermejo M, García-Pérez J, et al. Prostratin induces HIV activation and downregulates HIV receptors in peripheral blood lymphocytes [J]. *Antivir Ther*, 2004, 9(4): 545–554.
- [20] French AJ, Natesampillai S, Krogman A, et al. Reactivating latent HIV with PKC agonists induces resistance to apoptosis and is associated with phosphorylation and activation of BCL2 [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(10): e1008906.
- [21] Deeks SG, Lewin SR, Ross AL, et al. International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016 [J]. *Nat Med*, 2016, 22(8): 839–850.
- [22] 桑伟伟, 张红胜. SIRT1 影响 Tat 介导的 HIV-1 转录 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, 26(11): 975–980.
- [23] Kwon HS, Brent MM, Getachew R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(3): 158–167.
- [24] Liu X, Yang T, Sun T, et al. SIRT1-mediated regulation of oxidative stress induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides in human alveolar epithelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 813–818.
- [25] Hwang ES, Song SB. Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 *in vitro*, but can be a stimulator in cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18): 3347–3362.

[收稿日期]2021-12-22

闫峰, 田悦, 黄语悠, 等. 豨莶通栓胶囊减轻慢性脑缺血大鼠认知功能损伤的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (5): 47-52, 76.

Yan F, Tian Y, Huang YY, et al. Use of xi-xian-tong-shuan capsules for alleviating vascular cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 47-52, 76.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 007

豨莶通栓胶囊减轻慢性脑缺血大鼠认知功能损伤的机制研究

闫 峰¹, 田 悦^{1,2}, 黄语悠¹, 钟丽媛¹, 罗玉敏^{1*}

(1.首都医科大学宣武医院脑血管病研究室,北京 100052;2.广州中医药大学科技创新中心,广州 510405)

【摘要】 目的 研究豨莶通栓胶囊对大鼠慢性脑缺血 (chronic cerebral hypoperfusion, CCH) 模型的作用及对血脑屏障的影响。**方法** 使用 SD 大鼠制作双侧颈总动脉结扎慢性脑缺血模型,造模后连续灌胃豨莶通栓 (xi-xian-tong-shuan, XXTS) 42 d。应用水迷宫评价大鼠学习认知功能,尼氏染色观察海马区神经元,免疫荧光染色观察血脑屏障损伤程度,分别使用 ELISA 和 Western blot 检测血浆、脑组织中血脑屏障相关蛋白含量。**结果** 豨莶通栓胶囊可改善慢性脑缺血后大鼠学习认知功能下降,减少海马区神经元中尼氏小体减少、IgG 漏出,降低血浆中 MMP-9、claudin-5、occludin 的水平,提高脑组织中 claudin-5、occludin 的表达量。**结论** 豨莶通栓胶囊可以减轻血脑屏障损伤,改善慢性脑缺血后学习认知功能。

【关键词】 慢性脑缺血;血管性认知损伤;豨莶通栓胶囊;血脑屏障

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0047-06

Use of xi-xian-tong-shuan capsules for alleviating vascular cognitive impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion

YAN Feng¹, TIAN Yue^{1,2}, HUANG Yuyou¹, ZHONG Liyuan¹, LUO Yumin^{1*}

(1. Institute of Cerebrovascular Disease Research, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100052, China.

2. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405)

【Abstract】 Objective To study the effects of xi-xian-tong-shuan capsules on chronic cerebral hypoperfusion rats. **Methods** A rat model of chronic cerebral hypoperfusion was established by ligating bilateral common carotid arteries, and then xi-xian-tong-shuan capsules were given daily for 42 days. Water maze test was used to evaluate the learning and cognitive functions of these rats. Neurons in the hippocampus were observed by Nissl's staining and blood brain barrier (BBB) function was evaluated by immunofluorescence staining. BBB-related proteins in plasma and brain tissues were detected by ELISA and Western blot, respectively. **Results** Xi-xian-tong-shuan capsules ameliorated the declines of learning and cognitive functions in rats after chronic cerebral hypoperfusion, reduced the number of Nissl bodies and amount of IgG leakage in the hippocampus, and enhanced the expression of BBB-related proteins, when compared with those in the model group. **Conclusions** Xi-xian-tong-shuan capsules improved learning and cognitive functions after chronic cerebral ischemia by alleviating the damage to the BBB.

【Keywords】 chronic cerebral hypoperfusion; vascular cognitive impairment; xi-xian-tong-shuan capsule; blood brain barrier

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(82171301)。

[作者简介]闫峰(1984—),男,主管技师,博士,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail: yanfeng@ccmu.edu.cn

[通信作者]罗玉敏(1965—),女,教授,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail: yumin111@ccmu.edu.cn

缺血性脑血管病已成为威胁我国人民健康的头号杀手,随着人口老龄化社会的进入,我国脑血管病的发病率在近几年快速增长^[1]。其中慢性脑缺血作为一种常见的病理状态,伴发于血管性痴呆、老年性痴呆等多种神经系统疾病的进程中。因慢性脑缺血导致的运动、认知、行为能力以及学习记忆等功能障碍的患者人群越来越多,给患者和家人带来了严重的危害,给社会造成了严重的负担。与急性脑缺血相比,慢性脑缺血的治疗时间窗更长,早期干预,可以改善临床预后。但目前治疗慢性脑缺血的药物较少,亟待开发。

慢性脑缺血发病机制复杂,最新研究表明,血脑屏障(blood brain barrier, BBB)损伤,参与了慢性脑缺血的发生发展^[2-3]。豨莶通栓(xi-xian-tong-shuan, XXTS)胶囊由豨莶草等 13 味君臣佐使的中药药物组方,能够活血祛瘀、祛风化痰、舒筋通络、醒脑开窍。用于缺血性中风风痰痹阻脉络证引起的半身不遂、偏身麻木、口舌歪斜,语言蹇涩。在慢性脑缺血的治疗中是否能发挥神经保护作用报道较少。因此,本研究应用慢性脑缺血大鼠模型研究豨莶通栓胶囊对大鼠慢性脑缺血的作用及对 BBB 的影响,为后续药物的适应症开发提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠(270~300 g, 8~10 周龄)21 只,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],饲养于中国疾病预防控制中心 SPF 级动物实验室[SCXK(京)2019-0050]。所有动物实验均遵守 3R 原则及首都医科大学宣武医院动物伦理委员会相关要求(xw20211117-1)。

1.2 主要试剂与仪器

豨莶通栓胶囊(山西晋新双鹤药业有限责任公司,国药准字 z20040065);异氟烷(河北一品制药股份有限公司,国药准字 H19980141);IgG 荧光抗体(Alexa Flour 488, Life, 1:500);一抗(occludin, 1:250, Abcam, ab31721; claudin-5, 1:500, Santa, sc-28670);二抗(1:2000, 中杉金桥);基质金属蛋白酶 ELISA 试剂盒(MMP-9, 江苏酶免实业有限公司, MM-20918R2);紧密连接蛋白 ELISA 试剂盒(occludin, 江苏酶免实业有限公司 MM-70051R2; claudin-5, 江苏酶免实业有限公司, MM-61504R2)。显微镜(Nikon, 941176);水迷宫(上海科欣电子科技有限公司);酶标仪(Labsystems Multiskan MS, 芬兰)。

1.3 实验方法

1.3.1 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 CCH 模型及分组

术前 12 h 禁食水。CCH 模型组制作:5%异氟烷吸入诱导麻醉后取仰卧位固定,2%异氟烷维持麻醉状态。颈部备皮后碘伏消毒,沿颈部正中线切开皮肤,钝性分离筋膜、肌肉组织,充分暴露颈总动脉并小心分离,注意避免损伤迷走神经,用 6-0 线结扎右侧颈总动脉,缝合伤口。30 min 后同样步骤结扎左侧颈总动脉。假手术组找到双侧颈总动脉并与周围肌肉组织分离而不结扎。SD 大鼠随机分组:假手术组(Sham, $n=7$)、模型组(CCH, $n=7$)、模型+豨莶通栓胶囊组(CCH+XXTS, $n=7$)。

1.3.2 给药方法

大鼠术后第 2 天开始灌胃给药,豨莶通栓胶囊组大鼠给药剂量为 500 mg/(kg·d),假手术组与模型组给予相同体积的蒸馏水,所有大鼠术后持续灌胃 42 d。

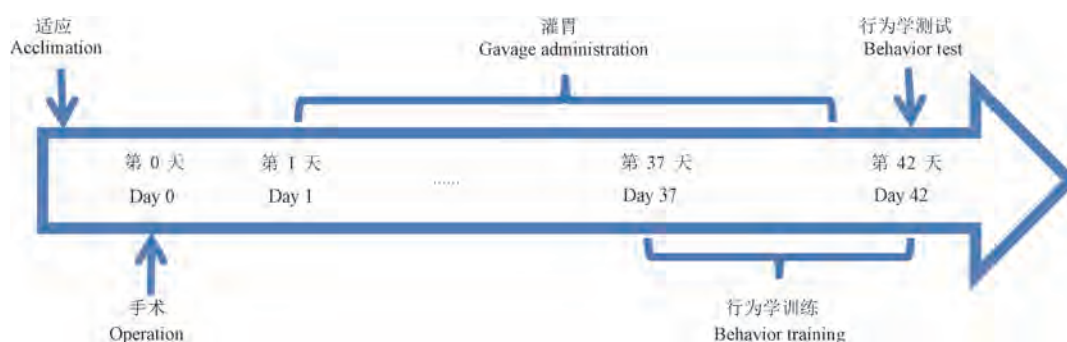


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental sequence

1.3.3 Morris 水迷宫实验

采取 Morris 水迷宫方法对大鼠的认知、记忆功能进行评价。Morris 水迷宫是用来评价大鼠脑缺血后空间学习记忆特征。本研究在大鼠手术后第 37~42 天进行学习训练,第 42 天进行记忆检测并记录(具体流程见图 1)。

1.3.4 取材与组织标本留存

所有组织与血液均在第 42 天完成水迷宫实验后当天取得。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后下腔静脉采集静脉血液 4 mL, EDTA 抗凝。离心(3000 r/min, 10 min)后,取上清血浆并分装, -80℃ 冷藏待后续检测。大鼠心脏灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛后取脑组织进行石蜡包埋及切片。

1.3.5 尼氏染色

石蜡切片常规脱蜡后放入 1% 焦油紫染液中于 37℃ 烤箱中染色 30 min, 后用蒸馏水小心冲洗脑组织表面染液。将切片放于 95% 乙醇溶液中分色后放入新的 95% 乙醇溶液中脱水 2 min。将切片放入二甲苯溶液中浸泡 10 min 后用中性树脂封片。显微镜下观察海马组织神经元变化并选取代表性位置拍照。

1.3.6 IgG 法检测血脑屏障通透性

大鼠脑组织石蜡切片常规脱蜡后,使用 5% BSA+驴血清封闭 4℃ 过夜。第 2 天使用 1:200 大鼠 IgG 荧光抗体避光孵育 24 h。后使用 PBS 常规清洗并用含 DAPI 的树脂封片剂封片。荧光显微镜观察并拍照。

1.3.7 ELISA 检测血脑屏障相关因子

根据 ELISA 说明书操作步骤,检测血浆中基质金属蛋白酶和紧密连接蛋白的含量。

1.3.8 Western blot 检测血脑屏障相关蛋白表达

取大鼠海马组织放入裂解液中用超声破碎匀浆后取上清,分光光度计测量蛋白浓度并定量变性后,取 20 μg 蛋白上样电泳、电转。将 PVDF 膜用 5% 牛奶封闭 1 h 后,加入一抗,4℃ 冰箱孵育过夜。次日常规洗膜后二抗室温孵育 1 h,常规洗膜后加发光液曝光。

1.4 统计学方法

采用 GaphPad Prism8 对实验数据进行统计分析。实验数据采用平均数±标准误差($\bar{x} \pm \bar{sx}$)表示。实验数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)统计,利用 Tukey 进行检验分析。 $P < 0.05$

代表组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稀荛通栓胶囊改善慢性脑缺血大鼠学习记忆能力

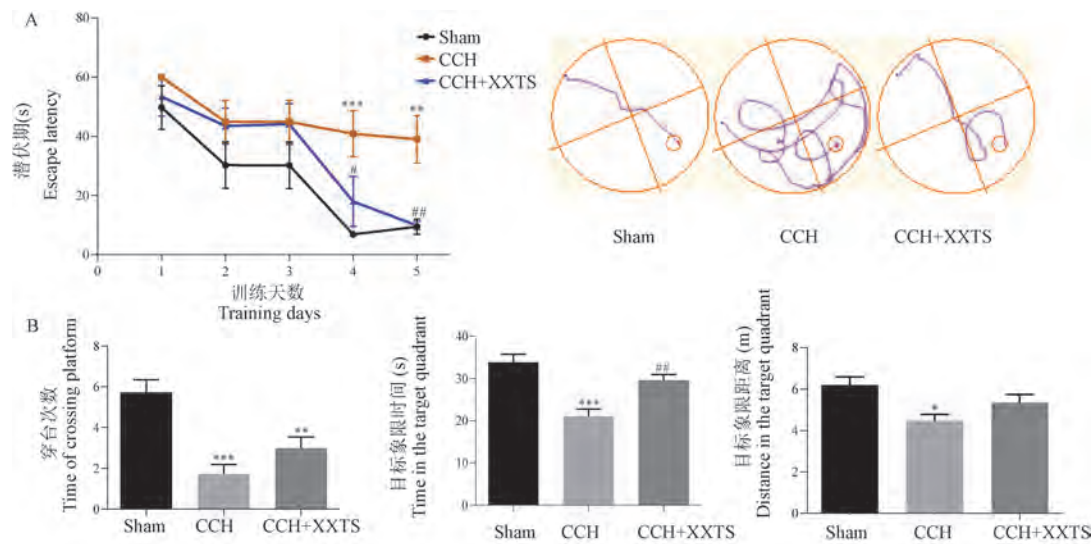
由于慢性脑缺血常导致认知功能损伤,因此我们使用 Morris 水迷宫对不同处理组大鼠的学习记忆能力进行了检测。结果显示,各组大鼠在 5 d 的训练中找到平台的潜伏期均随学习次数的增加而下降。训练第 4 天及第 5 天后,Sham 组和 CCH+XXTS 组找到平台的潜伏期均显著低于 CCH 组($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, 图 2A)。以上结果表明给予稀荛通栓胶囊治疗可以明显改善大鼠慢性脑缺血后学习能力下降的现象。在撤平台后对大鼠记忆能力的检测中发现,CCH 组大鼠的穿越平台次数、目标象限距离、目标象限时间,较 Sham 组均出现明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.001$, 图 2B)。给予稀荛通栓治疗后,大鼠记忆力改善,CCH+XXTS 组大鼠在目标象限停留时间显著高于 CCH 组。($P < 0.01$, 图 2B)。

2.2 稀荛通栓胶囊改善慢性脑缺血大鼠海马区神经元损伤

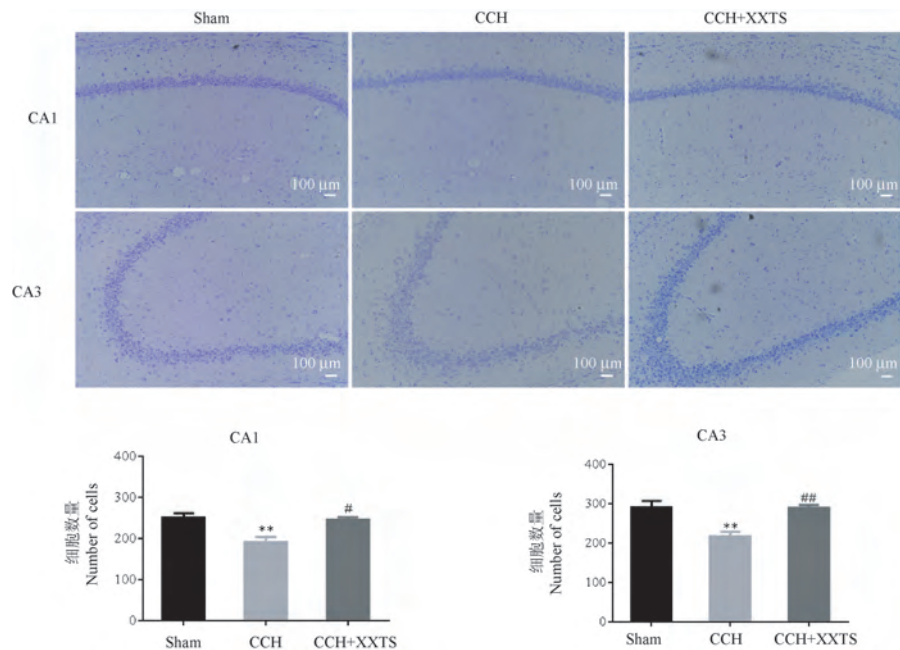
尼氏染色结果显示,正常对照组大鼠海马 CA1、CA3 区神经元染色可见深蓝色尼氏小体,神经元数目较多;慢性脑缺血后大鼠海马区神经元尼氏小体染色变淡,排列散乱,数量明显减少,胞体缩小。给予稀荛通栓胶囊治疗后,大鼠海马区神经元,尼氏小体染色较 CCH 组明显加深,数量增多,海马 CA1、CA3 区神经元损伤得到改善($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, 图 3)。

2.3 稀荛通栓胶囊减少慢性脑缺血后大鼠脑组织 IgG 渗出

IgG 分子量较大,在正常情况下其只存在于血管中。当血脑屏障被破坏后,血管中的 IgG 会渗漏到脑组织中。为了观察稀荛通栓胶囊对慢性脑缺血大鼠 BBB 通透性的影响,我们对脑组织切片 IgG 渗漏情况进行了检测。结果显示,与对照组相比,慢性脑缺血损伤大鼠脑组织 IgG 漏出量明显增多,给予稀荛通栓胶囊治疗后,可以显著减少大鼠脑组织中 IgG 的漏出量($P < 0.05$, $P < 0.01$, 图 4)。



注:与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 CCH 组相比, ## $P<0.01$ 。
图 2 稀荛通栓胶囊改善慢性脑缺血大鼠学习记忆能力($n=7$)
Note. Compared with Sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with CCH group, ## $P<0.01$.
Figure 2 Xi-xian-tong-shuan capsules improve the learning and memory abilities of CCH rats



注:与 Sham 组相比, ** $P<0.01$;与 CCH 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 3 稀荛通栓胶囊改善慢性脑缺血大鼠海马区神经元损伤($n=3$)
Note. Compared with Sham group, ** $P<0.01$. Compared with CCH group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.
Figure 3 Xi-xian-tong-shuan capsules reduce the number of Nissl body in hippocampus

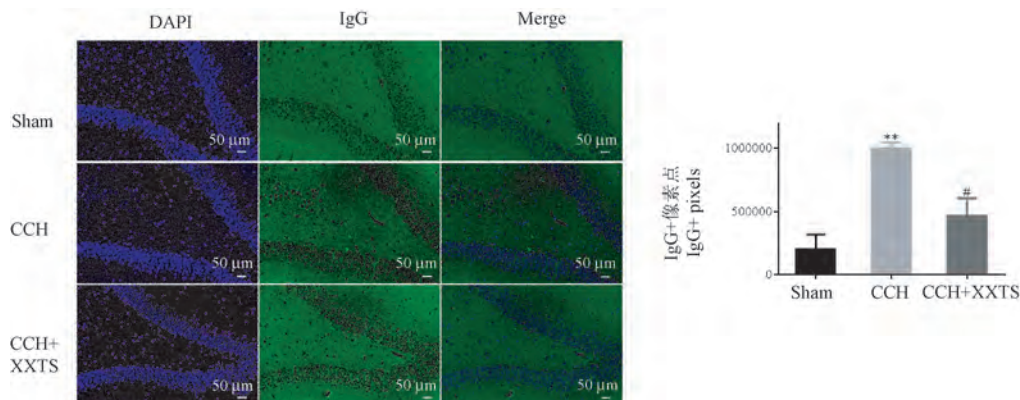
2.4 稀荛通栓胶囊减少慢性脑低灌注大鼠血浆 MMP-9、occludin、claudin-5 浓度
我们应用 ELISA 的方法检测了 Sham 组、CCH 组、CCH+XXTS 组血浆中 MMP-9、occludin、claudin-5 的蛋白浓度。结果显示与假手术相比,

CCH 组血浆中 MMP-9、occludin、claudin-5 浓度显著高于 Sham 组,给予稀荛通栓胶囊可显著降低慢性脑缺血损伤后血浆中 MMP-9、occludin、claudin-5 浓度($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$, $P<0.0001$,图 5)。

2.5 稀莶通栓胶囊增加慢性脑低灌注大鼠脑组织中紧密连接相关蛋白表达的影响

我们应用 Western blot 的方法检测了 Sham 组、CCH 组、CCH+XXTS 组脑组织中紧密连接相关蛋白

occludin 和 claudin-5 的表达情况。结果显示与 Sham 组相比, CCH 组中 occludin 和 claudin-5 的表达显著减少, 给予稀莶通栓胶囊治疗可显著上调上述紧密连接蛋白的表达 ($P<0.05$, $P<0.05$, 图 6)。

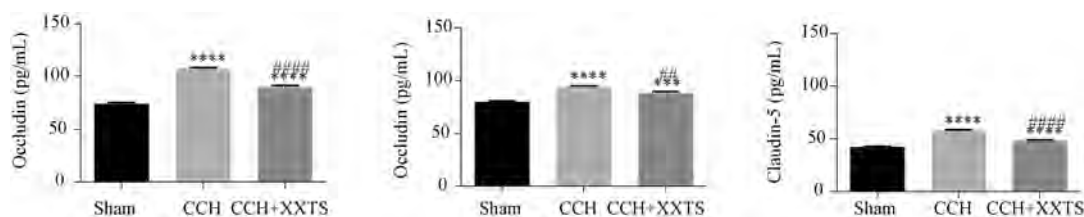


注: 与 Sham 组相比, ** $P<0.01$; 与 CCH 组相比, # $P<0.05$ 。

图 4 稀莶通栓胶囊减少慢性脑缺血大鼠海马 IgG 漏出 ($n=3$)

Note. Compared with Sham group, ** $P<0.01$. Compared with CCH group, # $P<0.05$.

Figure 4 Xi-xian-tong-shuan capsules reduce the IgG leakage in hippocampus

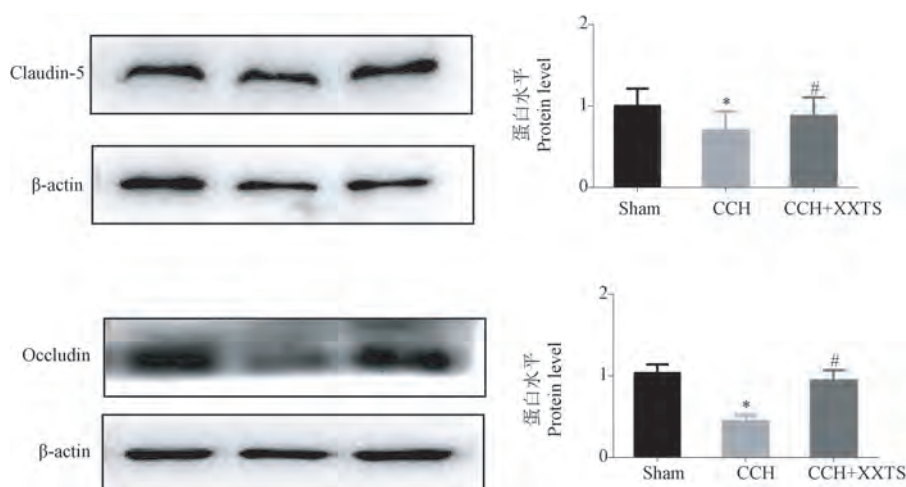


注: 与 Sham 组相比, *** $P<0.0001$, **** $P<0.0001$; 与 CCH 组相比, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$ 。

图 5 稀莶通栓胶囊减少慢性脑缺血大鼠血浆 MMP-9、occludin、claudin-5 水平 ($n=7$)

Note. Compared with Sham group, *** $P<0.0001$, **** $P<0.0001$. Compared with CCH group, ## $P<0.01$, #### $P<0.0001$.

Figure 5 Xi-xian-tong-shuan capsules improve the leave of MMP-9, occluding and claudin-5 in plasma



注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$; 与 CCH 组相比, # $P<0.05$ 。

图 6 稀莶通栓胶囊改善慢性脑缺血大鼠脑组织中 occludin、claudin-5 水平 ($n=3$)

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

Figure 6 Xi-xian-tong-shuan capsules improve the leave of occludin and claudin-5 in brain

3 讨论

慢性脑血管病与动脉粥样硬化、糖尿病、肾病等常见病息息相关,目前的研究发现慢性脑血管病的损伤机制主要包括脑白质损伤、神经炎症、细胞新生、神经细胞凋亡坏死等,血脑屏障作为中枢神经系统与外周的屏障,其在慢性脑血管病中的作用越来越受到重视^[4-6]。长期脑血管低灌注会导致 BBB 受损,通透性增加,脑微血管中水分和血浆蛋白的渗出,进而造成细胞间隙水分的增加,形成血管源性水肿。我们应用大鼠双侧颈总动脉结扎慢性脑缺血模型,观察脑慢性缺血后给予稀荃通栓胶囊 42 d 后,观察大鼠学习记忆能力和血脑屏障等情况。我们发现稀荃通栓胶囊可以明显改善慢性脑缺血造成的大鼠学习记忆能力下降的现象。在水迷宫实验中我们发现,给予稀荃通栓胶囊治疗组大鼠在撤平台后其穿台次数及目标象限时间均较模型组有明显改善。说明了稀荃通栓胶囊对于改善慢性脑缺血后认知记忆功能下降方面的作用。虽然在目标象限距离指标中稀荃通栓治疗组与模型组没有统计学差异,但由于目标象限时间和游速决定的,部分稀荃通栓治疗组组动物在到达其记忆的平台位置漂浮在水中不再移动,因而产生了此种结果。在血脑屏障功能检测中我们发现慢性脑低灌注损伤后大鼠血脑屏障破坏,而稀荃通栓胶囊治疗后可显著改善此情况。我们通过实验证实脑组织 BBB 破坏后引起毛细血管的通透性增加,可以使正常情况下只存在于血管中的大分子 IgG 通过破坏的 BBB 进入脑组织,因此测定脑组织中 IgG 渗出量可以反映 BBB 开放程度^[7]。我们通过对大鼠脑组织中 IgG 的荧光染色发现,稀荃通栓胶囊治疗可以显著减少慢性脑低灌注损伤后可脑组织中 IgG 的含量。以上结果提示我们,稀荃通栓胶囊治疗可以改善慢性脑低灌注损伤后 BBB 的损伤、降低其通透性。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是含有 Zn^{2+} 的蛋白水解酶家族。一方面, MMPs 可以降解细胞外基质 (ECM), 进而使得脑毛细血管的通透性增加,引起水分和血浆蛋白的渗出,形成水肿。另一方面, MMPs 对基底膜和内皮细胞间的紧密连接的破坏直接导致 BBB 损伤,参与多种病理情况下的 BBB 的开放^[8-11]。紧密连接相关蛋白在维持 BBB 完整性的过程中发挥关键的作用,

其结构和功能的破坏将引起 BBB 通透性增加,甚至脑水肿。其中 claudin-5 和 occludin 蛋白是细胞与细胞之间紧密连接完整性最关键的成分^[12-13]。研究发现,缺血损伤可以上调脑组织中 MMP-9 的表达,与缺血损伤后脑水肿和 BBB 开放密切相关,其机制可能与 MMP-9 直接降解紧密连接蛋白有关^[14]。因此为了进一步证实稀荃通栓胶囊对慢性脑低灌注损伤后 BBB 的保护作用,我们对血液中的 MMP-9 以及血液和脑组织中的紧密连接相关蛋白的表达进行了测定。我们发现血液中的 claudin-5 和 occludin 含量明显升高,这与临床研究发现脑血管病人血清中其二者的变化结果相一致^[15],且 MMP-9 的表达量明显上调。在脑组织中的紧密连接相关蛋白表达检测中我们发现紧密连接相关蛋白表达明显减少。并且稀荃通栓治疗后能够明显改善以上结果。这些研究结果均提示,稀荃通栓胶囊可能通过抑制 MMP-9 的表达,减少脑组织中紧密连接相关蛋白 claudin-5 和 occludin 的降解,最终发挥对 BBB 的保护作用。

综上所述,稀荃通栓胶囊可能通过保护血脑屏障的功能发挥神经保护作用,改善慢性脑缺血后大鼠的认知功能。

参考文献:

- [1] Li ZX, Jiang Y, Li H, et al. China's as response to the rising stroke burden [J]. BMJ, 2019, 364: 1879.
- [2] Liu QH, Radwanski R, Babadjouni R, et al. Experimental chronic cerebral hypoperfusion results in decreased pericyte coverage and increased blood-brain barrier permeability in the corpus callosum [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39(2): 240-250.
- [3] Yang HY, Wang W, Jia LF, et al. The effect of chronic cerebral hypoperfusion on blood-brain barrier permeability in a transgenic Alzheimer's disease mouse model (PS1V97L) [J]. J Alzheimers Dis, 2020, 74(1): 261-275.
- [4] 张悦, 赵虹, 郭朝晖, 等. 慢性脑缺血致脑白质病变的机制及研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1914-1918.
- [5] 韩星伟. 慢性缺血性脑血管病与动脉硬化性狭窄的关系 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20(11): 130-131.
- [6] 郝茂林, 刘菲, 商校, 等. 慢性肾脏病与脑血管病关系的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 22(21): 4101-4104.
- [7] Pan JJ, Qu MJ, Li YF, et al. MicroRNA-126-3p/-5p overexpression attenuates blood-brain barrier disruption in a mouse model of middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2020, 51(2): 619-627.

(下转第 76 页)

武云, 闫倩芝, 王捷, 等. 内质网应激-线粒体自噬通路在大鼠肺动脉高压中的作用观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 53-59.

Wu Y, Yan QZ, Wang J, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress-mitochondrial autophagy pathway on pulmonary hypertension in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 53-59.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 008

内质网应激-线粒体自噬通路在大鼠肺动脉高压中的作用观察

武云^{1*}, 闫倩芝¹, 王捷², 张敏芳³, 王瑞¹, 王世超¹

(1.新疆医科大学第一附属医院全科医学科, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆医科大学第一附属医院药学科, 乌鲁木齐 830054; 3.新疆医科大学电镜室, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 在野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠模型上抑制内质网应激, 观察内质网应激-线粒体自噬通路在大鼠肺动脉高压中的作用。**方法** 选择 45 只 SD 大鼠, 将其随机分为 3 组: 分别为正常对照组、野百合碱诱导的肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)组及 4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid, 4-PBA)药物干预组, 每组 15 只。利用生物信息采集系统测定各组大鼠血流动力学指标平均肺动脉压力和平均右心室压力; 采用苏木精-伊红染色观察肺血管重塑改变, 并利用 Image J 病理分析软件测定肺血管重塑相关指标; 在电镜下观察肺血管平滑肌细胞中线粒体状态改变; 采用 qPCR 分子生物学手段测定内质网应激-线粒体自噬通路关键因子的 mRNA 表达水平。**结果** (1)野百合碱诱导的 PAH 组平均肺动脉压力及平均右心室压力均升高。经过 4-PBA 干预后, 与 PAH 组相比, 平均肺动脉压力及平均右心室压力均下降($P < 0.001$)。(2)HE 染色后发现 PAH 组肺小血管重塑明显, 血管重塑指标测定提示肺小动脉中膜厚度增加, 管腔狭窄($P < 0.05$)。(3)电镜观察肺血管平滑肌细胞超微结构发现, PAH 组肺血管平滑肌细胞线粒体肿胀、线粒体嵴结构破坏, 溶解消失, 可见线粒体自噬现象增多。抑制内质网应激后, 线粒体正常结构破坏减少, 线粒体自噬减少。(4)内质网应激-线粒体自噬通路关键因子的 mRNA 水平测定结果发现, PAH 组内质网应激相关因子 PERK、ATF4、Bcl-2、CHOP 的 mRNA 表达水平上调($P < 0.001$), 线粒体融合关键因子 Mfn2 (mitofusin-2) 表达水平下调, 线粒体分裂关键因子 Drp1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 表达上调($P < 0.001$), 自噬相关因子 12 (autophagy related 12, Atg12)、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3 (microtubule-associated proteins 1A and 1B, LC3)、p62 (sequestosome-1, p62/SQSTM1) 的 mRNA 表达上调($P < 0.01$)。抑制内质网应激后, 内质网应激相关因子的 mRNA 表达水平下降($P < 0.001$), 线粒体融合因子 Mfn2 表达上调($P < 0.001$), 线粒体分裂因子 Drp1 的 mRNA 表达下调($P < 0.001$), Atg12、LC3 和 p62 的 mRNA 表达水平降低($P < 0.01$)。**结论** 内质网应激可能通过线粒体自噬途径在肺动脉高压发生发展中发挥重要作用, 干预该通路可能为肺动脉高压的防治提供治疗新思路。

【关键词】 内质网应激; 线粒体自噬; 肺动脉高压; 肺血管平滑肌细胞; 4-苯基丁酸

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0053-07

Effect of endoplasmic reticulum stress-mitochondrial autophagy pathway on pulmonary hypertension in rats

WU Yun^{1*}, YAN Qianzhi¹, WANG Jie², ZHANG Minfang³, WANG Rui¹, WANG Shichao¹

(1. Department of General Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China.
2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054. 3. Electron Microscope Lab, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金项目(81860096)。

【作者简介】 武云(1980—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 肺血管疾病基础与临床。E-mail: wuyun8009@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of the endoplasmic reticulum (ER) stress-mitochondrial autophagy pathway in pulmonary arterial hypertension (PAH) in rats by inhibiting ER stress induced by monocrotaline. **Methods** SD rats were randomly divided into three groups (15 rats per group): normal control group, group with PAH induced by monocrotaline, and 4-phenylbutyric acid (4-PBA) group. The mean pulmonary artery pressure (mPAP) and mean right ventricular pressure (mRVP) in the rats were measured by the Biological Information Acquisition System. The remodeling of pulmonary vessels was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, while ImageJ was used to measure indices related to pulmonary vascular remodeling. The ultrastructure of mitochondria in pulmonary artery smooth muscle cells was observed by electron microscopy. Quantitative real-time PCR analysis was used to measure the mRNA levels of the key factors in the ER stress-mitochondrial autophagy pathway. **Results** (1) mPAP and mRVP increased in the PAH group ($P < 0.001$). However, after 4-PBA intervention, mPAP and mRVP decreased compared with those in the PAH group ($P < 0.001$). (2) HE staining showed clear remodeling of pulmonary small vessels in the PAH group, and the measurement of vascular remodeling indices indicated increased thickness of pulmonary arteriole media and lumen stenosis ($P < 0.05$). (3) The mitochondria of pulmonary artery smooth muscle cells in the PAH group were swollen, the mitochondrial crista structure had dissolved or disappeared, and mitochondrial autophagy was increased, as revealed by electron microscopy. After the ER stress was inhibited, destruction of the mitochondrial structure and mitochondrial autophagy were reduced. (4) Compared with those in the NC group, the mRNA expression levels of ERS-related factors PERK, ATF4, Bcl-2 and CHOP were increased in the PAH group ($P < 0.001$), mitochondrial fusion factor Mfn2 decreased ($P < 0.001$), mitochondrial fission factor Drp1 increased ($P < 0.001$), and the expression of Atg12, LC3 and p62 increased in the PAH group ($P < 0.001$). After rats had been administered 4-PBA, the mRNA expression levels of ERS-related factors decreased ($P < 0.001$), the mRNA level of Mfn2 increased ($P < 0.001$), while that of Drp1 decreased ($P < 0.001$). Moreover, the mRNA expression levels of mitochondrial autophagy factors Atg12, LC3 and P62 ($P < 0.01$) decreased. **Conclusions** ERS may promote the establishment and progression of pulmonary hypertension through the mitochondrial autophagy pathway. This may provide a new concept for the treatment and prevention of pulmonary hypertension.

【Keywords】 endoplasmic reticulum stress; mitochondrial autophagy; pulmonary hypertension; pulmonary vascular smooth muscle cell; 4-phenylbutyric acid

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是各种原因引起的静息状态下右心导管测得的肺动脉平均压 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP) ≥ 25 mmHg 的一组临床常见病症, 肺血管重构是其重要的病理生理过程。这类患者因长期缺氧导致行动缓慢, 稍有活动便呼吸急促, 日常生活严重受限, 病死率高, 预后极差。内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 在肺血管重构所致的肺动脉高压发生发展中发挥重要作用^[1-2]。本研究前期证实, 通过抑制 ERS 可以降低 PAH 大鼠肺动脉压力, 减轻肺血管重构^[3]。

ERS 与线粒体自噬的相互作用是引起细胞增殖的机制之一^[4-5]。研究发现, 肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs) 增殖是导致 PAH 肺血管重构的重要因素之一, 线粒体自噬在其中发挥关键性作用^[6-7]。但是, ERS 是否通过线粒体自噬途径在其中发挥作用, 目前研究较少。因此, 本研究在前期实验基础上, 利用 ERS 抑制剂 4-苯基丁酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) 干预野百合碱诱导的 PAH 大鼠, 采用病理染色、电镜、分

子生物学方法观察肺血管重构、PASMCs 细胞线粒体形态及 ERS-线粒体自噬通路相关因子的 mRNA 水平, 为 PAH 防治研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

采用 6~8 周健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 45 只, 体重 180~200 g, 动物购于新疆医科大学第一附属医院研究中心实验动物科学研究部 [SCXK(新)2018-0002]), 置于新疆医科大学鲤鱼山校区实验动物中心饲养 [SYXK(新)2018-0003]。统一在温度 22℃~25℃, 湿度 50%~70%, 昼夜各半循环照明饲养 4 周后用于研究。本实验严格遵循美国国立卫生研究院指定的《实验动物实验指南》, 并严格按照 3R 原则^[8], 研究方案通过新疆医科大学实验动物伦理委员会审批 (IACUC20190416-01)。

1.2 主要试剂与仪器

野百合碱 (P19J8F40161, 上海源叶生物科技有限公司); 4-苯基丁酸钠盐 (P10083, 北京谨明生物科技有限公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂 (UN

7E262I8,美国 Invitrogen 公司生产);实时荧光定量 PCR(quantitative real time PCR,qPCR) 引物合成, primer express 2.0 软件设计,上海生工生物技术有限公司合成;qPCR 试剂盒(P200601,上海凯杰企业管理有限公司(Qiagen))。

BL-420F 生物信息采集系统(成都泰盟);病理分析软件 Image J、JSM-6390LV 扫描电镜(日本电子株式会社);QL-902 涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Centrifuge 5415D 离心机(Eppendorf);NANODROP 2000 分光光度计(Thermo scientific);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组

将 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 $n=15$:(1) NC 组为正常对照组;(2) PAH 组为野百合碱诱导的 PAH 模型组;(3) 4-PBA 组为 4-PBA 药物干预组。本研究按照以往实验采用一次性腹腔注射野百合碱诱导的方法建立 PAH 模型^[3]。4-PBA 组为 PAH 建模同时按照 500 mg/(kg·d) 剂量给大鼠灌服 4-PBA 混悬液,持续 4 周。NC 组及 PAH 组接受同等剂量 0.9%氯化钠溶液灌服,持续 4 周。

1.3.2 血流动力学指标测定

测定方法与前期实验相同^[3]。测定并记录平均右心室压力(mean right ventricular pressure, mRVP)、平均肺动脉压力(mean pulmonary arterial pressure, mPAP)。

1.3.3 大鼠肺血管重构指标测定

实验大鼠处死后,从右肺门横断面取材,取肺

组织 2.0 cm×2.0 cm×0.3 cm 大小,立即置入 10% 甲醛溶液中进行固定。后期行 HE 染色,用 Image J 分析软件测定肺血管重构相关病理指标,如肺细小动脉中膜厚度(medial wall thickness,MWT)、血管外径(external diameter,ED)、管腔面积(vascular lumen area,VA)、管壁面积(vascular wall area,WA)、管总面积(total vascular area,TA),计算肺细小动脉中膜厚度百分比 MWT%($MWT\% = 2 \times WT/ED$),管壁面积/管总面积比例 WA%($WA\% = WA/TA$),管腔面积/管总面积比例 VA%($VA\% = VA/TA$)作为肺小动脉重塑的指标。

1.3.4 大鼠 PSMCs 电镜观察

实验大鼠处死后,切取 0.5 mm³ 肺组织,立即投入到 0.1 mol/L (pH=7.4) 的二甲砷酸钠缓冲液配制的 2.5%戊二醛中固定 2 h(4℃冰箱中)。采用 0.1 mol/L (pH=7.4) 的二甲砷酸钠缓冲液洗脱后,再放入用相同缓冲液配制的 1%锇酸中固定 2 h (4℃),脱水后切片,并电镜下观察。

1.3.5 内质网应激-线粒体通路关键因子 mRNA 测定

按照参考文献的方法^[9],采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,以 GAPDH 为内参。根据 Real-time PCR 反应体系配制反应液。在 PCR 反应管中分别加入 ddH₂O、SybrGreen qPCR Master Mix、Forward primer、Reverse primer、cDNA 模板,并充分混匀。扩增程序为:95℃ 10 min,(95℃ 10 s, 58℃ 30 s, 72℃ 10 s) ×40 个循环。采用 2^{-△△CT}法进行数据的相对定量分析,计算出各样品的目的基因相对定量结果,目的基因引物合成见表 1。

表 1 目的基因引物列表
Table 1 Primers used in quantitative real-time PCR assays

基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Upstream primers(5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primers(5'-3')	引物长度(bp) Length
PERK	CGCTGCTGCTGCTGTTCTG	AGCCAAATGCCGTATCCGATGTG	102
ATF4	CTTAGAGGGCTACGGGACGGATG	CGTCAGCCTCGTGGTTGGTTC	137
CHOP	TGGCATCACCTCCTGTCTGTCTC	CCCTCTCCTTTGGTCTACCCCTCAG	119
BCL-2	GGTGGTGTGCGGCTGTCTG	AGAGTGGCTGCTGCTGTGTGTTAC	168
Mfn-2	TGAAGACACAGCACCTCAGCAATG	GGTGTTCAGCAGGAGGTGGAAG	133
Drp1	GAGAACTACCTTCCGCTGTATCGC	CACCATCTCCAATTCCACCACCTG	99
Atg12	AGATTGATGTGCCTGTCCGTGAAG	CCCTCAACGCCAGGTAAGAATGC	96
LC3	CCAGGACAAGCAGGCAGATGAAG	CAGGCTTTTCGTCTCTCCACCATC	149
p62	AAGTTCAGCACAGGCACAGAAG	TCCCACCGACTCCAAGGCTATC	145
GAPDH	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC	97

1.4 统计学方法

血流动力学指标和 ESR-线粒体自噬关键因子测定中的计量资料以平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,肺血管重构指标中的计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 22.0 进行统计处理,统计检测均基于双尾。多组比较采用单因素方差分析及 SNK-*q* 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血流动力学测定结果:

实验 4 周后,应用生物信息采集系统测定各组大鼠的 mPAP 和 mRVP。与 NC 组相比,野百合碱诱导的 PAH 组大鼠 mPAP、mRVP 均显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.001$)。采用 4-PBA 干预后,与 PAH 组相比,药物干预组大鼠 mPAP、mRVP

均显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.001$) (见表 2)。

2.2 各组大鼠肺血管重构病理指标测定结果

采用野百合碱诱导方法建立大鼠 PAH 模型后,肺组织 HE 染色可见大鼠肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄,血管平滑肌细胞排列紊乱,肺间质充血,炎症细胞浸润明显。经过 4-PBA 干预后,大鼠肺小动脉管壁变薄,肺间质充血减轻 (见图 1)。采用在 Image J 软件测量各组肺血管重塑相关指标,与 NC 组相比,PAH 组大鼠 MWT%、WA% 增高,VA% 减少,提示 PAH 组大鼠肺动脉管壁增厚、管腔狭窄,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。4-PBA 干预后,与 PAH 组相比,药物干预组大鼠上述肺血管重塑指标改善,差异具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 2)。病理检测指标提示,采用 ERS 抑制剂 4-PBA 后,PAH 大鼠肺组织肺血管重塑指标得到改善。

表 2 各组大鼠血流动力学指标测定

Table 2 Hemodynamic indexes of rats in each group

压力类型 Pressure types	NC 组 NC group	PAH 组 PAH group	4-PBA 组 4-PBA group
mPAP (mmHg)	16.22±1.78 *	55.89±4.10	30.02±2.89 *
mRVP (mmHg)	6.60±0.87 *	30.78±2.83	21.56±4.37 *

注:与 PAH 组相比, * $P < 0.001$ 。
Note. Compared with PAH group, * $P < 0.001$.

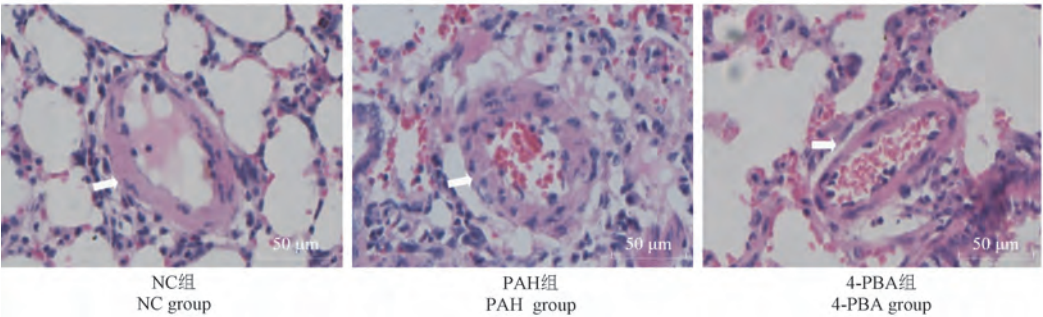
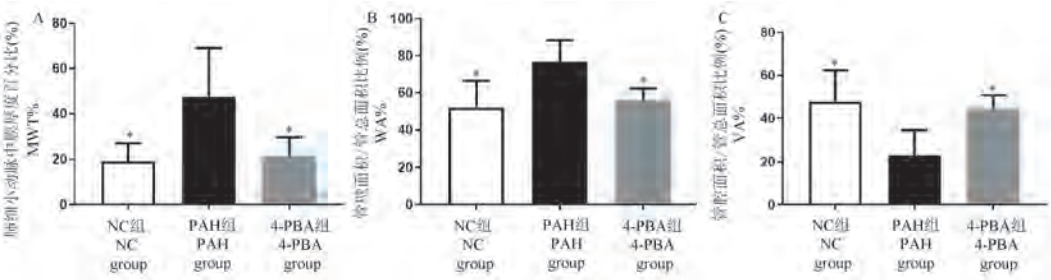


图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色

Figure 1 Lung histology examples of rats were stained by hematoxylin-eosin



注:与 PAH 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠肺血管重塑指标测定

Note. Compared with PAH group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Measurement of pulmonary vascular remodeling indexes of rats in each group

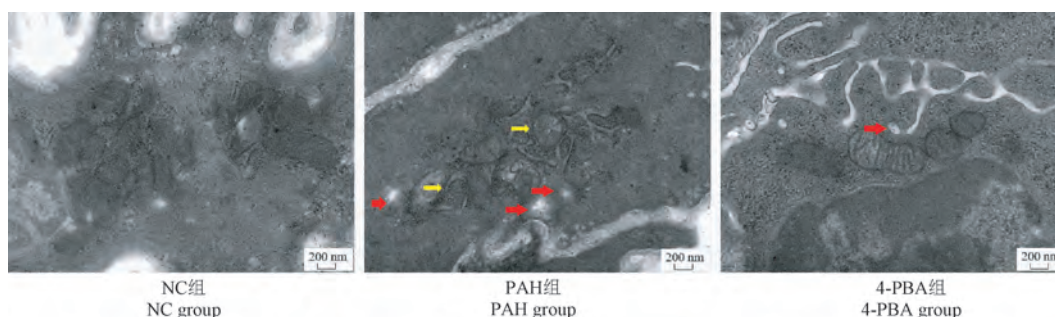
2.3 电镜下各组大鼠 PSMCs 线粒体表现

与 NC 组相比,野百合碱诱导的 PAH 组大鼠 PSMCs 线粒体肿胀、线粒体嵴结构破坏,溶解消失,可见线粒体自噬现象增多。经过 4-PBA 干预的大鼠 PSMCs 中线粒体结构改善,线粒体自噬减少(见图 3)。

2.4 各组大鼠肺组织 ERS-线粒体通路关键因子 mRNA 测定结果

野百合碱诱导的 PAH 组大鼠肺组织内质网应激相关因子 PERK、ATF4、Bcl-2、CHOP 的 mRNA 表达水平上调($P<0.001$),线粒体融合因子 Mfn2 的

mRNA 表达水平下调,线粒体分裂因子 Drp1 的 mRNA 表达上调($P<0.001$),线粒体自噬相关因子 Atg12、LC3、p62 的 mRNA 表达上调($P<0.001$)。经过 4-PBA 干预后,与 PAH 组相比,药物干预组大鼠内质网应激相关因子 PERK、ATF4、Bcl-2、CHOP 的 mRNA 表达水平下降($P<0.001$),线粒体融合因子 Mfn2 的 mRNA 表达上调,提示线粒体融合增加($P<0.001$),线粒体分裂关键因子 Drp1 的 mRNA 减少($P<0.001$),线粒体自噬因子 Atg12、LC3、p62 的 mRNA 表达水平降低($P<0.01$)(见图 4)。

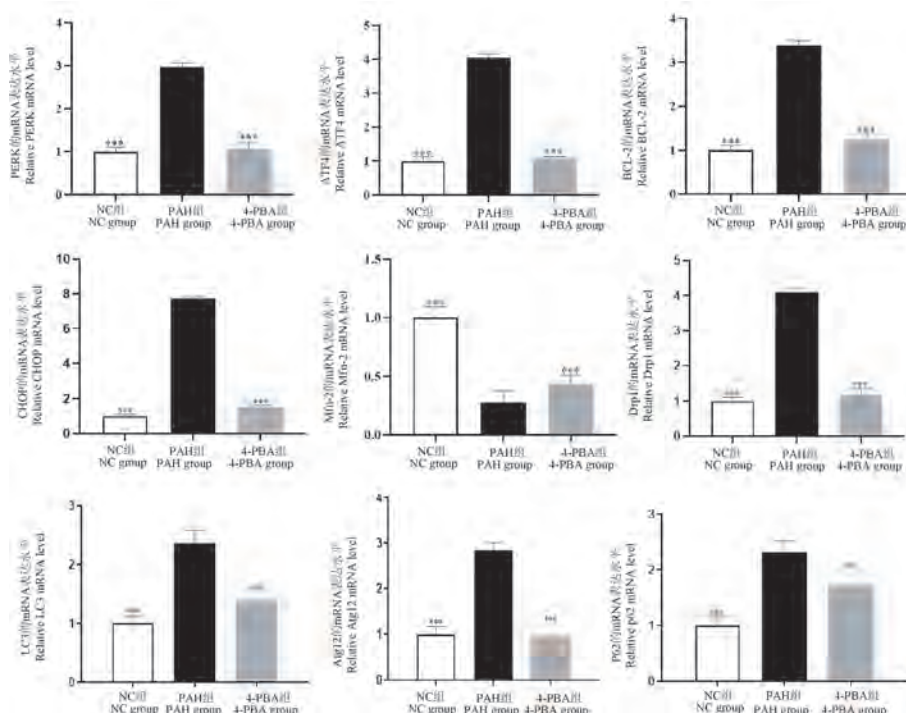


注:黄色箭头:线粒体肿胀、嵴结构紊乱、消失;红色箭头:线粒体自噬现象。

图 3 各组大鼠 PSMCs 线粒体超微结构表现

Note. Yellow arrow, Mitochondria are swollen, cristae are disorganized and disappeared. Red arrow, Mitochondrial autophagy.

Figure 3 Mitochondrial ultrastructure of pulmonary vascular smooth muscle cells of rats in each group



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

图 4 各组大鼠肺组织内质网应激-线粒体通路关键因子 mRNA 测定

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

Figure 4 mRNA determination of key factors of ERS-mitochondrial pathway in lung tissue of rats in each group

3 讨论

多项研究表明,ERS 是 PAH 发生发展中的重要病理机制^[9-12]。本研究前期已证实,野百合碱诱导的 PAH 大鼠肺组织中内质网应激关键通路 PERK、ATF6、IRE1 关键因子的 mRNA 及蛋白表达水平均上调,而 ERA 抑制剂 4-PBA 可有效抑制 ERS 关键因子,抑制肺血管重构,降低肺动脉压力^[3],但其具体调控机制有待进一步研究。

近年来,内质网-线粒体功能紊乱导致肺血管重构的机制研究已经成为肺动脉高压领域的研究热点之一。内质网与线粒体之间由线粒体结合内质网膜 (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes, MAMs) 相连,它是一种对细胞生理环境高度敏感的动态结构,主要参与调控 ERS、氧化应激、细胞凋亡、细胞自噬、线粒体动态变化和炎症等^[13]。研究发现,抑制 ERS 可以影响线粒体融合与分裂,从而导致线粒体结构紊乱^[14-15]。线粒体融合蛋白 2 (mitofusin-2, Mfn2) 是一种具有三磷酸鸟苷活性的动力蛋白相关蛋白,其物理结构位于 MAM 一端,锚定于线粒体外膜,可以与内质网上的 Mfn2 结合形成二聚体,连接线粒体与内质网,主要功能是调控线粒体外膜融合,但是也与内质网应激中蛋白激酶 R 样内质网激酶抗原 (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 偶联负向调节 ERS^[16]。McLelland 等^[17]发现,通过催化 Mfn2 泛素化,可引起线粒体外结合膜上 Mfn2/p97 复合物分离,从而导致内质网-线粒体结合膜的破坏及线粒体自噬发生。动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 是调节线粒体分裂的关键蛋白,Drp1 可通过形成螺旋寡聚体,包裹线粒体外膜并将其分裂^[18]。Shirakabe 等^[19]发现,敲除 Drp1,可使线粒体自噬减少。本研究发现,在 PAH 大鼠肺组织 Mfn2 的 mRNA 表达下调,Drp1 的 mRNA 表达上调,采用 ERS 抑制剂 4-PBA 后,Mfn2 的 mRNA 表达上调,Drp1 的 mRNA 表达上调,提示线粒体融合增加,分裂减少。因此,我们推测 ERS 与线粒体融合分裂之间的相互作用可能在 PAH 的发生发展中发挥重要作用。

近年来有研究发现,线粒体自噬在增加 PSMCs 增殖、抑制细胞凋亡方面发挥重要作用。在一项低氧 PSMCs 模型研究中发现,低氧可激活线粒体自噬引起 PSMCs 增殖,其过程与 ERS 密切

相关^[20]。本研究在电镜下观察 PAH 大鼠肺组织 PSMCs 线粒体形态变化的时发现,线粒体自噬现象增加,且采用 ERS 抑制剂 4-PBA 干预后这一现象明显减少。进一步检测线粒体自噬相关因子 LC3、Atg12、p62 的 mRNA 表达水平,发现这些信号分子的 mRNA 表达均减低。研究发现,LC3 是参与自噬的重要蛋白。在自噬中以 LC3 I、LC3 II 两种形式存在,LC3 II/I 比值的大小可以反映自噬水平的高低。在自噬发生过程中,LC3 I 与磷脂酰乙醇胺结合后形成 LC3 II。选择性自噬受体 p62 蛋白通过与 LC3 II 特异性结合将泛素化的蛋白聚集体或者其它细胞组分募集到自噬小体中,然后在自噬溶酶体内降解,在低氧或炎症诱导的动物肺动脉高压模型中发挥作用^[21]。Atg12 是一种泛素样蛋白,在自噬通路中起着关键作用,是自噬小体形成必不可少的因子^[22]。基于此,我们推测 4-PBA 抑制 ERS 可能通过干扰线粒体融合与分裂,减少线粒体自噬从而达到保护 PSMCs、抑制肺血管重构的作用(见图 5)。

本研究在 ERS-线粒体自噬通路在 PAH 发生发展中可能发挥重要作用方面仅仅做了初步的探索,存在一定的局限性。首先,p62、Atg12、LC3 I、LC3 II 以及 LC3 II/LC3 I 等线粒体自噬相关信号分子在蛋白和 mRNA 水平的表达与调控分子机制仍有待进一步验证和研究。其次,内质网与线粒体作为细胞中重要的两个细胞器,两者间的相互作用对 PSMCs 过度增殖导致肺动脉狭窄诱发 PAH 的具

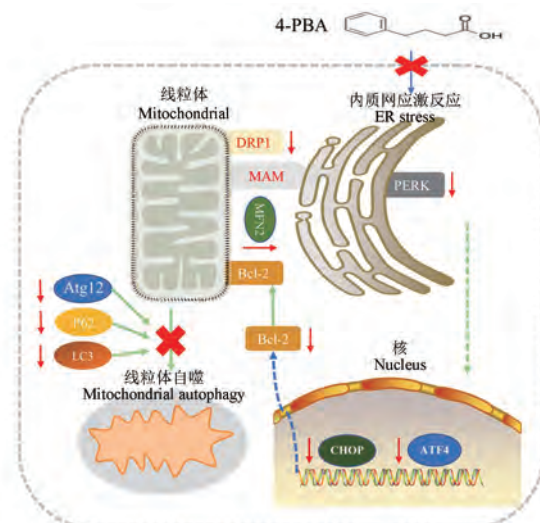


图 5 4-PBA 抑制 PSMC 内质网应激-线粒体自噬的信号通路和作用的假设模型

Figure 5 A hypothetical model for the signaling pathway and the role of 4-PBA-inhibited ERS-mitochondrial in PSMC

体机制仍有待探索。此外,需要开展深入的分子生物学研究和大规模的临床验证研究来进一步探索和验证 ERS-线粒体自噬通路中的关键因子,以期开发出以抑制 PSMCs 过度增殖为治疗靶点的新型靶向治疗药物。

参考文献:

- [1] Chen R, Zhong W, Shao C, et al. Docosahexaenoic acid inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension via attenuating endoplasmic reticulum stress and inflammation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(2): L243-L255.
- [2] 项冰倩, 高慧, 陈锡文, 等. 内质网过度应激介导低氧高二氧化碳肺动脉高压大鼠的脑损伤 [J]. *生理学报*, 2017, 69(4): 413-421.
- [3] Wu Y, Adi D, Long M, et al. 4-Phenylbutyric acid induces protection against pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157538.
- [4] Jia S, Xu X, Zhou S, et al. Fisetin induces autophagy in pancreatic cancer cells via endoplasmic reticulum stress-and mitochondrial stress-dependent pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 142.
- [5] Wang Z, Yin F, Xu J, et al. CYT997 (Lexibulin) induces apoptosis and autophagy through the activation of mutually reinforced ER stress and ROS in osteosarcoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 44.
- [6] Chen SJ, Bao L, Keefer K, et al. Transient receptor potential ion channel TRPM2 promotes AML proliferation and survival through modulation of mitochondrial function, ROS, and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 247.
- [7] He L, Zhou Q, Huang Z, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes apelin-13-induced vascular smooth muscle cell proliferation by AMPK α and exacerbates atherosclerotic lesions [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8668-8682.
- [8] 杜飞飞, 王凤清, 贾伟伟, 等. 啮齿类动物插管技术用于药理学采血的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(1): 129-136.
- [9] 龚姗, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七苜降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 733-741.
- [10] Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, et al. Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2013, 127(1): 115-125.
- [11] Bing Z, Xi W, Wang MD, et al. Hypoxia induces pulmonary artery smooth muscle dysfunction through mitochondrial fragmentation-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 23684-23697.
- [12] Wu J, Pan W, Wang C, et al. H2S attenuates endoplasmic reticulum stress in hypoxia-induced pulmonary artery hypertension [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(7): BSR20190304.
- [13] Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease [J]. *EMBO J*, 2012, 31(21): 4106-4123.
- [14] Martínez-Pizarro A, Desviat LR, Ugarte M, et al. Endoplasmic reticulum stress and autophagy in homocystinuria patients with remethylation defects [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150357.
- [15] Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, et al. Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2013, 113(2): 126-136.
- [16] Toyofuku T, Okamoto Y, Ishikawa T, et al. LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway [J]. *EMBO J*, 2020, 39(18): e105826.
- [17] McLelland GL, Thomas G, Wei Y, et al. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy [J]. *eLife*, 2018, 7: e32866.
- [18] Chen S, Liu S, Wang J, et al. TBK1-mediated Drp1 targeting confers nucleic acid sensing to reprogram mitochondrial dynamics and physiology [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(5): 810-827.
- [19] Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, et al. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure [J]. *Circulation*, 2016, 133(13): 1249-1263.
- [20] Li LQ, Qin YH, Luo EF, et al. Hypoxia-induced PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes pulmonary vascular remodeling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 568-575.
- [21] Saurabh A, Praveen M, Jianhua Z. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2): L433-L452.
- [22] Matoba K, Noda NN. Atg12-interacting motif is crucial for E2-E3 interaction in plant Atg8 system [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(9): 1337-1343.

[收稿日期]2021-04-21

王元, 曾凯宏, 邓波, 等. 柚皮素通过抑制 miR-29b 的过表达对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 60-66, 84.

Wang Y, Zeng KH, Deng B, et al. Effect of naringenin on insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting overexpression of miR-29b [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 60-66, 84.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 009

柚皮素通过抑制 miR-29b 的过表达对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响

王 元^{1,2}, 曾凯宏^{1,2*}, 邓 波¹, 余雪梅¹, 周 雪¹, 宋 怡¹, 黄璐娇¹

(1. 四川省医学科学院·四川省人民医院临床营养科, 成都 610072; 2. 电子科技大学医学院, 成都 610054)

【摘要】 目的 探讨柚皮素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的作用, 和 miR-29b 过表达在柚皮素与 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗效应中的关系, 进一步研究阐述柚皮素对糖尿病的防治作用机制。**方法** 利用地塞米松诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 并建立胰岛素抵抗模型, 用不同浓度柚皮素进行分组干预胰岛素抵抗模型细胞和被 miR-29b mimic 和 inhibitor 转染的胰岛素抵抗模型细胞, 分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测胰岛素信号传导通路中 IRS-1、Akt/p-Akt、GLUT4 基因和蛋白的表达。**结果** 柚皮素干预可逆转 3T3-L1 胰岛素抵抗模型细胞中 IRS-1、Akt/p-Akt、GLUT4 的基因和蛋白表达的降低; 柚皮素通过抑制 miR-29b 高表达增加 3T3-L1 胰岛素抵抗模型细胞 IRS-1、Akt/p-Akt、GLUT4 的基因和蛋白的表达。**结论** 柚皮素具有改善 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗的作用, 其分子机制可能通过抑制 miR-29b 的高表达影响 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白的表达。

【关键词】 柚皮素; 胰岛素抵抗; 微小 RNA-29b

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0060-07

Effect of naringenin on insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting overexpression of miR-29b

WANG Yuan^{1,2}, ZENG Kaihong^{1,2*}, DENG Bo¹, YU Xuemei¹, ZHOU Xue¹, SONG Yi¹, HUANG Lujiao¹

(1. Department of Clinical Nutrition, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China. 2. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054)

【Abstract】 Objective To explore the effect of naringenin on the insulin resistance of 3T3-L1 adipocytes, and the relationship between the overexpression of miR-29b and the effects of naringenin on insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes, in order to further illustrate the mechanism by which naringenin acts in the prevention and treatment of T2DM. **Methods** Dexamethasone was used to induce differentiated and mature 3T3-L1 adipocytes, after which an insulin resistance (IR) model was established. Different concentrations of naringenin were used to intervene in IR model cells and IR models cells transfected with miR-29b mimics and inhibitor. qRT-PCR and Western blot were used to determine the gene and protein expression of IRS-1, Akt/p-Akt and GLUT4. **Results** Naringenin intervention increased the gene and protein expression of IRS-1, Akt/p-Akt and GLUT4 that was reduced in 3T3-L1 IR model cells. Naringenin increased 3T3-L1 IR model cell IRS-1, Akt/p-Akt and GLUT4 gene and protein expression by inhibiting the overexpression of miR-29b.

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81202206); 四川省卫生计生委项目 (150216)。

【作者简介】 王元 (1991—), 女, 营养师, 医学硕士, 研究方向: 临床营养研究工作。E-mail: WYuan0908@163.com

【通信作者】 曾凯宏 (1974—), 男, 主任医师, 博士, 研究方向: 临床营养研究。E-mail: zengkaihong2013@hotmail.com

Conclusions These result show that naringenin can ameliorate insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes, which may improve the expression of related proteins in the PI3K/Akt signaling pathway by inhibiting the high expression of miR-29b.

【Keywords】 naringenin; insulin resistance; miR-29b

糖尿病是当代社会危害人类健康的重大疾病之一,如何有效预防糖尿病的发生和控制其发展,得到科研界广泛关注和重视^[1]。近年来研究发现,二氢黄酮类化合物柚皮素可显著降低Ⅱ型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)大鼠糖化血红蛋白和空腹血糖值,有防治 T2DM 的作用^[2-3],但柚皮素防治 T2DM 的机制及具体分子靶点是什么?目前还有争议,需进一步研究证实。机体外周组织(如骨骼肌、脂肪组织等)及其细胞产生的胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是 T2DM 的发病机理之一^[4],临床研究发现 T2DM 患者血清中 miR-29b 上升^[5],动物实验研究发现 T2DM 大鼠肝、骨骼肌和脂肪组织中 miR-29b 均被上调^[6],表明 miR-29b 的高表达与 T2DM 的发病机理相关。因此,本文选择了 3T3-L1 脂肪细胞作为研究对象,探讨柚皮素对 3T3-L1 细胞的胰岛素抵抗效应的影响,并进一步探讨了 miR-29b 的过表达与柚皮素在 3T3-L1 细胞的胰岛素抵抗效应之间的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠成纤维细胞株(3T3-L1)购自于美国菌种保藏中心(ATCC)。

1.2 主要试剂与仪器

柚皮素购自于 BBI Life Science 公司;miR-29b mimics、miR-29b inhibitor 购自于上海 Genepharma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自于 Gibco 公司;地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、胰岛素购自于 Sigma 公司;磷酸缓冲液(PBS)购自于 Hyclone 公司;IRS-1、GLUT4、p-Akt 购自于 Abcam 公司;IgG 兔抗鼠购自于 CST 公司;蛋白 RIPA 裂解液、TBST 购自于 Solarbio 公司;去 gDNA 反转录试剂盒、iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 购自于 Bio-Rad 公司;脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自于 Invitrogen 公司;蛋白预染 marker 购自于 Merck 公司。PCR 扩增仪购自于 Applied Biosystems;qPCR 仪器型号 ABI 7500 型。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与诱导分化

将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于含 10% FBS 的

DMEM 中,放于 37℃、5% CO₂、相对湿度 95% 培养箱中培养。待细胞融合 2 d 后,加入含 1 μmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L IBMx、10 mg/L 胰岛素的培养液,培养 48 h,然后换含 10 mg/L 胰岛素的培养液继续培养,以后每 48 h 换 1 次培养液,至 7~10 d,待细胞分化成功^[7],用油红“O”染色进行鉴定,85% 以上的细胞分化成为脂肪细胞。

1.3.2 胰岛素抵抗模型的建立、鉴定及实验分组

将培养液换成含 10% FBS、5 mmol/L 低糖培养液培养 48 h,再用无血清的低糖培养基培养 12 h,最后换入含 10% FBS、100 nmol/L 胰岛素的 DMEM、25 mmol/L 高糖培养液,干预 30 min,从而建立 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型^[8],与对照组比较,模型组细胞葡萄糖摄取明显减少,说明细胞出现胰岛素抵抗,提示建模成功。

细胞分组:分别用不同浓度(0、25、50、100 μg/mL)的柚皮素干预 24 h,建立如下分组:正常对照组(正常培养基培养的细胞,未干预,NC 组)、模型组(IR 模型细胞,未干预,IR 组)、溶剂模型组(IR 模型细胞+4 μL/mL DMSO,IR-V 组)、25 μg/mL 柚皮素干预 IR 组(IR 模型细胞+25 μg/mL 柚皮素,IR-L-Nar 组)、50 μg/mL 柚皮素干预 IR 组(IR 模型细胞+50 μg/mL 柚皮素,IR-M-Nar 组)、100 μg/mL 柚皮素干预 IR 组(IR 模型细胞+100 μg/mL 柚皮素,IR-H-Nar 组)。

1.3.3 细胞葡萄糖消耗检测

上述各实验组去掉培养液后,每孔加相应量含 10% FBS DMEM 培养基培养 2 h,按照 GOD 法试剂盒说明书所述方法测定各孔内剩余葡萄糖含量,使用酶标仪在 570 nm 波长处测量各孔 OD 值,根据标准浓度测出的标准曲线计算各孔中葡萄糖含量,葡萄糖消耗量=空白对照组葡萄糖含量-待测组葡萄糖含量。

1.3.4 细胞转染及转染后分组

将其中 miRNA-29b mimics (40 nmol/L) 和 miRNA-29b inhibitor (200 nmol/L) 在 50 μg/mL 柚皮素干预前加入前 1 h 通过 Lipofectamine™ 2000 转染入 3T3-L1 细胞内。

转染效率实验分组:Cell+IR 未转染组;IR;Cell+IR+miR-29b mimics 转染组;IR-miR-29b-mimic;

Cell+IR+mimic 转染阴性对照组:IR-mimic-NC; Cell+IR+miR-29b inhibitor 转染组:IR-miR-29b-inhibitor; Cell+IR+inhibitor 转染阴性对照组:IR-inhibitor-NC。

柚皮素干预实验分组:Cell+普通培养液组:NC; Cell+IR 组:IR; Cell+IR+miR-29b mimics 转染组:IR-miR-29b; Cell+IR+miR-29b inhibitor 转染组:IR-anti-miR-29b; Cell+IR+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组:IR-Nar; Cell+IR+miR-29b mimics + 50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组:IR-miR-29b-Nar; Cell+IR+miR-29b inhibitor + 50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组:IR-anti-miR-29b-Nar。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链式反应

分别收集各实验组中细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,测定 GLUT4、IRS1、AKT 用 TaKaRa 逆转录试剂盒进行逆转录,采用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 Real-time PCR,测定 miR-29b 按照 MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 MicroRNA Assays 试剂盒说明书进行 Real time PCR,以 U6 为内参,根据 qPCR 反应曲线得到各组样品目的基因和内参基因的 Ct 值。首先计算 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值=(实验组目的基因的 Ct 平均值-实验组内参基因的 Ct 平均值)-(对照组目的基因的 Ct 平均值-对照组内参基因的 Ct 平均值),则基因相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。引物序列见表 1。

1.3.6 Western blot 检测

收集各组细胞,用 1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解

表 1 引物序列的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequence of primer

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GLUT4	F:TCATCTTGGACGGTTCCTC R:GCCAGTTGGTTGAGTGTTC
IRS1	F:CTATGCTGACATGCGACAG R:GGTGGCTCCTTGAGGTGTA
AKT	F:GGACCACAGTCATCGAGAGG R:CTTGTAAATCCATGGCGTCCT
GAPDH	F:TGCCACTCAGAAGACTGTGG R:TTCAGCTCTGGGATGACCTT
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACA R:AACGCTTCACGAATTTCGCT
miR-29b mimics	F:UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA R:ACGCGAGCCGAACGAACAAAUU
Mimics NC	F:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-29b inhibitor	F:UCACGCGAGCCGAACGAACAAA R:AGUGCGCUCGGCUUGCTTGUUU
Inhibitor NC	F:CAGUACUUUUGUGUAGUACAA R:GTCAUGAAAACACAUCATGUU
miR-29b	F:ACGUGACACGUUCGGAGAATT R:CTTACTATCCGTTTGTTCGTTCC

液在冰上进行裂解细胞,离心取上清,BCA 法测定总蛋白质浓度,使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转印到 PVDF 上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗后在 4℃ 温度下孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应二抗室温孵育 1 h,ECL 法凝胶成像系统处理,对各组条带进行计值及统计分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计软件分析处理,定量数据采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用 SNK 法,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1 细胞和成熟脂肪细胞的形态及鉴定

如图 1A,3T3-L1 细胞呈长梭形,贴壁,不聚团生长。如图 1B 和 1C,诱导 3T3-L1 细胞 8 d 后,可见细胞均呈现典型的脂肪细胞表型,细胞中富含脂滴,脂滴可被油红“O”染色,含脂滴细胞 $>85\%$ 时,大部分 3T3-L1 细胞已被诱导为脂肪细胞,可用于进一步实验。

2.2 柚皮素干预对胰岛素抵抗 3T3-L1 模型细胞糖代谢的影响

与正常对照组比较,模型组 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量显著降低($P<0.001$);与模型组比较,溶剂干预模型组细胞的葡萄糖消耗量无差别,各柚皮素干预组细胞的葡萄糖消耗量均升高($P<0.01$),且 50 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素干预 IR 组最显著($P<0.001$),其中详见表 2。

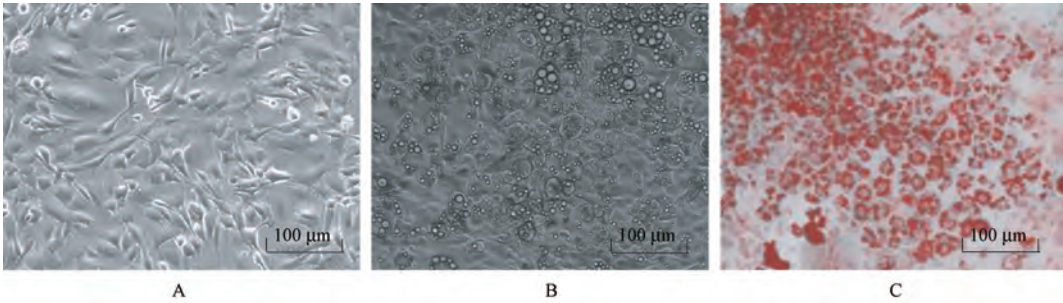
2.3 柚皮素对胰岛素抵抗 3T3-L1 模型细胞 IRS-1/Akt/GLUT4 基因表达的影响

如图 2,与正常 3T3-L1 细胞未干预组相比,IR 模型未干预组细胞中 IRS-1、AKT、GLUT4 的 mRNA 表达均明显下降,其差异具有统计学意义($P<0.001$)。与 IR 组比较,IR-L-Nar 组、IR-M-Nar 组、IR-H-Nar 组柚皮素干预均能促进 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达,其中 IR-L-Nar 组、IR-M-Nar 组对 3 种基因表达增加最明显($P<0.01$),即 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素干预最明显($P<0.001$)。溶剂组基因的表达与 IR 组比较,无差别。

2.4 柚皮素对胰岛素抵抗 3T3-L1 模型细胞 IRS-1/p-Akt 蛋白表达的影响

如图 3A 和 3B 所示,与正常培养 3T3-L1 细胞

相比,3T3-L1 IR 模型未干预组细胞中 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均明显下降;与 IR 模型未干预组相比,柚皮素干预组 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均增加,其中 25 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 IRS-1 增加最明显 ($P<0.001$),50、100 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素组 p-Akt 增加最显著 ($P<0.001$),溶剂组蛋白的表达与模型组无差别。

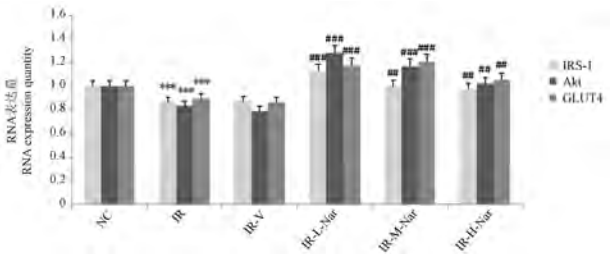


注:A: 诱导前 3T3-L1 细胞;B: 诱导成功 3T3-L1 脂肪细胞;C: 3T3-L1 脂肪细胞经油红“O”染色。

图 1 3T3-L1 细胞的形态及鉴定

Note. A, 3T3-L1 cells before induction. B, Successfully induced 3T3-L1 adipocytes. C, 3T3-L1 adipocytes were stained with oil red “O”.

Figure 1 Morphology and identification of 3T3-L1 cells



注:与正常对照组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 2 柚皮素干预对 3T3-L1 胰岛素抵抗模型细胞基因表达的影响

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with IR group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 Effect of naringenin intervention on gene expression of 3T3-L1 insulin resistance model cells

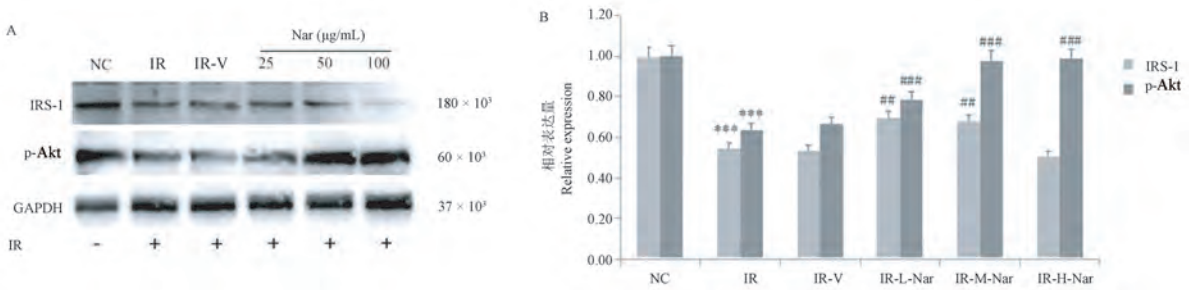
表 2 柚皮素对胰岛素抵抗 3T3-L1 模型细胞葡萄糖摄取的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of naringenin on glucose consumption in IR 3T3-L1 cells

组别 Groups	葡萄糖消耗量 (mmol/L) Glucose consumption
正常对照组 NC group	2.72 $\pm$ 0.12
模型组 IR group	1.95 $\pm$ 0.23 ***
溶剂模型组 IR-V group	1.89 $\pm$ 0.22
25 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素干预 IR 组 IR-L-Nar group	2.36 $\pm$ 0.16 ##
50 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素干预 IR 组 IR-M-Nar group	2.61 $\pm$ 0.31 ###
100 $\mu\text{g/mL}$ 柚皮素干预 IR 组 IR-H-Nar group	2.45 $\pm$ 0.25 ##

注:与正常对照组相比,*** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

Note Compared with NC group, *** $P<0.01$. Compared with IR group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.



注:与正常对照组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 3 各组 3T3-L1 细胞蛋白表达量

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with IR group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Expression level of protein in 3T3-L1 cells in each group

2.5 对 3T3-L1 细胞转染 miR-29b 的鉴定

如图 4 所示,与 Cell+IR 未转染组相比,3T3-L1 细胞被转染后 Cell+IR+miR-29b mimic 组细胞的 miR-29b 表达明显上升 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b-inhibitor 组 miR-29b 的表达水平降低 ($P<0.001$), Cell+IR+mimic 转染阴性对照组和 Cell+IR+inhibitor 转染阴性对照组与 Cell+IR 细胞未转染组 miR-29b 表达一致。此结果表明 miR-375-mimic 和 miR-375-inhibitor 被成功转染进入 3T3-L1 IR 细胞。

2.6 柚皮素对 3T3-L1 细胞 miR-29b 上调/下调后 IRS-1/Akt/GLUT4 基因表达的影响

如图 5,与 Cell+普通培养液组相比,Cell+IR 模型组 3T3-L1 细胞中 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达均明显下降,其差异具有统计学意义 ($P<0.001$); Cell+IR 模型组相比,Cell+IR+miR-29b mimics 转染组 3T3-L1 细胞中 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达均降低 ($P<0.001$),而 Cell+IR+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达均增加 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b mimics+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达均上升,且差异有统计学意义 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b inhibitor 转染组和 Cell+IR+miR-29b inhibitor+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组细胞中 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达量均无差异;与 Cell+IR+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 模型组比较,Cell+IR+miR-29b inhibitor+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、Akt、GLUT4 的 mRNA 表达量下降 ($P<0.001$)。

2.7 柚皮素对 3T3-L1 细胞 miR-29b 上调/下调后 IRS-1/p-AKT 蛋白表达的影响

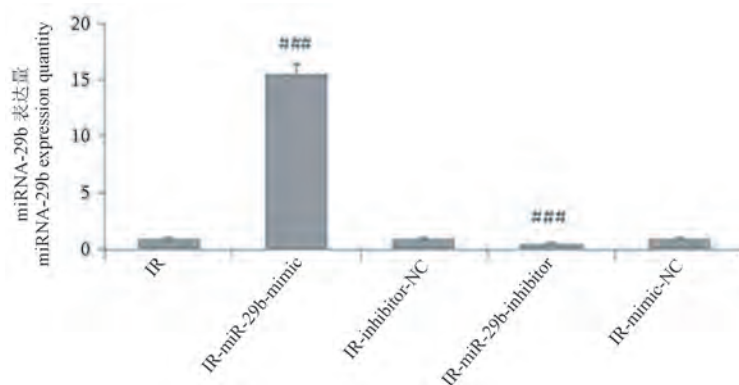
如图 6A 和 6B 所示,与 Cell+普通培养液组相

比,Cell+IR 模型组 3T3-L1 细胞中 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均明显下降 ($P<0.001$);与 Cell+IR 模型组比较,Cell+IR+miR-29b mimics 转染组 3T3-L1 细胞中 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均降低 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b inhibitor 转染组细胞中 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均无明显变化, Cell+IR+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达均增加 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b mimics+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、p-Akt 的蛋白增加 ($P<0.001$), Cell+IR+miR-29b inhibitor+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达无变化;与 Cell+IR+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组比较,Cell+IR+miR-29b mimics+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、p-Akt 的蛋白增加 ($P<0.05$), Cell+IR+miR-29b inhibitor+50 $\mu\text{g/mL}$ Nar 组 IRS-1、p-Akt 的蛋白下降 ($P<0.05$)。

3 讨论

柚皮素是二氢黄酮类化合物柚皮苷的苷元,研究发现膳食补充柚皮素可以显著降低链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导的 DM 小鼠的空腹血糖和血浆的糖化血红蛋白值,明显升高糖尿病小鼠血浆中胰岛素浓度^[9],可以改善 STZ 诱导的 DM 小鼠的炎症反应^[10]。在 3T3-L1 脂肪细胞中,柚皮素以剂量依赖方式抑制胰岛素刺激的葡萄糖摄取,从而增加脂肪细胞胰岛素抵抗发生^[11]。在本课题前期的研究中发现柚皮素干预可以提高 3T3-L1 IR 细胞模型葡萄糖的摄取和胰岛素敏感性^[12],但柚皮素影响 3T3-L1 脂肪细胞的具体分子机制尚不清楚。

胰岛素是体内降低血糖的唯一激素,当胰岛素信号传导通路发生故障时,机体产生胰岛素抵抗,

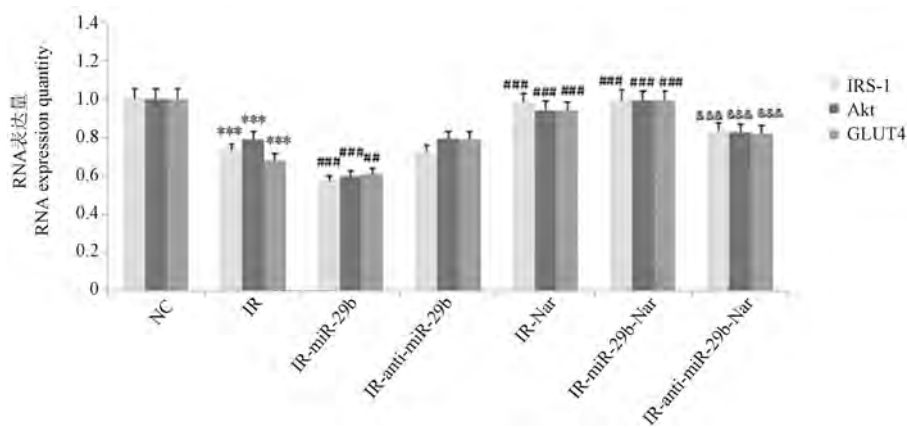


注:与 Cell+IR 未转染组相比,### $P<0.001$ 。

图 4 3T3-L1 脂肪细胞转染结果

Note. Compared with IR group, ### $P<0.001$.

Figure 4 Transfection results of 3T3-L1 adipocytes

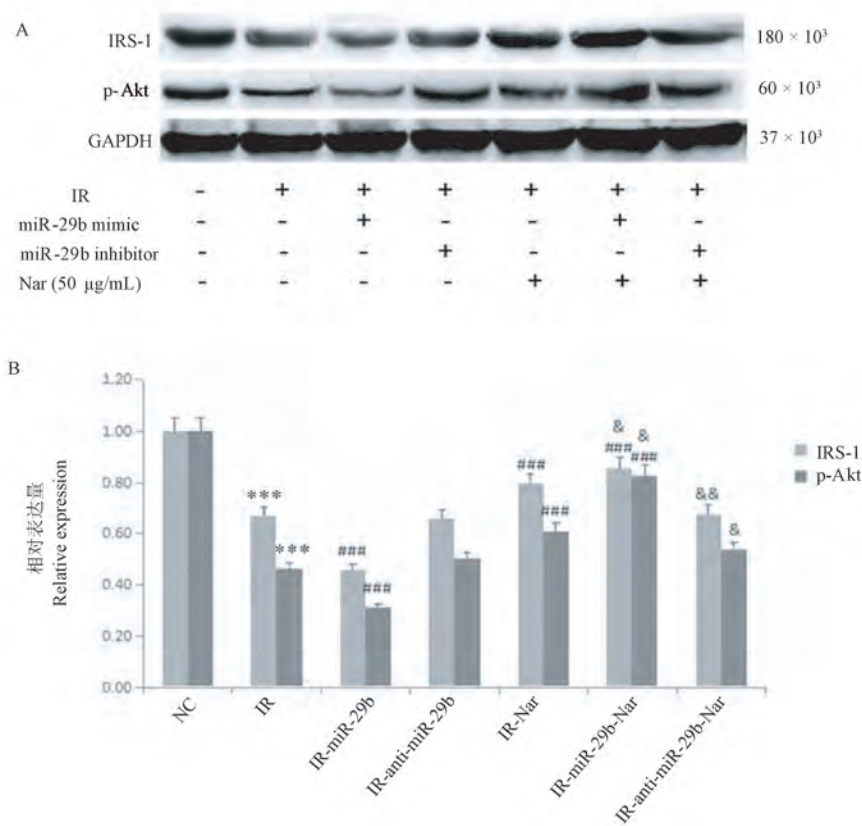


注:与 Cell+普通培养液组相比,*** $P<0.001$;与 Cell+IR 组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与 Cell+IR+miR-29b mimics 转染组相比, &&& $P<0.001$ 。

图 5 柚皮素干预对 3T3-L1 细胞转染 miR-29b mimics/inhibitor 后基因表达的影响

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with IR group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with IR-miR-29b group, &&& $P<0.001$.

Figure 5 Effect of naringenin intervention on the gene expression of 3T3-L1 adipocytes transfected with miR-29b mimics/inhibitor



注:与 Cell+普通培养液组相比,*** $P<0.001$;与 Cell+IR 组相比,### $P<0.001$;与 Cell+IR+miR-29b mimics 转染组相比,& $P<0.05$, && $P<0.01$ 。

图 6 柚皮素影响转染 miR-29b mimic/inhibitor 3T3-L1 细胞 IRS-1、p-Akt 的蛋白表达量

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with IR group, ### $P<0.001$. Compared with IR + miR-29b group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

Figure 6 Effect of naringenin on the protein expression of IRS-1 and p-Akt in miR-29b mimics/inhibitor 3T3-L1 cells transfected

导致肝、脂肪、骨骼肌等靶组织的葡萄糖摄取和利用率降低^[13-14]。胰岛素信号传导通过胰岛素受体促进胰岛素与胰岛素受体底物 IRS-1、IRS-2 的结合,然后将信号发出,激活胰岛素下游信号传导通路的蛋白激酶位点,如 Akt(也称 PKB, PI3K 信号通路成员)被激活^[15-16],进而触发下游葡萄糖转运体-4(glucose transporter-4, GLUT-4)向膜转运,降低靶细胞对葡萄糖的摄取能力,引起胰岛素抵抗的发生^[17],基于此本实验探究了柚皮素对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的影响,结果发现 3T3-L1 IR 细胞模型 IRS-1、GLUT-4 基因和蛋白表达明显降低,通过柚皮素的干预可以起到提高 IRS-1/Akt 信号通路的基因和蛋白表达的作用。

MicroRNA(miRNA)是约 20~24 个核苷酸的非编码小分子 RNA,主要在转录水平上,通过促进目标靶基因降解或抑制其翻译,从而减弱目标靶基因的功能^[18]。近年来大量研究发现 miRNA-29 对糖尿病的发生和胰岛素抵抗的调节作用, Mohammed 等^[5]在临床试验中证实 T2DM 患者血清中 miR-29b 升高,且 miR-29b 的高表达与 T2DM 疾病严重程度相关, Massart 等^[6]通过研究 miRNAs 在 Goto-Kakizaki(GK)大鼠骨骼肌中的表达,鉴定出两种 miR-29 被上调,分别是 miR-29a 和 miR-29b。Kurtz 等^[19]研究胰岛素抵抗时发现,在小鼠胰岛素抵抗模型的肝中 miR-29 的表达水平比正常小鼠升高。Dooley 等^[20]在进行体外试验中,发现 3T3-L1 脂肪细胞系中高表达的 miR-29 可降低胰岛素刺激的葡萄糖摄取,从而缓解 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗。还有研究报道在高糖、高胰岛素诱导体外胰岛素抵抗模型中,高表达的 miR-29 可抑制 Akt 的激活,降低脂肪细胞对葡萄糖的摄取能力,引起胰岛素抵抗发生^[21-22]。柚皮素对胰岛素抵抗的影响是否也与高表达的 miR-29 相关,目前尚无相关报道。因此,本研究进一步探索了柚皮素对胰岛素抵抗的影响与高表达的 miR-29b 的关系,结果发现柚皮素通过抑制 miR-29b 的高表达介导 3T3-L1 细胞 IRS-1/Akt 信号通路中相关蛋白的表达,最终改变胰岛素抵抗对脂肪细胞的影响,增强 3T3-L1 细胞对胰岛素的敏感性,促进葡萄糖吸收的作用,然而本研究结果仍不能完全解释柚皮素与改善胰岛素抵抗的作用,下一步将从多个蛋白靶点、多个调控环节继续深入研究,阐明柚皮素改善 T2DM 的作用及其分子机制。

参考文献:

[1] Vaziri K, Schwartz SG, Relhan N, et al. New therapeutic

approaches in diabetic retinopathy [J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(1-2): 196-210.

[2] Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398: 178-183.

[3] Molotski N, Soen Y. Differential association of microRNAs with polysomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets [J]. RNA, 2012, 18(9): 1612-1623.

[4] Ahmad K. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus [J]. Tradit Chin Med, 2014, 34(2): 234-237.

[5] Mohammed A, Amit KV, Mohammad YA, et al. Assessment of cell-free long non-coding RNA-H19 and miRNA-29a, miRNA-29b expression and severity of diabetes [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3727-3737.

[6] Massart J, Sjögren RJO, Lundell LS, et al. Altered miR-29 expression in type 2 diabetes influences glucose and lipid metabolism in skeletal muscle [J]. Diabetes, 2017, 66(7): 1807-1818.

[7] Richard AJ, Amini-Vaughan Z, Ribnicky DM, et al. Naringenin inhibits adipogenesis and reduces insulin sensitivity and adiponectin expression in adipocytes [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 549750.

[8] Nelson BA, Robinson KA, Buse MG. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. Diabetes, 2000, 49(6): 981-991.

[9] Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398: 178-183.

[10] Molotski N, Soen Y. Differential association of microRNAs with polysomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets [J]. RNA, 2012, 18(9): 1612-1623.

[11] Harmon AW, Patel YM. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(2): 229-234.

[12] 王元, 曾凯宏, 邓波, 等. 柚皮素对 3T3-L1 和 HepG2 细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取能力和胰岛素敏感性的影响 [J]. 成都医学院学报, 2017, 12(6): 651-665.

[13] Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, et al. Human beta cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis [J]. Mol Metab, 2017, 6(9): 943-957.

[14] Ahmad K. Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus [J]. Tradit Chin Med, 2014, 34(2): 234-237.

[15] Deyev IE, Popova NV, Serova OV, et al. Alkaline PH induces IRR-mediated phosphorylation of IRS-1 and actin cytoskeleton remodeling in a pancreatic beta cell line [J]. Biochimie, 2017, 138: 62-69.

(下转第 84 页)

赵汴霞, 任红, 晋佳路, 等. 冬凌草甲素调控 miR-200c/*EZH2* 轴抑制黑色素瘤细胞上皮-间质转化的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 67-76.

Zhao BX, Ren H, Jin JL, et al. Mechanism by which oridonin regulates miR-200c/*EZH2* axis to inhibit epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 67-76.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 010

冬凌草甲素调控 miR-200c/*EZH2* 轴抑制黑色素瘤细胞上皮-间质转化的机制研究

赵汴霞¹, 任红², 晋佳路¹, 曹杰^{2*}

(1.河南医学高等专科学校药理学教研室, 郑州 451191; 2.山东省青岛市市立医院药剂科, 山东 青岛 266000)

【摘要】 目的 探究冬凌草甲素调控微小 RNA200c (miR-200c)/组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2 (*EZH2*) 轴抑制黑色素瘤细胞 (A375 细胞) 上皮-间质转化 (EMT) 的影响机制。方法 MTT 法检测冬凌草甲素对 A375 细胞活力的影响; 将 A375 细胞分为对照组、冬凌草甲素组、mimic control 组、miR-200c mimics 组、冬凌草甲素+inhibitor control 组、冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组, qRT-PCR 检测 miR-200c、*EZH2* mRNA 表达情况; 免疫印迹法检测 *EZH2* 及 EMT 相关蛋白表达情况; 黏附实验检测 A375 细胞黏附能力; Transwell 实验检测 A375 细胞侵袭及迁移能力; 荧光素酶报告基因实验检测 miR-200c 与 *EZH2* 的靶向关系; 构建移植瘤裸鼠模型, 检测肿瘤质量; 免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况。结果 A375 细胞存活率随冬凌草甲素浓度的增加以剂量依赖性显著降低 ($P<0.05$), 由于 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素接近半数抑制浓度, 因此选取 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素进行后续实验; 与对照组相比, 冬凌草甲素组、miR-200c mimics 组 A375 细胞中 miR-200c、钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 表达水平显著增加, *EZH2* mRNA 及蛋白表达水平、神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin) 及波形蛋白 (Vimentin) 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低 ($P<0.05$); 与对照组、mimic control 组相比, miR-200c mimics 组 *EZH2* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); miR-200c 沉默可逆转冬凌草甲素对 A375 细胞的作用; 与对照组相比, 冬凌草甲素组肿瘤质量、*EZH2* mRNA、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著降低, miR-200c、E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组肿瘤质量、*EZH2* mRNA、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著增加, miR-200c、E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。结论 冬凌草甲素可能通过促进 miR-200c/*EZH2* 轴来抑制 A375 细胞的 EMT 及肿瘤生长。

【关键词】 黑色素瘤细胞; 冬凌草甲素; 微小 RNA200c; 组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2; 上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0067-10

Mechanism by which oridonin regulates miR-200c/*EZH2* axis to inhibit epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells

ZHAO Bianxia¹, REN Hong², JIN Jialu¹, CAO Jie^{2*}

(1. Department of Pharmacology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China.

2. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000)

【基金项目】 2021 年度河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (212102310684)。

【作者简介】 赵汴霞 (1983—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 心血管药理学、肿瘤药理学。E-mail: zhaobxyl83@163.com

【通信作者】 曹杰 (1985—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药学。E-mail: 1016160703@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which oridonin regulates the microRNA200c (miR-200c)/enhancer of *zeste* homolog 2 (*EZH2*) axis to inhibit the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of melanoma cells (A375 cells). **Methods** The MTT method was used to detect the effect of Rubescensine A on the viability of A375 cells. A375 cells were divided into a control group, oridonin group, mimic control group, miR-200c mimic group, oridonin+inhibitor control group, and oridonin+miR-200c inhibitor group. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-200c and *EZH2* mRNA, Western blot was used to detect the expression of *EZH2* and EMT-related proteins, adhesion test was used to detect the adhesiveness of A375 cells, Transwell test was used to detect the invasiveness and migration abilities of A375 cells, while a luciferase reporter gene experiment was used to detect the targeting relationship between miR-200c and *EZH2*, construct a nude mouse model of transplanted tumor to detect tumor quality. Finally, the expression of EMT-related proteins was analyzed immunohistochemically. **Results** The survival rate of A375 cells decreased significantly with increasing oridonin concentration in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Since 40 $\mu\text{mol/L}$ oridonin was close to the half inhibitory concentration, 40 $\mu\text{mol/L}$ oridonin was selected for follow-up experiments. Compared with those in the control group, the expression levels of miR-200c and E-cadherin in A375 cells in the oridonin group and miR-200c mimic group increased significantly, while the expression levels of *EZH2* mRNA and protein, neural cadherin (N-cadherin), and Vimentin, number of migrating cells, number of invading cells, and number of adhering cells decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the control group and the mimic control group, the expression level of *EZH2* protein in the miR-200c mimics group was significantly decreased ($P<0.05$), and the silencing of miR-200c could reverse the effect of oridonin on A375 cells. Compared with the levels in the control group, the tumor quality and expression levels of *EZH2* mRNA, N-cadherin, and Vimentin were significantly decreased in the oridonin group, while the expression levels of miR-200c and E-cadherin were significantly increased ($P<0.05$). Moreover, compared with those in the oridonin group, the tumor quality and expression levels of *EZH2* mRNA, N-cadherin and Vimentin in the oridonin+miR-200c inhibitor group were significantly increased, while the expression levels of miR-200c and E-cadherin were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Oridonin may inhibit the EMT of A375 cells and tumor growth by promoting the miR-200c/*EZH2* axis.

【Keywords】 melanoma cell; oridonin; miR200c; enhancer of *zeste* homolog 2; epithelial-mesenchymal transition

黑色素瘤主要发端于皮肤中称为黑色素细胞的含色素细胞,其发生率和死亡率逐年增加^[1]。尽管多数早期黑色素瘤患者通过外科手术的方式得到治愈,但由于其高转移性,晚期恶性患者的 5 年生存率仅在 5% 左右,已知上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在恶性肿瘤转移中具有关键作用,因此,阐明黑色素瘤的 EMT 机制对有效控制肿瘤的发展及治疗十分重要^[2-3]。冬凌草甲素是从红景天中分离出来的活性成分,具抗炎、抗菌和抗肿瘤的作用,一些研究称其在皮肤黑色素瘤中显示出有效的抗癌活性^[4]。多项研究表明微小 RNA(miRNA)以癌基因或抑癌基因的作用参与调控恶性肿瘤的发生和发展,促进或抑制肿瘤的 EMT 过程^[2-3,5]。miR-200c 作为 miRNA 家族的成员,已被发现其在黑色素瘤细胞中过表达可抑制细胞增殖、迁移能力以及耐药性^[6]。组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2(en enhancer of *zeste* homolog 2, *EZH2*) 在黑色素瘤中表达异常增加,还可作为重要的 EMT 诱导剂,参与癌症的转移^[7-8]。有研究表明,miR-200c 能通过抑制 *EZH2* 表达来抑制肾细胞癌的进展^[9]。因此,本研究旨在探究冬凌草

甲素通过调控 miR-200c/*EZH2* 轴对黑色素瘤 EMT 的影响机制,以期为黑色素瘤治疗机制研究及治疗靶点的寻找提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级 7~8 周龄 BALB/C 裸鼠(22~24 g)购买于河南省实验动物中心[SCXK(豫)2017-0001],于河南省中医药研究院[SYXK(豫)2019-0001]进行为期 1 周的适应性饲养(自由饮水、采食、12 h 明暗周期、(24±2)℃)。实验经河南医学高等专科学校实验动物福利伦理审查委员会批准通过(20190012),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

冬凌草甲素(上海宝曼生物科技有限公司,货号:D0348-20 mg, HPLC ≥ 98% 标准品); A375 细胞系(武汉益普生物科技有限公司,货号:YCL-0014); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(北京百瑞极生物科技有限公司,货号:BN17003); BCA 蛋白含量检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(武汉纯度生物科技有限公司,货号:CDLG-5055、

CDLG-4997);HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗抗体 (Invitrogen Antibodies,货号:A-11001);兔抗 β -actin 抗体 (Abcam,货号:ab8227);兔抗 *EZH2*、神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 抗体 (Cell Signaling Technology,货号:5246、13116、5741、3195);MTT 检测试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司,货号:ZY111105-500)。BioSpectrum-美国 UVP 凝胶成像系统购自上海天放实验仪器有限公司;实时荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔。

1.3 实验方法

1.3.1 A375 细胞培养

将黑色素瘤细胞(A375 细胞)培养于 RPMI 1640 培养基中(含双抗和胎牛血清),放入恒温培养箱中培养(5% CO₂、37℃)至细胞融合度约为 80% 时进行传代培养。

1.3.2 MTT 法检测 A375 细胞活力

取对数生长期 A375 细胞以每毫升 1×10⁵ 个浓度接种于 96 孔板中(每孔 100 μ L)培养 24 h 后,分别添加 0、5、10、20、40、80 μ mol/L 冬凌草甲素^[10](按每毫升培养基添加 29.16 μ g 冬凌草甲素配置成 80 μ mol/L 浓度,依次梯度稀释为 40、20、10、5 μ mol/L,设置 5 个复孔)培养 48 h,弃培养基后添加 20 μ L MTT(5 μ g/L)培养 4 h,添加二甲基亚砷(200 μ L)并震荡使结晶溶解,置于酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A₄₉₀)值,计算细胞活力(%)=处理组 A₄₉₀/对照组 A₄₉₀×100%。

1.3.3 实验分组

设置对照组、冬凌草甲素组(40 μ mol/L 冬凌草甲素)、mimic control 组、miR-200c mimics 组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组;将对数生长期 A375 细胞接种于 6 孔板中培养至细胞融合度约为 80%后按照试剂盒说明书操作,将 miR-200c 模拟物、抑制剂及其相应阴性对照分别转至 A375 细胞中,再按照分组情况添加 40 μ mol/L 冬凌草甲素进行培养 48 h。

1.3.4 qRT-PCR 检测 miR-200c、*EZH2* mRNA 表达

用 TRIzol 法提取转染后 A375 细胞及肿瘤组织中总 RNA 并检测浓度及纯度,后按反转录试剂盒说明书进行操作将 RNA 反转录成 cDNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书进行扩增(重复 3 次),通过 *GAPDH* 及 *U6* 作为内参分别对 *EZH2* 和 miR-200c 基因标准化后使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计算两基因表达情况(表 1)。

1.3.5 免疫印迹法检测 EZH2 及 EMT 相关蛋白表达情况

添加 RIPA 裂解液(500 μ L)于冰上将 A375 细胞裂解提取总蛋白,并使用 BCA 法定量蛋白后经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳将各蛋白分离,所得分离蛋白低温转膜后脱脂奶粉封闭(1 h),添加兔抗 β -actin、*EZH2*、N-cadherin、Vimentin 及 E-cadherin(1:1000)一抗并 4℃ 过夜,于次日添加已经过稀释的二抗(1:5000)1 h 孵育后 ECL 试剂显影,于蛋白凝胶成像仪中观察条带,并使用 Image J 分析条带灰度值,计算各个蛋白含量(重复 3 次)。

1.3.6 黏附实验检测 A375 细胞黏附能力

使用纤维粘连蛋白(fibronectin)5 μ g/mL 包被盖玻片风干后放置到 35 mm 培养皿中,添加 1.5 mL 各组 A375 细胞悬液(每毫升 3×10⁵ 个)1 h 后弃培养基,添加 200 μ L 表皮细胞生长因子(10 ng/mL)30 min 后使用 PBS 终止反应,多聚甲醛(4%)固定后于倒置显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞黏附数(每组重复 3 个)。

1.3.7 Transwell 实验检测 A375 细胞侵袭及迁移能力

迁移能力检测:将使用 RPMI-1640 无血清培养基所制成的 A375 细胞悬液(每毫升 1×10⁵ 个)接种到 Transwell 上室中(100 μ L),在下室中加入 RPMI-1640 含血清培养基(600 μ L),于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h,使用棉球将上室未穿膜的残余细胞擦去,选取 5 个视野对穿膜细胞计数;侵袭能力检测:使用经胶所包被的 Matrigel Transwell 小室上室,其余步骤与上述迁移步骤相同(每组重复 3 个)。

表 1 miR-200c、*EZH2* 所用 qRT-PCR 引物
Table 1 qRT-PCR primers for miR-200c and *EZH2*

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
miR-200c	GGTAATACTGCCGGGTAAT	CAGTCCGTGTCGTGGAGT
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT
<i>EZH2</i>	GTGAGAGATTATTCTCAAGATG	CCGACATACTTCAGGGCATCAGCC
<i>GAPDH</i>	GCCAAAAGGGTCATCATCTC	GTAGAGGCAGGGATGATGTTT

1.3.8 荧光素酶报告基因实验检测 miR-200c 与 EZH2 的靶向关系

首先通过生物信息学 TargetScan 网址确定 miR-200c 与 EZH2 结合位点后构建野生型 pmirGLO-EZH2-wt 载体及突变型 pmirGLO-EZH2-mut 载体,将二者分别与 miR-200c mimics、miR-NC 进行相应转染,分为: pmirGLO-EZH2-wt + miR-200c mimics 组、pmirGLO-EZH2-wt + miR-NC 组、pmirGLO-EZH2-mut + miR-200c mimics 组、pmirGLO-EZH2-mut + miR-NC 组,48 h 后弃培养基,并经过 PBS 清洗后加入细胞裂解液(200 μ L),离心取上清转移至新 EP 管中后根据双荧光素酶试剂盒说明书进行染色,检测荧光素酶相对活性。

1.3.9 构建移植瘤裸鼠模型及处理

将所购买的 24 只 BALB/C 裸鼠以 6 只/组随机分为 4 组,分为对照组、冬凌草甲素组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组,在裸鼠左侧腋窝外侧皮下注射 0.2 mL 1.3.2 中对照组、冬凌草甲素组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组细胞悬液(2×10^6 个),饲养 30 d 后将其处死,取出肿瘤组织并称取肿瘤质量(每组重复 6 个),取 3 只裸鼠体内肿瘤组织,通过 qRT-PCR 检测肿瘤组织中 miR-200c、EZH2 表达情况,取其余 3 只裸鼠体内肿瘤组织,免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况。

1.3.10 免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况

将所得各组肿瘤组织进行多聚甲醛固定,制作常规组织石蜡切片,二甲苯浸泡 5 min 后脱蜡水化,EDTA 缓冲液修复抗原后添加兔抗 N-cadherin、Vimentin 及 E-cadherin 一抗,过夜孵育后添加二抗孵育 0.5 h,DAB 显色、苏木精复染、封片、显微镜观察(每组重复 3 个)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 分析数据,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述计量资料,两组间比较行 t 检验,多组间比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对 A375 细胞活力的影响

A375 细胞存活率随冬凌草甲素浓度的增加(0、5、10、20、40、80 μ mol/L)而显著降低,其分为 100%, (85.15 ± 8.22)%, (70.35 ± 6.63)%, (60.82 ± 6.74)%, (47.26 ± 5.70)%, (30.49 ± 4.82)% ($P <$

0.05),存在剂量依赖性,并选取 40 μ mol/L 冬凌草甲素进行后续实验。

2.2 冬凌草甲素对 A375 细胞 miR-200c、EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达的影响

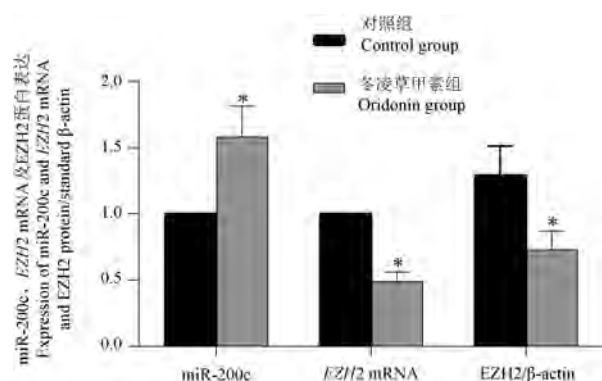
与对照组相比,冬凌草甲素组 A375 细胞中 miR-200c 表达水平显著增加,EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),见图 1、2。

2.3 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的影响

与对照组相比,冬凌草甲素组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低,E-cadherin 表达水平显著增加($P < 0.05$),见图 3、4、5。

2.4 miR-200c 靶向调控 EZH2 的表达

TargetScan 网址预测显示:miR-200c 与 EZH2 存在靶向结合位点(见图 6);荧光素酶报告基因检测显示,与 pmirGLO-EZH2-wt + miR-NC 组(0.91 ± 0.12)相比,pmirGLO-EZH2-wt + miR-200c mimics 组荧光素酶活性(0.47 ± 0.08)显著降低($P < 0.05$),而其余两组荧光素酶活性无显著性差异(0.89 ± 0.11



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 冬凌草甲素对 A375 细胞 miR-200c、EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达的影响

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

Figure 1 Effect of oridonin on the expression of miR-200c, EZH2 mRNA, EZH2 protein in A375 cells

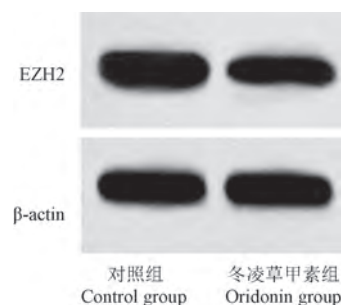


图 2 冬凌草甲素对 A375 细胞 EZH2 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of oridonin on EZH2 protein expression in A375 cells

vs 0.90 ± 0.13 , $P > 0.05$); 与对照组 (1.30 ± 0.24)、mimic control 组 (1.29 ± 0.22) 相比, miR-200c mimics 组 *EZH2* 蛋白表达水平 (0.68 ± 0.10) 显著降低 ($P < 0.05$), 见图 7。

2.5 miR-200c 过表达对 A375 细胞 EMT 的影响

与对照组相比, mimic control 组各指标无显著性差异 ($P > 0.05$), miR-200c mimics 组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低, E-cadherin 表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 见图 8、9、10。

2.6 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 的影响

与对照组相比, 冬凌草甲素组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低, E-cadherin 表达水平显著增加 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数黏附细胞数显著

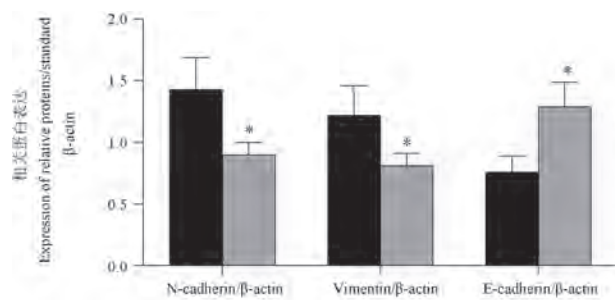
增加, E-cadherin 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 11、12、13。

2.7 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤质量的影响

与对照组 (0.54 ± 0.10) 相比, 冬凌草甲素组 (0.15 ± 0.03) 肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + inhibitor control 组 (0.16 ± 0.05) 无显著变化, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 (0.48 ± 0.12) 肿瘤质量显著增加 ($P < 0.05$), 见图 14。

2.8 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对体内肿瘤中 EMT 相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 冬凌草甲素组 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著降低, E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著增加, E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 15。



注: 与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

图 3 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的影响

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

Figure 3 Effect of oridonin on EMT of A375 cells

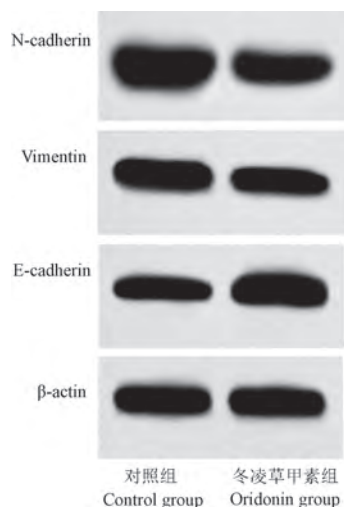


图 4 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of oridonin on EMT related protein expression in A375 cells

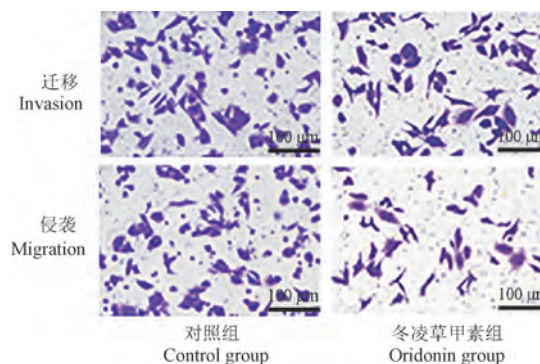
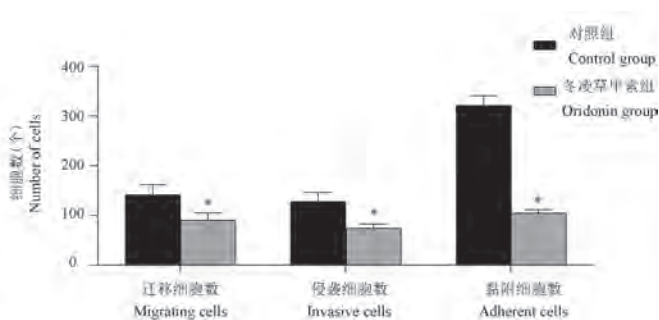


图 5 冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭及迁移的影响

Figure 5 Effect of oridonin on invasion and migration of A375 cells

2.9 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对体内肿瘤中 miR-200c、EZH2 mRNA 表达的影响

与对照组相比,冬凌草甲素组 *EZH2* mRNA 表达水平显著降低,miR-200c 表达水平显著增加

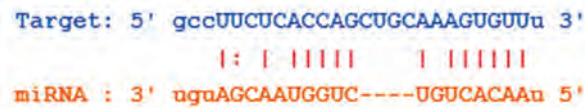


图 6 miR-200c 与 *EZH2* 的靶向结合位点

Figure 6 Targeted binding sites of miR-200c and *EZH2*

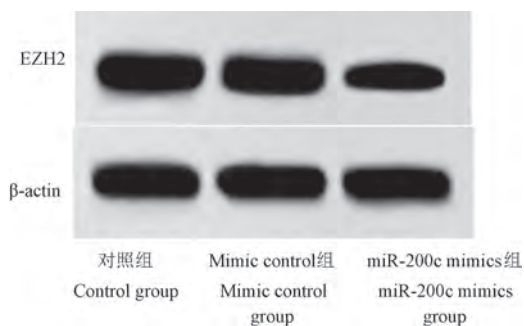
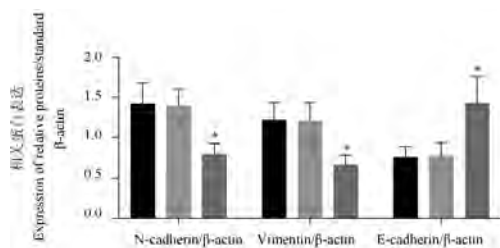


图 7 miR-200c 过表达对 A375 细胞中 *EZH2* 蛋白表达的影响

Figure 7 Effect of miR-200c overexpression on *EZH2* protein expression in A375 cells



注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

图 9 miR-200c 过表达对 A375 细胞 EMT 的影响

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

Figure 9 Effect of miR-200c overexpression on EMT of A375 cells

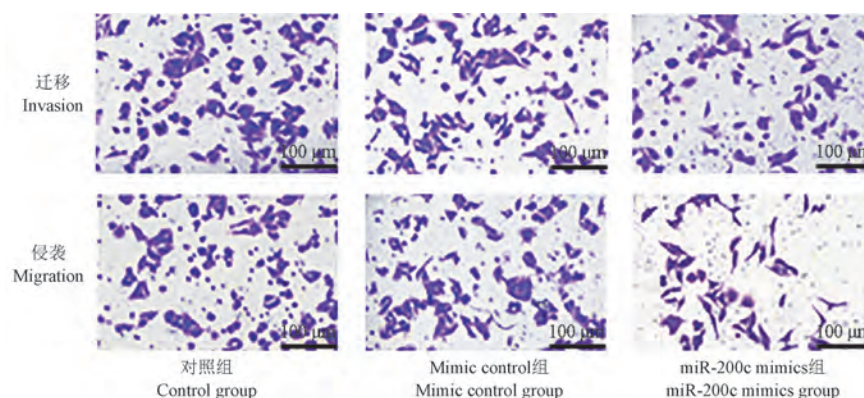


图 10 miR-200c 过表达对 A375 细胞侵袭及迁移的影响

Figure 10 Effect of miR-200c overexpression on invasion and migration of A375 cells

($P<0.05$);与冬凌草甲素组相比,冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组 *EZH2* mRNA 表达水平显著增加,miR-200c 表达水平显著降低($P<0.05$),见图 16。

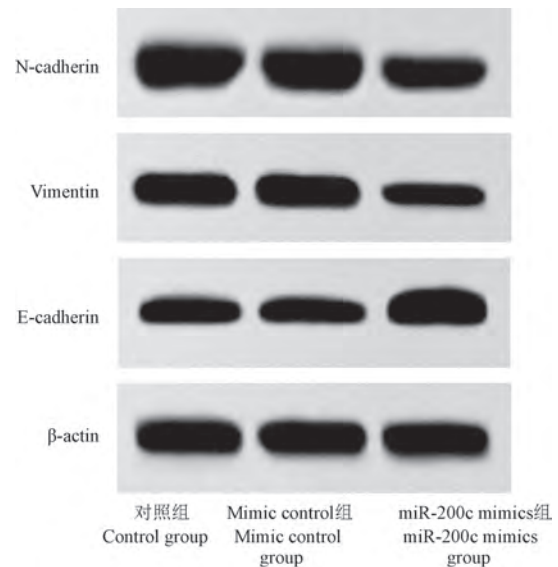
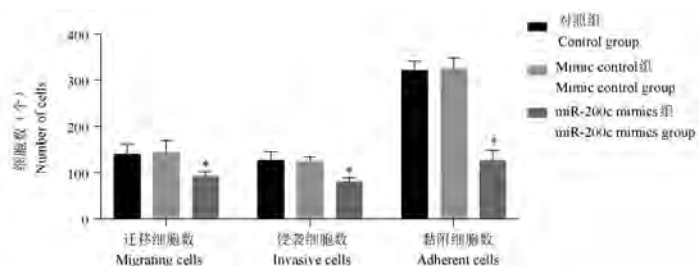
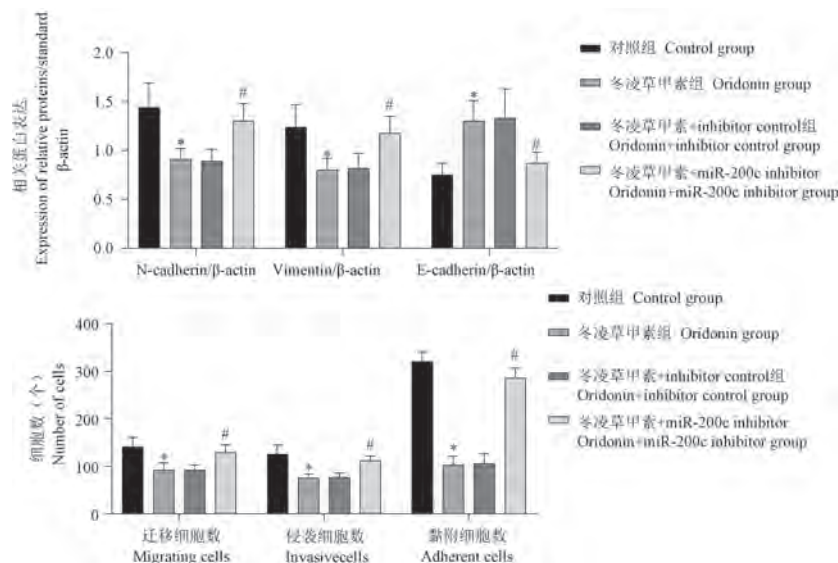


图 8 miR-200c 过表达对 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Figure 8 Effect of miR-200c overexpression on EMT related protein expression in A375 cells





注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与冬凌草甲素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 11 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 的影响

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

Figure 11 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on EMT

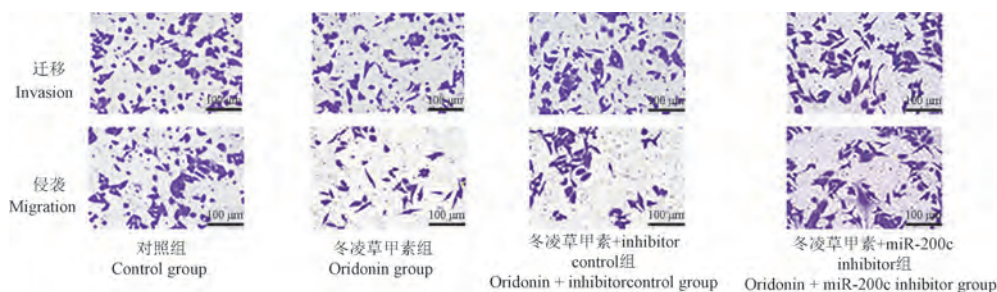
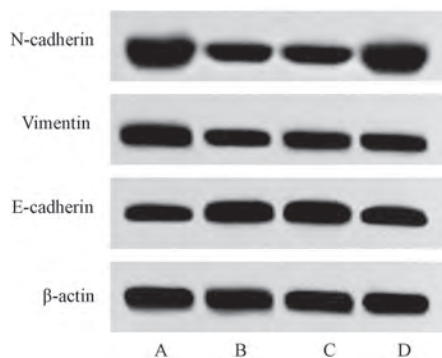


图 12 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭及迁移的影响

Figure 12 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on invasion and migration of A375 cells



注:A:对照组;B:冬凌草甲素组;C:冬凌草甲素+inhibitor control 组;D:冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组。

图 13 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 相关蛋白表达的影响

Note. A, Control group. B, Oridonin group. C, Oridonin+inhibitor control group. D, Oridonin+miR-200c inhibitor group.

Figure 13 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on EMT related protein expression



注:A:对照组;B:冬凌草甲素组;C:冬凌草甲素+inhibitor control 组;D:冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组。

图 14 肿瘤形态观察

Note. A, Control group. B, Oridonin group. C, Oridonin + inhibitor control group. D, Oridonin + miR-200c inhibitor group.

Figure 14 Tumor morphology observation

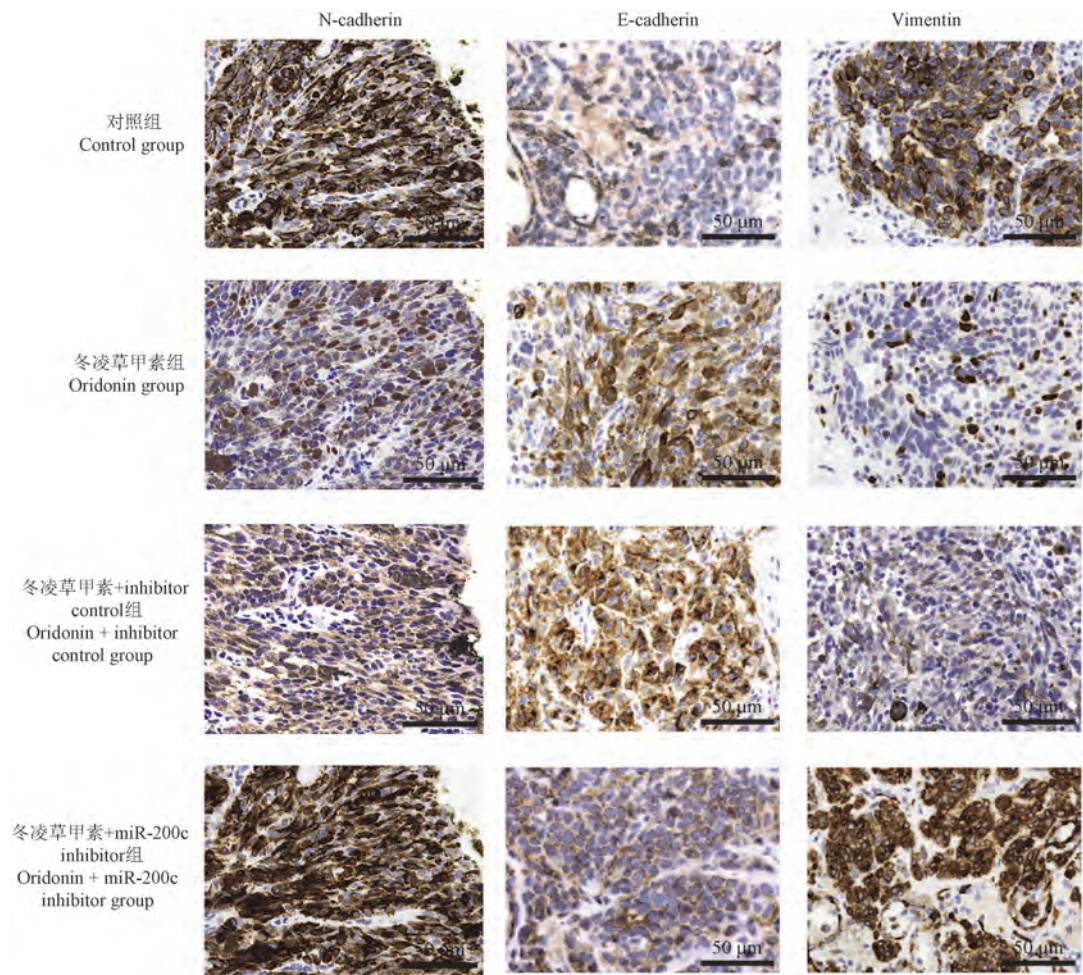
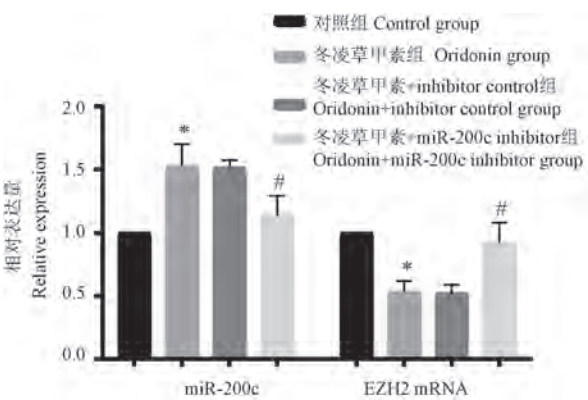


图 15 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤组织中 EMT 相关蛋白表达的影响
Figure 15 miR-200c expression silencing reverses the effect of oridonin on the expression of EMT-related proteins in tumor tissues



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与冬凌草甲素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 16 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤组织中 miR-200c、EZH2 mRNA 表达的影响

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

Figure 16 miR-200c expression silence reverses the effect of oridonin on the expression of miR-200c and EZH2 mRNA in tumor tissues

3 讨论

黑色素瘤近年来发病率不断增加,尽管采用标准疗法和新疗法在疾病治疗中取得了很大的进展,但患者预后仍不理想^[11-13]。上皮细胞转化为间质细胞的 EMT 过程在肿瘤侵袭和转移中具有关键作用,是肿瘤进展必要事件之一^[4]。因此,需要迫切寻找用于抑制黑色素瘤 EMT 过程的新的治疗手段,而目前低毒性新的治疗药物是研究重点^[11]。

冬凌草甲素是从红景天中提取的一种重要的中药活性成分之一,至今,其抗癌活性已得到了广泛研究,一些报告称其在黑色素瘤中通过诱导癌细胞凋亡抑制来损害黑素瘤细胞的存活和增殖能力^[4,12,14]。冬凌草甲素可通过抑制 EMT 及基质金属蛋白酶表达来有效抑制 A375 细胞的侵袭及转移能力^[10]。冬凌草甲素可通过抑制粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)-细胞外调节蛋白激酶

(extracellular regulated protein kinases, *ERK1/2*) 信号通路激活达到抑制小细胞肺癌细胞(H1688)的迁移和 EMT 的目的^[15]。冬凌草甲素可通过抑制蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路来抑制 EMT^[16]。本研究发现,冬凌草甲素以剂量依赖性的方式显著降低 A375 细胞存活率,与前人研究结果相一致,该结果表明冬凌草甲素对黑色素瘤具有有效抑癌作用。肿瘤在侵袭、转移过程中可对宿主的组织成分产生黏附作用,因此其黏附能力与癌细胞转移具有密切联系^[10]。在 EMT 过程中 E-cadherin 表达异常降低,而 Vimentin 和 N-cadherin 表达异常增加^[17]。本研究还发现,冬凌草甲素可显著增加 E-cadherin 表达水平,显著降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数,该结果与前人研究结果相一致,这表明冬凌草甲素能通过增加 E-cadherin 表达,降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达来抑制 A375 细胞的 EMT,以此达到抑制肿瘤转移的目的,提示冬凌草甲素有作为黑色素瘤靶向治疗药物的潜能。

miRNA 通过与靶 mRNA 的 3' UTR 结合来诱导 mRNA 的翻译抑制或降解,已成为各种真核生物中基因表达的有效调节剂,并且已被证实是黑色素瘤发生发展的关键调节因子,参与调控肿瘤的 EMT 过程^[18]。原发性皮肤黑色素瘤中 miR-200c 表达下调预示患者预后不良^[19]。上调 miR-200c 的表达可通过抑制 E 盒结合锌指蛋白 1 和 Vimentin 表达来抑制乳腺癌 MDA231 细胞迁移及 EMT^[20]。本研究发现,*EZH2* 是 miR-200c 的潜在靶基因。已有研究表明,*EZH2* 在黑色素瘤中表达异常上调,促使肿瘤的生长方式更具侵略性、恶性程度更高、预后更差^[21]。miR-200c 表达沉默可促进 *EZH2* 的表达,从而促进 HCC 细胞的致癌性^[22]。本研究发现,冬凌草甲素可显著增加 miR-200c 表达水平,降低 *EZH2* 表达水平;miR-200c 过表达可显著降低 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数,增加 E-cadherin 表达水平,与前人研究结果相似,该结果表明 miR-200c 过表达可显著抑制 A375 细胞 EMT 发生,提示,miR-200c/*EZH2* 轴有作为黑色素瘤潜在治疗靶点的可能。除此之外本研究还发现,miR-200c 表达沉默则可逆转冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的抑制,上述结果表明,冬凌草甲素能够增加 E-cadherin 表达,降

低 N-cadherin 及 Vimentin 表达,以此对 A375 细胞 EMT 起到抑制作用,该机制可能与其促进 miR-200c 表达、降低 *EZH2* 表达有关。

综上,冬凌草甲素可能通过促进 miR-200c/*EZH2* 轴来增加 E-cadherin 表达,降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达,以此抑制 A375 细胞的 EMT 过程,从而达到抑制肿瘤侵袭和转移的目的。本研究不仅为黑色素瘤治疗靶点的寻找提供依据,还为冬凌草甲素在裸鼠体内抑制 A375 肿瘤侵袭和转移或小鼠体内对抑制黑色素瘤侵袭和转移的研究提供基础。

参考文献:

- [1] Li F, Li X, Qiao L, et al. MALAT1 regulates miR-34a expression in melanoma cells [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 389.
- [2] 李璟蓉, 赵瑞, 方锐华, 等. miR-122-5p 通过靶向 NOP14 抑制黑色素瘤的细胞增殖 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(11): 1360-1365.
- [3] Wang SJ, Li WW, Wen CJ, et al. MicroRNA214 promotes the EMT process in melanoma by downregulating CADM1 expression [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 3795-3803.
- [4] Li CY, Wang Q, Shen S, et al. Oridonin inhibits migration, invasion, adhesion and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells by inhibiting the activity of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 1362-1372.
- [5] Han Y, Li X, Ma C, et al. Seed targeting with tiny anti-miR-1297 inhibits EMT in melanoma cells [J]. J Drug Target, 2019, 27(1): 75-81.
- [6] Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, et al. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1 [J]. Am J Pathol, 2012, 181(5): 1823-1835.
- [7] Zingg D, Debbache J, Peña-Hernández R, et al. *EZH2*-mediated primary cilium deconstruction drives metastatic melanoma formation [J]. Cancer Cell, 2018, 34(1): 69-84.
- [8] Li Z, Hou P, Fan D, et al. The degradation of *EZH2* mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(1): 59-71.
- [9] Ding J, Yeh CR, Sun Y, et al. Estrogen receptor β promotes renal cell carcinoma progression via regulating lncRNA HOTAIR-miR-138/200c/204/217 associated CeRNA network [J]. Oncogene, 2018, 37(37): 5037-5053.
- [10] 李春雨, 王琪, 申坤, 等. 冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 658-662.
- [11] Zhou WJ, Wang HY, Zhang J, et al. NEAT1/miR-200b-3p/SMAD2 axis promotes progression of melanoma [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(22): 22759-22775.
- [12] Liu F, Hu L, Pei Y, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1

- accelerates the progression of melanoma by targeting miR-653-5p/RAI14 axis [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 258.
- [13] Wang B, Shen C, Li Y, et al. Oridonin overcomes the gemcitabine resistant PANC-1/Gem cells by regulating GST pi and LRP/1 ERK/JNK signalling [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5751-5765.
- [14] Yang J, Ren X, Zhang L, et al. Oridonin inhibits oral cancer growth and PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100: 226-232.
- [15] Xu L, Bi Y, Xu Y, et al. Oridonin inhibits the migration and epithelial-to-mesenchymal transition of small cell lung cancer cells by suppressing FAK-ERK1/2 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4480-4493.
- [16] Liu W, Huang G, Yang Y, et al. Oridonin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human nasopharyngeal carcinoma cells by negatively regulating AKT/STAT3 signaling pathway [J]. Int J Med Sci, 2021, 18(1): 81-87.
- [17] 孟小琴, 李云峰, 周毅, 等. 过表达 OTUD1 对结肠癌细胞 HCT116 增殖和侵袭的影响及机制研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(5): 687-691.
- [18] Noori J, Sharifi M, Haghjooy Javanmard S. miR-30a inhibits melanoma tumor metastasis by targeting the *E-cadherin* and zinc finger E-box binding homeobox 2 [J]. Adv Biomed Res, 2018, 7: 143.
- [19] Sánchez-Sendra B, Martínez-Ciarpaglini C, González-Muñoz JF, et al. Downregulation of intratumoral expression of miR-205, miR-200c and miR-125b in primary human cutaneous melanomas predicts shorter survival [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17076.
- [20] Shi D, Guo L, Sun X, et al. UTMD inhibit EMT of breast cancer through the ROS/miR-200c/ZEB1 axis [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6657.
- [21] Xu Y, Wang H, Li F, et al. Long Non-coding RNA LINC-PINT suppresses cell proliferation and migration of melanoma via recruiting *EZH2* [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 350.
- [22] Xu L, Lin J, Deng W, et al. *EZH2* facilitates BMI1-dependent hepatocarcinogenesis through epigenetically silencing microRNA-200c [J]. Oncogenesis, 2020, 9(11): 101.

[收稿日期]2021-06-22

(上接第 52 页)

- [8] Jing N, Fang B, Li Z, et al. Exogenous activation of cannabinoid-2 receptor modulates TLR4/MMP9 expression in a spinal cord ischemia reperfusion rat model [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 101.
- [9] Wu MY, Gao F, Yang XM, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates the blood brain barrier via the hedgehog pathway in a rat model of traumatic brain injury [J]. Brain Res, 2020, 1727: 146553.
- [10] Ma GD, Pan ZR, Kong LL, et al. Neuroinflammation in hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator thrombolysis: potential mechanisms, targets, therapeutic drugs and biomarkers [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107216.
- [11] Han L, Jiang C. Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(8): 2306-2325.
- [12] Zhang Y, Li XF, Qiao SS, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury *in vitro* [J]. J Neurochem, 2021, 156(3): 352-366.
- [13] Yang ZG, Lin PP, Chen B, et al. Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5) [J]. Autophagy, 2020, 17(10): 3048-3067.
- [14] Jickling GC, Liu D, Stamova B, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(2): 185-199.
- [15] 朱玉岩, 常大伟, 聂恒浩. 急性缺血性脑卒中患者血清 Occludin 表达水平及其临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(9): 1479-1484.

[收稿日期]2021-11-15

陈千晴, 别亚男, 陈柏羽, 等. 人脐带间充质干细胞治疗小鼠急性肺损伤的安全性及有效性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 77-84.

Chen QQ, Bie YN, Chen BY, et al. Study on the safety and effectiveness of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of acute lung injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 77-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.011

人脐带间充质干细胞治疗小鼠急性肺损伤的安全性及有效性研究

陈千晴¹, 别亚男², 陈柏羽¹, 许佳欢¹, 欧宝芳¹, 谢水林^{3*}, 吴少瑜^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 511436;
3. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 探讨人脐带间充质干细胞(HUC-MSCs)治疗脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤小鼠模型的安全性及有效性。**方法** 通过致瘤性实验、体外溶血实验、急性毒性实验评价 HUC-MSCs 安全性。以 6~8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠为实验对象, 使用 LPS 滴鼻或腹腔注射构建急性肺损伤模型。造模后 6 h 给予 HUC-MSCs 治疗, 将治疗组分为: 尾静脉注射组(5×10^7 cells/kg)、雾化组(HUC-MSCs 条件培养基)。造模后 96 h 观察各组小鼠肺组织病理结果, 瑞氏-姬姆萨染色法观察小鼠肺泡灌洗液(BALF)炎性细胞计数和分类。**结果** HUC-MSCs 无致瘤性、无明显溶血反应, 无急性毒性。与对照组相比, 两种造模方法均出现一定程度的肺损伤, 肺组织病理切片 McGuigan 评分结果显示腹腔注射 LPS 引起的肺损伤较滴鼻组严重。与模型组相比, 治疗组肺组织损伤程度明显减轻, 其中尾静脉注射组治疗效果优于雾化组, BALF 中巨噬细胞数明显升高($P < 0.001$)。**结论** LPS 腹腔注射诱导的小鼠急性肺损伤模型优于滴鼻给药。尾静脉注射人脐带间充质干细胞可有效治疗小鼠急性肺损伤, 使用 HUC-MSCs 条件培养基雾化给药可缓解小鼠肺部炎症。

【关键词】 急性肺损伤; 人脐带间充质干细胞; 安全性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0077-08

Study on the safety and effectiveness of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of acute lung injury in mice

CHEN Qianqing¹, BIE Yanan², CHEN Boyu¹, XU Jiahuan¹, OU Baofang¹, XIE Shuilin^{3*}, WU Shaoyu^{1*}

(1. School of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. 2. School of Life Science and Biopharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 511436. 3. School of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Objective To investigate the safety and efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) in treating lipopolysaccharide (LPS) induced acute lung injury in a mouse model. **Methods** The safety of HUC-MSCs was evaluated through tumorigenicity experiments, *in vitro* hemolysis experiments, and acute toxicity

[基金项目] 广东省企业科技特派员项目(GDKTP2020041900); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2020449)。

[作者简介] 陈千晴(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 干细胞与转化医学。E-mail: qian_qingchen@163.com

[通信作者] 吴少瑜(1980—), 女, 副教授, 硕士导师, 研究方向: 具有抗肿瘤作用的新化合物筛选和机制研究。

E-mail: wushaoyu1980@126.com

谢水林(1980—), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: xsl@scut.edu.cn

* 共同通信作者

experiments. A model of acute lung injury was constructed by nasal or intraperitoneal injection of LPS in mice aged 6 to 8 weeks. HUC-MSCs treatment was given 6 h after modeling, and the treatment groups were divided into tail vein injection group (5×10^7 cells/kg) and nebulized group (HUC-MSCs conditioned medium). The histopathological result of mice lungs in each group were observed 96 h after modeling, and the inflammatory cell count and classification of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were observed by Richter-Kimsa staining. **Results** There was the absence of potentially tumorigenicity and acute toxicity in the animals after administration of the stem cells. HUC-MSCs had no hemolytic effect on rabbit blood. Compared with the control group, both modeling method showed some degree of lung injury, and the McGuigan score of lung histopathological sections showed that the lung injury caused by intraperitoneal injection of LPS was more severe than that of the nasal drip group. Compared with the model group, the degree of lung injury was significantly reduced in the treatment group, in which the tail vein injection group had a better treatment effect than the atomization group, and the macrophage count in BALF was significantly higher ($P < 0.001$). **Conclusions** The mouse model of acute lung injury induced by LPS intraperitoneal injection was superior to nasal drip administration. Caudal vein injection of HUC-MSCs can effectively treat acute lung injury in mice. HUC-MSCs conditioned medium atomization can alleviate lung inflammation in mice.

【Keywords】 acute lung injury; human umbilical cord mesenchymal stem cells; security

新型冠状病毒 (COVID-19) 感染引起的全球疫情使急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 再次受到大众的关注^[1]。ALI 发病急骤、病死率高, 死亡率在 34.9%~46.1% 之间^[2]。多种原因可引起急性肺损伤, 如吸入性肺炎^[3]、肺挫伤、多次输血、脓毒血症等^[4]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导炎症反应, 模拟脓毒血症引起的 ALI^[5]。ALI 发病机制较为复杂, 免疫调节反应是最为关键的因素^[6]。

间充质干细胞是一种具有自我更新、多向分化、免疫调控等特点的多潜能组织干细胞^[7], 可通过强大的抗炎^[8]和免疫调节^[9]功能减少肺部炎症细胞浸润^[10], 抑制炎症因子分泌, 从而减轻肺损伤。干细胞主要通过旁分泌功能 (包括细胞因子、生长因子以及外泌体等) 与巨噬细胞、T 细胞、NK 细胞等接触发挥免疫调控作用。研究表明, 干细胞条件培养基雾化给药可治疗小鼠肺炎^[11], 为 ALI 提供了新的治疗选择。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

清洁级成年健康新西兰兔 1 只, 雄性, 6 月龄, 体重 2.5~2.7 kg, 由南方医科大学实验动物中心提供 [SCXK (粤) 2021-0041]。SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 82 只, 6~8 周龄, 体重 18~22 g。SPF 级 BALB/c-nu 雌性小鼠 27 只, 15~21 d, 体重 18~20 g。均购自珠海百试通生物科技有限公司 [SCXK (粤) 2020-0051]。实验动物均饲养于广州华腾生物医药科技有限公司 [SYXK (粤) 2020-0237], 小

鼠饲养条件符合 SPF 级要求。环境温度维持在 20℃~24℃, 湿度维持在 40%~70%, 明暗比为 12 h/12 h, 动物可自由饮水及摄食。实验及研究过程给予动物人道主义关怀, 遵循“3R 原则”, 研究方案经广州华腾生物医药科技有限公司实验动物伦理委员会 (HTSW210211、HTSW210516) 审查通过。

1.1.2 细胞

人脐带间充质干细胞购自广州塞莱拉干细胞科技股份有限公司, 编号为 Y2023QD01141; Hela 细胞购自广州辉园苑医药科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (L861706, 麦克林); DMEM/F-12 (Gibco, C11330500BT); EDTA (Gibco, 25200-056); 氯化钠注射液 (辰欣药业股份有限公司); 苏木素 (美国 Sigma 公司); 伊红染液 (天津光复精细化工有限公司); 瑞氏-姬姆萨复合染液 (索莱宝, G1020)。生物显微镜 (舜宇光学科技 (集团) 有限公司); 组织切片机 (RM2245, 德国徕卡 Leica 公司); 雾化仪 (鱼跃, M104 网式雾化器); 电子精密天平 (倍尔 BEL)。

1.3 实验方法

1.3.1 HUC-MSCs 的准备

HUC-MSCs 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基中, 隔天换液, 2~3 d 传代 1 次。待细胞传代至 P6 代, 培养 48 h 后收集贴壁细胞上清液, 在 4℃ 条件下以 3000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片。收集离心后上清用于雾化治疗组。使用 0.05% 含 EDTA 胰酶消化收集细胞, 用于尾静脉注射治疗组。

1.3.2 HUC-MSCs 致瘤性实验

27 只 BALB/c-nu 雌性小鼠随机分成 3 组:阴性对照组(等体积生理盐水)、阳性对照组(1×10^6 个 Hela 细胞)、HUC-MSCs 组(1×10^7 个 HUC-MSCs 细胞^[12]),每组 9 只,各组均采用皮下注射给药。每周观察 2 次体重、瘤体大小、是否成瘤,持续观察 1 个月。按照公式 $V = \pi \times ab^2 / 6$ (V : 体积, a : 肿瘤长径, b : 肿瘤短径) 计算肿瘤体积。

1.3.3 体外溶血实验

将实验分为 3 组:阴性对照组、阳性对照组、HUC-MSCs 组,每组设置 3 个平行对照。取新鲜兔血脱纤处理,分别加入 2.5 mL 生理盐水、纯净水、HUC-MSCs (1×10^6 cells)。混匀每组血液样本后静置于 37℃ 水浴锅中,3 h 后观察血样样本是否有溶血和凝集现象。

1.3.4 HUC-MSCs 的急性毒性实验

(1) 40 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 4 组:3 个不同剂量的受试细胞组、对照组,每组 10 只小鼠。(2) 给药方案:受试细胞组分别尾静脉注射 4×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 个人脐带间充质干细胞,对照组尾静脉注射灭菌生理盐水,各组给药总体积 0.2 mL。(3) 观察:注射后 4 h 观察小鼠毒性反应,包括小鼠摄食量、体重变化等指标,记录小鼠死亡情况,此后连续观察记录 28 d。

1.3.5 急性肺损伤(ALI)模型构建及评分

12 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 3 组:对照组、滴鼻组、腹腔注射组,每组 4 只,分别使用 LPS (10 mg/kg) 缓慢滴鼻或腹腔注射构建模型。

各组肺组织 HE 染色后采用 McGuigan 评分法^[13]判定急性肺损伤程度,评分根据:(1) 肺泡壁增厚或透明膜形成;(2) 肺泡充血;(3) 血管壁或肺泡腔炎性细胞浸润;(4) 出血。每组随机抽取 5 个视野对以上 4 个评分根据进行急性肺损伤半定量检测评分分析。

1.3.6 HUC-MSCs 治疗小鼠急性肺损伤

30 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为 5 组:对照组、模型组、尾静脉注射治疗组、雾化对照组、雾化治疗组,每组 6 只。小鼠选用 LPS (10 mg/kg) 腹腔注射造模,6 h 后给予 HUC-MSCs 尾静脉注射治疗 (MSCs-IOCV, 5×10^7 cells/kg)。实验收集 HUC-MSCs 条件培养基用于雾化治疗组 (CM-atomization, 2 mL) 给药,雾化对照组小鼠使用同剂量空白培养基雾化给药。

1.3.7 BALF 炎症细胞分类计数

LPS 造模后 96 h,分离暴露支气管,注射器吸取 1 mL PBS 插入右主支气管灌洗肺部,重复 3 次,回收率 80% 以上。将肺泡灌洗液在 4℃ 条件下以 1500 r/min 离心 10 min,去除上清,加入 100 μ L PBS 重悬。取 10 μ L 重悬液于载玻片上涂抹展开,风干 5~10 min,固定 15 min,使用瑞氏-姬姆萨染色法染色。镜下选取 3 个视野进行炎症细胞分类计数。

1.4 统计学方法

应用 IBM SPSS 25.0 进行实验数据分析,使用 GraphPad Prism 9 软件作图。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用重复测量方差分析、单因素方差分析进行组间差异分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种给药方式导致的急性肺损伤程度比较

肺组织 HE 染色显示滴鼻组小鼠肺泡壁厚度均匀,肺泡未见炎性渗出物,血管附近有少量炎性细胞浸润。腹腔注射组小鼠肺泡壁增厚,伴炎性细胞浸润,多处支气管及血管周围淋巴细胞灶性浸润,并见淋巴小结形成,偶见支气管内出血(图 1A)。

McGuigan 评分结果显示,腹腔注射组评分与对照组相比显著升高 ($P < 0.01$),肺损伤程度对比滴鼻组明显加重 ($P < 0.05$) (图 1B)。

2.2 人脐带间充质干细胞致瘤性实验

小鼠皮下注射 HUC-MSCs 后持续观察 28 d,注射部位未见肿瘤形成,与阴性对照组结果一致,无致瘤性(图 2A)。阳性对照组小鼠皮下注射 Hela 细胞后 10 d 观察到肿瘤形成,并逐渐增大(图 2B),成瘤率 100%,小鼠肿瘤平均直径不超过 20 mm,生长不超过原体重 10%。

2.3 致瘤性实验小鼠组织病理切片

观察期结束后,解剖各组小鼠脏器并进行 HE 染色(图 3A)。HUC-MSCs 组、阴性对照组各脏器病理学检查均未发现异常。阳性对照组小鼠脾白髓数量减少,淋巴细胞减少,红髓大量髓外造血细胞增生,伴有多量中性粒细胞浸润;肺泡壁增厚,伴有较多中性粒细胞浸润。肿瘤细胞密集排列,胞核异型性低,核质比大,胞浆呈嗜碱性,多见核分裂像(图 3B)。

2.4 人脐带间充质干细胞的急性毒性实验

各组小鼠尾静脉注射给药后均未出现死亡,记

录给药后 28 d 小鼠体重及摄食。各组小鼠体重均正常增长(图 4A),摄食正常(图 4B),差异无统计学意义。

对各组小鼠的心、肝、脾、肺、肾进行病理学检查,HE 染色结果显示各脏器组织未见坏死或炎症反应(图 4C)。以上结果显示,尾静脉注射人脐带间充质干细胞($4\times10^5\sim1\times10^6$ cells)不会引起急性毒性反应。

2.5 人脐带间充质干细胞的体外溶血实验

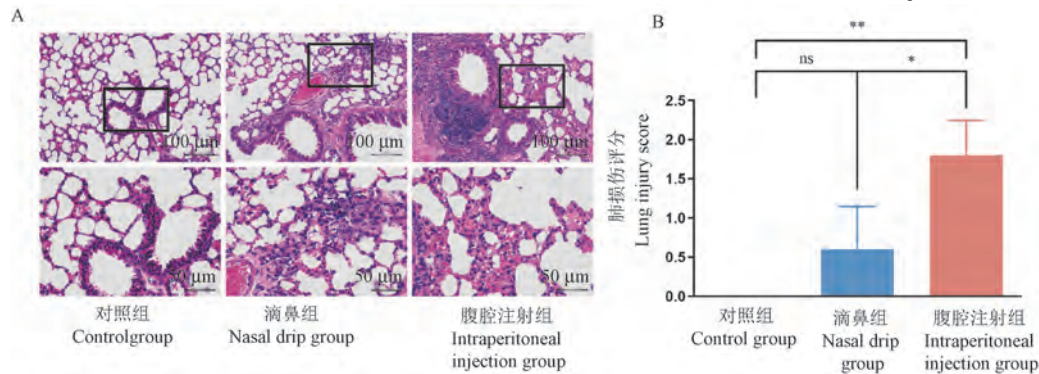
在 3 h 内阳性对照组有明显溶血现象,HUC-MSCs 组、阴性对照组上层澄清透明,下层细胞沉淀较多,无溶血现象发生(图 5A)。各组血液样本重悬后于显微镜下观察,阳性对照组红细胞破裂,红细胞数明显减少,HUC-MSCs 组、阴性对照组无溶血

和致红细胞凝集作用(图 5B)。

2.6 人脐带间充质干细胞治疗急性肺损伤的有效性评价

各治疗组肺组织 HE 染色结果显示,HUC-MSCs 尾静脉注射治疗后可见炎症缓解,肺泡壁无增厚(图 6A),肺损伤评分明显下降(图 6C)。HUC-MSCs 条件培养基雾化治疗后小鼠肺泡壁仍可见少量炎性细胞散在浸润,肺泡壁未见明显增厚,损伤评分介于模型组和尾静脉注射治疗组(MSCs-IOCV 组)之间(图 6C)。雾化对照组肺组织可见弥漫性肺间质增厚,肺泡腔缩小。

采用瑞氏-姬姆萨染色法观察各组 BALF(图 6B)的炎性细胞总数和分类计数,尾静脉注射治疗组巨噬细胞数明显高于模型组(图 6D),雾化治疗组巨噬细胞数介于两组之间。

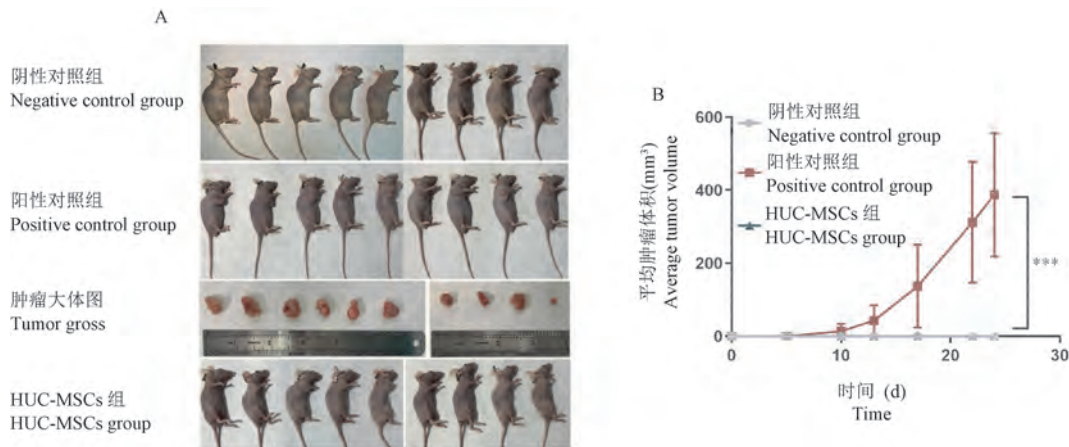


注:A:肺组织 HE 染色;B:肺损伤 McGuigan 评分。与同期相应组别比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

图 1 脂多糖诱导的肺病理改变及 McGuigan 评分结果($n=5$)

Note. A, HE staining of lung tissue. B, McGuigan score for lung injury. Compared with corresponding groups in the same period, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$.

Figure 1 Lipopolysaccharide induced lung pathological changes and McGuigan score results

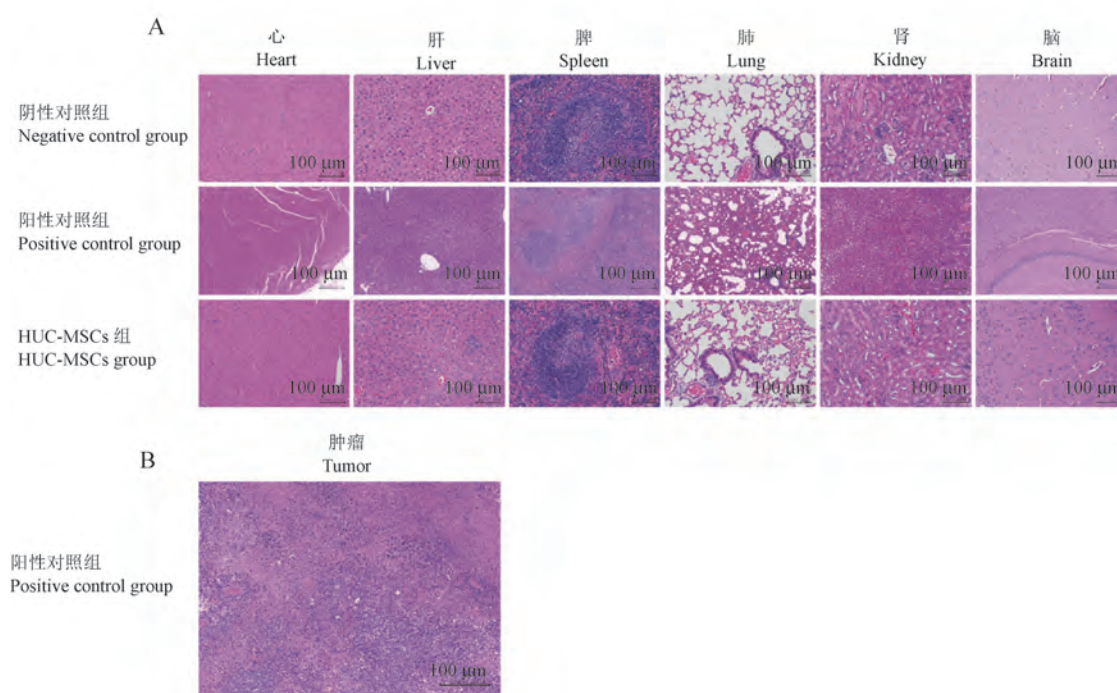


注:A:接种 28 d 后肿瘤的大体图;B:平均肿瘤体积。与同期相应组别比, *** $P<0.001$ 。

图 2 人脐带间充质干细胞体内致瘤性研究

Note. A, Macroscopic images of tumor 28 days post-inoculation. B, Average tumor volume. Compared with corresponding groups in the same period, *** $P<0.001$.

Figure 2 Tumorigenicity of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vivo*

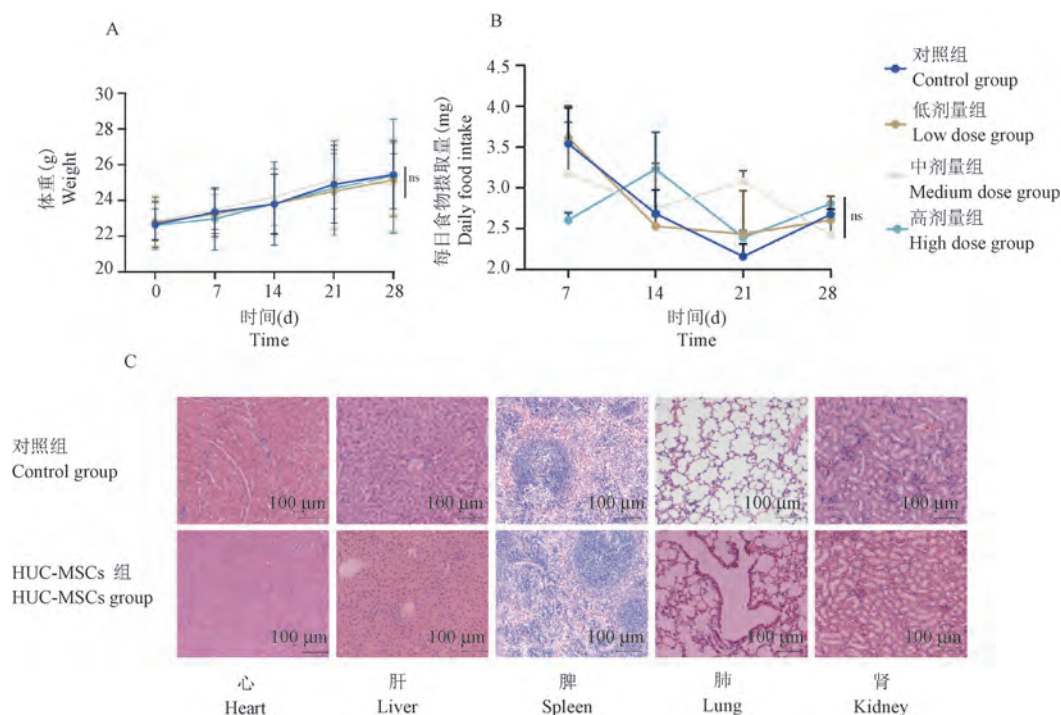


注:A:致瘤性实验小鼠各脏器 HE 染色;B:阳性对照组小鼠肿瘤 HE 染色。

图3 致瘤性实验小鼠组织 HE 染色

Note. A, HE staining of organs in tumorigenic experimental mice. B, HE staining of tumors in mice in the positive control group.

Figure 3 HE staining of tumorigenic experimental mouse tissues



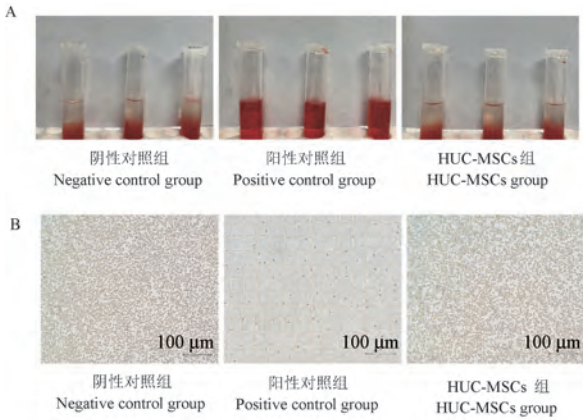
注:A:小鼠体重-时间曲线;B:小鼠摄食-时间曲线;C:小鼠各脏器 HE 染色。与同期相应组别比, $^{ns}P>0.05$ 。

图4 人脐带间充质干细胞尾静脉注射的急性毒性实验

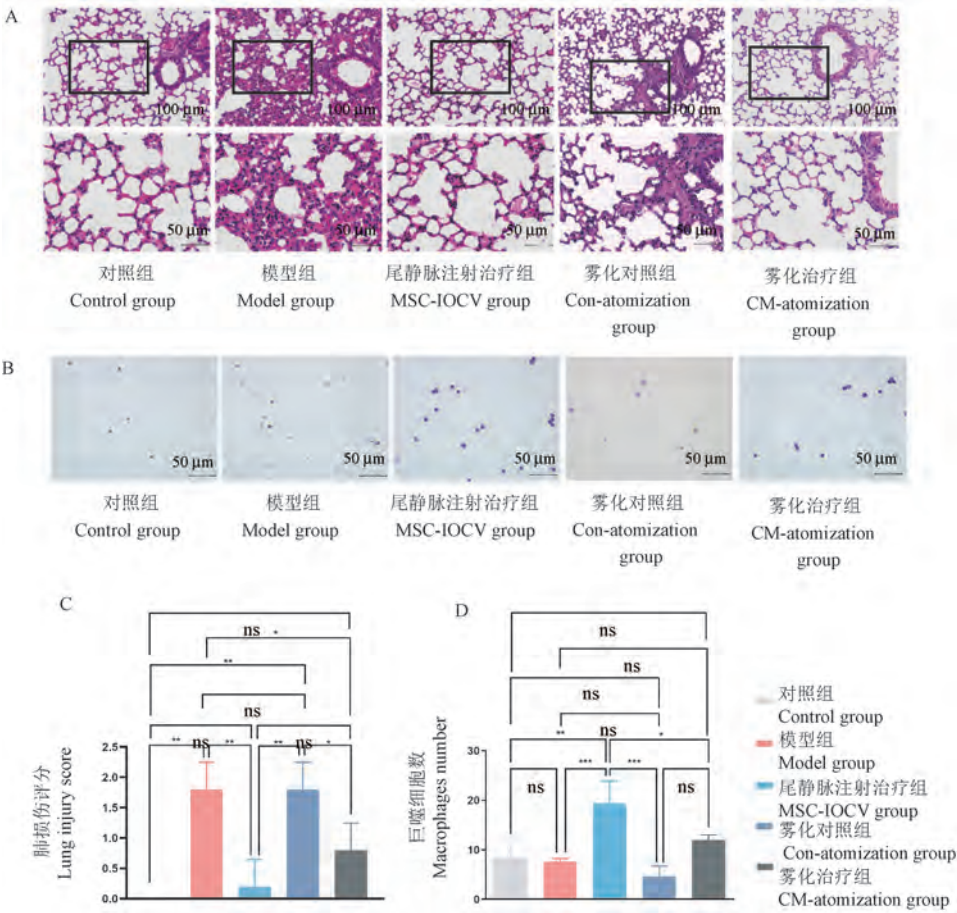
Note. A, Body weight of mice were measured once per week. B, Total amount of food intake were measured once per week.

C, HE staining of various organs in mice. Compared with corresponding groups in the same period, $^{ns}P>0.05$.

Figure 4 Acute toxicity of HUC-MSCs injected into tail vein of mice



注:A:体外溶血实验肉眼观察;B:体外溶血实验光镜观察结果。
图5 人脐带间充质干细胞体外溶血实验
Note. A, Visualizing of hemolysis experiment *in vitro*. B, Observation results of hemolysis test *in vitro* under light microscope.
Figure 5 Hemolysis experiment of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*



注:A:肺组织 HE 染色;B:BALF 瑞氏-姬姆萨染色;C:肺损伤 McGuigan 评分($n=5$);D:BALF 巨噬细胞数($n=3$)。与同期相应组别比, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ 。
图6 人脐带间充质干细胞治疗急性肺损伤的有效性评价
Note. A, HE staining of lung tissue. B, BALF Wright-Giemsa staining. C, McGuigan score for lung injury ($n=5$). D, Number of BALF macrophages ($n=3$). Compared with corresponding groups in the same period, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $^{ns}P>0.05$.
Figure 6 Efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of acute lung injury

3 讨论

急性肺损伤 (ALI) 是呼吸系统常见的危重症之一^[14], 其发展与炎症相关, 关键因素是抗炎因子/促炎因子水平失衡, 伴随着促炎因子的大量释放^[15], 进一步发展可引发急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress, ARDS) 甚至死亡^[16]。临床上可选择的治疗方法较为局限, 仍停留在支持治疗的层面。

本研究采用滴鼻^[17]或腹腔注射 LPS^[18]给药法构建急性肺损伤模型, 通过肺组织病理 McGuigan 评分对比两种造模方式的优劣。病理结果显示, 两种造模方法均出现一定程度的肺损伤, 滴鼻给药模型损伤部位主要集中在主支气管, 肺内分布不均, 组内差异较大, 重复性较差。且造成的肺损伤程度较轻, 偶见血管周围少量炎细胞浸润; 腹腔注射给药实验结果与 Nie 等^[19]一致, LPS 均匀分布于小鼠肺部, 肺泡壁明显增厚, 伴大量炎细胞浸润, 肺损伤程度更严重, 重复性好。

随后我们评估 HUC-MSCs 治疗 ALI 的安全性^[20]及有效性^[21]。安全性实验结果显示: HUC-MSCs 对兔红细胞无溶血反应; 裸鼠皮下注射 HUC-MSCs 无致瘤性; 临床安全剂量下^[22] ($4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/kg) 尾静脉注射 HUC-MSCs 28 d 后不会引起急性毒性反应, 无动物死亡; 且病理结果显示 HUC-MSCs 静脉注射后多脏器未见明显异常。这提示通过标准化的质检评估, 本批次获得的 HUC-MSCs 应用于动物治疗有较高的安全性。有效性结果显示: 尾静脉单次注射 5×10^7 cells/kg HUC-MSCs 后 ALI 小鼠的肺泡损伤减轻, McGuigan 评分降低, 肺组织炎细胞明显减少。这表明间充质干细胞是 ALI 的一种有效的治疗方法。研究表明, 间充质干细胞可通过外泌体诱导肺泡 II 型细胞再生^[23]、防止肺毛细血管内皮细胞凋亡、抑制免疫细胞的浸润^[24], 促进空气-肺泡屏障修复、抑制细菌生长, 从而降低 ARDS 的严重程度, 避免发展成 ARDS^[25]。

为了进一步评估 HUC-MSCs 旁分泌功能^[26]在 ALI 中的治疗作用, 本研究采用 HUC-MSCs 条件培养基雾化给药^[27]方式替代干细胞治疗。结果表明: 使用 HUC-MSCs 条件培养基单次雾化治疗 ALI 小鼠能缓解小鼠肺部炎症反应。但由于 HUC-MSCs 条件培养基中外泌体含量较少, 雾化治疗组 McGuigan 评分介于模型组与尾静脉注射治疗组之间。进一

步分析各组肺泡灌洗液炎症细胞群, 发现两个治疗组中巨噬细胞数明显增加, 这表明巨噬细胞在 MSCs 治疗急性肺损伤的进程中发挥关键作用。

综上, 腹腔注射 LPS 构建的急性肺损伤模型操作简单稳定, 重复性高, 造成的肺损伤效果较好。两种治疗方式均能缓解小鼠肺部炎症, 其中尾静脉注射组效果明显优于雾化治疗组, 可有效降低急性肺损伤小鼠 McGuigan 评分。

参考文献:

- [1] 薛磊. 急性肺损伤治疗策略的现状与未来 [J]. 上海医学, 2021, 44(8): 571-575.
- [2] 冯倩桐, 李爱民. 急性呼吸窘迫综合征表型的研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(9): 1439-1443.
- [3] 王东梅, 穆云婧, 周茜, 等. 吸入性肺损伤动物模型构建研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 126-130.
- [4] Zhan Z, Cai H, Cai H, et al. Effects of 45° prone position ventilation in the treatment of acute respiratory distress syndrome [J]. Medicine, 2021, 100(19): e25897.
- [5] 田艳艳, 程功梅, 李宁. miRNA-494 对脓毒症合并急性呼吸窘迫综合征大鼠急性肺损伤及 Nr2 信号途径的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(14): 1457-1460.
- [6] 王锦秀, 富学林. 急性呼吸窘迫综合征的发病机制及其与免疫调节机制关系的研究进展 [J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2021, 5(16): 137-140.
- [7] 姜芝峰, 张琳, 申捷. 间充质干细胞在急性肺损伤治疗中的研究进展 [J]. 中国临床医学, 2019, 26(6): 936-941.
- [8] Al-Khawaga S, Abdelalim EM. Potential application of mesenchymal stem cells and their exosomes in lung injury: an emerging therapeutic option for COVID-19 patients [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 437.
- [9] Shu L, Niu C, Li R, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 361.
- [10] Meng F, Xu R, Wang S, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase I clinical trial [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 172.
- [11] 雷琰, 刘长卿. 骨髓间充质干细胞培养上清液治疗支气管哮喘及对肺部炎症的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(36): 5764-5768.
- [12] 田义超, 周端鹏, 崔艳君, 等. 人脐带间充质干细胞的安全性毒理学评价 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(2): 159-163.
- [13] Li Y, Cao Y, Xiao J, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury [J]. Cell Death Differ, 2020, 27(9): 2635-2650.
- [14] 王清兵, 路超, 于刚. 基于 TLR4 通路依托咪酯对感染性休克大鼠急性肺损伤的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 1-8.

- [15] 李长力, 郑喜胜, 贾明雅. 黄芩苷通过调节 miR-223-3p/NLRP3 通路对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2047-2052.
- [16] 付静怡, 汪雷, 杨昇. 急性肺损伤动物模型建立的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(5): 690-694.
- [17] 丁秀秀, 黄琳惠, 黄奕江. microRNA-1247 通过靶向 CCR16 抑制脂多糖诱导的小鼠急性肺炎的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 98-103.
- [18] 王婷, 梁华平, 柴鉴深, 等. 三种大鼠急性肺损伤模型的比较 [J]. 成都医学院学报, 2016, 11(1): 5-9.
- [19] Nie Y, Wang Z, Chai G, et al. Dehydrocostus lactone suppresses LPS-induced acute lung injury and macrophage activation through NF- κ B signaling pathway mediated by p38 MAPK and Akt [J]. *Molecules*, 2019, 24(8): 1510.
- [20] 曾贵荣, 杨柳, 罗桂芳, 等. 间充质干细胞治疗的生物安全研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 140-145.
- [21] 杨玮杰, 李佳璽, 陈良键, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体的分离鉴定及其溶血性能研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(2): 165-170.
- [22] 曲海洪, 李晓昊, 张军. 不同剂量脐带间充质干细胞在针刀镜下定植治疗强直性脊柱炎患者病变髋关节的临床观察 [J]. 国际感染病学(电子版), 2019, 8(2): 67-69.
- [23] Shi MM, Yang QY, Monsel A, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10): e12134.
- [24] Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4(3): 281-286.
- [25] Khoury M, Cuenca J, Cruz FF, et al. Current status of cell-based therapies for respiratory virus infections: applicability to COVID-19 [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55(6): 2000858.
- [26] 孙理华, 王娟, 张岳, 等. 间充质干细胞来源的外泌体通过 microRNA-21-5p 调节心脏自噬并影响心肌缺血大鼠的心脏功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 88-96.
- [27] Shi MM, Yang QY, Monsel A, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10): e12134.

[收稿日期]2021-10-27

(上接第 66 页)

- [16] Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 718-727.
- [17] Stanirowski PJ, Szukiewicz D, Pyzlak M, et al. Impact of pre-gestational and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta [J]. *Endocrine*, 2017, 55(3): 799-808.
- [18] Miao C, Zhang G, Xie Z, et al. MicroRNAs in the pathogenesis of type 2 diabetes: new research progress and future direction [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(2): 103-112.
- [19] Kurtz CL, Peck BC, Fannin EE, et al. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes [J]. *Diabetes*, 2014, 63(9): 3141-3148.
- [20] Dooley J, Garcia-Perez JE, Sreenivasan J, et al. The microRNA-29 family dictates the balance between homeostatic and pathological glucose handling in diabetes and obesity [J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 53-61.
- [21] Yang WM, Jeong HJ, Park SY, et al. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(13): 2170-2176.
- [22] Zhu Y, Zheng G, Wang H, et al. Downregulated miR-29a/b/c during, contact inhibition stage promote 3T3-L1 adipogenesis by targeting DNMT3A [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170636.

[收稿日期]2021-06-02

胡玉英, 韦晓芸, 宋曦, 等. 蛋白酶抑制因子对大鼠帕金森病造模条件探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 85-90, 120.
Hu YY, Wei XY, Song X, et al. Exploration of the conditions for establishing proteasome inhibitor I-induced mouse model of Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 85-90, 120.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 012

蛋白酶抑制因子对大鼠帕金森病造模条件探讨

胡玉英^{1*}, 韦晓芸², 宋曦¹, 钟洁¹, 刘永辉¹, 罗荣卿²

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530022; 2. 广西中医药大学, 南宁 530007)

【摘要】 目的 观察不同剂量蛋白酶抑制因子 (proteasome inhibitors I, PSI) 对大鼠行为学及脑黑质酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH)、 α -突触核蛋白 (α -synuclein, α -syn) 表达的影响, 探讨 PSI 致帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 大鼠慢性模型的最佳条件。**方法** 将 30 只 SPF 级雄性大鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 皮下注射 PSI, 给药剂量分别为模型组 A 3 mg/kg、模型组 B 6 mg/kg, 对照组以相同方法注射二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶液, 剂量为 3 mg/kg。连续隔日 (每周一、三、五) 注射 2 周后, 观察 PD 大鼠的行为学变化, 同时常规 HE 染色, 在光学显微镜下观察中脑黑质区细胞变化情况, Western blot 及免疫组化染色法检测各组大鼠的脑内多巴胺能神经元黑质酪氨酸羟化酶 (TH)、中脑黑质区 α -syn 的表达变化。**结果** 与对照组相比, PSI 模型组两组大鼠运动能力明显下降, 模型组 A 爬杆实验行为学评分低模型组 B, 悬挂实验行为学评分高于模型组 B ($P < 0.05$); HE 染色结果显示: 模型组大鼠中脑黑质细胞变性; Western blot 法及免疫组化结果显示: 大鼠均出现黑质 TH 表达明显降低、 α -syn 的表达显著增加。**结论** PSI 大鼠模型可以复制 PD 的行为学和中枢、外周神经退行性改变特征, 是研究 PD 发病机制的有效模型。

【关键词】 帕金森病; 动物模型; 蛋白酶抑制剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0085-06

Exploration of the conditions for establishing proteasome inhibitor I-induced mouse model of Parkinson's disease

HU Yuying^{1*}, WEI Xiaoyun², SONG Xi¹, ZHONG Jie¹, LIU Yonghui¹, LUO Rongqing²

(1. the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530022, China.

2. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530007)

【Abstract】 Objective To observe the effects of different doses of protease inhibitor I (PSI) on behavior and the expression of tyrosine hydroxylase (TH) and α -synuclein in the substantia nigra of rats, and to explore the optimal conditions for establishing a chronic Parkinson's disease (PD) rat model induced by PSI. **Methods** Thirty SPF male rats were randomly and equally divided into three groups. Model groups were subcutaneously injected with PSI at a dose of 3 or 6 mg/kg, while the control group was injected with dimethyl sulfoxide solution at a dose of 3 mg/kg. After injection every other day (every Monday, Wednesday and Friday) for 2 weeks, the behavioral changes of PD rats were observed, and the changes of cells in the substantia nigra of the midbrain were observed by routine HE staining. The expression of TH and α -syn in the substantia nigra of dopaminergic neurons was determined by western blotting and immunohistochemical staining.

【基金项目】 国家自然科学基金 (81960842); 2020 年广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划 (桂教人才 (2020) 6 号); 广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目 (2018003)。

【作者简介】 胡玉英 (1970—), 女, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中西医结合防治帕金森病、老年痴呆、脑血管病等。

E-mail: 13878847908@163.com

Results Compared with that in the control group, the motor ability of the rats in the PSI model group was significantly decreased, the behavioral score in the pole climbing test was lower in the 3 mg/kg dose group than that in the 6 mg/kg dose group, and the behavioral score in the suspension test was higher in the 3 mg/kg dose group than that in the 6 mg/kg dose group. The result of HE staining showed that the substantia nigra cells of the model group were degenerated. The result of Western blot and immunohistochemistry showed that the expression of TH decreased significantly and that of α -syn increased significantly in the substantia nigra of rats. **Conclusions** The PSI rat model can replicate the behavioral and central and peripheral neurodegenerative changes of PD, making it an effective model to study the pathogenesis of PD.

【Keywords】 Parkinson's disease; animal model; protease inhibitor

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种缓慢进展的神经退行性疾病,病理变化集中表现为黑质致密部(compacta of the substantia nigra, SNc)多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性,其导致黑质纹状体通路缺失和纹状体内 DA 水平降低。动物模型的建立为研究 PD 的病因以及发病机制提供了新的思路,因此人们根据 PD 的病理特点制作了不同的动物模型。关于遗传性和散发性疾病泛素-蛋白酶体系统的最新研究结果表明^[1],蛋白酶抑制剂是诱导 PD 的候选毒素。其中蛋白酶抑制因子 PSI(proteasome inhibitors I, PSI)诱导的动物模型非常接近地概括 PD 的关键特征^[2],可能对研究疾病的发病机制和神经保护治疗有价值。本研究通过对模型大鼠行为学及 TH、 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)表达的测定,以期构建一个可用数据评估的慢性 PD 模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级 SD 大鼠,鼠龄 3~4 月,体重为 250~280 g,雌鼠,购自长沙市天勤生物技术有限公司[SCXK(湘)2014-0011]。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由实验动物中心提供)及自由饮水,恒定湿度,室温(23 ± 2)℃。动物实验经广西中医药大学伦理委员会审查,符合实验动物伦理学要求(DW20201011-099),并按规定执行,实验环境为广西中医药大学动物实验中心屏障环境动物实验室[SYXK(桂)2019-0001]。按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

PSI(Z-lle-Glu(OtBu)-Ala-Leu-al)(生产厂家:美国 ApexBio 公司;批号 A1900);浸蜡脱蜡透明液(批号:200801)、苏木精染液(批号:191202)、伊红染色液(批号:200901)(生产厂家:南昌雨露实验器材有限公司);anti- α -syn antibody(生产厂家:索莱宝;型号:K101295P)、anti-TH antibody(生产厂家:

wanleibio;型号:WL01820);HRP 标记山羊抗兔(生产厂家:Servicebio;型号:GB23303)、高效 RIPA 组织/细胞裂解液(生产厂家:Solarbio;型号:R0010)、蛋白酶抑制剂混合液($100\times$ PIC)(生产厂家:Solarbio;型号:P6730);PBS 缓冲液(生产厂家:Servicebio;型号:G0002)。R0010 型赛默飞世尔脱水机(英国赛默飞公司 Excelsior AS);莱卡组织切片机(型号:2235)、莱卡组织摊片机(型号:HI1210)、莱卡组织烤片机(生产厂家:上海莱卡);低温离心机(生产厂家:Eppendorf 公;型号:5418R);多功能酶标仪(美国 MD FilterMax F3);Mini Trans-Blot Cell 蛋白转印模块(湿转)(Bio-Rad);凝胶成像系统(生产厂家:上海天能;型号:Tanon 5200);显微镜(生产厂家:Nikon;型号:E100)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与模型制备

随机分为对照组 10 只,PSI 模型组 A 组和模型组 B 组各 10 只。参照 McNaught 等^[3]及刘雨清等^[4]皮下注射 PSI 制作 PD 慢性大鼠模型溶解方法:取 PSI 粉剂 5 mg,加入 100% DMSO 溶液 875 μ L 快速搅拌溶解,最后加入蒸馏水 375 μ L,配制成 PSI 溶液(浓度为 70%),以 75 μ L/100 g(3 mg/kg),150 μ L/100 g(6 mg/kg)进行颈背部皮下注射。PSI 模型组 A、模型组 B 大鼠分别给予皮下注入 PSI 3 mg/kg、6 mg/kg,对照组给予 70% DMSO 3 mg/kg 皮下注射,分别于每周一、三、五进行大鼠颈背部皮下注射,连续给药 2 周,共给药 6 次。

1.3.2 行为学实验

实验过程中注意观察大鼠的自主行为变化,包括有无活动迟缓、少食少动、震颤、尾巴僵直、嗅探及易激惹等异常行为。行为学检测前对大鼠进行训练 1 周,分别于注射前 1 d 及注射后第 14、21、28 天进行记录。

(1)爬杆实验 以大鼠爬竿实验考察大鼠行为变化,参照 Zhang 等^[5]的爬杆实验。用一直径为

1 cm,长 50 cm 的木杆,顶端固定有一直径 2.5 cm 的软木小球,木杆上缠上纱布防滑,倾斜 45° 放置,大鼠头向下放置在软木小球的顶部,使其沿杆自然爬下,观察大鼠在下行过程中的行为及时间,对其进行评分。同时观察爬行过程的行为。每只测 5 次,每次隔 3 min。评分标准:0 分,大鼠从杆上一次顺利下,爬杆时间<4.00 s;1 分,大鼠停顿数次后能爬下,爬杆时间为 4.01~8.00 s;2 分,大鼠缓慢爬行伴轻微震颤,爬杆时间为 8.01~12.00 s;3 分,大鼠掉落,频繁性震颤,四肢僵直或爬杆时间>12.00 s。

(2)悬挂实验 参照 Tao 等^[6]设计的爬杆实验进行改良,1 个直径为 1.5 mm 的不锈钢棒,水平放置于两支架间,两支架底座距离为 20 cm,高度为 30 cm,在横杆上方 1 cm 处添加玻璃盖,下方铺布料防摔伤。被测大鼠倒置悬挂于不锈钢棒中点后放开大鼠。评分标准:0 分,大鼠双后爪均可抓住不锈钢棒;1 分,仅有一只后爪可抓住不锈钢棒;2 分,大鼠跌落,双后爪均抓不住不锈钢棒。

1.3.3 组织样本及切片制备

行为学实验结束后,将实验大鼠麻醉后打开胸腔,并经心内快速推注生理盐水 50 mL,每组选取 5 只大鼠黑质部分,放置-80℃ 冰箱保存备用,用于后续 Western blot 检测。剩余各组 5 只大鼠在灌注完生理盐水后,再缓慢推注 100 mL 4%多聚甲醛,打开颅骨取材,用 4%多聚甲醛进行固定保护 24 h,用于进行 HE 染色检测及免疫组化检测。

1.3.4 组织病理学观察

脑组织经脱水,经石蜡包埋后进行切片,厚度为 3 μm,捞片,65℃ 烤片过夜,进行常规 HE 染色,光镜观察。

1.3.5 Western blot 检测大鼠黑质区 TH、DA 能神经元、α-syn 的表达

黑质组织称取 20~40 mg,做好标记,加入裂解液 200~400 μL,用移液器吹打裂解,转至 EP 管,可用匀浆机匀浆至无明显的粘稠状匀浆,-20℃ 保存,电泳分离,恒流转膜 90 min,室温下于封闭液中孵育 3 h。将膜置于一抗稀释液中,4℃ 孵育 12 h,用 TBST 洗膜(3×15 min);加入相应 1:4000 比例稀释的二抗中,37℃ 孵育 1 h,PBS 洗涤(3×5 min),ECL 显色,应用凝胶成像系统进行分析。

1.3.6 免疫组化检测大鼠黑质区 TH、DA 能神经元、α-syn 的阳性表达

石蜡切片,经乙醇梯度脱水,用 EDTA (PH =

9.0)抗原修复,冷却后 PBS 洗涤(3×5 min);放入 3%双氧水溶液,室温避光孵育 25 min,PBS 洗涤(3×5 min);在组化圈内滴加 3% BSA 均匀覆盖组织,室温封闭 30 min;滴加一抗工作液,4℃ 过夜。添入二抗工作液,室温孵育 50 min;PBS 洗涤(3×5 min)。DAB 溶液显色,阳性显色为棕黄色,自来水终止反应。在显微镜下观察结果,拍片。图像分析软件采用 Image J 1.8.0,每张切片拍摄不同视野 3 个,最后计算 TH 阳性细胞数目。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件,所有数据均采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采集 3 次测量数据并取平均值进行统计,用 *t* 检验对组间差异比较分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。使用 Image J 1.8.0 软件对 TH 阳性细胞进行数目统计,总数进行分析。

2 结果

2.1 皮下注射 PSI 导致大鼠出现 PD 样症状

注射 PSI 后第 14、21、28 天,通过观察大鼠有无活动迟缓、震颤、抓握、嗅探等异常行为,评估大鼠行为学改变情况。结果显示:第 14 天,PD 模型组两组大鼠于第 2 周皮下注射后均出现间断性细小的震颤、竖毛、嗅探、弓背;第 21 天,PD 模型组两组大鼠均出现程度各异的震颤,症状持续 10~20 min 后逐渐轻但仍有反复发作,且有毛发变黄,活动减少,动作变慢等变化;第 28 天,PD 模型组两组大鼠出现步态蹒跚、活动减少、动作迟缓等症状,模型组 B 大鼠部分出现肢体麻痹,颤抖并且无法站立,与模型组 A 组相比较,上述行为学症状明显加重;上述行为学于对照组未出现变化。

2.2 爬杆实验

首次注射 PSI 前 24 h(即实验前 24 h)监测大鼠爬杆行为并作出评分,而后将模型 A、B 组评分与对照组作对比,无明显统计学差异($P > 0.05$)。注射 PSI 第 14、21、28 天观察模型组两组大鼠爬杆行为,其评分明显升高,与对照组相比,差异显著($P < 0.05$)。实验第 21、28 天模型组 B 评分较模型组 A 显著升高,两组差异显著($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 悬挂实验

对照组大鼠悬挂实验评分相对稳定,PSI 模型组随着时间的延长,评分逐渐降低,第 14~21 天缓慢降低,第 28 天急剧降低($P < 0.05$),且模型组 B 评分较模型组 A 显著降低($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 HE 染色

显微镜下观察 HE 染色切片,结果显示对照组大鼠 SNc 神经元数量丰富,胞体较大,多为圆形、椭圆形,胞浆染色较淡,核仁清楚。与对照组相比,模型组 A 细胞形态有改变,部分神经元胞体深染,胶质细胞增生(胶质细胞的细胞形态为核小、深染,呈扁圆形或三角形),说明大鼠神经元损伤;模型组 B 模型组细胞变形,镜下观察核仁不明显,同时伴有深染物增多,与模型组 A 比较程度加重。见图 1。

2.5 Western blot 法检测大鼠黑质区 TH 和 α -突触核蛋白表达

与对照组比较,模型组两组大鼠黑质区 TH 表达减少及 α -syn 表达增加($P<0.05$),其中模型组 B

的 TH 表达显著低于模型组 A($P<0.05$),模型组 B 的 α -syn 表达增加高于模型组 A($P<0.05$)。见图 2。

2.6 免疫组化染色检测大鼠黑质区 TH 和 α -突触核蛋白阳性表达

免疫组化染色方法观察各组 TH 阳性细胞数目的变化,研究结果表明:对照组 TH 阳性细胞数目为(39.33 ± 17.92)个、模型组 A TH 阳性细胞数目为(22.00 ± 2.65)个、模型组 B TH 阳性细胞数目为(16.17 ± 3.82)个、与对照组相比,模型组两组大鼠黑质区 TH 表达显著降低($P<0.05$),模型组 B 低于模型组 A($P<0.05$),说明两组模型组大鼠 TH 阳性神经元显著丢失。见图 3。

表 1 各组爬杆实验评分比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Pole test scores of each group were compared

组别 Groups	注射前 Before the injection	注射后第 2 周 2 weeks after injection	注射后第 3 周 3 weeks after injection	注射后第 4 周 4 weeks after injection
对照组 Control group	6.25 $\pm$ 3.55	6.33 $\pm$ 2.77	6.31 $\pm$ 2.73	6.69 $\pm$ 2.17
模型组 A Model group A	5.79 $\pm$ 1.87	10.37 $\pm$ 5.78 *	15.76 $\pm$ 7.13 *	21.70 $\pm$ 7.61 **
模型组 B Model group B	6.06 $\pm$ 0.95	12.17 $\pm$ 5.22 *	21.80 $\pm$ 8.05 *	44.40 $\pm$ 8.05 **

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组 A 相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group A, # $P<0.05$.

表 2 各组悬挂实验评分比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Traction test scores of each group were compared

组别 Groups	注射前 Before the injection	注射后第 2 周 2 weeks after injection	注射后第 3 周 3 weeks after injection	注射后第 4 周 4 weeks after injection
对照组 Control group	2.53 $\pm$ 0.39	2.53 $\pm$ 0.42	2.37 $\pm$ 0.43	2.33 $\pm$ 0.45
模型组 Model group A	2.60 $\pm$ 0.47	2.10 $\pm$ 0.65 *	1.93 $\pm$ 0.63 *	1.33 $\pm$ 0.38 **
模型组 Model group B	2.57 $\pm$ 0.45	2.07 $\pm$ 0.60 *	1.37 $\pm$ 0.55 *	0.53 $\pm$ 0.53 **

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组 A 相比, # $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with Model group A, # $P<0.05$.

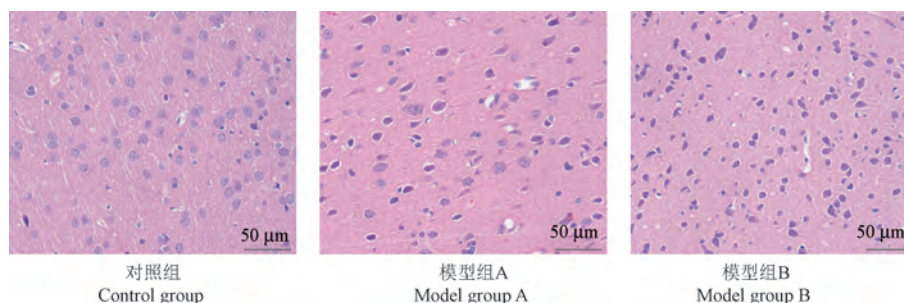
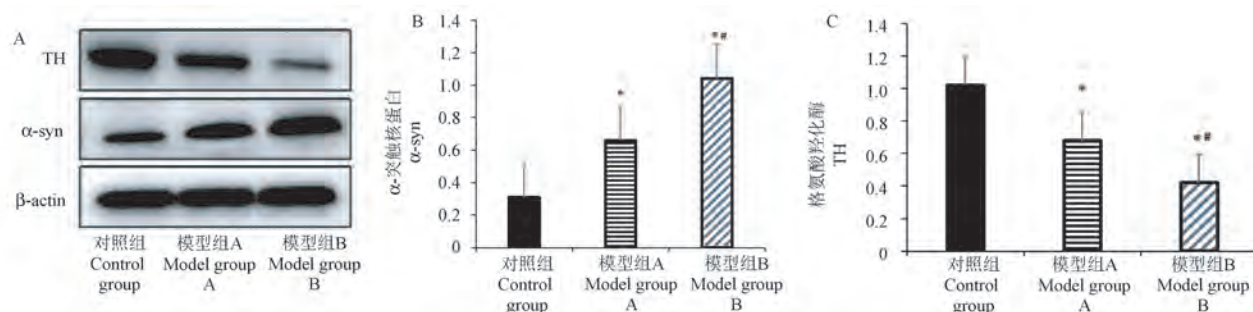


图 1 各组大鼠黑质区 HE 染色

Figure 1 HE staining in rat melanoregion of each groups



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组 A 相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 大鼠黑质区 TH 和 α -突触核蛋白比较

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

Figure 2 Comparison of TH and α -syn in substantia nigra of mice

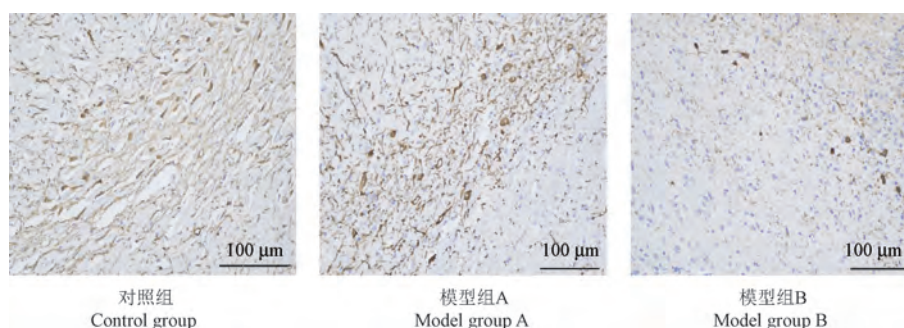


图 3 脑黑质中 TH 阳性表达

Figure 3 TH positive expression in the substantia nigra

3 讨论

PD 动物模型制备方法多种多样,尚未有统一一定论,各种动物模型都有各自的优点与不足^[7]。6-OHDA 模型不能模拟人类 PD 的所有病理和临床特征,它在保存非 DA 能神经元的情况下诱导 DA 能神经元死亡,但不会形成胞浆内含物(路易小体)^[8]。6-OHDA 不影响与 PD 有关的其他脑区,如前嗅觉结构、低位脑干区或蓝斑^[9-10]。MPTP 模型多为急性或亚急性模型,病理局限于黑质纹状体系统,该模型也显示 TH 神经元丢失,但未见典型的路易小体^[11-12]。鱼藤酮诱导大鼠黑质神经细胞变性并形成包涵体,但这种化合物也引起更广泛的变性,涉及纹状体和小脑神经元,这种模式在 PD 中并不典型^[13]。给小鼠使用除草剂百草枯以及联合使用百草枯和杀菌剂会导致黑质中多巴胺能神经元的丢失,但百草枯不会即刻越过血脑屏障^[14]。百草枯、鱼藤酮的模型会导致很高的死亡率,因为它们具有很高的全身毒性^[15-16]。

研究表明 PD 患者死后黑质组织中泛素-蛋白酶体途径存在结构和功能缺陷^[17]。这些基本发现

激发了基于蛋白酶体抑制剂的新一代动物模型的发展,该模型利用蛋白酶体抑制剂来扰乱蛋白质稳态,产生进行性黑质 DA 能细胞丢失、路易小体形成和行为障碍^[18-19],由于该模型能够触发内源性蛋白(如突触核蛋白)的聚集,导致神经毒性,从而复制了 PD 的中心致病途径之一,因此引起了研究界的关注。

蛋白酶体抑制剂诱导的 PD 模型比以前描述的毒素引起的疾病模型有几个优点,McNaught 等^[20]通过研究表明,该模型在治疗停止后数周缓慢进展,一旦启动,神经退化过程可能是自我维持的。其次,蛋白酶体抑制剂诱导的神经变性不限于黑质纹状体系统,还包括其他结构,如蓝斑、迷走神经背侧运动核和梅纳德氏基底核,这些结构也与 PD 有关。蛋白酶体抑制大鼠的 SNc 神经元,且大鼠的蓝斑和迷走神经背侧运动核中形成了路易体样包涵体。因此,蛋白酶体抑制剂诱导的 PD 大鼠模型比其他模型更能概括人类 PD 的疾病特征,我们也可以推测环境中类似的毒素可能会导致或促进易感人群的疾病发展。

本研究通过皮下注射 PSI 的方式,作用于 SD 大

鼠诱导 PD 动物模型。已有研究证实,PD 运动症状的产生与相关基底神经节活动失调及黑质 DA 能神经元丢失关系密切^[21]。相关病理结果证明聚集性 α -syn 是 PD 的重要标志,异常高表达的 α -syn 能够引起 PD^[22]。TH 是合成 DA 的限速酶,在大脑黑质中含量较高,TH 表达的减少使得 DA 合成受限是导致 PD 的主要原因;因此,TH 是 PD 发病机制的关键点。例如, α -syn 不仅通过抑制 TH 的 Ser40 磷酸化来抑制 TH,而且还通过刺激蛋白磷酸酶 2A 活性来抑制 TH,从而减少 DA 合成并导致 PD。因此,对黑质内 α -syn 以及 TH 表达水平进行检测,可推出 DA 能神经元的数量及位置,据此可明确 PSI 所诱导 PD 模型的严重程度^[23]。

从本次实验看,随着注射完成后时间的延长,模型组两组大鼠爬竿时间逐渐延长,悬挂时间逐渐缩短,2 周后逐渐出现行动迟缓、下颌不自主震颤、竖毛、尾僵直等症状。造模 3 周后的大鼠协调运动能力降低更为明显,活动减少,动作变慢;造模 4 周后模型组 B 大鼠多出现的步履蹒跚、甚至握杆不能。上述表现均表明:PSI 皮下注射可造成大鼠的 PD 样症状,模型组大鼠肢体协调能力、肌力、动作灵敏度等运动功能较对照组均明显下降,与模型组 A 比较,模型组 B 下降显著,表明增大 PSI 剂量后,爬杆实验评分也随之增高,悬挂实验评分缩短。从 HE 染色和 Western blot 检测结果分析,给药 4 周后,模型组 A 较对照组病理学显示 TH 表达明显降低、 α -syn 的表达显著增加,成功建立了符合行为学及病理学特征的 PD 大鼠模型,而注射 6 mg/kg 的模型组 B 大鼠状态低下,与对照组相比,病理结果显示 TH 阳性细胞显著减少, α -syn 高表达($P<0.05$),因此可以选择隔天皮下注射 3 mg/kg,作为 PD 慢性模型的一般标准。这一研究结果与 McNaught 等^[3]、刘雨清等^[4]采用 PSI(3 mg/kg)皮下注射,连续 2 周造模的研究结果相似。McNaught 等^[3]以 1.5、3.0、6.0 或 12.0 mg/kg 的剂量给大鼠注射溶于 70%乙醇的 PSI,并在 PD 分级量表上仅观察到 1.5 和 3.0 mg/kg 剂量的 PSI 显著的行为效应(恶化)。而关于皮下注射 PSI 的剂量可引起进行性运动障碍和黑质 DA 能细胞丢失,这是有争议的,因为其他人没有复制这些发现,Bové 等^[24]在啮齿类动物全身应用 PSI 3.0、6.0 mg/kg 均不能诱导产生任何行为或病理学改变。Bukhatwa 等^[25]从未能够达到 McNaught 报道的效应程度,实验采取 PSI 剂量为 8、

12 和 16 mg/kg 皮下注射诱导 PD 模型,与对照组相比,大鼠黑质中 TH 阳性细胞的数量减少,但随着 PSI 剂量的增加,TH 阳性细胞的损失变得不那么明显,只有在 8 mg/kg 时才有统计学意义,同时发现神经元的丢失随着 PSI 剂量的增加而减少。

PSI 具有诱导大鼠产生 PD 典型特征的作用,多项研究在重复 McNaught 等^[3]实验方法时也得到相同结果,但仍有部分实验室在严格按照 McNaught 等^[3]实验方法进行实验时得到相反结果^[24-25],为验证此方法的可靠性,本次实验重复了 McNaught 等^[3,20]研究,结果发现,PSI 诱导的 PD 模型大鼠在 3 mg/kg 剂量组上造模是成功的,在此基础上,本研究增加了行为学实验爬杆实验以及悬挂实验,进行整合行为学评分与形态学表现关联分析,以形态学结果为判定标准,在证实 PSI 具有诱导大鼠产生 PD 典型特征作用的同时进一步分析了 PSI 诱导 PD 动物模型导致的 PD 症状的严重程度。鉴于样本量限制,本次我们仅采用 3、6 mg/kg 作为模型组,未来本课题组将扩大进行 PSI 剂量对比实验研究,同时目前也缺乏关于 PSI 的药代动力学曲线和剂量与效果之间关系的数据,后续有必要对 PSI 进行全面的药代动力学分析,这将有助于确定为什么很难在实验室之间观察到 PSI 的一致影响的一些原因。

综上所述,本研究发现在皮下注射 PSI 诱导的大鼠 PD 模型中,很好地概括了 PD 的关键特征,同时黑质中细胞形态存在改变、TH 表达降低, α -syn 过表达,且本次增加采用悬挂及爬杆实验作为大鼠行为学表现的统计和评价,将行为学和形态学数据相互印证,这对 PD 的发病机制、病理学与神经递质变化的研究以及治疗方法和效果的改善可能产生积极的影响。

参考文献:

- [1] Bentea E, Verbruggen L, Massie A. The proteasome inhibition model of Parkinson's disease [J]. J Parkinsons Dis, 2017, 7 (1): 31-63.
- [2] McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, et al. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats [J]. NeuroReport, 2002, 13(11): 1437-1441.
- [3] McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, et al. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease [J]. Ann Neurol, 2004, 56(1): 149-162.
- [4] 刘雨清,张伟栋,李媛媛.一种新的帕金森病动物模型[J].中国实验动物学报,2007,15(2):159-160.

(下转第 120 页)

王宏欣, 付苏, 淳雪莉, 等. miR-4539 通过靶向作用于叉头盒转录因子 1 抑制胶质瘤细胞生长的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 91-97.

Wang HX, Fu S, Chun XL, et al. miR-4539 inhibits the growth of glioma cells by targeting Foxp1 [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 91-97.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 013

miR-4539 通过靶向作用于叉头盒转录因子 1 抑制 胶质瘤细胞生长的实验研究

王宏欣¹, 付 苏², 淳雪莉², 张 帆^{2*}

(1. 成都上锦南府医院, 四川大学华西医院上锦医院神经外科, 成都 510117; 2. 四川大学华西医院, 成都 510117)

【摘要】 目的 探讨 miR-4539 抑制胶质瘤细胞生长的效应及相关机制。**方法** 采用 RT-PCR 法检测脑胶质瘤标本和 7 株胶质瘤细胞株中 miR-4539 的表达水平。采用 CCK-8 法、流式细胞法、Western blot 法检测 miR-4539 在胶质瘤细胞中的作用。采用双荧光素酶实验验证叉头盒转录因子 1(Foxp1) 是否是 miR-4539 的直接靶点。构建小鼠移植瘤模型, 探讨 miR-4539 转染对小鼠肿瘤生长的抑制作用。**结果** (1) miR-4539 在胶质瘤组织中的表达水平显著低于正常脑组织 ($P < 0.05$)。miR-4539 在 7 个常用的人脑胶质瘤细胞系 (U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229、SF295) 中的表达量显著低于人正常脑胶质细胞株 HEB ($P < 0.05$)。(2) 与 miR-NC 组相比, miR-4539 转染 72 h 后, T98G 细胞和 LN18 细胞中 miR-4539 的表达水平都显著增加 ($P < 0.05$)。CCK-8 检测显示, 外源性 miR-4539 过表达可显著抑制 T98G 和 LN18 细胞的增殖。同时可诱导 T98G 和 LN18 细胞周期阻滞, G0/G1 期细胞百分率增加, S 期细胞百分率降低, 且细胞周期调控蛋白 cyclinD1、cyclinE1 和 Ser780 的表达水平也显著降低 ($P < 0.05$)。(3) 荧光素酶报告显示, Foxp1 是 miR-4539 的直接靶点, 可被 miR-4539 直接调控。接种 T98G 细胞后 6 周, miR-4539 转染组小鼠移植瘤平均体积、平均重量均显著小于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。(4) T98G 和 LN18 细胞过表达 miR-4539 后, Foxp1 mRNA 和蛋白表达都显著降低, 免疫荧光结果也确认, miR-4539 降低了 Foxp1 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中的表达。**结论** miR-4539 可通过靶向作用于 Foxp1 发挥抑癌因子效应, 有望成为脑胶质瘤患者诊断和治疗的新靶点。

【关键词】 脑胶质瘤; miRNA; 叉头盒转录因子 1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0091-07

miR-4539 inhibits the growth of glioma cells by targeting Foxp1

WANG Hongxin¹, FU Su², CHUN Xueli², ZHANG Fan^{2*}

(1. Chengdu Shang Jin Nan Fu Hospital, West China Hospital, S.C.U. Neurosurgery, Chengdu 510117, China.

2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 510117)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of miR-4539 on the growth of glioma cells. **Methods** The expression levels of miR-4539 in glioma samples and 7 glioma cell lines were detected by RT-PCR. CCK-8 method, flow cytometry and Western blot were used to detect the role of miR-4539 in glioma cells. Dual luciferase assay was used to verify whether Foxp1 is a direct target of miR-4539. To investigate the inhibitory effect of miR-4539 transfection on tumor growth in mice, a mouse transplanted tumor model was constructed. **Results** (1) The expression level of miR-4539 in

【作者简介】 王宏欣 (1988—), 女, 本科, 研究方向: 神经外科方面。E-mail: whx20212020@163.com

【通信作者】 张帆 (1984—), 男, 博士, 研究方向: 神经凋亡, 神经线粒体功能障碍。E-mail: neurozhangfan@163.com

glioma tissues was significantly lower than that in normal brain tissues ($P < 0.05$). The expression level of miR-4539 in 7 commonly used human glioma cell lines (U87, U251, U373, T98G, LN18, LN229, SF295) was significantly lower than that in human normal glioma cell line HEB ($P < 0.05$). (2) Compared with the miR-NC group, the expression levels of miR-4539 in T98G cells and LN18 cells were significantly increased 72 h after transfection of miR-4539 ($P < 0.05$). CCK-8 showed that the overexpression of exogenous miR-4539 significantly inhibited the proliferation of T98G and LN18 cells. Meanwhile, T98G and LN18 cell cycle arrest was induced, and the percentage of G0/G1 phase cells was increased, while the percentage of S phase cells was decreased, and the expression levels of cell cycle regulatory proteins cyclinD1, cyclinE1 and Ser780 were also significantly decreased ($P < 0.05$). (3) Luciferase reports showed that Foxp1 is a direct target of miR-4539 and can be directly regulated by miR-4539. At 6 weeks after T98G cells were inoculated, the average volume and weight of transplanted tumor in the miR-4539-transfected mice were significantly smaller than those in the miR-NC group ($P < 0.05$). (4) After overexpression of miR-4539 in T98G and LN18 cells, the expression of Foxp1 mRNA and protein were significantly decreased. Immunofluorescence result also confirmed that miR-4539 reduced the expression of Foxp1 in T98G and LN18 cells. **Conclusions** MiR-4539 acts as a tumor suppressor by targeting Foxp1, which is expected to be a new target for the diagnosis and treatment of gliomas.

【Keywords】 glioma; miRNA; forked head box transcription factor 1

胶质瘤是成年人最常见的原发性恶性脑肿瘤,近年来形成了以手术切除为主,配合以放化疗的综合治疗体系,但胶质瘤患者的生存率并没有显著提高^[1]。尤其对恶性度较高的 IV 级胶质瘤,也被称为多形性胶质母细胞瘤 (GBM),患者的中位生存期仅为一年^[2]。因此,迫切需要开发出新的更有效的生物标志物来及早诊断及治疗脑胶质瘤。miRNAs 是一种内源性的非编码小 RNA 分子,约有 18~25 个核苷酸,通过与靶信使 RNAs (miRNAs) 3'-非翻译区 (3'-UTR) 的互补序列结合,在转录后调节其靶基因的表达^[3-4]。越来越多的证据表明,miRNAs 在各种人类癌症中调控失调,并参与肿瘤发生过程,包括细胞增殖、凋亡、血管生成和侵袭^[5-6]。以前的研究结果已经在人脑胶质瘤中发现了几个致癌和抑瘤的 miRNAs,如 miR-10b^[7]、miR-30^[8]、miR-203^[9]等。这些特异的 miRNAs 可以潜在地作为有效的生物标志物来提高诊断和预后的准确性,或者作为针对恶性脑瘤的新的治疗策略的靶点。但关于 miR-4539 在脑胶质瘤中的研究很少,因此,本研究探讨了 miR-4539 抑制胶质瘤细胞生长的效应及相关机制,以期对脑胶质瘤的诊断、治疗提供更多潜在的靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雌性免疫缺陷裸鼠 (BALB/C-null), 4 周龄, 20 只, 体重 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2017-0033], 饲养于海

南医学院动物实验中心 [SYXK (琼) 2017-0033]。实验室内温度约为 25℃, 相对湿度为 50%~60%, 每日 12 h / 12 h 明暗交替, 实验前适应性饲养 1 周。实验研究过程按照 3R 原则, 动物实验开展前获得本院实验动物伦理委员会审批 (IACUC-2019-324)。

1.1.2 组织样本及细胞系

脑胶质瘤患者新鲜肿瘤组织取自我院神经外科, 新鲜胶质瘤标本离体后立即冷冻于液氮中, 保存于 -80℃ 进行核酸提取。所有的组织病理学诊断都是由两位经验丰富的神经病理学家根据世界卫生组织的标准独立确定的。瘤患者在术前均未接受过化疗或放疗, 8 个非肿瘤性脑组织是在交通事故中死亡的个人同意的情况下通过收集捐赠获得的, 并且被证实没有任何先前的病理损害。本研究由中国医科大学伦理委员会批准。正常脑胶质细胞株 HEB 及脑胶质瘤细胞 U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229 和 SF295 均购自美国典型培养物保藏中心, 在添加 10% 胎牛血清和青霉素/链霉素 (100 U/mL) 的 Eagle's 培养基中培养。细胞在 37℃ 含 5% CO₂ 的孵育箱中孵育。

1.2 主要试剂与仪器

慢病毒载体 (上海吉满生物科技有限公司); MirVana miRNA 试剂盒 (上海觅拓生物科技有限公司); 荧光素酶报告分析系统试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海晶抗生物工程有限公司); cyclinD1 蛋白、cyclinE1 蛋白、Ser780 蛋白、Foxp1 蛋白多克隆抗体 (艾美捷生物公司); TaKaRa RNA PCR 试剂盒 (南京诺唯赞

生物科技股份有限公司)。实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(杭州博日科技有限公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);Western blot 垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 检测

RT-PCR 定量分析根据 MirVana miRNA 试剂盒说明书的操作步骤进行。从冷冻的胶质瘤组织和胶质瘤细胞系中提取总 RNA,测定 RNA 浓度。合成 cDNA 后进行定量实时 PCR,以 RNU6B 作为内源性对照,用非肿瘤性脑组织进行校正。为评价 miR-4539 转染胶质瘤细胞后 Foxp1 mRNA 表达的变化,采用 TaKaRa RNA PCR 试剂盒和 SYBR PreMix Ex TaqII 试剂盒进行 cDNA 合成和实时定量 PCR, GAPDH 作为内源性对照。所有反应均重复 3 次。用 2^{-ΔΔCt}法计算相关基因 mRNA 表达的相对定量。引物序列见表 1。

1.3.2 慢病毒载体、质粒构建及转导

从 miRBase 数据库获得 miR-4539 成熟序列。用限制性内切酶 EcoRI 线性化 GV217 载体(Ubi-EGFP-MCS)。将含有成熟 miR-4539 序列的片段导入 GV217 载体的多克隆位点。使用 HEK-293T 包装细胞,采用脂质体 2000 制造病毒。慢病毒载体在-80℃保存直至使用。为了实现靶向高表达,将人 Foxp1cDNA 克隆到 pcDNA3.1 载体中。将胶质瘤细胞株 T98G 细胞和 LN18 细胞接种于 6 孔板中。当细胞融合达到 30%时,分别用 1 μL 的 miR-4539 慢病毒载体(滴度:3×10⁸ TU/mL)或 1 μL 的慢病毒载体(滴度:3×10⁸ TU/mL)感染细胞。感染后 14 h 更换细胞培养液。分别于感染后 24、48、72 h 用倒置荧光显微镜观察胶质瘤细胞株中绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况,评价其感染效率,转导后 72 h 荧光蛋白表达水平相对较高。质粒转染按脂质体 3000 转染试剂厂家说明书进行。

1.3.3 小鼠模型构建及检测指标

小鼠被安置和维持在层流橱柜中,自由饮食

水。将稳定转染的 T98G 细胞(miR-4539 和 miR-NC)按每 0.2 毫升 5×10⁶ 个的密度注射到裸鼠腋下。每周用游标卡尺测量肿瘤大小 1 次,用公式 V=(D×d²)/2 计算肿瘤体积,其中 D 为最长直径(mm),d 为最短直径(mm)。6 周后处死小鼠,称量肿瘤重量并拍照。

1.3.4 双荧光素酶报告实验

HEK-293T 细胞以每孔 1×10⁴ 细胞密度接种于 96 孔板。将 3'-UTR 质粒共转染 HEK-293T 细胞。转染 48 h 后收集细胞裂解产物,用双荧光素酶报告分析系统测定荧光素酶活性。将相对的 Renilla 荧光素酶活性进行归一化,作为转染效率的内对照。

1.3.5 CCK-8 检测及流式细胞检测

CCK-8 检测:培养 24 h 后收集转染细胞,悬浮于 DMEM 中,以 3×10³ 个/孔的密度接种于 96 孔板中。于接种后不同时间点(0、24、48、72 h)检测细胞增殖情况。在这些特定的时间,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液进行检测。在 37℃孵育 2 h 后,在 450 nm 处测定光密度(OD)值。流式细胞检测:应用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。转染后 48 h 胰蛋白酶消化细胞,冰 PBS 洗涤。将这些细胞重新悬浮在 100 μL 的结合缓冲液中,并用 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 5 μL 的碘化丙啶处理。在室温黑暗中孵育 20 min 后,用流式细胞仪对细胞进行分析。

1.3.6 Western blot 检测

收集各组细胞后提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。混合上样缓冲液,煮沸变性,电泳、转膜、封闭、一抗/二抗孵育、ECL 法显影定影。通过 Quantity One 软件分析条带强度,以 GAPDH 为内参,检测 cyclinD1 蛋白、cyclinE1 蛋白、Ser780 蛋白、Foxp1 蛋白的表达。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析处理数据,计量资料均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多样本计量资料比较采用方差分析,两两样本比较采用 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 目的基因的引物序列
Table 1 Primer sequence of target gene

基因	正义链序列	反义链序列
Gene	Justice chain sequences	Antisense chain sequences
<i>Foxp1</i>	5'-GCTGCGAAGTGGAACCATC-3'	5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3'	5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'

2 结果

2.1 miR-4539 在胶质瘤组织中的表达

RT-PCR 检测结果显示,与正常脑组织比较胶质瘤组织中 miR-4539 的表达水平明显降低($P<0.05$)。miR-4539 在 7 个常用的人脑胶质瘤细胞系(U87、U251、U373、T98G、LN18、LN229 和 SF295)中的表达量明显低于人正常脑胶质细胞株 HEB($P<0.05$),图 1。

2.2 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞增殖活性的影响

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组中的 miR-4539

表达水平、OD₄₅₀ 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中均明显增加($P<0.05$),EDU 染色结果显示,miR-4539 转染的 T98G 细胞和 LN18 细胞的 EDU 掺入率明显低于相应的 miR-NC 组细胞,图 2。

2.3 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞周期的影响

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组 G0/G1 期细胞百分率增加,S 期细胞百分率及 cyclinD1、cyclinE1 和 Ser780 蛋白表达均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),图 3。

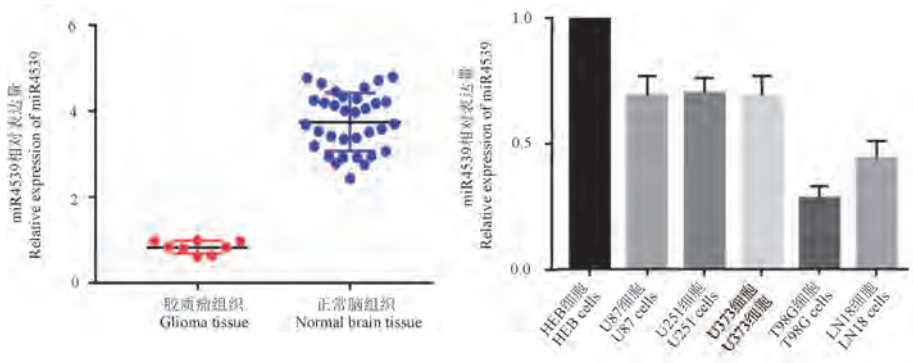
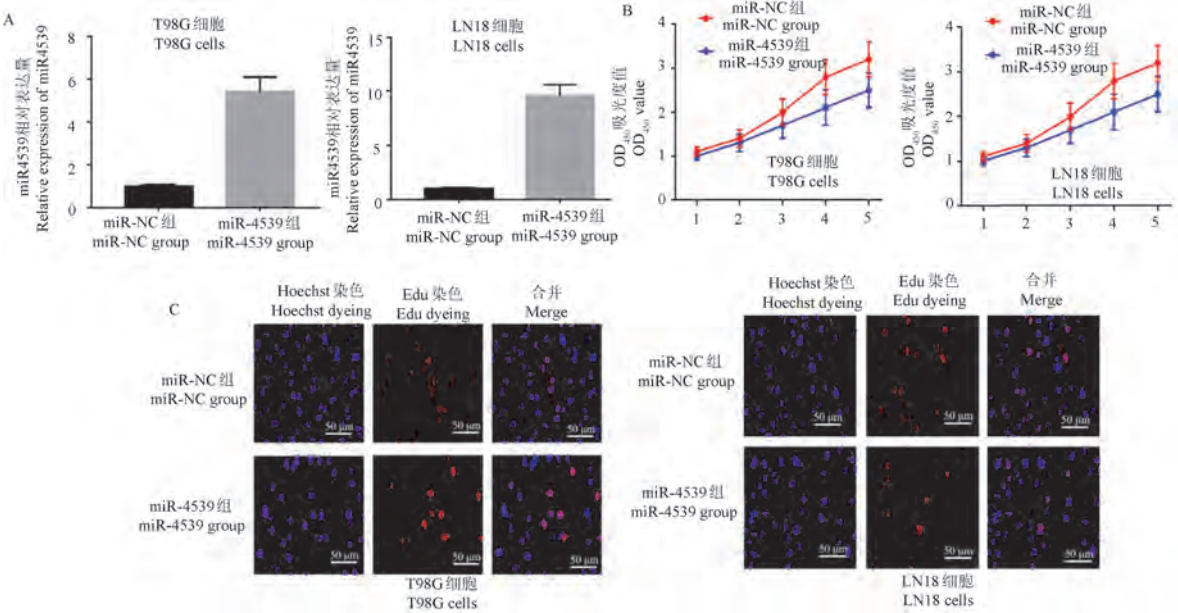


图 1 miR-4539 在胶质瘤组织及细胞系中的表达

Figure 1 Expression of miR-4539 in glioma tissues and cell lines

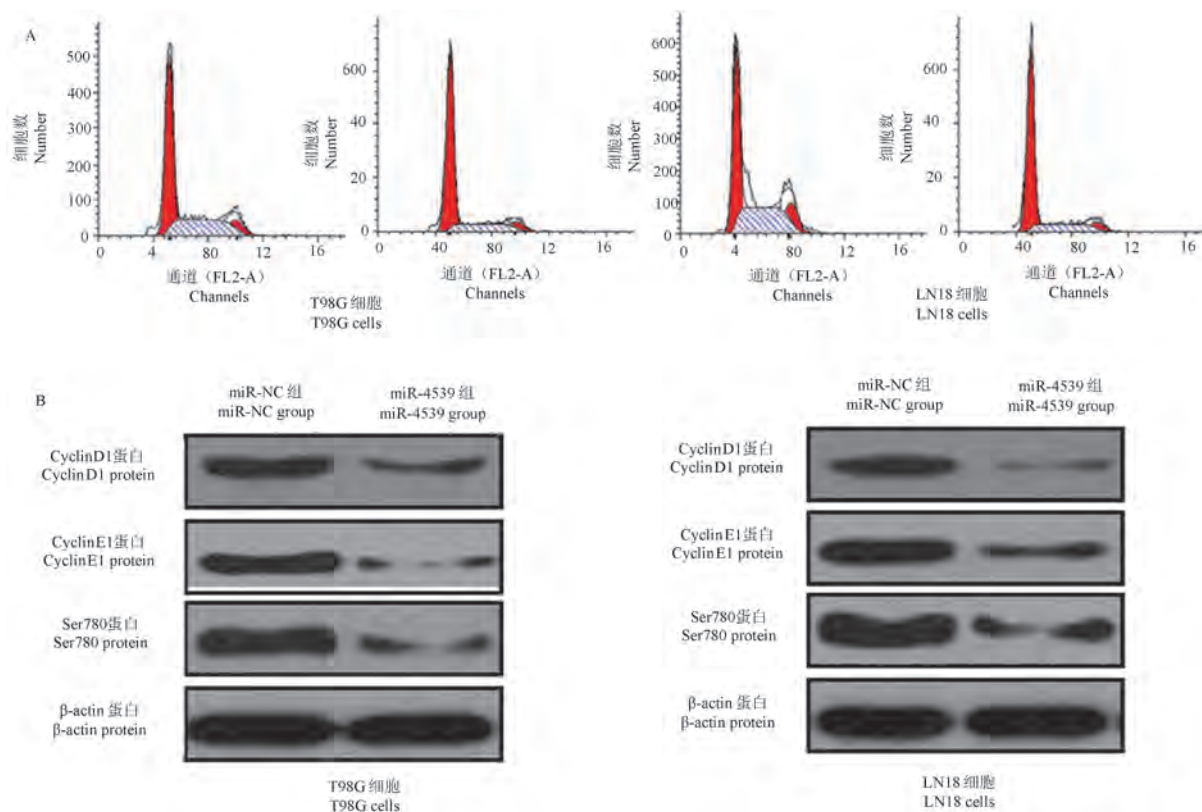


注:A:miR-4539 相对表达量;B:miR-4539 对 T98G 细胞和 LN18 细胞活性的影响;C:Edu 染色检测 miR-4539 对 T98G 细胞和 LN18 细胞增殖的影响。

图 2 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞增殖活性的影响

Note. A, Relative expression level of miR-4539. B, Effects of miR-4539 on T98G and LN18 cell activities. C, Edu staining was used to detect the effects of miR-4539 on proliferation of T98G cells and LN18 cells.

Figure 2 Effect of overexpression of miR-4539 on proliferation of glioma cells



注:A:流式细胞检测各组细胞 G0/G1 期和 S 期细胞百分率;B:Western blot 检测各组周期蛋白的表达。

图 3 miR-4539 过表达对胶质瘤细胞周期的影响

Note. A, Percentage of G0/G1 and S phase cells in each group was detected by flow cytometry. B, Western blot was used to detect cyclin expression in each group.

Figure 3 Effect of miR-4539 overexpression on glioma cell cycle

2.4 Foxp1 作为 miR-4539 的直接靶点的鉴定

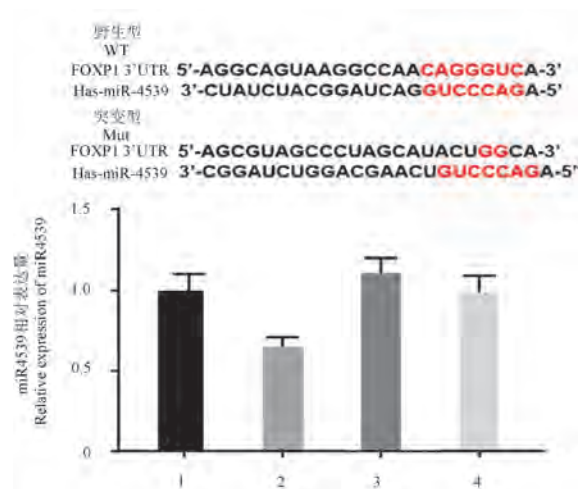
与 pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC 相比, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539 荧光素酶活性明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539 与 pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC 的荧光素酶活性无明显差异 ($P > 0.05$),图 4。

2.5 转染 miR-4539 对小鼠肿瘤生长抑制作用

miR-4539 组裸鼠腋下移植瘤平均体积及肿瘤的平均重量明显低于 miR-NC 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),图 5。

2.6 miR-4539 对胶质瘤细胞中 Foxp1 的调控作用

与 miR-NC 组相比,miR-4539 组 T98G 和 LN18 胶质瘤细胞中 Foxp1 mRNA、蛋白表达水平均明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);免疫荧光分析发现,miR-4539 降低了 Foxp1 在 T98G 细胞和 LN18 细胞中的表达,图 6。



注:1: pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC; 2: pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539; 3: pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539; 4: pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC。

图 4 Foxp1 作为 miR-4539 的直接靶点的鉴定

Note. 1, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/NC. 2, pGL3-FoxP1 3'-UTR-mut/miR-4539. 3, pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/miR-4539. 4, pGL3-FoxP1 3'-UTR-wt/NC.

Figure 4 Identification of Foxp1 as a direct target for miR-4539

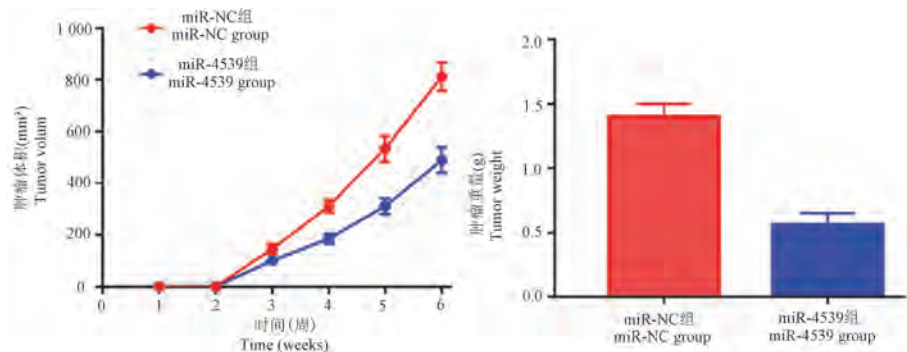
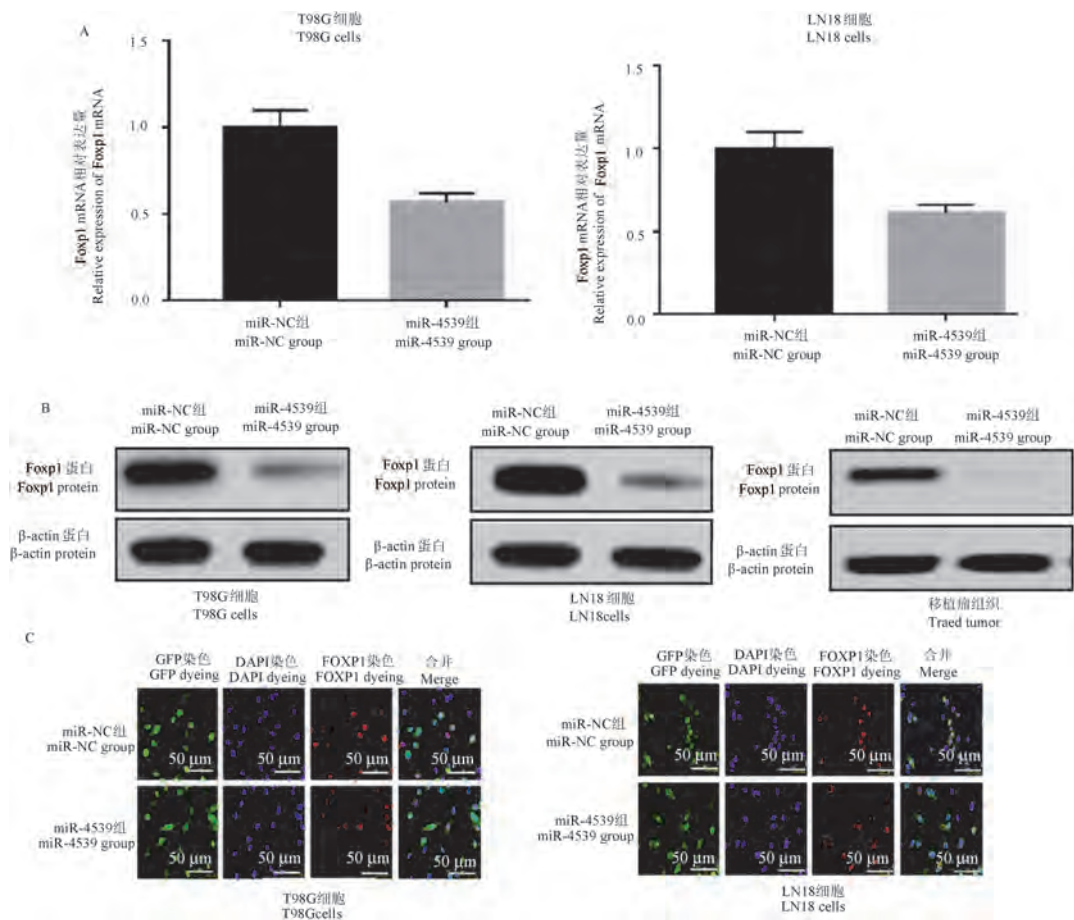


图 5 转染 miR-4539 对小鼠肿瘤生长抑制作用

Figure 5 Inhibitory effect of miR-4539 transfection on tumor growth in mice



注:A:Foxp1 mRNA 相对表达量;B:Western blot 检测各组 Foxp1 蛋白表达;C:免疫荧光检测 Foxp1 蛋白表达。

图 6 miR-4539 对胶质瘤细胞中 Foxp1 的调控作用

Note. A, Relative expression level of Foxp1 mRNA. B, Foxp1 protein expression in each group was detected by Western blot. C, Foxp1 protein expression was detected by immunofluorescence.

Figure 6 Regulatory effect of miR-4539 on Foxp1 in glioma cells

3 讨论

研究表明,miRNAs 在各种人类癌症中通过调节靶基因表达水平而发挥癌基因或肿瘤抑制因子的功能,如 miR-141、miR-196、miR-155、miR-34a、miR-326 和 miR-184 被发现参与了胶质瘤的细胞增

殖、凋亡和侵袭等几个关键过程^[10]。此外,这些失调的 miRNAs 还被证明对诊断和预测预后以及对胶质瘤患者的最终治疗干预具有重要价值。然而,miR-4359 在胶质瘤中的临床意义和生物学功能尚不清楚。本研究中,我们发现 miR-4359 在胶质瘤组织和细胞系中的表达明显低于在非肿瘤性脑组织

或细胞系中的表达。这些结果提示 miR-4359 可能作为一种肿瘤抑制因子负向调节胶质瘤的发生。因此,我们进一步评估了 miR-4359 对胶质瘤细胞增殖的影响。结果表明,miR-4359 过表达可显著抑制胶质瘤细胞增殖,诱导细胞周期阻滞,促进细胞凋亡。我们还发现 miR-4359 在体内对胶质瘤细胞的致瘤性有抑制作用。

为了确定 miR-4359 调节胶质瘤生长的机制,我们使用公开可用的在线算法(TargetScan、Miranda 和 PITA)预测了它的目标基因,并通过执行微阵列分析、Western blot 和荧光素酶分析最终确定,miR-4359 负调控其靶基因 Foxp1 在胶质瘤细胞中的表达。Foxp1 是 Foxp 转录因子基因家族的成员,包括 43 个人类基因,参与转录调节和 DNA 修复,并在免疫反应、器官发育和癌症发病机制中发挥关键作用。与其他家族成员相似,Foxp1 具有多种功能,例如调节 B 细胞发育、单核细胞分化、促进心脏瓣膜和肺发育等^[11]。此外,根据细胞类型的不同,Foxp1 可作为癌症驱动因子或肿瘤抑制因子参与调节各种人类癌症的发生。Foxp1 的表达缺失最初报道在几种类型的实体肿瘤中,如结肠癌^[12]和乳腺癌^[13]。作为癌基因,Foxp1 在 B 细胞淋巴瘤中直接抑制广泛的促凋亡基因。最近的一项研究表明^[14],在 B 细胞淋巴瘤、结直肠癌和黑色素瘤等不同的人类癌症中,Foxp1 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的转录增强子。然而,Foxp1 在肿瘤发生中的作用及其在胶质瘤中的临床意义仍然知之甚少。Gomez 等^[15]人发现,Foxp1 高表达预示胶质母细胞瘤患者生存率较低,沉默 Foxp1 的表达则可抑制肿瘤的生长,因此,Foxp1 可能在脑胶质瘤中起到了癌基因的作用。在本研究中,通过 RT-PCR 和 Western blot 检测发现,当 T98G 细胞和 LN18 细胞过表达 miR-4359 后,Foxp1 mRNA 和蛋白表达都显著降低,这表明在脑胶质瘤中,Foxp1 可被 miR-4359 直接靶向并下调,并且 Foxp1 在功能上参与了 miR-4359 介导的肿瘤生长抑制。但 miR-4359/Foxp1 对具体的下游信号讨论的影响仍值得进一步研究。

综上所述,本研究发现,miR-4359 通过直接调节转录因子 Foxp1 的表达抑制肿瘤生长,抑制胶质瘤细胞增殖。我们的结果证实了 miR-4359 在胶质瘤中作为一种肿瘤抑制性 miRNA 的作用,并提示 miR-4359 可能成为治疗胶质瘤的新靶点。

参考文献:

[1] 李德培,陈银生,郭铮铮,等. 脑胶质瘤的临床疗效和预后

因素分析(附 741 例报告)[J]. 中华神经外科杂志, 2018, 34(9): 905-909.

- [2] 高一凡, 宫宇娇, 程华坤, 等. RTK/ECM/Integrin 相关信号通路促进胶质母细胞瘤侵袭的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2019, 42(1): 69-72.
- [3] Zhang Y, Xu Y, Li F, et al. Dissecting dysfunctional crosstalk pathways regulated by miRNAs during glioma progression [J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25769-25782.
- [4] Sun L, Li D, Yuan Y, et al. Intestinal long non-coding RNAs in response to simulated microgravity stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Sci Rep UK, 2021, 11(1): 1997.
- [5] Liu M, Chen Y, Huang B, et al. Tumor-suppressing effects of microRNA-612 in bladder cancer cells by targeting malic enzyme 1 expression [J]. Int J Oncol, 2018, 52(6): 1923-1933.
- [6] Huang S, Cui H, Lou Z, et al. Association of rs3787016 in long non-coding RNAs POLR2E and rs2910164 in miRNA-146a with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Iran J Public Health, 2018, 47(5): 623-632.
- [7] Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, et al. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC [J]. Int J Cancer, 2009, 125(6): 1407-1413.
- [8] Jiang L, Lin C, Song L, et al. MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF- κ B/I κ B α negative feedback loop [J]. J Clin Invest, 2012, 122(1): 33-47.
- [9] Dontula R, Dinasarapu A, Chetty C, et al. MicroRNA 203 modulates glioma cell migration via robo1/ERK/MMP-9 signaling [J]. Genes Cancer, 2013, 4(7-8): 285-296.
- [10] Peng T, Zhang S, Li W, et al. MicroRNA-141 inhibits glioma cells growth and metastasis by targeting TGF- β 2 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(8): 3513-3521.
- [11] Barrans SL, Fenton JA, Banham A, et al. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome [J]. Blood, 2004, 104(9): 2933-2935.
- [12] Zhang J, Chen J, Ma T, et al. Genetic variants of FOXP1 and FOXP1 are associated with the susceptibility of oesophageal adenocarcinoma in Chinese population [J]. J Genetic, 2018, 97(1): 1-6.
- [13] Halacli SO, Dogan AL. FOXP1 regulation via the PI3K/Akt/p70S6K signaling pathway in breast cancer cells [J]. Oncol Lett, 2015, 9(3): 1482-1488.
- [14] Yang S, Liu Y, Li MY, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 124.
- [15] Gomez GG, Volinia S, Croce CM, et al. Suppression of microRNA-9 by mutant EGFR signaling upregulates FOXP1 to enhance glioblastoma tumorigenicity [J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1429-1439.

[收稿日期]2021-05-28

陈秋荷, 刘晓玲. 浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会——以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 98–101.

Chen QH, Liu XL. Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: Case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 98–101.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 014

浅谈实验动物屏障设施的建设及管理体会 ——以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例

陈秋荷*, 刘晓玲

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

【摘要】 实验动物是教学科研工作中的重要载体和工具, 合格的实验动物是科学研究的重要前提。建立标准化、科学化、规范化的实验动物屏障设施可提供 SPF 级实验动物并为开展实验动物研究提供平台保障。本文将以广州中医药大学中药学院实验动物屏障设施为例, 从屏障设施建设情况、规章制度管理、人员培训及管理、灭菌清洁工作、废弃物处理等方面介绍该实验动物屏障设施的运行模式, 就管理过程中遇到的常见问题提出相关解决措施, 并对未来努力方向提出个人思考, 以期实验动物屏障设施的建设和管理提供参考。

【关键词】 实验动物屏障设施; 建设; 管理体会

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0098-04

Construction and management experience of laboratory animal barrier facilities: Case study of specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine

CHEN Qiuhe*, LIU Xiaoling

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Laboratory animals are important in teaching and scientific research, and qualified laboratory animals are an important prerequisite for scientific research. The establishment of scientific and standardized laboratory animal barrier facilities provides specific pathogen-free laboratory animals and platform support to carry out animal research. This article discusses the specific pathogen-free barrier facility for laboratory animals in the School of Pharmaceutical Sciences of Guangzhou University of Chinese Medicine as an example to introduce the operation mode of the laboratory animal barrier facility from the aspects of construction, management of regulations, personnel training and management, sterilization and cleaning, and waste disposal. We also propose relevant solutions to common problems encountered in the management process. Finally, some opinions on the future direction of laboratory animal barrier facilities will be put forward to provide significant information for the construction and management of laboratory animal barrier facility.

【Keywords】 laboratory animal barrier facility; construction; management experience

实验动物是“活的分析天平”, 是生命科学研究不可或缺的支撑条件^[1-2]。随着我国改革开放和世

界经济科技一体化进程, 实验动物成为了影响科学研究的重要因素。SPF (specific pathogen free) 级实

[基金项目] 广东省中医药局项目 (20221117)。

[作者简介] 陈秋荷 (1992—), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 实验室建设与管理、神经药理学研究。E-mail: 021326@ gzuem.edu.cn

验动物是目前国际上普遍采用的动物,建立标准化、科学化、规范化的实验动物屏障设施可提供 SPF 级实验动物并为开展实验动物研究提供平台保障^[3-4]。

近年来,随着生命科学、医药领域的迅速发展,相关领域研究的规范化,各大高校及科研院所对实验动物资源及实验动物屏障设施的需求越来越广泛^[5]。为了进一步满足广州中医药大学中药学院广大师生的科研需求,中药学院经过充分的前期准备、投入和论证,于 2018 年建成了实验动物屏障设施,并于 2019 年取得广东省科技厅颁布的《实验动物使用许可证》,现已投入使用,总体运行状况良好,为我院的科学研究提供更多的便利和平台基础。

1 实验动物屏障设施的建设情况

1.1 总体建设情况

实验动物屏障设施在《实验动物设施建筑技术规范》(GB 50447-2008)的指导下,在原有普通实验室的基础上改建而成^[6]。采用双走廊(洁净走廊和污物走廊)设计,屏障系统内有风淋间、储物间、检疫室、饲养室、实验操作室,屏障设施外还设有接收室、更衣室、灭菌室、洗消间、储物间及办公室,总建筑面积 274 m²。屏障设施整体墙壁及天花板由彩钢夹芯板组成,地面采用防静电 PVC 地板,墙壁与地面连接处采用铝合金材料连接。为了减少大小鼠间实验干扰,该屏障设施以物品储物间为中心,左右划分大小鼠饲养区域,并设独立空调通风系统、一更、二更、风淋间、检疫室及配套接收室。饲养室配备独立通风笼具(IVC)、小型推车、电子秤;实验操作间配有洁净工作台、冰箱、超净台等;另配有高压灭菌器、传递窗、小型发电机等设备设施。

屏障系统的设计参数包括:湿度 40%~70%,温度:20℃~26℃,空气洁净度:7 级;换气次数:每小时 15~20 次,与相通房间的最小静压差:≥10 Pa,氨浓度≤14 mg/m³,噪声≤60 dB,最低工作照度:200 lx,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h。

1.2 空调通风系统及监控、警报系统

实验动物屏障设施内采用万级洁净空调系统,每套系统由两套单元式机组组成,每套机组有 4 台空气压缩机,空气经初效、中效、高效过滤进入屏障设施。屏障设施内进风口位于天花板中央,各室于靠近前后门处各设 1 个排风口,离地 0.25 m。管理人员每日上午、下午进出屏障设施,对设施内温度、湿度、压差等参数进行记录,如有异常,将及时维

护,以保证通风系统正常运行。

由于室内构造独特,屏障设施内遇险逃生、解救困难指数增加。为预防或及时控制火灾等发生,设施内规定不得使用明火,且各室内装有联网烟雾报警器,并配有灭火器等灭火设备。同时,各室装有联网高清摄像头,管理人员可实现实时监控。此外,屏障设施内配有移动设备及对讲机,方便实验人员及时与外界取得联系,解决问题。

2 实验动物屏障设施管理制度

2.1 严格制定科学规范的规章制度和操作规程

实验动物屏障设施参照国家有关标准,并结合学院实际情况,制定了一系列相关的规章制度和操作规程^[7]。主要包括《实验动物屏障设施专业技术人员分工与职责》、《实验动物屏障设施从业人员培训制度》、《实验动物屏障设施实验动物福利保障制度》、《实验动物屏障设施安全管理制度》、《实验动物屏障设施人员安全保障制度》、《实验动物屏障设施设施设备管理制度》等管理制度,编写了《实验动物屏障设施设备操作、维护操作规程》、《脉动真空灭菌器标准操作规程》、《物品传递窗标准操作规程》、《无菌水系统标准操作规程》、《独立通气笼盒系统标准操作规程》、《实验动物屏障设施实验动物饲养与管理》、《人员、物品、动物进出实验动物屏障设施标准操作规程》等相关规范文件,并制定了实验动物屏障设施突发事件应急预案,以确保实验动物屏障设施的正常运行及人员人身安全。

2.2 人员培训及管理

2.2.1 人员培训

实验动物屏障设施管理人员应具备动物管理方面相关知识^[8],为了规范管理,管理人员参加广东省实验动物学会举办的广东省动物从业人员技术培训班并获得相关培训证书;参加校内外举办的伦理委员会建设和审查能力提升系列培训以及其他动物医学相关会议;另外,针对高压灭菌器特种设备,积极组织管理人员参加广州市市场监督管理局举办的特种设备培训并获得相关证书,做到持证上岗。此外,每周召开管理小组会议,讨论解决屏障设施运行管理中遇到的问题及工作部署,同时还定期组织职工学习规章制度和业务知识,加强业务能力,提高工作效率,提升服务意识。针对实验人员,我们结合国家标准、省级管理条例及管理特色,创建了实验动物屏障设施使用培训题库。所有实验人员需通过书面考试及考试后培训后,方可具备准入使用资格。

2.2.2 创建人员健康档案

为了保障实验动物屏障设施人员及实验动物健康情况,要求管理人员每年进行体检并建立健康档案,要求每位实验人员在申请动物实验前提供体检证明,若患有传染病特别是人兽共患病者在患病期间将不得继续从事动物实验相关操作。

2.3 实验动物屏障设施人员、物品、动物准入及管理

人员、物品、动物进出屏障设施均应遵守严格的单向流动原则^[9],并做好登记工作。人员流向:屏障设施外做好登记,进入一更,做好手部消毒后进入二更,实验人员需再次做好手部消毒,佩戴一次性手套、口罩、穿戴无菌隔离服,进入风淋室风淋 60 s,随后经清洁走廊进入各室开展实验操作,实验操作结束后实验人员经污物走廊进入缓冲间,做好登记后离开。物品流向:实验物品需经高压灭菌、紫外照射或熏蒸消毒等方式消毒灭菌后传入屏障设施。管理人员根据物品性质选择合适的消毒方式,所有传入屏障设施物品均应标明姓名、联系方式、有效期等。实验结束后,实验物品随实验人员经污物走廊带离屏障设施。动物流向:实验动物应从具有实验动物生产资质的单位购进,具备《实验动物质量合格证》或《实验动物质量检测报告》。动物进入屏障设施前,管理人员核查材料及运输盒完整性;核查无误后,使用消毒水对运输盒进行全面擦拭,放入传递窗,经紫外照射 20 min 后由检疫室内实验人员接收并进行 5~7 d 的检疫观察,检疫合格的动物将移入饲养室进行饲养备用;如有动物需移出实验动物屏障设施,应从污物走廊带出饲养室,随后由缓冲间退出屏障设施,做好动物处置登记后离开。

2.4 实验动物屏障设施内灭菌清洁工作

微生物是实验动物屏障设施的重要指标之一,只有做好消毒灭菌工作,严加管理才能保证参数达标^[10]。我们安装了山东新华医疗器械股份有限公司的脉动真空灭菌器,对传入实验动物屏障设施耐高压高温物品进行高压蒸汽灭菌。实验后,实验人员应严格按照要求使用 75% 乙醇或消毒水对操作台、电子秤等使用设备进行清洁;此外,管理人员每日使用消毒水对地板、墙面进行擦拭,每晚定时开启紫外灯照射 1 h。每周定期对地面、墙面、笼架、设备等擦拭,使用百毒杀/过氧乙酸等喷雾室内空间进行消毒(每半个月对消毒水品种进行更替)。对于空调通风系统,每周对进风口进行擦拭,每两周排风口进行拆卸清洗;对空调机组防尘网每周进

行拆卸清洗,空调通风系统初效、中效、高效过滤器进行定期更换等。传递物品根据性质不同,选择不同的消毒灭菌方式,对于耐高温高压的手术器械、笼具、水瓶、垫料、隔离服等采用高压蒸汽灭菌器进行 121℃、30 min 的程序灭菌;对于不耐高温高压、不可浸泡消毒的物品喷洒酒精消毒后再经紫外照射 30 min 进行灭菌;对于大型设备、笼架等通过熏蒸消毒^[11-12]。实验动物屏障设施为实验动物提供经过滤消毒的纯水,符合国家标准。

2.5 动物尸体及废弃物处理

由于实验条件有限,本实验动物屏障设施不接收具有感染性或放射性相关实验。动物尸体存放于特定的-20℃冰柜中,定期与学校动物中心对接,交由具备相关资质的企业统一进行无害化处理。实验过程中产生的利器,分类置于利器盒中,与学校门诊部对接,交由具备相关资质的公司统一进行处理。与学校后勤部门对接,将饲养过程中产生的废弃垫料、针筒、口罩、手套等实验废弃物交由具备相关资质的公司进行焚烧处理。笼具清洗过程中产生的废水需经使用含氯消毒水浸泡后方可排放。

3 实验动物屏障设施运行管理中的常见问题及解决办法

自实验动物屏障设施运行以来,常见的问题主要有:(1)实验人员进出频繁,对屏障设施环境稳定造成影响;(2)实验人员认识不足,违规现象较多,实验人员常存在咬伤、抓伤现象;(3)粉尘较多,空气洁净度较难控制;(4)屏障设施断电,以及空调系统故障未能及时维修等问题。

人员是实验动物屏障设施的最大潜在污染源,人员频繁进出屏障设施不仅会干扰屏障设施环境的稳定,还会增加管理人员工作压力^[13]。为有效解决实验人员进出频繁问题,我们采取以下对策:(1)实验申请时应明确实验人员信息,实验过程中无关人员不可进入;(2)采取预约制,实验人员需提前 1 d 预约,每天每批实验限制为 2 人次;因特殊实验需求,可书面申请,获批后增加进入人次。自约束政策实施后,屏障设施每日进出人数得到了极大程度的控制。

在前期管理过程中发现,实验人员即便通过培训考试,但在实验过程中违规现象仍层出不穷,且常出现被动物抓伤、咬伤等情况。为了进一步改善这种情况,我们采取以下相关对策:(1)整理屏障设施使用过程中常犯错误,整合入准入考试题库;(2)举办培训考试后的专项培训,重点强调屏障设施使用注意事项、常见违规行为及处罚措施;(3)管理人

员加强日常巡查,针对违规类型采取相应的处罚措施;(4)与药理学本科实验教学中心合作,每月定期举办动物实验基本操作相关培训,尽可能规范学生的实验基本操作。通过加强培训等整改措施后,实验人员违规行为明显减少,被咬伤现象也得以缓解,屏障设施整体处于良性运行状态。

刨花垫料由于材质蓬松,在相同鼠笼的更换频率下,刨花垫料用量相对较少,性价比高,但容易带来粉尘问题^[14];而玉米芯具有较好的吸水性、碎粉率低,动物适应性好,但价格较高^[15]。为了兼顾粉尘问题、降低运行成本及满足动物天性,我们后期同时采用玉米芯、刨花垫料,实验人员可根据实验需求进行选择。除此之外,屏障设施相应地增加了清洁次数以及实验人员卫生意识方面培训,进一步改善屏障设施空气洁净度问题。

独立通风笼具采用微型隔离技术,可保证动物免受微生物的污染,也能降低屏障设施内氨气浓度、粉尘污染;但设备对供电要求高,为此,我们配备小型发电机用于满足实验动物屏障设施断电后用电需求。此外,前期由于管理经验不足,常出现设备故障未能及时有效解决等问题,导致出现较多管理漏洞,耽误实验进程。为此,我们与具备屏障设施建设资质和维保能力的公司签订维保协议,对通风系统、屏障设施等相关设备定期进行检查维护及配件更换;另外,管理人员加强日常巡视管理,以保障实验动物屏障设施的正常运转。

4 实验动物屏障设施未来努力方向

实验动物屏障设施因管理特殊,相关设施设备需全天候运行^[16],且空调过滤器、纯水过滤器、IVC 主机过滤器、紫外灯等相关配件需经常更换;空调系统、纯水系统、屏障设施等需定期维护检修;加之动物饲料垫料、水电等其他费用支出较大,维持实验动物屏障设施的正常运转需耗费巨大的财力。节约能源,减少运行成本,目前仍是实验动物屏障设施未来努力方向之一。部分实验动物屏障设施利用热管式空气换热器进行换热,回收排风中的能量进行利用而达到节能效果^[17]。此外,小型实验动物屏障设施往往由于投入成本有限,经常会出现管理人员身兼数职、管理手段较为落后等情况,进而导致管理过程中出现费用核算不及时、笼位跟踪管理滞后、人员进出管理任务大,管理人员工作任务繁重等问题。如果能加大投入成本,构建完善的涉

及实验申请、笼位变更、人员进出统计、饲养费用核算等内容的信息化管理系统,将极大程度提高工作效率。但如何平衡降低管理成本与提高管理工作效率间的关系,是值得我们深入探讨的问题。

参考文献:

- [1] 刘学旭,丁运萍. 国内口腔医学杂志动物实验论文中某些基本参数的书写规范化的统计分析[J]. 实验动物科学, 2008, 25(3): 65-67.
- [2] 李秀荣,黄治朝,李妍涵,等. 无特定病原体级实验动物屏障环境设施独立通风笼系统的运行与维护[J]. 中国医学装备, 2019, 16(8): 132-134.
- [3] 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.
- [4] 贺争鸣,李根平,徐平,等. 写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年[J]. 实验动物科学, 2018, 35(4): 1-13.
- [5] 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.
- [6] 中华人民共和国住房和城乡建设部,中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 实验动物设施建筑技术规范: GB 50447-2008[S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2008.
- [7] 刘艳,赵赤鸿,李晓燕,等. 实验动物屏障设施运行管理标准操作规程的制定和实施[J]. 中国医学装备, 2014, 11(1): 14-16.
- [8] 刘伟. 国外兽医生物安全实验室建设与管理对我国的启示[J]. 中国家禽, 2012, 34(7): 5-10.
- [9] 柏合,杜鹃. 医学院校 SPF 级动物实验室建设与运行管理初探[J]. 牡丹江医学院学报, 2014, 35(4): 157-158.
- [10] 赵东岳,林丹枫. SPF 实验动物屏障系统的运营管理[J]. 实验室科学, 2020, 23(3): 157-160.
- [11] 孙静,杜蕾,丁玉春,等. 无菌猪的制备与微生物质量控制[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(6): 699-702.
- [12] 丁燕霞,李琳,朱莉莉,等. 中南大学实验动物屏障环境运行初期总结[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 83-86.
- [13] 谢秀佛,林清强,林春花,等. 实验动物中心的管理难点及改进建议[J]. 实验室科学, 2020, 23(5): 184-187, 191.
- [14] 刘继超,牛屹东,张孟蕾,等. 比较工作状态下杨木刨花与玉米芯垫料的物理性状[J]. 实验动物科学, 2014, 31(6): 36-39.
- [15] 詹红微,王福金,刘亚奇,等. 三种 SPF 小鼠垫料的比较[J]. 实验动物科学, 2012, 29(2): 21-25.
- [16] 李长雷,马宝苗,艾永循,等. SPF 级动物实验室的建设与管理[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(4): 228-231.
- [17] 张大维,徐彩云,李晓慧,等. 热管式空气换热器在实验动物设施建设上的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 109-112.

[收稿日期]2021-05-14

刘浪, 王海存, 刘广麟, 等. 肿瘤中 HAGLR 反义长链非编码 RNA 的表达与机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 102-106.

Liu L, Wang HC, Liu GL, et al. Expression and regulatory mechanisms of HAGLR opposite-strand long non-coding RNA in tumors [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 102-106.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 015

肿瘤中 HAGLR 反义长链非编码 RNA 的表达与机制研究

刘浪, 王海存, 刘广麟, 高欣, 赵俞乔, 姜兴明*

(哈尔滨医科大学附属第二医院, 肝胆胰外科, 哈尔滨 150086)

【摘要】 长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA。随着研究不断深入,越来越多的证据表明 lncRNA 广泛参与调控机体病理生理过程,影响着人类疾病与肿瘤的发生发展。HAGLR 反义长链非编码 RNA(HAGLR opposite strand long non-coding RNA, lncRNA HAGLROS)在诸多肿瘤中呈异常高表达,对肿瘤的恶性生物学行为起重要的调控作用。本文就 lncRNA HAGLROS 在肿瘤中的表达与调控机制做一简要综述。

【关键词】 长链非编码 RNA; HAGLROS; 肿瘤; 表达; 调节机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0102-05

Expression and regulatory mechanisms of HAGLR opposite-strand long non-coding RNA in tumors

LIU Lang, WANG Haicun, LIU Guanglin, GAO Xin, ZHAO Yuqiao, JIANG Xingming*

(Department of HPB Surgery, the 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

【Abstract】 Long noncoding RNAs (lncRNAs) are a group of noncoding RNAs of more than 200 nucleotides in length. Accumulating research has unearthed increasing evidence that lncRNA was widely involved in the regulation of pathophysiological processes and affect the establishment and progression of human diseases including cancers. HAGLR opposite-strand lncRNA is highly expressed in many tumors, playing important roles in regulating tumors' malignant behaviors. This paper reviews the expression and mechanisms of action of the HAGLR opposite-strand lncRNA in tumors.

【Keywords】 long noncoding RNA; HAGLROS; tumor; expression; regulatory mechanism

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 由于在转录本上缺乏开放阅读框和保守密码子, lncRNA 基本不具有编码蛋白的能力^[1-3]。随着

研究的深入,越来越多的证据表明 lncRNA 参与调节染色质重塑、转录后调控、蛋白质翻译和组蛋白乙酰化等生物学过程。既往研究显示 lncRNA 可作为致癌基因或抑癌基因, 影响肿瘤的发生和发

【基金项目】 黑龙江省自然科学基金 (LH2020H058); 湖北陈孝平科技发展基金 (CXPJH12000002-2020015); 国家自然科学基金 (81602088)。

【作者简介】 刘浪 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 非编码 RNA 与肝胆胰肿瘤的研究。E-mail: antienusi@126.com

【通信作者】 姜兴明 (1986—), 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 非编码 RNA 与肝胆胰肿瘤的研究。

E-mail: xmjiang@hrbmu.edu.cn

展^[4-13]; HAGLR 反义长链非编码 RNA (HAGLR opposite strand long non-coding RNA, lncRNA HAGLROS) 被证实多种人类恶性肿瘤中起重要调控作用, 可作为临床诊治的潜在标志物和患者的预后评估指标。

1 HAGLROS 概述

HAGLROS 是新发现的长度为 699 个核苷酸的长链非编码 RNA, 主要定位于细胞质。研究表明 HAGLROS 过表达可通过抑制 mTOR 介导的 P13K/Akt/mTOR 信号通路调控细胞自噬从而促进帕金森氏病的进展; HAGLROS 可靶向 miR-20a-5p 调控高糖诱导的心肌细胞的增殖与凋亡; 在脂多糖引发的肺炎细胞中, HAGLROS 还可通过 miR-100/NF- κ B 轴调控细胞自噬进而加重炎症损伤^[14-16]。此外, 研究显示 HAGLROS 在胃癌、肝癌和结直肠癌等诸多恶性肿瘤中呈异常高表达并且存在不同的分子调控机制, 探明 HAGLROS 在肿瘤中的作用机制将为疾病早期诊断与临床治疗提供新的思路。

2 HAGLROS 与肿瘤

2.1 HAGLROS 与胃癌

Chen 等^[17]对 84 例胃癌患者肿瘤组织与癌旁正常组织进行实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测发现 HAGLROS 在肿瘤组织中表达更高; 数据分析显示 HAGLROS 表达水平与癌肿浸润深度、TNM 分期及淋巴结转移密切相关, 并且高水平表达的 HAGLROS 往往提示预后不良。体外细胞学实验结果显示: 利用小干扰 RNA 外源性沉默胃癌细胞中 HAGLROS 的表达后, 肿瘤细胞的增殖和侵袭迁移能力显著下降。随后该实验团队通过生物信息学预测发现 HAGLROS 与 miR-100-5p 及 miR-100-5p 与自噬抑制因子哺乳动物雷帕霉素靶点 (mechanistic target of rapamycin kinase, mTOR) 间存靶向在结合位点; 载体构建及双荧光素酶报告基因检测 (luciferase) 实验证实 HAGLROS 可作为竞争性内源 RNA 吸附 miR-100-5p 来阻断 miR-100-5p 对下游基因 mTOR 3'-UTR 的靶向作用, 进而上调肿瘤细胞内 mTOR 的表达 (mTOR 蛋白可以形成 mTORC1 复合体, 通过调控自噬相关基因表达来抑制细胞自噬)。进一步的实验结果显示: 下调胃癌肿瘤细胞内 HAGLROS 的表达后 mTORC1 活性明显

下降且细胞内自噬抑制因子 p62 表达水平降低。上述实验结果提示: 过表达的 HAGLROS 通过内源性竞争吸附 miR-100-5p, 促进下游靶基因 mTOR 的表达及复合体 mTORC1 的形成, 从而抑制细胞自噬来促进胃癌肿瘤的发生发展。

2.2 HAGLROS 与肝细胞癌

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 复发率高且预后较差; 手术切除作为目前最有效的治疗方法仍存在复发和转移的风险^[18-20]。为探索新的分子诊断标记物和治疗靶点, Wei 等^[21]对 68 例 HCC 患者肿瘤组织及癌旁正常组织进行定量检测及临床病理学数据分析后发现: 肿瘤组织中 HAGLROS 的表达水平明显更高, 并且 HAGLROS 的表达水平越高, 患者的术后生存时间越短; 同时 HAGLROS 的表达水平与癌肿分化程度和肿瘤分期存在显著的相关性。深入研究发现: 外源性沉默肿瘤细胞 (Huh7、MHCC94H 和 HepG2. 2. 15) 内 HAGLROS 的表达可抑制 HCC 的细胞活力, 减弱肿瘤细胞的侵袭和迁移; 与此同时细胞内 caspase-3 等凋亡相关蛋白表达水平明显降低, 并且细胞的自噬能力显著增强。随后的机制研究结果显示: HAGLROS 与 miR-5905 及 miR-5905 与有自噬抑制效应的自噬相关因子 12 (autophagy related 12, ATG12)^[22]存在相同结合位点; 且过表达的 HAGLROS 可部分逆转过表达 miR-5905 导致的 HCC 肿瘤细胞内 ATG12 的表达降低。该团队的研究结果提示: 过表达的 HAGLROS 可通过 miR-5905/ATG12 轴抑制 HCC 肿瘤细胞发生自噬从而发挥促癌作用。

2.3 HAGLROS 与肝内胆管癌

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是常见的肝胆系统恶性肿瘤, 脂质异常积累被认为是影响 ICC 发生发展的重要因素, 虽然目前肝内胆管癌患者的诊断和治疗取得了一定进展, 但晚期患者的预后仍不尽如人意^[23-25]。Ma 等^[26]对 ICC 患者肿瘤组织及癌旁正常组织进行 qRT-PCR 检测发现 HAGLROS 在肿瘤组织中呈异常高表达。体外细胞学实验结果显示: 外源性下调 QBC939 细胞内 HAGLROS 的表达后肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显减弱, 同时 QBC939 细胞中 mTOR 通路相关蛋白水平下降且自噬蛋白荧光强度显著升高; 当 HAGLROS 过表达后, QBC939 细胞内脂质积累增加 (TG、LDL-C 和 TC 水平明显上升)。上述实验结果

提示:异常高表达的 HAGLROS 通过激活 mTOR 信号通路来抑制细胞自噬,来对 ICC 肿瘤细胞的恶性生物学行为发挥促进作用,并且还可通过增加肿瘤 ICC 细胞内脂质积累来促进肿瘤的发生发展。此外,单多变量和 Kaplan-Meier 分析以及 ROC 曲线分析结果表明 HAGLROS 可作为肝胆管癌患者独立预后的危险因素,对 ICC 患者的早期诊断及临床治疗预后评估具有一定的辅助作用。

2.4 HAGLROS 与结直肠癌

对 78 例结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者肿瘤组织与癌旁正常组织的定量检测及临床病理学数据分析结果显示:HAGLROS 在 CRC 肿瘤组织中表达更高;HAGLROS 异常高表达提示癌肿恶性程度高且患者术后生存时间短。Zheng 等^[27]的实验团队对此展开研究发现:外源性下调肿瘤细胞内 HAGLROS 的表达后,CRC 细胞的增殖、侵袭和迁移能力明显减弱;并且低表达的 HAGLROS 对 CRC 细胞自噬有明显的促进作用。机制研究结果显示:生物信息学预测 HAGLROS 与 miR-100 和 miR-100 与有促癌效应的自噬相关因子 5 (autophagy related, ATG5) 存在靶向作用关系;luciferase 实验结果证实 HAGLROS 能够靶向结合 miR-100,同时 miR-100 与 ATG5 也存在靶向位点;并且对肿瘤细胞转染 miR-100 mimics 后可部分截制过表达 HAGLROS 对 ATG5 表达的调控作用(高表达的 ATG5 可通过激活 mTOR 通路抑制细胞发生自噬,进而促进结直肠癌的发生发展^[28-33])及对肿瘤细胞恶性生物学行为的促进作用。由此可见,过表达的 HAGLROS 通过 miR-100/ATG5 轴来激活 mTOR 通路,抑制结直肠癌肿瘤细胞的自噬进而发挥促癌作用。

2.5 HAGLROS 与骨肉瘤

在骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 的研究中,Wu 等^[34]通过对 193 例 OS 患者肿瘤组织与癌旁正常组织进行 qRT-PCR 检测发现 HAGLROS 在肿瘤组织中的表达明显更高。随后收集 OS 患者临床病理学数据并建立分析模型:HAGLROS 高表达与 OS 癌肿分化程度、TNM 分期和远处转移密切相关;Kaplan-Meier 生存曲线显示 HAGLROS 高表达患者的 5 年总生存期更短;多变量及 Cox 回归模型分析结果表明 HAGLROS 可作为骨肉瘤患者独立预后的独立危险因素,提示 HAGLROS 可作为骨肉瘤潜在的治疗靶点及预后评估标志物。此外,Zhou 等^[35]同样发现:HAGLROS 在 CRC 肿瘤组织和肿瘤细胞内表达

明显高于正常组织和细胞;外源性下调骨肉瘤细胞中 HAGLROS 的表达后,肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显受抑。并且随后的生物信息学预测及验证实验结果表明:HAGLROS 可内源性竞争吸附 miR-152 来阻断 miR-152 对下游促癌因子 Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1 (Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1) 的靶向作用,从而上调 ROCK1 的表达来增强骨肉瘤的恶性生物学行为。

2.6 HAGLROS 与非小细胞肺癌

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 作为肺癌的主要亚型,近年来发病率有明显上升的趋势^[36-37]。Wang 等^[38]对 NSCLC 组织样本的 qRT-PCR 检测及患者临床病理学数据分析结果显示:非小细胞肺癌肿瘤组织中 HAGLROS 的表达更高;高表达 HAGLROS 患者癌肿的恶性程度相对更高并且总体术后生存时间更短。细胞功能学实验结果显示:外源性沉默 A549 细胞内 HAGLROS 后,肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力明显减弱。为了探究 HAGLROS 在 NSCLC 中的作用机制,该团队借助生物信息学预测及双荧光素酶报告基因检测实验发现:野生型 HAGLROS 载体与 miR-152 mimics 共转染后细胞内荧光素强度明显降低,证实 HAGLROS 与 miR-152 存在靶向作用关系。进一步验证实验结果表明:转染 miR-152 mimics 后,过表达的 HAGLROS 对肿瘤细胞 A549 恶性生物学行为的促进作用被部分逆转。后续的研究中 Chen 等^[39]同样发现:HAGLROS 在 NSCLC 肿瘤组织中表达更高;转染特异性 siRNA 干扰 A549 细胞内 HAGLROS 表达后,肿瘤细胞的恶性生物学行为受到明显抑制。随后利用数据库进行相关性分析、构建非小细胞肺癌 HAGLROS 表达网络以及对其靶基因功能的分析结果显示:非小细胞肺癌中 HAGLROS 通过调控目的基因的表达进而参与剪切体、DNA 复制、细胞周期和染色体分离的调控。综上所述:过表达的 HAGLROS 通过多种调控途径促进非小细胞肺癌的发生发展,并可能成为 NSCLC 临床治疗的潜在靶点,对 NSCLC 患者的诊断及预后评估有一定的指导意义。

2.7 HAGLROS 与卵巢癌

卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 是女性常见的恶性肿瘤之一,由于进展无明显症状多数患者在确诊时已处于晚期,目前手术切除和化疗是卵巢癌的主要

治疗方法但患者预后均不理想^[40-42]。为了探索卵巢癌发生发展的分子机制, Yang 等^[43]使用 GEPIA 数据库分析并对患者肿瘤组织进行定量检测发现 HAGLROS 在卵巢癌组织中表达明显更高; 患者临床病理学数据的分析结果表明, HAGLROS 高表达组患者的总生存时间显著降低并且 HAGLROS 表达水平与肿瘤分期、癌肿浸润深度及远处转移密切相关。进一步的研究指出 HAGLROS 与 miR-100 间存在靶向作用; 生物信息学预测提示 HAGLROS 与 miR-100 存在结合位点; TCGA 数据库统计 371 例 OS 肿瘤样本中 miR-100 与 HAGLROS 表达呈负相关。随后实验人员对 miR-100 目的基因进行预测和功能分析; miR-100 下游靶基因主要参与调控细胞分解代谢、蛋白多糖生物合成及蛋白酶体泛素降解过程的正向调控; 并且目的基因主要富集于 MAPK 以及调控干细胞多能性的信号通路中; 此外, PPI 网络揭示 mTOR 与锌和环指 2 (zinc and ring finger 2, ZNRF2) 为枢纽基因。上述实验结果指出: HAGLROS 可作为卵巢癌诊断与评估预后的生物学标记物; 过表达的 HAGLROS 可与 miR-100 直接结合来促进 mTOR 和 ZNRF2 的表达, 激活 mTOR 通路从而促进卵巢癌的发生发展。

3 展望

在肿瘤之外的研究中, lncRNA HAGLROS 被证实可通过调控多种信号通路, 例如: P13K/Akt/mTOR 信号通路和 NF- κ B 信号通路等影响细胞自噬从而调控疾病的进展。这些结果为肿瘤中 lncRNA HAGLROS 效应的研究提供了新的思路。随着研究的深入, lncRNA HAGLROS 作为新发现的在诸多恶性肿瘤中呈异常高表达的 lncRNA, 不仅可通过 mTOR 信号通路以及 MAPK 信号通路调控肿瘤细胞的自噬过程, 还能借助内源性竞争机制结合下游 miRNA 来调控靶基因的表达, 对肿瘤的增殖、迁移侵袭和自噬等过程产生影响。此外, 诸多临床数据分析结果也提示 lncRNA HAGLROS 对肿瘤的诊断及患者预后评估有一定的辅助作用, 其因此有成为肿瘤诊疗新的生物学标志物的潜力。进一步挖掘 lncRNA HAGLROS 在肿瘤发生发展中的作用及具体调控机制, 将有助于为患者的诊断与治疗提供新的方向。

参考文献:

[1] Peng ZX, Liu CH, Wu MH. New insights into long noncoding

- RNAs and their roles in glioma [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17 (1): 61.
- [2] Tay Y, Rinn J, Pandolfi PP. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition [J]. *Nature*, 2014, 505 (7483): 344-352.
- [3] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152 (6): 1298-1307.
- [4] Jiang XM, Li JL, Wang WN, et al. AR-induced ZEB1-AS1 represents poor prognosis in cholangiocarcinoma and facilitates tumor stemness, proliferation and invasion through mediating miR-133b/HOXB8 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (2): 1237-1255.
- [5] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15 (1): 7-21.
- [6] 赵俞乔, 苏志雷, 崔云甫, 等. 恶性肿瘤中 HOTAIRM1 的调控作用及机制 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41 (2): 262-266.
- [7] Feretzaki M, Pospisilova M, Valador Fernandes R, et al. RAD51-dependent recruitment of TERRA lncRNA to telomeres through R-loops [J]. *Nature*, 2020, 587 (7833): 303-308.
- [8] Wang WN, Li X, Guan CH, et al. LncRNA PCAT6 promotes the proliferation, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma via regulating miR-185-5p/CBX2 axis [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216 (9): 153074.
- [9] Marchese FP, Raimondi I, Huarte M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function [J]. *Genome Biol*, 2017, 18 (1): 206.
- [10] Lyu Y, Bai L, Qin C. Long noncoding RNAs in neurodevelopment and Parkinson's disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2019, 2 (4): 239-251.
- [11] 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 等. 巨噬细胞条件性 Atg5 基因敲除小鼠的构建及鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27 (6): 770-775.
- [12] Robinson EK, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: an innate immune perspective [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863 (4): 194419.
- [13] Yang Z, Jiang S, Shang JJ, et al. LncRNA: shedding light on mechanisms and opportunities in fibrosis and aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 52: 17-31.
- [14] Peng T, Liu XY, Wang JT, et al. Long noncoding RNA HAGLROS regulates apoptosis and autophagy in Parkinson's disease via regulating miR-100/ATG10 axis and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47 (1): 2764-2774.
- [15] 刘晓东, 刘晓琴, 党宏伟, 等. HAGLROS 靶向 miR-20a-5p 调控高糖诱导的心肌细胞增殖和凋亡 [J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37 (12): 2159-2165.
- [16] Liu MH, Han T, Shi SM, et al. Long noncoding RNA HAGLROS regulates cell apoptosis and autophagy in lipopolysaccharides-induced WI-38 cells via modulating miR-

- 100/NF- κ B axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(3): 589–596.
- [17] Chen JF, Wu P, Xia R, et al. STAT3-induced lncRNA HAGLROS overexpression contributes to the malignant progression of gastric cancer cells via mTOR signal-mediated inhibition of autophagy [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 6.
- [18] 陈婷婷, 单杉, 李南, 等. β -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 40–46.
- [19] Chen BH, Deng SC, Ge TY, et al. Live cell imaging and proteomic profiling of endogenous NEAT1 lncRNA by CRISPR/Cas9-mediated knock-in [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(9): 641–660.
- [20] García-Venzor A, Mandujano-Tinoco EA, Lizarraga F, et al. Microenvironment-regulated lncRNA-HAL is able to promote stemness in breast cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118523.
- [21] Wei HM, Hu J, Pu J, et al. Long noncoding RNA HAGLROS promotes cell proliferation, inhibits apoptosis and enhances autophagy via regulating miR-5095/ATG12 axis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 73: 72–80.
- [22] Fahmy AM, Labonté P. The autophagy elongation complex (ATG5-12/16L1) positively regulates HCV replication and is required for wild-type membranous web formation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 40351.
- [23] 关沧海, 赵俞乔, 史文广, 等. 恶性肿瘤中小核仁 RNA 宿主基因 3 的表达及作用研究 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(6): 638–643.
- [24] Peng PH, Chieh-Yu Lai J, Hsu KW, et al. Hypoxia-induced lncRNA RP11-390F4.3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis through upregulating EMT regulators [J]. *Cancer Lett*, 2020, 483: 35–45.
- [25] Sun W, Shen NM, Fu SL. Involvement of lncRNA-mediated signaling pathway in the development of cervical cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(9): 3672–3687.
- [26] Ma J, Feng JF, Zhou X. Long non-coding RNA HAGLROS regulates lipid metabolism reprogramming in intrahepatic cholangiocarcinoma via the mTOR signaling pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104466.
- [27] Zheng YS, Tan KL, Huang HP. Long noncoding RNA HAGLROS regulates apoptosis and autophagy in colorectal cancer cells via sponging miR-100 to target ATG5 expression [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3922–3933.
- [28] 黄艺滢, 白琳, 雷雪裴, 等. 肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 (TNFRSF4) 敲除和人源化小鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 137–144.
- [29] An Y, Zhang Z, Shang Y, et al. miR-23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2 [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(5): e1766.
- [30] Hu JL, He GY, Lan XL, et al. Inhibition of ATG12-mediated autophagy by miR-214 enhances radiosensitivity in colorectal cancer [J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(2): 16.
- [31] Li W, Zhang G, Wang HL, et al. Analysis of expression of cyclin E, p27kip1 and Ki67 protein in colorectal cancer tissues and its value for diagnosis, treatment and prognosis of disease [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(23): 4874–4879.
- [32] Kang MR, Kim MS, Oh JE, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability [J]. *J Pathol*, 2009, 217(5): 702–706.
- [33] Cho DH, Jo YK, Kim SC, et al. Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 4091–4096.
- [34] Wu PF, Dai ZT, Liu WD, et al. Elevated long noncoding RNA HAGLROS expression correlates with clinical progression and prognosis in osteosarcoma [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(4): 1428–1433.
- [35] Zhou KF, Xu J, Yin XF, et al. Long noncoding RNA HAGLROS promotes cell invasion and metastasis by sponging miR-152 and upregulating ROCK1 expression in Osteosarcoma [J]. *Comput Math Methods Med*, 2020, 2020: 7236245.
- [36] 杨雨晴, 李洋洋, 程旭, 等. 长链非编码 RNA HAGLROS 对非小细胞肺癌 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响 [J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2020, 21(5): 608–612.
- [37] Wang J, Zhang YX, Li QJ, et al. Influenza virus exploits an interferon-independent lncRNA to preserve viral RNA synthesis through stabilizing viral RNA polymerase PB1 [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(11): 3295–3304.
- [38] Wang WL, Yu DJ, Zhong M. lncRNA HAGLROS accelerates the progression of lung carcinoma via sponging microRNA-152 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(15): 6531–6538.
- [39] Chen Y, Shen TL, Ding XP, et al. HAGLROS is overexpressed and promotes non-small cell lung cancer migration and invasion [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2020, 50(9): 1058–1067.
- [40] Lheureux S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(4): 280–304.
- [41] Lv DZ, Xu K, Jin XY, et al. LncSpA: LncRNA spatial atlas of expression across normal and cancer tissues. [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(10): 2067–2071.
- [42] Choi SW, Kim HW, Nam JW. The small peptide world in long noncoding RNAs [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1853–1864.
- [43] Yang MQ, Zhai ZS, Zhang YF, et al. Clinical significance and oncogene function of long noncoding RNA HAGLROS overexpression in ovarian cancer [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2019, 300(3): 703–710.

[收稿日期]2021-05-31

陆丹丹, 韩晓燕, 张晗, 等. 类风湿性关节炎药理实验模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 107-114.
Lu DD, Han XY, Zhang H, et al. Research and progress of rheumatoid arthritis experimental models [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 107-114.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.05.016

类风湿性关节炎药理实验模型的研究进展

陆丹丹¹, 韩晓燕², 张晗¹, 李霖^{1*}, 房士明^{1*}

(1.天津中医药大学, 方剂学教育部重点实验室, 天津 301617; 2.天津中医药大学, 中药学院 天津 301617)

【摘要】 类风湿性关节炎是一种常见的自身免疫病, 以慢性滑膜炎和关节软骨及骨损伤为主要特点, 据中医对 RA 的判定, 属于“痹证”范畴。现有药理模型主要包括诱导性模型、自发性基因修饰模型及中医症候模型三大类, 本文对类风湿性关节炎药理实验模型进行综述, 并对实验模型的理论基础、典型特征、评价方法、主要用途以及和中西医临床病症吻合度进行总结, 同时梳理肠道菌群与类风湿性关节炎的关系, 为后续研究提供参考。

【关键词】 中医药; 类风湿性关节炎; 实验模型; 肠道菌群

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0107-08

Research and progress of rheumatoid arthritis experimental models

LU Dandan¹, HAN Xiaoyan², ZHANG Han¹, LI Lin^{1*}, FANG Shiming^{1*}

(1. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China. 2. College of Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617)

【Abstract】 Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease characterized by chronic synovial inflammation with joint cartilage and bone damage. Under Traditional Chinese Medicine, RA is categorized as a “Bi disease.” Various RA models have been developed, including induced model, spontaneous genetic modification model, and model of Traditional Chinese Medicine syndrome. These models were reviewed and summarized in terms of their theoretical basis, typical characteristics, evaluation method, main usages, and degree of agreement. This paper also deals with the relationship between intestinal flora and RA to provide a reference for follow-up research.

【Keywords】 Traditional Chinese Medicine; rheumatoid arthritis; experimental model; intestinal flora

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以滑膜炎为基本病理改变的自身免疫病, 中医认为“风、寒、湿三气杂至, 合而为痹”, 并根据疾病特点将 RA 归属于“痹症”“尪痹”等范畴, 在《内经》、《素问·痹论篇》等书中均有记载^[1]。据统计, RA 影响全球约 0.1%~2.0% 的人口, 在中国类风湿性关节炎的患病率约为 0.42%, 其中心血管合并症患

病率为 1.5%^[2-3]。类风湿性关节炎临床表现为手腕等小关节对称性、持续性活动受限且疼痛肿胀, 发病与气候、遗传、免疫及肠道菌群失衡具有相关性^[4]。

现代研究认为 RA 发病过程主要包括炎性细胞浸润滑膜, 造成滑膜增生并在滑膜腔中形成血管翳, 最终使关节软骨和骨质破坏^[5]。大量文献研究

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82994331); 天津市教委科研项目(2019KJ072)。

【作者简介】 陆丹丹(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 类风湿关节炎基础研究。E-mail: ml7863275903@163.com

【通信作者】 李霖(1990—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理学研究。E-mail: lilintcm@126.com

房士明(1980—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药效物质基础研究。E-mail: fang_shiming@163.com

* 共同通信作者

表明类风湿关节炎与免疫 T 细胞及 B 细胞亚群的聚集、促炎因子、趋化因子活化和表达等相关,但其深入确切的发病机理尚不完全明确^[6]。中医认为 RA 病机复杂,多与湿、热、瘀血等证紧密联系^[7]。

本文根据现代医学理论和传统中医辨证论治原则,从类风湿关节炎发病机制出发,分析几种关节炎实验模型,同时综述肠道菌群与 RA 的关系,希望能为类风湿研究选择合适的模型提供参考。

1 诱导性 RA 动物模型

在诱导模型中,非特异性免疫激活,软骨定向自身免疫或大量的外源、感染性诱因会引起类似 RA 样疾病,目前使用较多的该模型有胶原诱导关节炎、佐剂性关节炎模型。

1.1 胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型

CIA 是主动免疫诱导 RA 的经典模型。Ⅱ型胶原(collagen Ⅱ, CⅡ)乳剂制备方法是在 4℃ 条件下将Ⅱ型胶原溶于乙酸,灭活卡介苗置于液体石蜡中配成弗氏完全佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)。将二者等体积混合乳化至滴水不溶状态,制成 CII 乳剂^[8]。

小鼠(例如 DBA/1J 品系)造模方法是将 50 μL 含 2 mg/mL 牛Ⅱ型胶原的 CII 乳剂在尾根部皮内注射诱发关节炎,于 18 d 后用含有弗氏不完全佐剂(incomplete freund's adjuvant, IFA)的 CII 乳剂同法注射加强免疫^[9]。小鼠 CIA 模型病变情况可由关节肿胀度测量,关节炎评分和关节病理变化确定^[10]。小鼠关节肿胀度和关节炎评分增加,关节组织中出现炎性细胞浸润、滑膜增厚等可提示造模成功^[11]。此模型可用于 RA 新药物预防、治疗作用检测和细胞因子(IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α)等治疗靶点的检测^[12]。有研究发现 DBA/1 小鼠中 CIA 的严重程度和发病率可以通过 CII 与 CFA, IFA 和 LPS 的组合变化来控制,结果显示使用 LPS 可以增加关节炎严重程度^[13]。

大鼠 CIA 模型的制备方法是在距离大鼠尾根部 4 cm 处皮下注射 CII 乳剂(1 mg/mL) 200 μL,注射后按压针孔防止乳液流出,于 7 d 后采用同样方法在距离尾根 2 cm 处皮下注射 CII 乳剂 100 μL。若大鼠炎症评分、关节肿胀度均显著增高,痛域显著降低则提示造模成功^[14]。CIA 所致关节炎可探究 Th17/Treg(辅助性 T 细胞/调节性 T 细胞)失衡

在 RA 中的作用,但模型在疾病的发生率、同步性和分布方面存在个体差异^[15]。国外学者借助 CIA 大鼠模型,通过显微计算机断层扫描技术(micro-computed tomography, Micro-CT)、骨组织学检查评估骨密度,定量 ELISA 分析肌腱组织中促炎因子(TNF-α、IL-23)的方法,得出英夫利昔单抗(infliximab)可以预防关节炎相关的骨质疏松症,抑制其肌腱损伤的结论^[16]。

1.2 佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)模型

AA 大鼠发病原理是诱导后的大鼠会产生针对于热休克蛋白 65(heat shock protein 65, HSP65)的 T 细胞和抗体反应^[17]。常选用 Lewis 大鼠建立 AA 模型,对大鼠尾根部或足垫皮内注射 0.1 mL 含有热灭活分枝杆菌(10 mg/mL)的 CFA^[18]。模型制备成功的标志是大鼠自造模两周左右开始发病,炎症以踝关节为重,并累及全足,第 18 天左右达到炎症高峰;在关节炎发展过程中同时伴有毛色暗淡、易脱毛和体重减轻等表现^[19]。在大多数情况下,AA 关节炎的肿胀程度不对称,其中一只足关节的发炎程度高于对侧^[20]。AA 操作非常简单,具有明显的细胞免疫异常特征,缺乏慢性病过程^[21]。Bao 等^[22]利用 AA 模型,蛋白质印迹和免疫组化等分析方法确定 JAK/STAT 和 NF-κB 信号通路中蛋白质的表达和磷酸化水平,发现芫花素(genkwanin)能够抑制 AA 大鼠滑膜组织中 JAK/STAT 和 NF-κB 信号通路的激活。

1.3 蛋白多糖诱导的关节炎(proteoglycan-induced arthritis, PGIA)模型

在关节滑液中注射蛋白多糖抗原引发 T 细胞慢性依赖性自身免疫反应,导致慢性炎症、关节破坏和轴骨受累^[23]。Horváth 等^[24]选取 8~12 周龄的雌性 BALB/c 小鼠,将 PG 核心蛋白乳化剂每隔 3 周对小鼠 3 次腹腔注射来完成造模。整个实验周期较为缓慢,约需 17 周完成。小鼠初期以急性炎性水肿和滑膜炎为特征,随后表现为骨和软骨吸收,最后进展为广泛的关节强直。此造模方法的局限所在是人类软骨必须经过广泛的加工才能制备所需的蛋白多糖组分。Liu 等^[25]用肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)阻滞剂对 PGIA 中肠道菌群进行干预影响发现抗 TNF-α 疗法减缓了 PGIA 进程,起到调节肠道菌群和肠屏障功能的作用。

1.4 链球菌细胞壁诱导的关节炎(streptococcal cell wall-induced arthritis, SCWA)模型

链球菌产生一种具有较高炎症活性的肽聚糖

多糖 (peptidoglycan-polysaccharide, PG-PS), 可以诱导易感大小鼠形成关节炎^[26]。方法是在第 0、7、14 和 21 天, 向右后足关节内注射包含细胞壁肽聚糖多糖片段的混悬液诱发单侧慢性关节炎, 在第 8、15 和 22 天再次关节内注射激活致发炎。第 1 天和第 2 天为急性非 T 细胞依赖期, 第 23~28 天为慢性 T 细胞依赖期^[27]。此模型有助于研究关节炎的急性反应, 但这类动物模型使用频率较低, 可能是因其使用成本和操作要求较高^[28]。Jain 等^[29] 利用 SCWA 模型研究姜黄素-双氯芬酸共轭物 (curcumin-diclofenac conjugate, CDC) 体外抗炎活性, 发现其显著减轻了 SCWA 模型的关节炎症状。

1.5 降植烷诱导的关节炎 (proteoglycan-induced arthritis, PIA) 模型

降植烷是一种非免疫原性化学物质, 在 DA (Dark-Agouti) 大鼠尾部单次皮下注射 300 μ L 降植烷纯品, 于 50 d 后再次同法注射以诱发关节炎, 每隔 1 周进行如上常规检测, 大鼠出现足容积增加、关节活动障碍等表现提示造模成功^[30]。该炎症为 T 细胞依赖型, 主要用来药物验证, 也可用于分析类风湿关节炎发病相关的性别差异情况。有研究指出大鼠关节炎 PIA 模型可用于模拟 RA 中的血管功能障碍和脂质受损情况^[31]。

1.6 抗原诱导的关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA) 模型

此模型建立原理是甲基化的牛血清白蛋白 (methylated bovine serum albumin, m-BSA) 与免疫球蛋白 G Fc 段受体 (Fc γ R) 结合, 从而有效激活针对 m-BSA 的 T 细胞应答。造模过程是将 100 μ g m-BSA 在 CFA 中 1:1 乳化对小鼠进行免疫, 每隔 1 周在颈部进行两次皮下注射 m-BSA/CFA 作为加强剂量, 于 3 周后通过关节内注射 10 μ g/ μ L m-BSA 生理盐水混悬液诱发关节炎^[32]。AIA 模型的特征是明显的 T 细胞受累且不影响对侧关节。Frey 等^[33] 借助 AIA 模型分析成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synovial cells, FLS) 对慢性关节炎致病作用的分子机制, 结果表明从 AIA 急性期的小鼠中分离出的 FLS 能够在受体中诱发炎症和关节破坏。

1.7 葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose 6-phosphate isomerase, G6PI) 诱导的关节炎模型

该模型建立的发病机制是 G6PI 能够在体内产生抗体, 通过诱导免疫活性细胞产生细胞因子 (如

TNF- α 、IL-1 β), 从而诱发关节炎。造模方法是将 400 μ g 重组人 G6PI 在完全弗氏佐剂中 1:1 乳化, 并将该乳剂皮下注射于小鼠体内进行免疫^[34]。基于免疫前 Treg 细胞的耗竭将自限性关节炎转变为具有明显骨破坏的不缓解性关节炎理论, 有学者利用 G6PI 诱导的关节炎模型进行研究发现感觉神经元的分子标志物转录激活因子 3 (activating transcription factor 3, ATF-3) 上调对感觉神经元有早期性和持续性影响^[35]。

2 自发性基因修饰 RA 动物模型

该模型建立基础是小鼠在经过一定的基因修饰后可以自发形成关节炎, 该模型有利于了解类似于人类 RA 的慢性病过程。

2.1 K/BxN 小鼠模型

将来自转基因 K/BxN 小鼠中含有 G6PI 致病性自身抗体的血清注射到 C57BL/6 幼鼠诱发 RA^[36]。K/BxN 血清诱导的关节炎模型制备: 将雄性 KRN 鼠与雌性 NOD 鼠合笼饲养, 所生的第一代小鼠即为 K/BxN 小鼠。采集 2~6 月龄 K/BxN 小鼠静脉血清。将不同 K/BxN 小鼠的血清混合后分别在第 0 天和第 2 天尾静脉注射至 8 周龄 C57BL/6 小鼠以制备 K/BxN 小鼠模型。小鼠踝关节肿胀程度严重, 且 HE 染色显示关节腔隙变窄、炎症细胞浸润则提示造模成功^[37]。此模型的特点是在广泛应变背景下诱导, 且关节炎发病迅速, 发病率 100%, 可用于研究干扰素等治疗 RA 的相关机制。Bopp 等^[38] 首次在 K/BxN 小鼠模型中描述了颞下颌关节 (temporomandibular joint, TMJ) 损坏, 得出了侵蚀性变化主要发生在关节软骨的浅表部分, 进而导致 TMJ 软骨纤维层消失的结论。

2.2 人 TNF 基因 (the human tumor necrosis factor gene, HTNFG) 小鼠模型

通过构建人类 TNF 转基因小鼠, 表现出人类 TNF 基因表达的失调模式进而发展为慢性炎性多关节炎。方法是将含有 3' 端修饰后的完整人类 TNF 基因的片段整合到 CBA 与 C57BL/6 杂交第 2 代小鼠受精卵内, 待小鼠 3~4 周龄时可观察到踝关节肿胀, 继而 9~10 周腿部运动障碍发展为完全丧失后腿的运动能力。不同于 AA、CIA 模型, TNF- α 转基因小鼠能自发性出现关节炎, 与人 RA 的关节破坏更为相似^[39]。有学者使用该模型来确定 RA 炎症进展是否受到 RANKL (receptor activator of

NF- κ B ligand, NF- κ B 配体的受体激活剂)的基因失活或过表达的影响,发现 RANKL 不仅可以作为破骨细胞生成和骨吸收的介质,而且可以作为影响炎症和免疫激活的疾病调节剂来调节关节炎^[40]。

2.3 SKG 小鼠模型

SKG 小鼠是一种 BALB/c 小鼠,其编码 70×10^3 zeta 相关蛋白(ZAP-70) Src 同源 2 结构域的基因发生突变,进而形成慢性自身免疫性关节炎^[41]。方法是将溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS pH=7.2~7.4)溶液的甘露聚糖腹腔注射于 16 周龄 SKG 雌性小鼠诱发关节炎。通过组织病理学评分发现,滑膜细胞多层次增生,关节腔内有单核细胞和中性粒细胞浸润、血管紧张素形成和富含营养的粒细胞渗出表明造模成功^[42]。Jeong 等^[43]为评估酵母聚糖诱导的 SKG 小鼠的临床和分子特征,利用酵母聚糖诱导的 SKG 小鼠模型来反映人脊柱关节炎(spondyloarthritis, SpA)的复杂特征。

3 中医症候 RA 动物模型

在 RA 疾病动物模型的基础上,施加风寒湿、风湿热等外部刺激建立病证结合的 RA 动物模型,或直接在痹症理论上建立中医动物模型以探究 RA 病因病机。

3.1 AA 模型基础上的风寒湿痹模型

朱兴旺^[44]通过实验表明风寒湿环境可能加重关节滑膜缺氧,刺激缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)表达,造成 RA 滑膜细胞和新生血管生成,从而产生或加重 RA 滑膜病变。造模方法是在造模的第 0 天,每只大鼠左后足跖皮内注射 0.1 mL CFA,造模 7 d 后再注射 0.1 mL 加强免疫,建立 AA 大鼠模型,并将大鼠置于 5~7℃ 冷水中,水深 2 cm,伴以 3 档风力,每日 1 次,每次 20 min,连续 14 d。大鼠右后足垫致炎后肿胀明显,致炎后关节炎指数评分显著升高,提示造模成功^[45]。

3.2 AA 模型基础上的风湿热痹模型

该模型建立的理论基础是风湿热环境可能使 HSP 大量分泌,部分 HSP 被瓜氨酸化进而激活免疫系统产生抗瓜氨酸抗体,从而激活或加重炎症^[44]。除将大鼠置于 36℃~38℃ 热水中,其余条件及结果观察同上述风寒湿痹模型。

3.3 风、湿、寒、热诱导的关节炎模型(wind-damp-cold-heat induced arthritis, WDCH)

造模方法是将大鼠的后足分别在 45℃ 和 4℃ 的

恒定温度下放入水中 10 min,然后在 20℃ 的温度下用风吹动大鼠 10 min,每天 2 次,共 14 d。通过血细胞分析、脾和胸腺系数、自身抗体和血清细胞因子变化对其进行评估。大鼠滑膜中 TNF- α 和血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)表达水平升高,可表明关节炎和血管生成的发生,提示 WDCH 的变化可能是 RA 发病的关键因素^[46]。模型的主要特点是通过外界压力来感染疾病,模拟自然环境变化。该模型具有客观性,建模时间短,自身抗体表达水平极高和明显的组织病理学改变等优点。

4 潜在新型类风湿实验模型建立

近年来,有学者发现类风湿性关节炎作为一种粘膜疾病,有 3 个部位与其有关,即肺、口腔粘膜和胃肠道^[47]。其中肠道菌群被认为是类风湿性关节炎发展的重要环境因素^[48],研究表明类风湿性关节炎患者的肠道微生物多样性降低,与 RA 持续时间和自身抗体水平相关^[49]。闫梦真等^[37]通过研究发现肠道菌群失调可诱导关节组织炎症因子水平增高。肠道营养不良可以通过影响 T 细胞亚群的分化来诱发关节炎,并可能导致 Th17/Treg 细胞比例失衡^[50]。有学者借助 CIA 小鼠模型分析肠道微生物群及肠黏膜变化,结果发现肠道菌群失调可以影响小鼠疾病严重程度,在诱导 CIA 之前微生物群的消耗可导致疾病严重程度降低约 40%,诱导 CIA 后期微生物消耗则导致疾病严重程度降低 90%以上^[51]。肠道菌群的变化是现在研究 RA 新发病机制的重要思路,未来可尝试依据肠道菌群混乱诱发建立类风湿性关节炎模型,帮助探究类风湿性关节炎相关发病机制。

5 总结

目前 RA 发病机制还未完全研究清楚,临床治疗主要以控制症状,延缓关节破坏,减少并发症进而提高生活质量为目的。因此,为更好地开发新的 RA 治疗策略,需依据不同的理论和发病机制建立 RA 药理模型,并根据 RA 分型选用合适的动物模型。其中 CIA 模型和 AA 模型应用较为广泛,在 CIA、AA 基础上建立的病症结合模型在中医药基础研究中也日益受到重视。上述几类造模方法中均以出现关节发红肿胀、关节病理改变等为主要标准,与中西医临床诊断标准中的部分内容(例如晨僵、RF 阳性等现象)有一定差别。

表 1 类风湿关节炎实验模型与中西医临床病症吻合度

Table 1 Coincidence between experimental model of rheumatoid arthritis and the clinical symptoms of Chinese and western medicine

分类 Classification	模型 Model	理论基础 Theoretical basis	模型典型特征 Typical characteristics of model	评价方法 Evaluation methods	主要用途 Main applications	吻合度 Degree of agreement
诱导性模型 Induced model	胶原诱导的关节炎模型 CIA model	诱导型免疫 Induced immunity	无类风湿因子及抗核抗体等关节外表现 No extra-articular manifestations such as rheumatoid factor and antinuclear antibodies	踝关节肿胀、痛阈检测、组织学分析(炎症细胞浸润、滑膜增生、血管翳形成软骨破坏和骨质侵蚀)、自身抗体和血清细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-17、TNF- α)水平、影像学检查(X线、CT)、关节炎指数评分、体重变化。Swelling of the ankles, pain threshold detection, histological analysis (infiltration of inflammatory cells, synovial hyperplasia, pannus formation, cartilage destruction and bone erosion),	最常用,例如涉及 Th1, Th17 和 Th1/17 细胞研究 Most commonly used, involving Th1, Th17 and Th1/17 cell research	高 High
	佐剂性关节炎模型 AA model		由 T 细胞驱动的慢性全身性自身免疫 Chronic and systemic autoimmune driven by T cells		T 细胞分子机制、抗 RA 药物筛选及药效机制研究 Research of T cell molecular mechanism, anti-RA drug screening and pharmacodynamic mechanism	高 High
	蛋白多糖诱导关节炎模型 PGIA model		初期急性炎性水肿和滑膜炎,接着骨和软骨吸收,最后为广泛的关节强直 The initial phase is characterized by acute inflammatory edema and synovitis, which is followed by bone and cartilage resorption, and it finally progresses into widespread ankylosis of the joints		多用于脊柱炎研究 Mostly used for spondylitis research	低 Low
	链球菌细胞壁诱导的关节炎模型 SCWA model		初期为急性非 T 细胞依赖期,后期为慢性 T 细胞依赖期 The initial phase is the acute T cell-independent, and the latter phase is the chronic T cell-dependent		RA 急性发作反应过程及炎症细胞因子、生长因子变化研究 Research of the acute reaction in arthritis, the changes of inflammatory cytokines and growth factors	中 Medium
	降植烷诱导的关节炎模型 PIA model		T 细胞依赖型;造模周期较长 T cell-dependent; Long molding cycle		RA 的发病机制及其临床研究 Research of the pathogenesis and clinical treatments of RA	高 High
	抗原诱导的关节炎模型 AIA model		明显的 T 细胞受累;不影响对侧无炎症侧关节 Clear T-cell involvement; The contralateral joint without inflammation is not affected		生物制剂疗效研究 Research of the efficacy of biological agents	中 Medium
自发性基因修饰模型 Spontaneous genetic modification model	葡萄糖-6-磷酸异构酶的诱导关节炎模型 G6PI model	自发型免疫 Spontaneous immunity	骨破坏明显 Obvious bone destruction		RA 发展过程、分子标志物研究 Research of the development, molecular markers of RA	高 High
	K/BxN 小鼠模型 K/BxN mouse model		在广泛的应变背景下诱导 Induced in a wide range of strain backgrounds		分子生物层面上的病因病机研究 Research of the etiology and pathogenesis at the molecular biology level	中 Medium
	人 TNF 基因小鼠模型 HTNFG model		自发性出现侵蚀性关节炎 Spontaneous appearance of erosive arthritis			高 High

续表 1

分类 Classification	模型 Model	理论基础 Theoretical basis	模型典型特征 Typical characteristics of model	评价方法 Evaluation methods	主要用途 Main applications	吻合度 Degree of agreement
中医症候模型 Model of TCM syndrome	SKG 小鼠模型 SKG mouse model	病证结合 Disease and syndrome combined	呈慢性进行性发展,后期为关节强直 Develops chronically, and the latter phase is ankylosis of the joints	analysis of coefficients of spleen and thymus, levels of autoantibodies and serum cytokines (IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α), imaging examinations (X-ray and CT), arthritic index score, weight changes.	中医痹症病因病机理论及中医药开发研究 Research of the etiology and pathogenesis theory of arthralgia and the development of TCM	中 Medium
	风寒湿痹模型 Wind-cold-damp model		体现中医学“证”的特色 Reflect the characteristics of Chinese medicine ‘ syndrome ’			高 High
	风湿热痹模型 Wind-damp-heat model	中医理论 Theory of Chinese medicine	人体通过压力感染疾病;模拟自然环境的变化 The human body infects diseases through stress, simulating changes in the natural environment			中 Medium
	风湿寒热诱导的关节炎模型 WDCH mode					中 Medium

动物模型与临床应用的接近程度有助于 RA 相关炎症及自身免疫的基础研究。因此,动物模型特征及评价方法与中西医临床诊断标准的吻合度^[52]至关重要(表 1),例如吻合度较高的模型有:AA 模型、人 TNF 基因小鼠模型和风寒湿痹证模型等。其中 AA 模型具有多处关节对称性肿胀、类风湿因子阳性及骨质侵蚀破坏等特征,与西医诊疗标准吻合度较高。而风寒湿痹模型则在满足西医诊疗标准的基础上体现了中医 RA 临床辨证分型,具有一定应用价值。简化模型评价方法从而提高与临床应用的吻合度是未来动物模型发展的重要方向,如 Micro-CT 技术在定量评价骨密度及骨结构等方面较为权威,且多适用于疾病的临床前研究,可作为模型评价的重要指标之一。除此之外,肠道菌群与 RA 的发生、发展及治疗有很大相关性,未来可通过矫正肠道微生物混乱来保护骨关节免受破坏,也可通过舌象与肠道微生物的联系进而建立新型动物模型来探寻治疗 RA 的新策略。然而针对中医临床症状如舌象、脉象等情况不易在动物身上被观察,为满足今后研究,还需深入研究中医证候的内涵,同时契合现代医学病因来选择和建立模型。

参考文献:

[1] 葛高月,郑新春. 类风湿关节炎中西医治疗进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 23(2): 84-89.
[2] Jin SY, Li MT, Fang YF, et al. Chinese registry of rheumatoid arthritis (CREDIT): II. prevalence and risk factors of major

comorbidities in Chinese patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19: 251-259.
[3] Almutairi K, Nossent J, Preen D, et al. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review [J]. Rheumatol Int, 2021, 41(5): 863-877.
[4] Aryaeian N, Shahram F, Mahmoudi M, et al. The effect of ginger supplementation on some immunity and inflammation intermediate genes expression in patients with active rheumatoid arthritis [J]. Gene, 2019, 698: 179-185.
[5] Meng C, Li Z, Zheng Z, et al. Intervention of integrative medicine treatment has impact on serum levels of ET-1, TNF-α, MLT in RA-CVD [J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(5): 959-964.
[6] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2016, 388(10055): 2023-2038.
[7] 刘蔚翔, 巩勋, 姜泉, 等. 类风湿关节炎湿热与寒湿证候的病情特点分析 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 1088-1091.
[8] Pietrisimone KM, Jin M, Poston B, et al. Collagen-induced arthritis: a model for murine autoimmune arthritis [J]. Bio Protoc, 2015, 5(20): e1206.
[9] Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2018, 9(3): 603-612.
[10] Zhou X, Liu Q, Zhou X, et al. THH relieves CIA inflammation by reducing inflammatory-related cytokines [J]. Cell Biochem Biophys, 2020, 78(3): 367-374.
[11] 吴兴源, 张国如. 粉防己碱通过 NF-κB 和 MAPK 信号通路影响人滑膜细胞炎症及对类风湿性关节炎治疗作用研究 [J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(9): 1636-1641.
[12] Tsai SW, Hsieh MC, Li S, et al. Therapeutic potential of sclareol

- in experimental models of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1351–1366.
- [13] Thornton S, Strait RT. Head-to-head comparison of protocol modifications for the generation of collagen-induced arthritis in a specific-pathogen free facility using DBA/1 mice [J]. *Biotechniques*, 2016, 60(3): 119–128.
- [14] 黄琳, 周东海, 何志兴, 等. 运脾祛风除湿方对胶原诱导性关节炎模型大鼠的影响 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2020, 44(10): 929–934.
- [15] Jin S, Chen H, Li Y, et al. Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis through miR-21 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(11): 1644–1652.
- [16] Poutoglidou F, Pourzitaki C, Manthou ME, et al. Infliximab prevents systemic bone loss and suppresses tendon inflammation in a collagen-induced arthritis rat model [J]. *Inflammopharmacology*, 2021, 29(3): 661–672.
- [17] Eden WV, Tholet J, Zee R, et al. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis [J]. *Nature*, 1988, 331(6152): 171–173.
- [18] Zhang Y, Qian X, Yang X, et al. ASIC1a induces synovial inflammation via the Ca^{2+} /NFATc3/RANTES pathway [J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 247–264.
- [19] 张巍, 王芳, 王博, 等. 佐剂诱导关节炎大鼠模型的建立及成纤维样滑膜细胞的分离 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(6): 73–77.
- [20] Fechtner S, Singh AK, Srivastava I, et al. Cannabinoid receptor 2 agonist JWH-015 inhibits interleukin-1 β -induced inflammation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and in adjuvant induced arthritis rat via glucocorticoid receptor [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1027–1039.
- [21] 刘琪, 张巧琳, 陈晓芸, 等. 性别差异对大鼠佐剂性关节炎模型的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(9): 1328–1332.
- [22] Bao Y, Sun YW, Ji J, et al. Genkwanin ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats through inhibiting JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153036.
- [23] Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis; immune regulation, cellular mechanisms, and genetics [J]. *Crit Rev Immunol*, 2003, 23(3): 199–250.
- [24] Horváth Á, Borbély É, Bölskei K, et al. Regulatory role of capsaicin-sensitive peptidergic sensory nerves in the proteoglycan-induced autoimmune arthritis model of the mouse [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 335–347.
- [25] Liu B, Yang L, Cui Z, et al. Anti-TNF- α therapy alters the gut microbiota in proteoglycan-induced ankylosing spondylitis in mice [J]. *Microbiologyopen*, 2019, 8(12): e927.
- [26] 郝建权. 鼠源 IL-1 β 基因的克隆、表达、活性鉴定及类风湿关节炎动物模型的建立 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [27] Anita F, Shahla AR, Christina B, et al. The involvement of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of erosive autoimmune arthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(9): 4399–4409.
- [28] Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2192–2205.
- [29] Jain SK, Gill MS, Pawar HS, et al. Novel curcumin diclofenac conjugate enhanced curcumin bioavailability and efficacy in streptococcal cell wall-induced arthritis [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2014, 76(5): 415–422.
- [30] 张利文, 文凯, 袁泉. 降植烷诱导的 DA 大鼠类风湿性关节炎模型的建立和评估 [J]. *现代医学*, 2013, 41(1): 1–5.
- [31] Chouk M, Bordy R, Moretto J, et al. Pristane-induced arthritis in dark agouti rat is a relevant model for mimicking vascular dysfunction and lipid paradox in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2019, 86(4): 483–490.
- [32] Ceglie DI, Ascone G, Cremers NAJ, et al. Fc γ receptor-mediated influx of S100A8/A9-producing neutrophils as inducer of bone erosion during antigen-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20: 80–95.
- [33] Frey O, Huckel M, Gajda M, et al. Induction of chronic destructive arthritis in SCID mice by arthritogenic fibroblast-like synoviocytes derived from mice with antigen-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20: 261–270.
- [34] Lu Y, Yu SS, Zong M, et al. Glucose-6-phosphate isomerase (G6PI) mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40274.
- [35] Ebbinghaus M, Muller S, Banchet GSV, et al. Contribution of inflammation and bone destruction to pain in arthritis—a study in murine glucosephosphate isomerase (G6PI) induced arthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(12): 2016–2026.
- [36] Christensen AD, Haase C, Cook AD, et al. K/BxN serum-transfer arthritis as a model for human inflammatory arthritis [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(5): 213–230.
- [37] 闫梦真, 余婕, 董甜甜, 等. 由肠道菌群变化研究资本瓜总苷对 K/BxN 小鼠血清转移性关节炎的治疗作用 [J]. *现代免疫学*, 2020, 40(4): 265–271.
- [38] Bopp KS, Mariotte A, Strub M, et al. Temporomandibular joint damage in K/BxN arthritic mice [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12: 5–14.
- [39] 朱兴旺, 赵文婷, 陈永, 等. 三水白虎汤对类风湿关节炎人 TNF- α 转基因小鼠模型的作用研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(4): 480–484.
- [40] Papadaki M, Rintas V, Violitzi F, et al. New insights for RANKL as a proinflammatory modulator in modeled inflammatory arthritis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 97–116.
- [41] Rahman MA, Thomas R. The SKG model of spondyloarthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2018, 31(6): 895–909.
- [42] Kustiarini DA, Nishigaki T, Kanno H, et al. Effects of morinda citrifolia on rheumatoid arthritis in SKG mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(3): 496–500.
- [43] Jeong H, Bae EK, Kim H, et al. Spondyloarthritis features in zymosan-induced SKG mice [J]. *Joint Bone Spine*, 2018, 85(5): 583–591.
- [44] 朱兴旺. 人工环境诱导类风湿关节炎寒痹与热痹动物模型的实验研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2020.

- [45] 徐杰, 王宝成, 姜文月, 等. 活络止痛丸对风湿痹症模型大鼠的治疗作用及机制研究 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16(3): 11-14.
- [46] Ge C, Hao J, Wu X, et al. A novel arthritis model induced by wind, damp, cold and heat in female rats [J]. Lab Anim, 2020, 54(5): 433-442.
- [47] Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Immunity, 2017, 46(2): 183-196.
- [48] Maeda Y, Takada K. Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(12): 150-156.
- [49] Chen J, Wright K, Davis JM, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis [J]. Genome Med, 2016, 8: 43-57.
- [50] Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(10): 569-578.
- [51] Jubair WK, Hendrickson JD, Severs EL, et al. Modulation of inflammatory arthritis in mice by gut microbiota through mucosal inflammation and autoantibody generation [J]. Arthritis Rheumatol, 2018, 70(8): 1220-1233.
- [52] 黄淑敏, 钟森杰, 廖晓倩, 等. 基于中西医临床病症特点的类风湿性关节炎动物模型分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 5152-5158.

[收稿日期]2021-07-12

TRDMT1 通过 TLR4-NF- κ B/MAPK-TNF- α 通路对大鼠 LPS 诱导的炎症表现出保护作用

炎症是一种系统性适应性的反应状态,常由刺激和损伤等条件引发,是机体借助免疫系统对内外变化做出的综合性反应。目前有大量研究将 TRDMT1 与压力应激联系起来,TRDMT1 在炎症反应中发挥的生物学作用尚不清楚。

为了探究 TRDMT1 是否对炎症过程敏感及其在炎症进程中是否发挥作用,北京协和医学院-中国医学科学院医学实验动物研究所马元武副研究员率领的研究团队构建了 Trdmt1 敲除大鼠,这些大鼠正常状态下生长、发育、生存与野生大鼠没有明显差异。在 LPS(炎症的常用诱发因素)作用后,Trdmt1 敲除大鼠的死亡率明显上升,组织损伤加剧,产生促炎因子水平显著升高,抗炎因子水平明显降低,还出现了 TLR4 通路的上调。此外,研究也对稳态及 LPS 刺激下可能发生的代偿机制进行了探索。

本项研究首次揭示了 TRDMT1 与炎症进程存在联系,并为理解 TRDMT1 和压力应激的关系进一步提供了新视野,并可能为临床败血症的治疗等过程给予新思路。

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(2):172-182; <https://doi.org/10.1002/ame2.12221>)。

胡建英, 狄娟, 曹亿会, 等. 空气污染对男性生育能力的影响及其机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 115-120.
Hu JY, Di J, Cao YH, et al. Effects of air pollution on male fertility and associated mechanisms [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 115-120.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 017

空气污染对男性生育能力的影响及其机制

胡建英¹, 狄娟², 曹亿会³, 张瑞仙^{4*}

(1. 云南省疾病预防控制中心 免疫规划所, 昆明 650022; 2. 云南省疾病预防控制中心 环境卫生所, 昆明 650022;
3. 云南省疾病预防控制中心 急性传染病防制所, 昆明 650022; 4. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院
疾病预防控制科, 昆明 650034)

【摘要】 空气污染不仅影响精子质量, 如精子数量、浓度、活力、进行性运动、形态等物理特性, 同时影响精子基因组, 如 DFI、染色体畸形等; 而且, 空气污染还可能通过影响体内睾酮水平甚至睾丸组织细胞, 进而影响男性生育能力。本研究从流行病学的人群研究和实验室的动物研究进行总结, 并将空气污染物影响精子发育的机制归纳为 4 种: 作为内分泌干扰物、诱导活性氧产生、血睾屏障破坏和 DNA 突变、表观遗传修饰。同时, 最新研究也提出了具有保护精子发育作用的药物。

【关键词】 空气污染; 精子质量; 氧化应激; 表观遗传修饰

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0115-06

Effects of air pollution on male fertility and associated mechanisms

HU Jianying¹, DI Juan², CAO Yihui³, ZHANG Ruixian^{4*}

(1. Institute for Immunization Program, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China.
2. Institute of Environment-related Health, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022.
3. Institute for Acute Infectious Diseases Control and Prevention, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming, 650022. 4. Department of Disease Control and Prevention, the First People's Hospital of Yunnan Province, the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming 650034)

【Abstract】 Air pollution affects not only sperm quality, such as the amount of sperm, sperm concentration, motility, progressive movement, morphology and other physical characteristics, but also the sperm genome, such as DNA fragmentation index and chromosome integrity. Air pollution has also been shown to influence male fertility by affecting the testosterone level or even testicular tissue cells. This review summarizes these issues on two levels: epidemiologically at the population level and from findings in animal research. This review also presents four possible mechanisms by which air pollutants affect spermatogenesis and development: as endocrine disruptors, by inducing reactive oxygen species, by destroying the blood-testosterone barrier, and by causing DNA mutations and epigenetic modifications. Finally, this review surveys recent studies suggesting medicines that have protective effects on sperm development.

【Keywords】 air pollution; sperm quality; oxidative stress; epigenetic modification

世界卫生组织 (world health organization, WHO) 报道, 2016 年, 全球 91% 的人生活之处, 空气质量均未达到 WHO 空气质量指南水平^[1]。该指南指出, 空

气污染是威胁健康的重要环境风险因素, 不仅使中风、心脏病、癌症等多种疾病负担加重, 对生殖细胞的损害, 也是近年来生育率下降的重要原因^[2], 尤

【基金项目】 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82060305); 云南省应用基础研究计划项目 (青年项目) (2017FD004)。

【作者简介】 胡建英 (1981—), 女, 主管技师, 学士, 研究方向: 微生物检验。E-mail: 84124341@qq.com

【通信作者】 张瑞仙 (1980—), 女, 副主任医师, 博士, 研究方向: 公共卫生。E-mail: 41250668@qq.com

其在工业化国家^[3-5]。本综述重点关注空气污染对男性不育的影响及其发生机制的研究进展,将从宏观流行病学和微观分子生物学两个层次着手,总结论述空气污染对男性不育的影响及其分子机制。

1 环境污染影响男性不育的流行病学研究

衡量男性生育能力最重要、最直接的指标是精子质量,也有研究关注体内激素水平、甚或睾丸相关细胞等。精子质量参数主要包括:精子数量和/或精子浓度(精子浓度=精子数量/精液量)、总活力、进行性运动(progressive motility, PrM)、非进行性运动(non-progressive motility, NPrM)、正常形态精子率;也有研究指向精子基因如 DNA 碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)、染色质变化等。

1.1 PM 污染与精子质量

意大利一项为期 6 年的研究,将空气污染物监测数据与谷歌地图程序对研究对象的地理编码相结合,发现环境颗粒物(particulate matter, PM)浓度与精子的 PrM 能力呈负相。而 PM 与精子的 NPrM 和正常形态精子比例(normal, Nor)则呈正相^[6]。Bosco 等^[7]研究发现,职业性污染 PM_{2.5}和 PM₁₀环境中,育龄男性的精子数量、浓度、线性进行性运动精子比例并未发现差异,而静止精子比例则显著降低。

以上国外研究中,PM 对精子质量影响的研究结论存在争议,国内也类似。如香港大学 Lao 等^[8]利用基于卫星导出的气溶胶光学深度数据的时空模型,对台湾 6475 名 15~49 岁男性参与者精子质量研究,发现 2 年平均空气 PM_{2.5}每增加 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$,精子正常形态率下降 1.29%、而精液浓度每毫升提高 1.03×10^6 个;3 个月的空气质量变化数据结果类似,精子正常形态率下降 0.91%、精液浓度变化量同前。因此认为,长期和短期 PM_{2.5}暴露,均与正常形态精子数减少、精液浓度升高相关。另外,武汉和淮安所进行的研究均提示,PM_{2.5}和 PM₁₀暴露与精子数量减少、浓度下降均呈负相关^[9-10];然而,此两项研究关于 PM 对精子活力的影响则不同,前者认为两者无关^[9],后者则认为 PM₁₀暴露与精子活力下降有关^[10]。相反,Zhou 等^[11]对不育男性患者的研究发现,PM 暴露对精子浓度有积极影响,然而,PM₁₀暴露与精子正常形态比例下降、活力下降有关。淮安市研究还发现,PM_{2.5}和 PM₁₀对精液质量不利影响的敏感期在精子形成的早中期;故鉴于空气污染的普遍存在,为促进生殖健康,提高精液质

量,提出采取预防措施应于受孕 90 d 前就开始,而不仅仅在精子形成阶段(如射精前 70~90 d)^[10]。

1.2 多种空气污染物与精子质量

国内外均有部分研究将时空结合,较为真实地反应了空气污染与精子质量的相关性;从研究设计来看,前瞻性研究可提高因果关系的可靠性,如一项在健康捐精者中进行的研究,发现 4 种空气污染物(O₃、NO₂、CO 和 PM₁₀)中,只有 O₃ 暴露对精子参数有显著影响,且暴露的不同阶段,对精子的影响也不同:精液收集前 0~9 d,若空气 O₃ 浓度增加,则精子浓度下降;若 10~14 d 或 70~90 d 时,O₃ 与精子浓度变化关系不明显^[12]。同样是多种空气污染物与精子质量参数的相关报道,Radwan 等^[13]在波兰进行的研究认为,暴露于空气污染物 PM₁₀、PM_{2.5}、SO₂、NO_x、CO 均与精子形态异常相关,但对精子浓度和活力却均无影响^[13]。捷克学者则认为与非产煤地区相比,产煤地区空气对男性精子活动性有显著的负面影响,而且,空气污染与精子及其头部形态异常比例增高显著相关,但并未发现其对精子总数有影响^[14]。

我国有学者也持续关注该领域,多年来从不同维度报道了空气污染与精子质量的关系,首先比较了空气污染程度较轻的农村与污染较重的城市,发现农村居民精液质量较城市者更好,特别是精子形态;其次,不仅外暴露的 PM₁₀、SO₂、NO₂ 浓度与研究对象正常精子形态百分比分别显著负相关,而且,PM₁₀和 NO₂ 均与精子运动速率显著负相关,提示 PM₁₀、SO₂、NO₂ 可能是城市男性精液质量较差的重要影响因素^[11]。近年在同一地区的深入研究发现,较差的空气质量可能与精子氧化损伤有关,特别是在精子发育的特定时期暴露于 SO₂ 中^[15]。对此,如果能够持续追踪,并观察研究对象的生育能力,则可得出更有意义的结论。

1.3 特定空气污染与精子质量

空气污染的一个主要来源是汽车尾气,已有不少研究关注暴露于尾气中的职业人员,如高速公路上的收费员(暴露于汽车尾气中),与同一公司在室内工作的同事相比,前者在精子数量、活动性和形态(尤其是头部缺陷)方面均有显著下降或异常^[16-17]。类似研究 De Rosa 等^[18]报道,暴露于空气污染环境的收费员与年龄匹配的随机招募对照男性相比,其精子能动性、活力、核 DNA 完整性、宫颈粘液穿透能力均显著降低,但精子数量和浓度则无差异。

可见,空气污染可能改变精子数量、活力、形态等物理特性,究其原因,可能在精子 DNA 水平已发生可逆或不可逆性变化。这点在以上部分研究中已有报道:空气污染可能影响精子基因组^[13,19];Jurewicz 等^[20]在不育咨询者的精子研究中,发现其精子浓度正常,而 PM₁₀、PM_{2.5}暴露与精子某些染色体非整倍体率显著正相关; $r(\text{PM}_{10} \text{ vs. } 21 \text{ 号染色体畸形}) = 0.58$; $r(\text{PM}_{2.5} \text{ vs. } Y \text{ 染色体畸形}) = 0.68$;类似的,PM₁₀、PM_{2.5}与不成熟精子(精子不成熟表现在染色质浓缩不全)比例增高相关^[13];捷克学者则发现,暴露于空气污染严重的男性,其染色质异常的精子比例显著增加,DFI 增高^[19](DFI 是公认的临床不育和自然流产的重要直接原因);类似的,意大利学者在研究 PM 污染环境中的职业男性时,发现其平均 DFI 显著高于对照^[7]。

1.4 空气污染与雄性激素

有研究报道了空气污染对体内性腺轴中激素循环水平的影响。Radwan 等^[13]发现,空气中 PM₁₀、PM_{2.5}、NO_x、CO 含量与男性睾酮水平呈负相关;多种可挥发性化学污染物,如双酚 A、邻苯二甲酸酯等残留,可直接导致睾酮生成紊乱^[21];然而,暴露于汽车尾气的高速站收费工人,睾酮水平却与对照组无差异^[18]。对于形成并分泌睾酮的睾丸组织,主要在动物体内进行观察研究。

可见,从流行病学水平对人群进行研究时,空气污染对精子质量不同指标影响的程度不同,甚至截然相反。可能因为现有研究可比性局限,且各项研究的污染物来源或成分有差异,而且往往在研究对象、研究持续时间和暴露时间等方面有所不同。为此,进一步的研究需更为严格的课题设计,数据处理时需进行多因素统计分析、逐步寻找影响因素,并通过构建不同模型进行预测,以定量衡量其对精子质量的影响程度。

2 环境污染影响男性不育的实验室研究

由于伦理问题,对于更深入的体内研究,则需要在动物中进行。与在男性精子变化中观察到的结果类似,暴露于汽车尾气(尤其是柴油车尾气)的小鼠和大鼠中,精子的每日产生量显著下降,形态异常率也有所增加^[22-25];而且,空气污染对精子核质量的深入影响也有研究,如加拿大科学家于本世纪初报道,暴露于两家综合钢铁厂下风 1 公里处的小鼠,其串联重复 DNA 位点比 30 公里外小鼠相应

基因位点的遗传突变频率高 1.5~2.0 倍^[26]。Yauk 等^[27]进一步发现,暴露于环境污染空气中的小鼠,其精子 DNA 断裂和精子 DNA 高甲基化显著增加,这些均与精子 DNA 突变率显著增加相关,特别是在 DNA 序列重复位点上,后者又增加了精子 DNA 发生基因突变的可能性,并遗传给后代。

除上述指标,动物实验更便于观察和检测睾丸组织相关细胞和性激素水平的变化。Yoshida 等^[23]发现,暴露于柴油废气中的小鼠,睾丸间质细胞上黄体生成素(luteinizing hormone, LH)受体转录水平显著降低、间质细胞和生精细胞形态改变;同样条件下的大鼠,Watanabe^[22]发现其睾丸支持细胞数量减少($P < 0.05$)。关于激素的变化,Jeng 等^[24]已经证明,长期接触多环芳烃会导致血液睾酮水平下降,LH 水平上升,以上变化均有统计学意义;暴露于苯并(a)芘的大鼠,血液睾酮和 LH 变化同上^[28]。然而,Tsukue 等^[29]则观察到,暴露于不同浓度梯度柴油尾气的小鼠,血液睾酮和 LH 均较对照组显著升高,而这可能与副性腺(前列腺、精囊)的重量变化有关。另一组研究,同样暴露于柴油废气条件下,大鼠的雌激素和睾酮水平显著升高,LH 和卵泡刺激素则显著降低,此外,精母细胞和精子细胞间,变性细胞数量显著增加^[25]。近年,我国有学者发现,汽油尾气可使大鼠睾丸生精小管上皮细胞疏松、数量减少、生精小管内精子数量显著减少,附睾精子数减少、精子畸形率显著升高;分子水平上, $\alpha 6$ -整合素和 $\beta 1$ -整合素(鼠精原干细胞表面标记物)的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低^[30-31];另一方面,汽车尾气衍生的 PM_{2.5},可通过激活 ROS-MAPK-Nrf2 通路,诱导大鼠支持细胞凋亡、破坏血睾屏障、损伤其生育能力^[32]。

可见,不同形式空气污染在动物体内研究的结论,与流行病学在人群中所进行的研究结论基本一致,均给雄性生育能力带来不利影响。

3 环境污染影响男性不育的分子机制研究

近年,在空气污染对男性生育能力影响的发生机制研究中,环境、生物、医学等不同领域学者均进行了多角度深入探讨。本文将机制研究分为 4 类,然而,不同机制间也交互渗透,此处简要概述如下:

3.1 干扰内分泌

空气污染物,尤其是附着于 PM 上的多环芳烃,是具有雌激素、抗雌激素或抗雄激素活性的内分泌

干扰物^[33],多环芳烃通过结合雌激素受体或雄激素受体,发挥激动或拮抗作用;也可能进一步激活芳香烃受体下游通路,参与许多细胞过程,最终影响精子的生成、活力、形态等^[34]。

3.2 诱导产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)

大多数空气污染物(如 NO₂、PM)是 ROS 诱导剂,或者通过其(如 O₃ 或 PM)所含的重金属和多环芳烃,诱导 ROS 产生^[16,32,35]。虽然正常受精需要一定量的 ROS,而过量则会对精子造成损伤^[35];因为精子膜含有大量多不饱和脂肪酸,以维持胞膜流动性,使其对氧化应激高度敏感,然而,这些脂肪酸的过氧化作用会导致其流动性丧失、膜表面酶和离子通道活性降低,从而改变精子的活动能力和精卵融合能力。ROS 诱导的蛋白氧化,也可能通过分裂多肽链和聚合蛋白的积累,在精子分化的最后阶段,染色质重塑受损和精化不良,使精子功能改变。最后,ROS 可能引发导致细胞凋亡的连锁反应,尤其是通过改变线粒体膜的完整性。近年也有报道称,PM_{2.5}通过 PI3K/Akt 信号通路引发氧化应激,导致雄性大鼠生殖功能障碍^[36]。以上这些错误还可能同时或续惯发生、使损害叠加,最终导致精子数量、活性异常,影响男性生育能力^[35,37]。

3.3 血睾屏障破坏和 DNA 突变

多种环境污染物(如多氯联苯、二氯化铬等)均可引起睾丸免疫微环境变化,如 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等致炎因子升高,NALP3 炎症小体形成,从而直接或间接破坏血睾屏障^[38-39];或通过诱导 ROS 的产生,经多种信号通路(如上述动物观察研究部分)引起血睾屏障损伤^[32,38];炎症微环境还可致精子 DNA 链断裂和基因突变,受精潜能下降,进而改变随后的胚胎发育^[2]。类似的,不同空气污染成分同时或先后使 DNA 位点遗传突变频率显著增高^[26],并增加细胞凋亡风险。其次,在生殖细胞中,一些空气污染物分子(尤其是 PM 中含有的多环芳烃)可通过共价键与 DNA 碱基结合,形成 DNA 加合物,从而改变基因表达^[24,40]。

3.4 表观遗传修饰

表观遗传修饰,如 DNA 甲基化的改变、RNA 和/或组蛋白修饰等,均可能在精子发育的不同阶段引起基因表达异常^[2]。暴露于交通相关空气污染的小鼠,其基因甲基化状态会发生变化^[41];长期暴露于对羟基苯甲酸丁酯,可致成年大鼠睾丸从有

丝分裂到减数分裂后 DNA 高甲基化^[42];PM_{2.5}污染可影响线粒体(mt)DNA 甲基化^[43];附着于 PM 的重金属污染物影响体内多种 miRNAs 的表达水平,进而影响精子 RNA 的表达及其潜在功能,如依赖于靶向 FOXO1 的 miR-183/96/182 簇表达增加,均可诱发胎儿生长发育异常^[39,44];动物研究也表明,新生儿接触 PM 时,StAR(产生睾酮所必需的)蛋白 H3K14 乙酰化减少,降低了其精子数量和质量^[44]。可见,空气污染扰乱了参与不同表观遗传过程的细胞代谢物水平,更甚者认为,表观遗传学改变与精子发生失败有关^[2]。

4 小结

综上,尽管不同国家学者的研究中,空气污染物种类、生育能力相关检测指标并不完全一致,但所取得的结果基本一致,即空气污染可影响男性生育能力。通过机制研究,近年也有学者提出,维生素 C 和维生素 E 可通过减轻氧化应激损伤,部分恢复精子的发生^[32];如果联合限制热量摄入,可提高精子数量和质量^[45];姜黄素也可通过抗氧化作用,对苯并芘引起的精子运动和形态损伤具有保护作用^[46]。然而,对抗空气污染所致损伤的保护方法,虽然一定程度上奏效,但根本措施仍是保护环境、改善空气质量。

参考文献:

- [1] WHO. Ambient (outdoor) air pollution [M]. WHO: World Health Organization, 2018.
- [2] Vecoli C, Montano L, Andreassi MG. Environmental pollutants; genetic damage and epigenetic changes in male germ cells [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23(23): 23339-23348.
- [3] Rolland M, Le Moal J, Wagner V, et al. Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26609 men close to general population between 1989 and 2005 in France [J]. Hum Reprod, 2013, 28(2): 462-470.
- [4] Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, et al. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years [J]. N Engl J Med, 1995, 332(5): 281-285.
- [5] Deng Z, Chen F, Zhang M, et al. Association between air pollution and sperm quality: A systematic review and meta-analysis [J]. Environ Pollut, 2016, 208: 663-669.
- [6] Santi D, Magnani E, Michelangeli M, et al. Seasonal variation of semen parameters correlates with environmental temperature and air pollution: A big data analysis over 6 years [J]. Environ Pollut, 2018, 235: 806-813.
- [7] Bosco L, Notari T, Ruvolo G, et al. Sperm DNA fragmentation: An early and reliable marker of air pollution [J]. Environ Toxicol

- Pharmacol, 2018, 58: 243–249.
- [8] Lao XQ, Zhang Z, Lau AKH, et al. Exposure to ambient fine particulate matter and semen quality in Taiwan [J]. *Occup Environ Med*, 2018, 75(2): 148–154.
 - [9] Wu L, Jin L, Shi T, et al. Association between ambient particulate matter exposure and semen quality in Wuhan, China [J]. *Environ Int*, 2017, 98: 219–228.
 - [10] Guan Q, Chen S, Wang B, et al. Effects of particulate matter exposure on semen quality: A retrospective cohort study [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 193: 110319.
 - [11] Zhou N, Cui Z, Yang S, et al. Air pollution and decreased semen quality: a comparative study of Chongqing urban and rural areas [J]. *Environ Pollut*, 2014, 187: 145–152.
 - [12] Sokol RZ, Kraft P, Fowler IM, et al. Exposure to environmental ozone alters semen quality [J]. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(3): 360–365.
 - [13] Radwan M, Jurewicz J, Polanska K, et al. Exposure to ambient air pollution-does it affect semen quality and the level of reproductive hormones? [J]. *Ann Hum Biol*, 2016, 43(1): 50–56.
 - [14] Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(9): 887–894.
 - [15] Zhang G, Jiang F, Chen Q, et al. Associations of ambient air pollutant exposure with seminal plasma MDA, sperm mtDNA copy number, and mtDNA integrity [J]. *Environ Int*, 2020, 136: 105483.
 - [16] Arbak P, Yavuz O, Bukan N, et al. Serum oxidant and antioxidant levels in diesel exposed toll collectors [J]. *J Occup Health*, 2004, 46(4): 281–288.
 - [17] Guven A, Kayikci A, Cam K, et al. Alterations in semen parameters of toll collectors working at motorways: does diesel exposure induce detrimental effects on semen? [J]. *Andrologia*, 2008, 40(6): 346–351.
 - [18] De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, et al. Traffic pollutants affect fertility in men [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(5): 1055–1061.
 - [19] Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(10): 2776–2783.
 - [20] Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, et al. The relationship between exposure to air pollution and sperm disomy [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2015, 56(1): 50–59.
 - [21] Mima M, Greenwald D, Ohlander S. Environmental toxins and male fertility [J]. *Curr Urol Rep*, 2018, 19(7): 50.
 - [22] Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155(1): 51–58.
 - [23] Yoshida S, Sagai M, Oshio S, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice [J]. *Int J Androl*, 1999, 22(5): 307–315.
 - [24] Jeng HA, Yu L. Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles [J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2008, 43(7): 675–681.
 - [25] Watanabe N, Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats [J]. *Environ Health Perspect*, 1999, 107(7): 539–544.
 - [26] Somers CM, Yauk CL, White PA, et al. Air pollution induces heritable DNA mutations [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 15904–15907.
 - [27] Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, et al. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2): 605–610.
 - [28] Inyang F. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a) pyrene [J]. *Reprod Toxicol*, 2003, 17(5): 527–537.
 - [29] Tsukue N, Toda N, Tsubone H, et al. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2001, 63(2): 115–126.
 - [30] 罗连民. 汽车尾气损伤大鼠生殖功能及其机制研究 [D]. 广州: 广州医科大学, 2018.
 - [31] Luo L, Li E, Zhao S, et al. Gasoline exhaust damages spermatogenesis through downregulating $\alpha 6$ - integrin and $\beta 1$ - integrin in the rat model [J]. *Andrologia*, 2018, 50(7): e13045.
 - [32] Liu B, Shen LJ, Zhao TX, et al. Automobile exhaust-derived PM_{2.5} induces blood-testis barrier damage through ROS-MAPK-Nrf2 pathway in sertoli cells of rats [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 189: 110053.
 - [33] Oh SM, Ryu BT, Chung KH. Identification of estrogenic and antiestrogenic activities of respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed fractionation [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(1): 75–82.
 - [34] Barouki R, Aggerbeck M, Aggerbeck L, et al. The aryl hydrocarbon receptor system [J]. *Drug Metab Pers Ther*, 2012, 27(1): 3–8.
 - [35] Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage [J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84(10): 1039–1052.
 - [36] Cao XN, Yan C, Liu DY, et al. Fine particulate matter leads to reproductive impairment in male rats by overexpressing phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 237(3): 181–190.
 - [37] Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2015, 21(6): 502–515.
 - [38] Selvaraju V, Baskaran S, Agarwal A, et al. Environmental contaminants and male infertility: Effects and mechanisms [J]. *Andrologia*, 2021, 53(1): e13646.
 - [39] Zhou L, Su X, Li B, et al. PM_{2.5} exposure impairs sperm quality through testicular damage dependent on NALP3 inflammasome and miR-183/96/182 cluster targeting FOXO1 in

- mouse [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 169: 551–563.
- [40] Jeng HA, Pan CH, Chao MR, et al. Sperm DNA oxidative damage and DNA adducts [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 794: 75–82.
- [41] Ding R, Jin Y, Liu X, et al. Characteristics of DNA methylation changes induced by traffic-related air pollution [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016, 796: 46–53.
- [42] Park C, Nah W, Lee J, et al. Butyl paraben-induced changes in DNA methylation in rat epididymal spermatozoa [J]. *Andrologia*, 2012, 44: 187–193.
- [43] Byun HM, Colicino E, Trevisi L, et al. Effects of air pollution and blood mitochondrial DNA methylation on markers of heart rate variability [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(4): e003218.
- [44] Shukla A, Bunkar N, Kumar R, et al. Air pollution associated epigenetic modifications: Transgenerational inheritance and underlying molecular mechanisms [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 656: 760–777.
- [45] Vahidinia A, Rahbar AR, Shakoobi Mahmoodabadi MM. Effect of astaxanthin, vitamin E, and vitamin C in combination with calorie restriction on sperm quality and quantity in male rats [J]. *J Diet Suppl*, 2017, 14(3): 252–263.
- [46] Seymen CM, Kaplanoglu I, Gülnur T, et al. The possible protective effects of curcumin in the case of benzo (a) pyrene administration on rat sperm motility and morphology [J]. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 2020, 12(2): 241–250.

[收稿日期]2021-06-02

(上接第 90 页)

- [5] Zhang QS, Heng Y, Mou Z, et al. Reassessment of subacute MPTP treated mice as animal model of Parkinson's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(10): 1317–1328.
- [6] Tao H, Liu Y, Hou Y. miRNA-384-5p regulates the progression of Parkinson's disease by targeting SIRT1 in mice and SHSY5Y cell [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2): 441–450.
- [7] 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.
- [8] Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP [J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 318(1): 215–224.
- [9] Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease [J]. *Bioessays*, 2002, 24(4): 308–318.
- [10] Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, et al. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages) [J]. *J Neurol*, 2002, 249(3): 1–5.
- [11] Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, et al. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(14): 4546–4550.
- [12] Melrose HL, Lincoln SJ, Tyndall GM, et al. Parkinson's disease: a rethink of rodent models [J]. *Exp Brain Res*, 2006, 173(2): 196–204.
- [13] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(12): 1301–1306.
- [14] Gubellini P, Kachidian P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview [J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2015, 171(11): 750–761.
- [15] Nisticò R, Mehdawy B, Piccirilli S, et al. Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24(2): 313–322.
- [16] Songin M, Ossowska K, Kuter K, et al. Alteration of GSK-3 β in the hippocampus and other brain structures after chronic paraquat administration in rats [J]. *Folia Neuropathol*, 2011, 49(4): 319–327.
- [17] McNaught KS, Olanow CW. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. [J]. *Ann Neurol* 2003, 53(3): S73–S86.
- [18] Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(11): S7–S14.
- [19] Kikuchi S, Shinpo K, Tsuji S, et al. Effect of proteasome inhibitor on cultured mesencephalic dopaminergic neurons [J]. *Brain Res*, 2003, 964(2): 228–236.
- [20] McNaught KS, Olanow CW. Proteasome inhibitor-induced model of Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2006, 60(2): 243–247.
- [21] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models [J]. *Neuron*, 2003, 39(6): 889–909.
- [22] McCann H, Stevens CH, Cartwright H, et al. α -synucleinopathy phenotypes [J]. *Parkinsonism relat disord*, 2014, 20(1): S62–S67.
- [23] Zhu Y, Zhang J, Zeng Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012, 11(4): 350–358.
- [24] Bové J, Zhou C, Jackson-Lewis V, et al. Proteasome inhibition and Parkinson's disease modeling [J]. *Ann Neurol*, 2006, 60(2): 260–264.
- [25] Bukhatwa S, Zeng BY, Rose S, et al. The effects of dose and route of administration of PSI on behavioural and biochemical indices of neuronal degeneration in the rat brain [J]. *Brain Res*, 2010, 1354: 236–242.

[收稿日期]2021-07-27

牛雨晴, 秦合伟, 姬令山, 等. 血管性认知障碍和卒中后认知障碍动物模型初步评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 121-127.

Niu YQ, Qin HW, Ji LS et al. Preliminary evaluation of animal models of vascular and post-stroke cognitive impairments [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 121-127.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 018

血管性认知障碍和卒中后认知障碍动物模型 初步评价

牛雨晴¹, 秦合伟^{1,2*}, 姬令山², 李伟峰¹, 郭 宁¹, 宋雪梅¹

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.河南省中医院, 郑州 450002)

【摘要】 血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是脑血管病变及血管危险因素导致至少一个认知域损害的临床综合征, 病理表现有血管功能的改变、组织的损伤以及神经的退行性病变等。卒中后认知障碍 (post-stroke cognitive impairment, PSCI) 是 VCI 的一个重要亚型, 占 VCI 的大部分。以往 PSCI 多依赖 VCI 动物模型来进行病理机制研究、药物研发等。随着学者们对 PSCI 概念的提出和深入探讨, 我们发现两者的病理特征和主要受损害的认知区域并非完全相同, 因此有必要尝试建立具有 PSCI 临床特征的动物模型。VCI 实验动物模型有多种类型, PSCI 研究模型应区别于 VCI 动物模型。本文对 VCI 和 PSCI 的特征和受损的认知域进行介绍, 从构建模型的角度总结和初步评价了常见 VCI 和 PSCI 实验动物模型, 尝试为 VCI 和 PSCI 的研究提供有用建议。

【关键词】 血管性认知障碍; 卒中后认知障碍; 动物模型; 初步评价

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0121-07

Preliminary evaluation of animal models of vascular and post-stroke cognitive impairments

NIU Yuqing¹, QIN Hewei^{1,2*}, JI Lingshan², LI Weifeng¹, GUO Ning¹, SONG Xuemei¹

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

2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

【Abstract】 Vascular cognitive impairment (VCI) is a clinical syndrome in which at least one cognitive domain is damaged by cerebrovascular disease and vascular risk factors. The pathological manifestations include changes in vascular function, tissue damage, and nerve degeneration. Post-stroke cognitive impairment (PSCI) is a major subtype of VCI, which accounts for most VCI. Pathological mechanism research and drug development for PSCI have mostly relied on VCI animal models. As researchers have put forward and discussed in-depth the PSCI concept, we found that the pathological characteristics and main damaged cognitive areas of the two are not exactly the same. Therefore, it is necessary to establish an animal model with the clinical features of PSCI. There are many types of experimental animal models for VCI, and a PSCI research model should be distinguished from a VCI animal model. This article introduces the characteristics and impaired cognitive domains of VCI and PSCI, summarizes and preliminarily evaluates common VCI and PSCI experimental animal models from the perspective of model construction, and provides useful suggestions for VCI and PSCI research.

【Keywords】 vascular cognitive impairment; cognitive impairment after stroke; animal model; preliminary evaluation

【基金项目】 中原英才计划中原青年拔尖人才资助 (豫人才办[2021]1号); 河南省中医药科学研究专项课题 (20-21ZY2122, 20-21ZY1054); 河南省中医药拔尖人才培养项目资助 (豫卫中医函[2021]15号)。

【作者简介】 牛雨晴 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 心脑血管疾病的康复。E-mail: niuyuqing2020@126.com

【通信作者】 秦合伟 (1982—), 男, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 研究方向: 心脑血管疾病研究。E-mail: qinhewei2012@126.com

血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是由脑血管病或血管危险因素导致或促成认知衰退的疾病,认知功能损害从轻度认知障碍到痴呆不等,包括轻度和重度血管性认知障碍^[1]。VCI被认为是继阿尔兹海默症之后第2大常见的痴呆类型,具有慢性进行性认知损害的特点,患者的认知损害主要涉及学习记忆能力、语言能力和行为功能障碍等几个方面。脑卒中后认知障碍(post-stroke cognitive impairment, PSCI)是指卒中事件发生后6个月以内开始和(或)延迟出现的认知衰退、认知障碍持续存在3个月以上^[2],患者额叶功能、执行功能、视空间和注意转移能力障碍是最常见的受损域^[3]。根据认知障碍受损的程度,可分为卒中后非痴呆(PSCIND)和卒中后痴呆(PSD)^[4]。VCI包括一切与血管损伤及其相关因素引起的认知障碍,PSCI重点关注的是缺血性或出血性卒中事件发生后6个月之内出现的认知障碍。PSCI是VCI的一个亚型,且PSCI引起的认知功能的损害具有不可逆的特点^[5]。脑血管病已成为我国首位致残性疾病^[6],脑卒中占脑血管病的大部分,国内部分社区调查研究显示PSCI的患病率为30.00%~80.97%不等^[7-9]。因此,如果能够在卒中后早期有效干预,将可能大大降低认知障碍的发生。

随着对VCI的深入研究,PSCI日益受到学者重视,卒中后认知障碍的筛查评估、规范用药及综合管理,国内专家已达成共识^[1]。为了进行PSCI发病机制研究以及药物筛选和研发,成功建立具有PSCI特征的动物模型非常必要。但目前建立的认知障碍模型以VCI居多,如何在此基础上建立凸显PSCI特征的模型还存在一定的困难。故本综述从VCI的发病机制和临床分型入手,通过介绍常用VCI和PSCI实验动物模型的研究进展,从模型建立的角度对其进行总结和初步评价,为开展PSCI的研究提供参考。

1 VCI和PSCI特征

关于VCI的发病机制目前仍不明确,大多认为与胆碱能系统受损、脑白质高信号、氧化应激、血管炎症反应、脑血流量下降、脑灌注不足、神经病变以及退行性改变、神经细胞凋亡、血管内皮功能障碍和损伤、 β -淀粉样蛋白沉积增加、神经递质和受体的异常、神经毒性作用、血脑屏障的通透性改变等有关^[10-12]。目前氧化应激、神经炎症与认知障碍的关

系研究较多^[13]。VCI可由缺血性和出血性脑血管病变引起,其常见的血管病变多与深部脑白质核团血液供应的小血管缺血有关;脑白质的高信号、基底节区的梗塞、高血压、糖尿病也常会导致或加速VCI^[14]。PSCI的发生多与皮质和皮质下大血管的梗死、微出血以及小血管的梗死有关^[15],还与高血压、房颤以及动脉粥样硬化等血管危险因素密切相关。PSCI多表现在额叶皮层下、角回、颞叶内侧部分的损害,而VCI患者可发现海马、丘脑、基底节等部位的病变^[16-17]。卒中等血管相关因素影响脑血的血液供应常会导致VCI,而脑血流量的减少或持续加重会进一步引发PSCI。

PSCI作为VCI的一个亚型,两者的病因相似,但又不完全相同。根据发病原因,VCI可分为以下几种类型:血管危险因素相关性、缺血性(大血管性、小血管性和低灌注性)、出血性(脑实质出血、蛛网膜下腔出血以及硬膜下血肿等)、其他脑血管病性、脑血管病合并AD(脑血管病伴AD和AD伴脑血管病)等^[18]。结合PSCI的临床分型和特征^[1],VCI分型中缺血性认知障碍中的大血管性、小血管性和出血性VCI符合卒中事件的定义。结合PSCI的诊断、筛查原则以及病理表现^[1,3],PSCI动物模型的理想特征应为有明确脑卒中(脑出血、脑缺血和脑梗死)事件、与认知密切相关的功能区损伤、认知障碍明显、认知障碍的出现和脑卒中事件有明确的因果和时间关系等,至少出现以上两种特征,即可认为是合理的PSCI模型。这与张勇等^[3]认为研究PSCI主要的特征化受损认知域有助于定义和发现该病的病理学性质的观点一致。综上所述,VCI和PSCI实验动物模型之间的区分标准应包括模型动物认知障碍发生的原因、认知障碍损害发生的时间和主要的特征化认知受损域。

2 动物模型及造模方法

VCI和PSCI的动物模型大致分为两类:一是遗传模型,即通过改变动物基因获得的动物模型,常用的有转基因、脑淀粉样改变动物模型等;二是手术模型,通过人为的介入物理、化学等致病因素,使实验动物呈现部分或全部疾病特征,如脑缺血、脑血栓、脑出血和其他模型等,本文主要讨论后者。

2.1 常用VCI动物模型

VCI的主要脑血管病理学是缺血导致的梗塞和白质高信号^[19],认知损害主要涉及学习记忆能力、

语言能力和行为功能障碍,目前大多基于脑缺血开发 VCI 动物模型,啮齿动物是 VCI 动物模型中最常见的动物类型。

2.1.1 脑缺血或缺血再灌注模型

(1) 瞬间全脑缺血模型

全脑瞬间缺血可产生持续性脑组织损伤和认知障碍^[20],目前常用的 VCI 全脑缺血模型主要有四血管阻塞法(4-VO)和二血管阻塞法(2-VO),造模动物主要是大鼠。4-VO 自 1979 创立以来,虽经过不断改良,但基本原理还是永久或短暂阻断两侧颈总动脉和椎动脉,通常阻断 5~20 min,常可导致脑组织发生不可逆性损伤,海马锥体细胞 CA1 区的神经元急性坏死或死亡,导致学习和记忆障碍^[21]。

2-VO 是通过阻断双侧的颈总动脉达到短暂脑缺血。造模动物主要有沙鼠、大鼠和 C57BL/6 变异小鼠动物类型^[22]。由于沙鼠和 C57BL/6 变异小鼠大脑动脉环的后交通动脉缺乏或非常纤细,颈内动脉系统和椎-基底动脉系统之间没有血液贯通。因此,结扎双侧颈总动脉可造成全脑缺血。通常持续时间是 5~15 min,与 5 min 相比,15 min 的脑缺血,可见星形细胞和微胶质细胞在海马区明显增殖和肥大。与 4-VO 相比,2-VO 病变主要在海马体,特别是 CA1 区神经元的损失^[23]。

(2) 慢性脑缺血模型

双侧颈总动脉阻塞(BACO),是通过结扎双侧颈总动脉造成大鼠慢性全脑缺血,是制作慢性脑缺血模型的经典方法。造模动物主要是大鼠。该方法夹闭大鼠颈总动脉后,大鼠脑部仍有椎动脉系统供血,因此不同于 2-VO,又没有 4-VO 严重。术后模型动物的脑血流量会明显减少,术后 14 d 出现白质脱髓鞘病变,术后四周进行水迷宫实验可发现空间学习能力受损,术后 3 个月脑血流量几乎恢复到原来的水平,但是认知功能仍严重受损^[24]。Mansour 等^[25]通过针结技术诱导双侧颈总动脉狭窄生成改良 BACO 模型,降低了动物死亡率和模型制作难度。Vidyanti 等^[26]通过先永久结扎大鼠右侧颈总动脉,1 周后再短暂结扎左侧颈总动脉 30 min,形成改良 BACO 慢性脑缺血模型,降低了动物死亡率。

双侧颈总动脉狭窄(BACS),是通过在两条颈总动脉周围放置部分隐匿的微线圈引起的慢性低灌注小鼠模型,线圈的直径会影响闭塞的严重程度。造模动物通常是小鼠。0.18 mm 线圈是最常用的,因为与 0.18 mm 线圈(15%)相比,0.16 mm 线

圈的死亡率很高(75%),0.18 mm 线圈在 2 h 后导致脑血流量减少 60%~70%^[27]。脑血流量的减少会增加血脑屏障的通透性,BACS 可诱发脑白质的病变和行为障碍,在造模后的 5~6 个月,进行水迷宫测试,可观察到模型鼠出现记忆受损^[28]。

非对称颈总动脉阻塞模型(ACAS),是通过在 C57BL/6 小鼠左右颈总动脉植入不同的设备生成。造模动物通常是小鼠。通过在右侧颈总动脉处放置缩窄器,在左侧颈总动脉处放置微线圈导致大约 50%的动脉狭窄。该模型导致的脑血流量的减少较 BACS 温和,Y-迷宫测试显示 ACAS 14 d 之后小鼠出现空间记忆受损。研究表明,ACAS 后该动物表现出肌肉无力和步态异常等运动障碍,协调和平衡功能受损^[24]。

大脑中动脉闭塞模型(MCAO),该模型是通过单侧丝线阻塞大脑中动脉制备的局灶性脑缺血模型。造模动物大小鼠均有。多采用线栓法、灯丝法、开颅手术法闭塞大脑中动脉来制备模型,此模型可用于制作永久脑缺血或缺血再灌注模型,是目前最常用的脑缺血卒中模型之一。丝线阻塞大脑中动脉对大小鼠产生明确定位的脑缺血损伤,受损的区域主要是包括皮层、海马和纹状体^[27]。Delattre 等^[27]通过水迷宫测试发现,在脑缺血 6 个月后 MCAO 大鼠出现学习和空间记忆损伤,CA1、CA3 区域的海马体显著变形和皮质变薄。

2.1.2 脑栓塞模型

(1) 光化学诱导脑栓塞模型

该方法是通过在动物体静脉系统(大鼠)或腹腔(小鼠)内注射光化学敏感染料(孟加拉玫瑰红或红斑狼疮 B),然后通过特定(通常是 480~560 nm)的荧光或激光照射脑部区域,诱发大脑内产生光化学反应,释放氧自由基,导致皮质血管内皮受损,启动凝血机制使得血小板聚集,引起皮质的缺血以及脑细胞的死亡,形成缺血区域的局限性脑梗死模型^[29-30]。造模动物大小鼠均有。在组织学水平,大脑皮层在栓塞后的 4 h 可观察到神经元、胶质细胞的退化。光照射后 1~4 h 可观察到细胞毒性、血管和细胞水肿等^[31]。

(2) 内皮素模型

内皮素-1 是一种由内皮细胞产生的强效血管收缩剂肽,通常采用血管注射或在大脑表面立体定向注射来制备,与血管功能障碍和心血管疾病相关^[32]。造模动物通常为小鼠。Dojo Soeandy 等^[33]

通过在小鼠体内注射内皮素-1 制备高度可重复性脑梗塞模型。在细胞内注射内皮素-1 可导致 CD1 和 C57BL/6 小鼠缺血引起细胞死亡,内皮素-1 引起的缺氧损伤反应影响早期神经元调节,在损伤反应后期阶段,粒细胞和微胶质介导效应可能突出上升。此外经内皮素-1 介导后经化学染色和免疫组化可观察到皮质组织缺氧和皮质神经元细胞死亡。

(3) 微栓子模型

微栓子模型通常在颈内动脉和颈外动脉处采用微栓子、自体血栓、复合血栓等栓状材料进行建模。造模动物通常为大鼠。微栓子模型是通过抽取自体新鲜动脉血 0.5 mL,注入 50 cm 长的 PE50 管内,室温放置 2 h,4℃ 冰箱放置 22 h,剪取其中 5 cm 一段,吸入 PE50 管内。套管两端各连接 1 个充有生理盐水的注射器,使生理盐水反复通过套管,制成一个含纤维蛋白的单个栓子^[34]。自体血栓是在导管内注入 2 mL 全血,立即加入 125 单位凝血酶形成血栓,40 min 后切成 0.2 mm×0.5 mm 大小,用生理盐水制成 1 mL 血栓混合液。复合血栓采用二磷酸腺苷、凝血酶和肾上腺素制备大鼠多发性脑血栓模型^[34]。微栓子模型、自体血栓模型经形态学观察可发现大鼠出现典型行为障碍,经 TTC 染色可见明显的梗死灶,光镜下均可见以纤维蛋白、血小板为主的血栓。复合血栓模型经伊文思蓝脑屏障通透性检测,可见模型组双侧大脑伊文思蓝含量、脑重量增加,血栓形成侧大脑可见毛细血管扩张、细胞间质水肿及脑细胞散在的卫星现象^[34]。

(4) 三氯化铁诱发脑血栓模型

该方法采用三氯化铁(FeCl_3)损伤大脑中动脉管壁,引起动脉血栓形成,继而造成局部脑梗死及动物行为障碍。造模动物通常为大鼠。 FeCl_3 可诱导血管内皮和胶原纤维的损伤、血小板凝集和血栓形成,产生活性氧化物和血管炎性反应^[35-36]。TTC 染色显示模型动物,梗死区域呈白色,脑梗死面积明显增大。行为障碍评分进行评估可发现模型动物在麻醉清醒后即出现偏瘫样症状,大鼠在血栓形成 4、8 及 24 h 后行为障碍维持在高峰阶段^[34]。

2.1.3 脑出血模型

(1) 自体血注射大鼠脑出血模型

该模型是以非肝素化自体血注入大鼠脑内特定部位形成血肿,出现脑水肿和颅内压升高,血肿压迫脑组织引起周围脑组织缺血和血流改变,并形成局部氧自由基损伤等病理改变。造模动物通常

为小鼠。自体血注入脑内的方式主要有开颅直视下脑内注血、按解剖定位钻孔注血和脑立体定位注血 3 种方法^[34],注射的部位多为尾状核。自体血来源有股动脉、颈动脉、心脏穿刺以及为动脉穿刺,应用较多的是尾动脉穿刺。注血次数有 1、2 和 3 次之分^[37-38]。采用立体定位法在大鼠尾状核注射自身尾动脉血来造模是较为理想的造模方法。注射自体血后,注血对侧肢体可有不同程度的瘫痪。光镜下可观察到注血侧出血区有明显的血凝块形成,周围水肿区组织结构破坏,神经元数目明显减少,排列紊乱,基质明显水肿,可见较多的中性粒细胞浸润和小胶质细胞的增生肥大。

(2) 胶原酶和肝素注射脑出血模型

采用Ⅶ型胶原酶和肝素生理盐水溶液注入大鼠脑尾状核诱发脑出血模型,其造模原理是利用胶原酶能分解细胞间质和血管基膜的胶原蛋白,引起局部渗血,肝素使得渗出的血液不凝固,增大血肿体积。造模动物多为小鼠。该模型在脑内单独注射胶原酶的基础上加上肝素生理盐水,缩短了血肿形成的时长,接近临床急性脑出血情况。经神经功能评分,经该方法造模的小鼠在脑血肿形成后会出现明显的神经功能障碍。

(3) 自发性高血压脑出血模型

自发性高血压小鼠脑出血模型是目前应用较多的模型,包括改变遗传基因开发的自发性高血压小鼠(SHR)和易卒中型高血压小鼠(SHRSP)模型。此种动物模型也可在已有高血压基因小鼠的基础上进行近交繁殖、或者是喂养高盐饮食,使模型动物血压升高。在 SHRSP 小鼠 MRI 中可观察到白质的渐进性损伤^[22]。Mustapha 等^[39]研究发现 SHRSP 小鼠小脑体积的减少可能导致执行功能缺陷,如空间工作记忆和注意力,以及运动功能障碍。

2.1.4 其他模型

根据血管性认知障碍的相关危险因素和从基因层面开发出一些新模型,如脑淀粉样血管病(CAA)模型^[40]、常染色体显性脑病伴皮下梗死和脑白质病(CADASIL)模型^[41]、二型糖尿病模型^[42]、脑小血管疾病模型(CSVD)^[43]。将中医的证候特征和西医的疾病诊断结合起来开发的病症结合动物模型(如气虚血瘀型^[44]),这些新的模型为研究血管性认知障碍提供了更多可能。

2.2 常用 PSCI 动物模型

PSCI 病理基础主要与大脑前额叶皮层损伤有

关,认知障碍出现的时间是卒中事件发生后的 6 个月内,持续存在 3 个月以上;执行功能、视空间和注意转移能力障碍是最常见的认知功能受损域。

在基础实验研究方面,VCI 实验动物模型有多种类型,且动物造模方法较为成熟,目前根据 VCI 特征已开发出一些新的模型^[40-44]。PSCI 的动物模型相对较少,大多还是应用 VCI 造模方法来复制模型。但根据 PSCI 的定义及主要的损伤认知域,可知 PSCI 动物模型的脑部造模区域及评估方式都应该区别于 VCI。VCI 模型中的光化学诱导栓塞模型和内皮素模型有报道用于 PSCI 模型的制备,但与 VCI 不同的是,这些模型的受损域是前额叶皮层。PSCI 最明显的障碍是执行功能,大脑前动脉的损伤会影响执行功能、计划能力和认知灵活性。因此,PSCI 动物模型造模的受损域应在前额叶皮层或大脑前动脉而非大脑中动脉,且在损伤后的卒中后 6 个月内出现明显的认知障碍,这样才更符合 PSCI 的特征。Sadigh-Eteghad 等^[45]通过在雄性 BALB/c 小鼠体内注射孟加拉玫瑰红(150 $\mu\text{g/g}$)光敏燃料,利用激光在小鼠双侧前额叶皮层区域照射 15 min 诱导形成 PSCI 模型。Livingston-Thomas 等^[46]通过在雄性 SD 大鼠脑内双侧前额叶皮层立体定位注射内皮素-1 诱导局灶性脑缺血模型,认知功能在造模后的 1~4 个月采用若干物体识别测试、注意力转移、明暗盒、自发交替、巴恩斯迷宫等进行评估。结果显示,该模型导致的前额叶皮层受损使得动物的物体识别能力、行为灵活性方面发生显著变化,而这种变化与人类中风后的认知障碍极为相似,因此可能有助于研究新的干预措施以减轻卒中后认知障碍。

3 模型评价

通过模型总结发现:以上几种动物模型均可引起认知功能的障碍,但不同的动物模型呈现不同的特点。瞬间全脑缺血模型可导致大脑严重缺血并具有良好的可重复性,但此类模型在损伤脑组织的同时也会影响其他器官,对认知障碍的评定会出现偏差。MCAO 是最常用的脑缺血模型,该模型与人类缺血性脑卒中最为相似。但该模型的缺点是会导致大鼠自发体温过高,这在人类身上是罕见的^[47]。BACO 是应用最广泛的慢性脑灌注不足大鼠模型之一,该模型可表现出认知障碍和胆碱能损害,类似于人类脑灌注不足引起的脑白质的损伤。但该模型会对视神经造成损伤,影响认知功能的评

估。BCAS 不涉及视神经的损伤,且该模型的死亡率较低,易控制脑缺血的严重程度,具有良好的可重复性,可以很好的观察脑白质的病变和海马萎缩和海马神经元的丧失,被认为是研究 VCI 的最佳动物模型。但该模型的缺点是要在造模后的 6 个月以上才能获得明显的病理和行为特征^[48],且在手术后会缺乏运动功能障碍和出现脑血流量的突然下降,模型评价周期较长。ACAS 可观察到脑血流量的逐渐减少、白质梗死、胶质细胞的增生、运动障碍和海马神经元的损失,能够较好的模仿人类慢性脑灌注不足的神经学临床状况。但该模型的缺点是 ACAS 小鼠不发生微血管的病变,且手术难度较高,造模所用器材较昂贵。光化学模型可利用立体定位在特定的大脑区域进行光化学栓塞,具有高重复性、死亡率、梗死区域大小确定等优点^[49]。但该模型的缺点是光化学栓塞诱导的细胞毒性和血管性水肿同时发生,且血脑屏障迅速破裂,这与急性脑卒中出现的细胞毒性水肿显著不同。另外,该模型缺血区域缺乏半暗带,模型的转化效果较差。内皮素模型缺血的区域较明确,内皮素的浓度会影响缺血的严重程度、持续时间以及由此产生的梗死灶的大小。但该模型的缺点是应用内皮素后,缺血发展缓慢,仅伴随轻微的水肿。因此,该模型不能准确的模拟人类脑卒中状态。微栓子模型可用于 rt-PA 自发性和医源性溶栓的研究,其病理生理学与人类栓塞性脑卒中较为一致,但也存在栓子的大小不可控、麻醉时间较长、死亡率较高且有脑出血的风险的缺点^[49-50]。三氯化铁诱导脑血栓模型,与临床血栓形成的病理过程相似,血栓部位固定,是一种快速评价抗栓药和溶栓药疗效的脑血栓模型。但该模型不足之处是动物的颧弓被去除后会影响到动物摄食,不利于长期观察。自体血注射脑出血模型是应用最多的脑出血动物模型之一,主要用于观察药物对血肿的吸收、脑水肿、颅内压升高、局部脑缺血和神经功能改善的效果。但缺点为防止血液凝固使得整个采血和注血的过程要求在较短时间内完成,这对操作人员的熟练度和技术要求较高。另外,针道穿刺可能损伤脑实质,并伴有针孔反流现象。胶原酶加肝素注射模型操作简单、血肿大小基本一致、重复性好、造模成功率高。该模型克服了以往单独注入胶原酶导致的以渗血为主、血肿形成时间长、与人类急性脑出血病理过程不一致等缺点,但胶原酶的剂量过大会导致动物过早死亡。自

发性高血压脑出血模型是模拟高血压导致大脑微小血管变化引起认知衰退的动物模型。该模型可观察到大脑白质的渐进性损伤,类似于 VCI 中的皮质下缺血性脑血管病,大鼠脑体积的缩小可能导致执行功能障碍,且认知功能的变化仍需要更多的运动功能评测来证明。

VCI 和 PSCI 的临床诊断方法包括神经心理学评估、神经生化标志物、神经影像技术、影像学检查、实验室检查、基因检测和脑脊液检查等,并分别制定了详细的筛查评估、诊断标准和治疗指南。在基础研究方面,PSCI 的动物模型应区别于 VCI。VCI 动物模型相对成熟,但是 PSCI 动物模型尚没有详细且明确的造模方法,大多还是依据 VCI 动物模型。所以针对基础研究的 PSCI 阶段,目前需要考虑两个问题,第 1:PSCI 模型应采用何种方法使得模型动物前额叶皮层受损;第 2:PSCI 模型采用何种评估方式来评价模型动物是否出现执行功能、注意转移能力障碍。明确的造模方法,清晰统一的评价体系对于建立 PSCI 动物模型必不可少。

4 小结

目前用于研究 VCI 的动物种类和方法众多,每个模型都有各自的造模方法和优缺点,研究者可从研究目的和模型特点出发,进行选择匹配度较高的模型用于研究。PSCI 的动物模型的复制应明确认知障碍的受损域且尽可能地与人类卒中后认知障碍相似。由于 VCI、PSCI 疾病本身的复杂性,单一造模不能很好的复制人类疾病,目前已开发出一些复合模型,但尚缺乏对单一造模和复合造模效果的比较研究,由于 VCI 和 PSCI 的病因和发病机制涉及到多种途径,且涉及的分子机制和致病因素复杂多样,目前尚未开发出能够完美复制符合人类 VCI、PSCI 病理特征的动物模型。多数研究者认为,采用复合方法造模能有望复制出更为接近 VCI 或 PSCI 特征的模型动物。随着基因编辑、基因检测等技术的发展和不同评估指标的联合应用,将为认知障碍的药物研究和分子治疗靶点提出更深入的研究方向和更多可能。结合中医的证候理论和西医的疾病诊断开发的病症结合的动物模型,为挖掘和验证中医药疗法治疗认知功能障碍开拓了前景。

参考文献:

[1] 中国卒中学会,卒中后认知障碍管理专家委员会.卒中后认知障碍管理专家共识[J].中国卒中杂志,2017,12(6):

519-531.

- [2] 国家卫生健康委办公厅.血管性认知障碍的诊疗规范(2020年版)[J].全科医学临床与教育,2021,19(3):197-199.
- [3] 张勇,杨百瑜,张振馨,等.卒中后认知障碍的概念、病理生理和受损认知域[J].中国老年学杂志,2016,36(2):509-511.
- [4] Erkinjuntti T. Vascular cognitive deterioration and stroke [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2007, 24(1): 189-194.
- [5] Iadecola C, Duering M, Hachinski V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC scientific expert panel [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(25): 3326-3344.
- [6] 王陇德.《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J].中国脑血管病杂志,2020,17(5):272-281.
- [7] Zhou DH, Wang JY, Li J, et al. Frequency and risk factors of vascular cognitive impairment three months after ischemic stroke in china: the chongqing stroke study [J]. *Neuroepidemiology*, 2005, 24(1-2): 87-95.
- [8] Zhang Y, Zhang Z, Yang B, et al. Incidence and risk factors of cognitive impairment 3 months after first-ever stroke: a cross-sectional study of 5 geographic areas of China [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(6): 906-911.
- [9] Qu Y, Zhuo L, Li N, et al. Prevalence of post-stroke cognitive impairment in china: a community-based, cross-sectional study [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122864.
- [10] Forte G, Casagrande M. Effects of blood pressure on cognitive performance in aging: a systematic review [J]. *Brain Sci*, 2020, 10(12): 919.
- [11] Skrobot OA, Attems J, Esiri M, et al. Vascular cognitive impairment neuropathology guidelines (VCING): the contribution of cerebrovascular pathology to cognitive impairment [J]. *Brain*, 2016, 139(11): 2957-2969.
- [12] Bergkamp MI, Wissink JGJ, van Leijssen EMC, et al. Risk of nursing home admission in cerebral small vessel disease [J]. *Stroke*, 2018, 49(11): 2659-2665.
- [13] Hort J, Vališ M, Kuca K, et al. Vascular cognitive impairment: information from animal models on the pathogenic mechanisms of cognitive deficits [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2405.
- [14] Wardlaw JM, Smith EE, Biessels GJ, et al. Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(8): 822-838.
- [15] Kalaria RN, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(5): 915-925.
- [16] Gorelick PB, Counts SE, Nyenhuis D. Vascular cognitive impairment and dementia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(5): 860-868.
- [17] Graff-Radford J. Vascular cognitive impairment [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2019, 25(1): 147-164.
- [18] 中国医师协会神经内科分会认知障碍专业委员会.2019年中国血管性认知障碍诊治指南[J].中华医学杂志,2019,99(35):2737-2744.
- [19] Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, et al. Vascular contributions

- to cognitive impairment and dementia; a statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association [J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2672-2713.
- [20] Neumann JT, Cohan CH, Dave KR, et al. Global cerebral ischemia; synaptic and cognitive dysfunction [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(1): 20-35.
- [21] Chung Eh, Iwasaki K, Mishima K, et al. Repeated cerebral ischemia induced hippocampal cell death and impairments of spatial cognition in the rat [J]. *Life Sci*, 2002, 72(4-5): 609-619.
- [22] Tuo QZ, Zou JJ, Lei P. Rodent models of vascular cognitive impairment [J]. *J Mol Neurosci*. 2021, 71(5): 1-12.
- [23] Lee TK, Kim H, Song M, et al. Time-course pattern of neuronal loss and gliosis in gerbil hippocampi following mild, severe, or lethal transient global cerebral ischemia [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(8): 1394-1403.
- [24] Washida K, Hattori Y, Ihara M. Animal models of chronic cerebral hypoperfusion: from mouse to primate [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6176.
- [25] Mansour A, Niizuma K, Rashad S, et al. A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats [J]. *J Neurosurg*, 2018, 131(3): 892-902.
- [26] Vidyanti AN, Hsieh JY, Lin KJ, et al. Role of HMGB1 in an animal model of vascular cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2176.
- [27] Delattre C, Bournonville C, Auger F, et al. Hippocampal deformations and entorhinal cortex atrophy as an anatomical signature of long-term cognitive impairment: from the MCAO rat model to the stroke patient [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(3): 294-305.
- [28] Bink DI, Ritz K, Aronica E, et al. Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11): 1666-1684.
- [29] Frauenknecht K, Diederich K, Leukel P, et al. Functional improvement after photothrombotic stroke in rats is associated with different patterns of dendritic plasticity after G-CSF treatment and G-CSF treatment combined with concomitant or sequential constraint-induced movement therapy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146679.
- [30] Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia; a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies [J]. *J Vis Exp*, 2013, 76: 50370.
- [31] Uzdensky AB. Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(5): 437-451.
- [32] Nepal G, Ojha R, Dulal HP, et al. Association between Lys198Asn polymorphism of endothelin-1 gene and ischemic stroke: A meta-analysis [J]. *Brain Behav*, 2019, 9(10): e01424.
- [33] Dojo Soeandy C, Salmasi F, Latif M, et al. Endothelin-1-mediated cerebral ischemia in mice; early cellular events and the role of caspase-3 [J]. *Apoptosis*, 2019, 24(7-8): 578-595.
- [34] 李才, 任立群. 人类疾病动物模型的复制 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [35] Bang J, Jeon WK. Mumefural improves blood flow in a rat model of FeCl₃-Induced arterial thrombosis [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3795.
- [36] Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. *Thromb Res*, 1990, 60(4): 269-280.
- [37] 李玉呈, 齐文涛, 段晓春. 脑出血动物模型与临床转化研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(2): 388-392.
- [38] 闫峰, 吉训明, 罗玉敏. 多种实验动物脑出血模型的制作 [J]. *实验动物科学*, 2009, 26(1): 38-40, 51.
- [39] Mustapha M, Nassir CMNCM, Aminuddin N, et al. Cerebral small vessel disease (CSVD)-lessons from the animal models [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1317.
- [40] Jäkel L, Van Nostrand WE, Nicoll JAR, et al. Animal models of cerebral amyloid angiopathy [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(19): 2469-2488.
- [41] Wallays G, Nuyens D, Silasi-Mansat R, et al. Notch3 Arg170Cys knock-in mice display pathologic and clinical features of the neurovascular disorder cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(12): 2881-2888.
- [42] Niedowicz DM, Reeves VL, Platt TL, et al. Obesity and diabetes cause cognitive dysfunction in the absence of accelerated β -amyloid deposition in a novel murine model of mixed or vascular dementia [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 64.
- [43] 董成亚, 王伊龙, 刘向荣. 脑小血管病脑白质损伤动物模型 [J]. *中国卒中杂志*, 2019, 14(5): 497-503.
- [44] 李莹, 王磊沙, 刘建勋, 等. 脑梗死气虚血瘀证大鼠模型表征及病理生理变化研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(4): 786-793.
- [45] Sadigh-Eteghad S, Geranmayeh MH, Majidi A, et al. Intranasal cerebrolysin improves cognitive function and structural synaptic plasticity in photothrombotic mouse model of medial prefrontal cortex ischemia [J]. *Neuropeptides*, 2018, 71: 61-69.
- [46] Livingston-Thomas JM, Jeffers MS, Nguemeni C, et al. Assessing cognitive function following medial prefrontal stroke in the rat [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 294: 102-110.
- [47] Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2): 245-261.
- [48] Lee ES, Yoon JH, Choi J, et al. A mouse model of subcortical vascular dementia reflecting degeneration of cerebral white matter and microcirculation [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(1): 44-57.
- [49] Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4): 165260.
- [50] 翟羽佳, 穆寒露, 何蓉蓉, 等. 光照血栓中风模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 135-141.

[收稿日期]2021-04-19

史宝燕, 孙洪胜, 李玥, 等. 心房颤动的机制与代谢组学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 128–131, 137.
Shi BY, Sun HS, Li Y, et al. Mechanism and metabonomics of atrial fibrillation [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 128–131, 137.
doi: 10. 3969/j.issn.1671–7856. 2022. 05. 019

心房颤动的机制与代谢组学研究

史宝燕¹, 孙洪胜², 李 玥², 李 彦¹, 张学顺^{2*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250300; 2. 山东中医药大学附属医院药学部, 济南 250014)

【摘要】 心律失常是早期的心脏异常表现之一, 心房颤动是临床最常见的心律失常。但其病理生理机制尚未完全阐明, 药物治疗存在致心律失常的风险且导管消融治疗成本高昂, 给临床工作带来巨大的挑战。近年来代谢组学在揭示房颤生物标志物、药理作用等方面不断深入。本文就房颤的发病机制、代谢组学研究方法以及房颤的生物标志物进行综述, 以期对房颤的预防和治疗研究拓展思路。

【关键词】 房颤; 机制; 代谢组学; 生物标志物

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0128-04

Mechanism and metabonomics of atrial fibrillation

SHI Baoyan¹, SUN Hongsheng², LI Yue², LI Yan¹, ZHANG Xueshun^{2*}

(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China.

2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014)

【Abstract】 Arrhythmia is an early abnormal manifestation of the heart. Atrial fibrillation is the most common arrhythmia in the clinic. However, its pathophysiological mechanism has not been fully elucidated. The risk of arrhythmias in drug therapy and the high cost of catheter ablation are clinical challenges. In recent years, metabonomics has made great progress in revealing the biomarkers and pharmacological effects of atrial fibrillation. This article reviews the pathogenesis, metabonomics research method, and biomarkers of atrial fibrillation to expand research ideas to prevent and treat atrial fibrillation.

【Keywords】 atrial fibrillation; mechanism; metabonomics; biomarker

心律失常是常见和多发的心血管疾病, 可认为是心脏异常最初的表现。心律失常是左室收缩功能障碍的重要病因, 可诱发心肌病^[1-2]。目前对于心律失常的治疗主要有药物和导管消融两种方式。近十年来, 抗心律失常药物发展缓慢, 部分药物有致心律失常的风险^[3], 故使用上存在局限性。导管消融术在维持窦性心律方面有效, 但其成本高、有创, 存在手术风险^[4]。

心房颤动(房颤)是临床上常见的心律失常之一。心房颤动的发生率和死亡率都很高, 给患者、社会健康和健康经济带来了重大负担^[5]。然而目前应对房颤进展的理想预防和治疗策略仍然很少, 对其发病机制尚不完全清楚。代谢组学的应用有助于发现参与疾病发展的新的代谢途径^[6]。探究与房颤预后相关的生物标志物, 对阐明其发病机制, 早期干预治疗, 改善预后等方面有重大意义^[7]。

【基金项目】 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH378); 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0077)。

【作者简介】 史宝燕(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 实验方剂学与中药新剂型。E-mail: shi9502yan@163.com

【通信作者】 张学顺(1963—), 男, 主任药师, 研究方向: 实验方剂学与中药新剂型。E-mail: zhangxs321@126.com

1 心房颤动的发病机制

房颤的发生往往不是由单一机制导致的,随着对触发、折返、局灶性异位活动、电重构、结构重构等机制的研究,普遍认为房颤是多种机制共同作用的结果^[8]。此外,氧化应激、遗传学、炎症、自主神经系统等作用机制目前也备受关注。

1.1 电生理机制

引起房颤的电生理机制通常分为触发和维持机制。触发部位多位于肺静脉肌袖、冠状静脉窦、上腔静脉和左心房后壁等位置,以肺静脉肌袖来源最普遍^[9]。诸多学者提出维持机制的假说包括多重小波折返、局灶激动、转子样激动学说等^[10]。

1.2 病理生理学机制

1.2.1 电重构

电重构是房颤最常见的改变,电重构的发生是由于 L 型 Ca^{2+} 电流电导的降低和内向整流电流电导增加导致的^[11]。Molina 等^[12]认为房颤和钙超载有关,在各种心衰模型中, Ca^{2+} 处理异常在增加房颤易感性方面发挥着重要作用。

1.2.2 结构重构

结构重构指组织结构的变化,包括微观的(如纤维化)和宏观的(如心房扩张)^[13-14],影响心房心肌细胞的收缩功能。肌细胞和细胞外基质的改变是引起结构重构的主要原因,结构重构特别是纤维化在许多形式的房颤中的作用都很重要,除肌细胞外,心房肌间质也有明显改变,引起间质纤维增生,最终导致心房扩张。结构重构比电重构的影响更为严重。

1.2.3 氧化应激

活性氧自由基正常水平可以维持机体功能,过量的活性氧自由基会导致炎症反应,组织损伤加重^[15]。房颤患者的心房肌组织中出现明显的氧化应激损伤,氧化应激可能通过触发或促进心房电重构及结构重构,进而参与房颤的过程。

1.2.4 分子遗传学

有部分房颤患者发病年纪较小,且未识别出明确病因,高度怀疑与基因有关。Micro RNA 是近年来研究较为深入的小分子 RNA, Micro RNA 参与调控房颤中多种蛋白基因的表达^[16],目前认为其与房颤的发生发展有密切关系,在房颤的发生及维持中具有重要的作用。

1.2.5 炎症

房颤患者血清炎症因子水平升高,心房肌组织

存在炎症性细胞浸润。表明房颤与炎症有一定的相关性^[15,17]。炎症与房颤之间的关系是双向的,房颤能引发炎症性白内障,而促炎症状态又能加速房颤发作。

1.2.6 自主神经系统

自主神经系统在房颤的发生和发展中起到关键性的作用,自主神经系统活性增强可能使患者更易患阵发性心律失常,如心房颤动,会导致过量乙酰胆碱的释放^[18]。交感神经和副交感神经失衡会导致房颤的发生,交感神经和副交感神经同时激活是最常见的触发因素。

2 代谢组学的应用

2.1 代谢组学的概念

代谢组学是继基因组学、转录组学、蛋白质组学后新兴的一门学科。与基因组学和蛋白质组学相比,代谢组学具有快速、准确、分辨率高、灵敏度高、样本量小等优点。代谢组学的最终目标是对尿液、血浆、细胞提取物等样本类型中不同小分子种类进行表征,应用代谢组学数据可以更深入的探索疾病机制^[19]。代谢组学不仅可以发现生物体对各种内外环境干扰的不同反应,而且可以区分同一物种不同个体间的表型差异。

2.2 代谢组学的研究技术

代谢组学使用的分析技术多种多样,可分为两类:核磁共振(NMR)和质谱(MS)^[20]。使用气相色谱-质谱联用(GC-MS)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)、核磁共振(NMR)等平台从生物样品中提取代谢数据,从平台得到的一系列复杂数据中提取有用的信息进行数值处理,将原始数据转换成可供进一步统计分析的可用形式。

2.3 代谢组学的研究方法

代谢组学研究分为两种方法,靶向代谢组学和非靶向代谢组学。靶向代谢组学可以对特定的代谢物进行绝对定量,非靶向代谢组学对可测量的分析物进行综合分析,也可以发现新的化合物^[21-23]。代谢组学被广泛用于研究心血管疾病的代谢谱和筛选生物标志物^[24]。

3 基于代谢组学心房颤动生物标志物的研究

心脏代谢紊乱是大多数心血管疾病的基础。当前,只有当患者心律失常后,才能通过心电图来诊断。常规十二导联心电图虽然诊断房颤的特异

性强,在定性诊断上具有优势,但在房颤的定量诊断,却缺乏进一步的标准。因此,迫切需要确定有助于对房颤进行定量诊断的生物标志物,开发基于机制的治疗方法^[25]。

3.1 心脏生物标志物

心脏生物标志物脑钠肽(BNP)、N 端脑利钠肽前体(NT-proBNP)和肌钙蛋白升高^[26-29],受试者发生房颤的风险显著增加。在预测隐源性脑卒中后房颤的发生方面,BNP 相比于 NT-proBNP 具有更好的诊断准确性^[30]。

3.2 纤维化相关生物标志物

纤维化相关的生物标志物促纤维化蛋白 Gal-3 是一种 β -半乳糖苷结合凝集素,可以预测房颤的发生^[31]。转化生长因子 GDL-15 是一种应激反应细胞因子,在细胞缺血或氧化应激时被激活,可保护心肌防止发生肥大和纤维化。阵发性房颤患者 GDL-15 水平较高^[32]。

3.3 自身抗体生物标志物

自身抗体可能是一类被低估但是大有前景的候选生物标志物,它们的检测可以帮助识别处于疾病早期阶段的患者^[31]。抗毒蕈碱 2(M2)受体、抗 $\beta 1$ 肾上腺素受体、抗热休克蛋白 65 抗体和抗热休克蛋白 70 抗体的自身抗体水平在房颤中均升高^[31-32]。

3.4 炎症生物标志物

半乳糖凝集素-3 是一种与心房重构相关的炎症生物标志物,心房高频发作患者半乳糖凝集素-3 水平显著高于正常人,心房高频发作与房颤的发生发展相关^[33]。房颤患者血浆血管紧张素 II 浓度及 TGF- $\beta 1$ 、TNF- α 水平轻度升高。

3.5 微小核糖核酸类生物标志物

微小核糖核酸(Micro RNAs)是内源性的、保守的、长度为 21~25 个核苷酸的单链非编码核糖核酸^[34]。MicroRNAs 在心房组织和循环血液中表达稳定且较容易检测,可作为诊断房颤的标志物^[35-37]。早期检测 MicroRNA 多态性或单核苷酸多态性可以提高房颤患者的诊断和治疗水平^[11]。一项大型研究确定了人血清环状 RNA(hsa-circRNA-025016)可作为预测术后房颤的潜在生物标志物^[38]。Xiao 等^[39]证实 hsa-miR-4443 的显著降低可作为房颤的生物标志物。MicroRNA-208 作为一种心肌特异性 MicroRNA,被认为与心律失常等心脏疾病相关。

3.6 氨基酸类生物标志物

血浆氨基酸水平可以诊断或预测房颤的潜在生物标志物,持续性心房颤动患者循环中的 4-羟基吡咯烷-2-羧基降低。相比于无房颤患者,房颤患者 D-异丙苏氨酸、赖氨酸、苏氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸水平降低。L-3-氨基异丁酸、缬氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、牛磺酸水平升高^[40]。

4 小结和展望

代谢组学是基因组学、转录组学和蛋白质组学的重要补充。多组学策略能够系统的诊断患者血浆中的功能失调因子,揭示潜在的生物标志物及相关的代谢途径,为进一步的病理研究提供帮助,有利于寻找药物治疗新靶点^[41]。随着代谢组学技术的快速发展,各种代谢产物在不同疾病状态下的变化以及可能影响它们的代谢途径可以被高灵敏度、高选择性地检测出来,进而全面的分析生物系统内源性代谢物谱的动态变化,确定内源性机制^[42]。代谢组学技术也正应用于多组分药物的药效研究,不足之处是对于外源性药物如何影响机体的研究还不够深入。代谢组学技术在检测药物疗效和探索药物不良反应相关的代谢途径等方面发挥了关键作用^[43]。目前,代谢组学在房颤的诊断生物标志物和代谢途径方面的应用已日趋广泛。尽管现在代谢组学技术仍处于成长阶段,也面临着困难挑战,相信随着代谢组学技术的进步,深层次的探索房颤的发病机制,实现早期诊断和治疗,使人们的健康安全得到科学合理地保障。

参考文献:

- [1] Sossalla S, Vollmann D. Arrhythmia-induced cardiomyopathy [J]. Dtsch Arztebl Int, 2018, 115(19): 335-341.
- [2] 程宽,陈庆兴,庞暘,等. 心律失常诱导的心肌病导管射频消融结果与随访 [J]. 临床心血管病杂志, 2021, 37(3): 229-233.
- [3] Podrid PJ. Aggravation of arrhythmia: a complication of antiarrhythmic drugs [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 1993, 4(3): 311-319.
- [4] Wang Z, Wang B, Li X, et al. Metabolic syndrome, high-sensitivity C-reactive protein levels and the risk of new-onset atrial fibrillation: results from the kailuan study [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2021, 31(1): 102-109.
- [5] Hindricks G, Potpara T, Dagres N, et al. ESC scientific document group. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)

- [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(5): 373-498.
- [6] Zuo K, Li J, Li K, et al. Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation [J]. *Gigascience*, 2019, 8(6): giz058.
- [7] Alonso A, Yu B, Sun YV, et al. Serum metabolomics and incidence of atrial fibrillation (from the atherosclerosis risk in communities study) [J]. *Am J Cardiol*, 2019, 123(12): 1955-1961.
- [8] Leonelli F, Bagliani G, Boriani G, et al. Arrhythmias originating in the atria [J]. *Card Electrophysiol Clin*, 2017, 9(3): 383-409.
- [9] 黄从新, 张澍, 黄德嘉, 等. 心房颤动: 目前的认识和治疗建议-2018 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2018, 32(4): 315-368.
- [10] 王增夏, 王贺, 邱承杰, 等. 心房颤动发病机制的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(15): 26-29.
- [11] Komal S, Yin JJ, Wang SH, et al. MicroRNAs: Emerging biomarkers for atrial fibrillation [J]. *Cardiol*, 2019, 74(6): 475-482.
- [12] Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, et al. Profibrotic, electrical, and calcium-handling remodeling of the atria in heart failure patients with and without atrial fibrillation [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1383.
- [13] Wijesurendra RS, Casadei B. Mechanisms of atrial fibrillation [J]. *Heart*, 2019, 105(24): 1860-1867.
- [14] Harada M, Melka J, Sobue Y, et al. Metabolic considerations in atrial fibrillation-mechanistic insights and therapeutic opportunities [J]. *Circ J*, 2017, 81(12): 1749-1757.
- [15] 毛文锋, 司春婴, 王贺, 等. 房颤发病机制及治疗的中西医结合研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(3): 856-862.
- [16] 张红明, 何青松, 韩雅玲. 微小 RNA 与心房颤动关系的研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2016, 18(2): 208-210.
- [17] Tousoulis D. Biomarkers in atrial fibrillation: from pathophysiology to diagnosis and treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(5): 762-764.
- [18] Manolis AA, Manolis TA, Apostolopoulos EJ, et al. The role of the autonomic nervous system in cardiac arrhythmias: the neuro-cardiac axis, more foe than friend? [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2021, 31(5): 290-302.
- [19] Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, et al. Untargeted metabolomics strategies-challenges and emerging directions [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, 27(12): 1897-1905.
- [20] Vettukattil R. Preprocessing of raw metabolomic data [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1277: 123-136.
- [21] Papadimitropoulos MP, Vasilopoulou CG, Maga-Nteve C, et al. Untargeted GC-MS metabolomics [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1738: 133-147.
- [22] Zhou Y, Tan W, Zou J, et al. Metabolomics analyses of mouse retinas in oxygen-induced retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(10): 9.
- [23] Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207082.
- [24] Wang X, Wang D, Yu X, et al. Non-targeted metabolomics identified a common metabolic signature of lethal ventricular tachyarrhythmia (LVTA) in two rat models [J]. *Mol Biosyst*, 2016, 12(7): 2213-2123.
- [25] van Wijk SW, Ramos KS, Brundel BJM. Cardioprotective role of heat shock proteins in atrial fibrillation: from mechanism of action to therapeutic and diagnostic target [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 442.
- [26] Sørensen NA, Shah AS, Ojeda FM, et al. High-sensitivity troponin and novel biomarkers for the early diagnosis of non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with atrial fibrillation [J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2016, 5(6): 419-427.
- [27] Kumarathurai P, Mouridsen MR, Mattsson N, et al. Atrial ectopy and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as predictors of atrial fibrillation: a population-based cohort study [J]. *Europace*, 2017, 19(3): 364-370.
- [28] Berg DD, Ruff CT, Morrow DA. Biomarkers for risk Assessment in atrial fibrillation [J]. *Clin Chem*, 2021, 67(1): 87-95.
- [29] Xiao J, Persson AP, Engström G, et al. Supraventricular arrhythmia, N-terminal pro-brain natriuretic peptide and troponin T concentration in relation to incidence of atrial fibrillation: a prospective cohort study [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 134.
- [30] Palà E, Pagola J, Juega J, et al. B-type natriuretic peptide over N-terminal pro-brain natriuretic peptide to predict incident atrial fibrillation after cryptogenic stroke [J]. *Eur J Neurol*, 2021, 28(2): 540-547.
- [31] Hammerer-Lercher A, Namdar M, Vuilleumier N. Emerging biomarkers for cardiac arrhythmias [J]. *Clin Biochem*, 2020, 75: 1-6.
- [32] Hu XF, Zhan R, Xu S, et al. Growth differentiation factor 15 is associated with left atrial/left atrial appendage thrombus in patients with nonvalvular atrial fibrillation [J]. *Clin Cardiol*, 2018, 41(1): 34-38.
- [33] Aksan G, Yanık A, Yontar OC, et al. Galectin-3 levels and the prediction of atrial high-rate episodes in patients with cardiac resynchronization therapy [J]. *J Investig Med*, 2021, 69(1): 20-27.
- [34] Çakmak HA, Demir M. MicroRNA and cardiovascular diseases [J]. *Balkan Med J*, 2020, 37(2): 60-71.
- [35] 张天磊, 魏泽人, 杨树森. MicroRNAs 作为心房颤动新兴生物标志物的研究进展 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2020, 12(9): 1141-1143.
- [36] 李思瑶, 钟江华. MicroRNA 与心房颤动关系的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2020, 41(1): 34-38.

梁紫君, 张雪儿, 黄健, 等. miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 132–137.
Liang ZJ, Zhang XE, Huang J, et al. Research progress of miRNA in ischemic cerebrovascular disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 132–137.
doi: 10. 3969/j.issn.1671–7856. 2022. 05. 020

miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展

梁紫君^{1,2}, 张雪儿^{1,2}, 黄 健^{1,2}, 张林杰¹, 安红伟^{1*}

(1. 柳州市中医医院神经内科, 广西 柳州 545001; 2. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530000)

【摘要】 缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 是常见的中枢神经系统疾病, 具有较高的发病率和死亡率。脑侧支循环对常由动脉粥样硬化所致的 ICVD 具有良好的代偿作用。近年来有研究显示, miRNA 在脑血管动脉粥样硬化及其侧支循环建立的多种生理、病理过程中发挥重要作用, 具有作为 ICVD 疾病诊断和病情评估的新型生物标志物的潜力。本文就 miRNA 与 ICVD 脑血管动脉粥样硬化及其侧支循环建立的相关性作一综述。

【关键词】 miRNA; 缺血性脑血管病; 动脉粥样硬化; 侧支循环

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671–7856 (2022) 05–0132–06

Research progress of miRNA in ischemic cerebrovascular disease

LIANG Zijun^{1,2}, ZHANG Xueer^{1,2}, HUANG Jian^{1,2}, ZAHGN Linjie¹, AN Hongwei^{1*}

(1. Department of Neurology, Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Liuzhou 545001, China.

2. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000)

【Abstract】 Ischemic cerebrovascular disease (ICVD) is a common central nervous system disease with high morbidity and mortality. Cerebral collateral circulation has a positive compensatory effect on ICVD, which is often caused by atherosclerosis. In recent studies, various physiological and pathological processes of cerebrovascular atherosclerosis and establishment of collateral circulation were closely related to miRNA that has the potential to be used as a new biomarker for diagnosis and evaluation of ICVD. This article reviews the relationship between miRNA and cerebrovascular atherosclerosis, and the establishment of collateral circulation in ICVD.

【Keywords】 miRNA; ischemic cerebrovascular disease; atherosclerosis; collateral circulation

随着人口老龄化的加剧, 缺血性脑血管病 (ischemic cerebrovascular disease, ICVD) 的发病率正在上升, 是造成人类残疾和死亡的重要原因之一, 严重影响患者的生命健康。ICVD 是指由于脑血管狭窄或闭塞等各种原因导致脑组织低灌注和

缺血缺氧, 进而出现神经功能损害的一类疾病。脑缺血可引起多种缺血性脑病 (如缺血性脑卒中、短暂性脑缺血发作等) 的发生, 其中缺血性脑卒中最为常见, 占有脑血管意外的 87%^[1-2]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是 ICVD 的主要病理基

【基金项目】 广西重点研发计划 (桂科 AB16380233); 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题 (Z20180391); 柳州市科技计划项目 (2019BJ10611); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题 (Z20210522); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCXJ2021127)。

【作者简介】 梁紫君 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管病的基础与临床。E-mail: 2943699797@qq.com

【通信作者】 安红伟 (1971—), 男, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 脑血管病的基础与临床。E-mail: ahw0305@163.com

础,而脑侧支循环的建立对该疾病的恢复具有重要的作用。miRNA 在 ICVD 的发病机制中起着重要的调节作用,与动脉粥样硬化、侧支循环等密切相关,是近年来生物医学领域是研究热点之一^[3]。已有研究表明,miRNA 与 ICVD 脑缺血损伤的炎症反应、氧化应激、自噬、细胞凋亡等生理病理过程密切相关^[2]。本文就 miRNA 在 ICVD 脑血管 AS 的炎症机制及其侧支循环建立中的调控作用进行综述,为探索 ICVD 的防治提供新思路。

1 miRNA 简介

miRNA 是一类长度约 22 个核苷酸的、具有高度保守性的内源性非编码单链 RNA 分子,能够通过序列配对结合到靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)上,发挥降解靶基因 mRNA 或者抑制其翻译的作用,从而参与转录后基因表达调控,广泛存在于动植物、真菌及病毒中^[4]。miRNA 可以通过与相应靶基因结合而调节炎症反应等多种机体生理病理过程,是近年来生物学研究领域的重大突破。许多研究表明,miRNA 在肿瘤发生、斑块形成、细胞生长、分化和血管生成等过程中发挥着重要的调节作用,与动脉粥样硬化、缺血性脑卒中、癌症、心血管疾病等疾病的发病机制有着显著的相关性;而且 miRNA 既能在细胞或组织中特异性表达,又能稳定存在于血液中成为循环 miRNA,具有作为早期疾病诊断和病情评估的新型血液生物标志物的巨大潜力^[5-8]。

2 miRNA 通过介导炎症反应参与 ICVD 中的动脉粥样硬化过程

动脉粥样硬化(AS)是一种血管的慢性炎症性疾病,其特征是由于过多的脂质和炎症细胞累积于血管壁形成斑块而导致血管腔狭窄。AS 是 ICVD 发病的重要危险因素之一,是预防和治疗 ICVD 的关键所在^[9]。许多研究发现,miRNA 参与调节 AS 的血管内皮损伤、不稳定斑块的破裂及血栓形成等过程,从而导致脑血管狭窄诱发 ICVD。内皮细胞功能障碍是 AS 的最初触发机制^[10],这一点已得到普遍认可。Liang 等^[11]通过建立载脂蛋白 E(ApoE)^{-/-}基因敲除小鼠的 AS 模型,发现 miR-155 可以通过靶向抑制脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(brain and muscle ARNT-like protein-1, Bmal1)诱导内皮细胞凋亡和炎症反应,促进 AS 的发展。此外,miRNA 也可以通过调节白细胞介导的炎症反应来参与 AS

疾病的进展。miR-21 是巨噬细胞中表达最丰富的 miRNA,巨噬细胞中 miR-21 的缺失可以增加炎症细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的表达,促进 AS 形成期间的斑块坏死和血管炎症^[12]。因此,miRNA 可以通过调节炎症反应参与 AS 的形成、发生发展等过程,从而诱导 ICVD 的发生。已有多项研究表明,miRNA 是基因表达转录后重要的调控因子,可以通过多种炎症信号通路调控 AS 的炎症应答过程,从而参与 AS 的演进。

2.1 核因子- κ B(NF- κ B)信号通路

NF- κ B 是一种促炎转录因子,在无刺激条件下,与 κ B 抑制物(I κ B)相互作用被隔离在细胞质中;当受到炎症信号刺激时,I κ B 激酶(IKK)复合物磷酸化 I κ B 导致其蛋白酶体降解,因而 NF- κ B 得以释放进入细胞核并与细胞黏附分子、促炎细胞因子、趋化因子等促炎基因结合,从而介导 AS 的炎症反应过程。NF- κ B 途径是引起炎症的主要途径,许多 miRNA 可通过 NF- κ B 途径参与血管炎症和炎症疾病(如 AS 和败血症)的调节^[13]。有研究表明,MiR-181a-5p 和 miR-181a-3p 分别通过靶向 TAB2 和 NEMO 来阻断 NF- κ B 信号通路的激活,抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中的黏附分子表达以及单核细胞与内皮细胞的相互作用,协同缓解高血脂应激引起的血管炎症,从而延缓 AS 的病理进展^[14]。Dong 等^[15]通过对缺血性脑卒中大鼠模型和体外模型进行研究,发现 miRNA-22 可以通过 p38 MAPK/NF- κ B 途径减轻缺血性脑卒中诱发的炎症反应。另外,Wei 等^[16]通过分析 miRNA 在氧化性低密度脂蛋白(oxidative low-density lipoprotein, ox-LDL)诱发的 HUVECs 活化中的生物学活性,发现 MiR-345-3p 通过靶向内皮细胞中的 TRAF6 抑制 TAK1/p38/NF- κ B 信号通路的激活,从而减轻了由 ox-LDL 引起的细胞凋亡和炎症反应。因此,miRNA 可通过阻断 NF- κ B 信号通路,参与抑制 AS 的炎症反应过程。

2.2 Toll 样受体 4(TLR4)信号通路

Toll 样受体 4 信号通路在 AS 的炎症激活和脂质积聚过程中起着重要作用,可以激活转录因子 NF- κ B 而导致各种炎症因子的产生^[17],而 miRNA 可通过 TLR4 信号通路参与 AS 斑块中的脂质积累和炎症反应。有研究发现,在 ox-LDL 诱导 THP-1 巨噬细胞的体外实验中,TLR4 的表达以时间和剂量依赖性方式显著增加,miR-370 的表达则以相同的

依赖性下降,该研究证实 miR-370 可通过靶向 THP-1 巨噬细胞中的 TLR4 来减少 ox-LDL 触发的血管炎症和氧化应激^[18]。有研究者通过利用脂多糖 (LPS) 建立内皮细胞炎症损伤模型,发现 LPS 可显著上调 miR-146a 的表达,证明了 miR-146a 以 TLR4 依赖的方式负调节 LPS 诱导的 CXCL16 表达,从而抑制动脉粥样硬化中的炎症反应^[19]。以上研究表明,TLR4 信号通路的激活可促进 AS 炎症的发生发展。

2.3 Notch 信号通路

Notch 通路是由 4 种 Notch 受体亚型 (Notch 1-4) 和 5 种 Notch 配体 (Delta-like ligand 1/3/4 (DLL1/3/4)、Jagged-1/2) 组成的介导细胞间信息交流的信号系统,在 AS 的炎症和免疫调节中起着重要的作用^[20]。Sun 等^[21]研究发现,Notch 1 作为 miR-181b 的直接结合位点,在 AS 模型鼠中表达上调,而 miR-181b 表达下调;miR-181b 表达的下调是通过调节 Notch 1 机制引起 AS 炎症和血管内皮损伤的重要因素。另一项相关研究报道,在 ApoE^{-/-} 基因敲除小鼠模型中 miR-181b 可通过直接靶向 Notch1 调节巨噬细胞极化,从而拮抗 AS 斑块的易损性^[22]。Gao 等^[23]通过建立冠状动脉粥样硬化小鼠模型,发现 miR-107 可通过靶向 KRT1 来抑制 Notch 信号途径的激活,拮抗血管内皮细胞的炎症和内质网应激,从而发挥预防血管 AS 发生的作用。由此可见,抑制 Notch 信号通路对减少 AS 炎症反应具有一定的作用。

2.4 其他信号通路

一项研究通过荧光素酶报告基因分析证实,一氧化氮合酶 3 (NOS3) 是 miR-195 和 miR-582 的直接靶标;而 miR-195 和 miR-582 的上调可通过靶向结合 NOS3 mRNA 的 3'-UTR 来抑制内皮细胞中 NOS3 的表达,从而减少 NO 的释放,防止血小板的活化、黏附和聚集,从而抑制血栓的形成^[24]。在另一项研究中,经 ox-LDL 诱导的树突状细胞中 miR-155 表达上调,miR-155 可通过抑制 JNK 信号负调控清道夫受体 A (scavenger receptor A, SRA) 的表达,该研究阐明了 miR155-JNK-SRA-miR-155 负反馈环是 ox-LDL 调控 miR-155 表达的分子机制^[25]。Tang 等^[26]研究发现,经 ox-LDL 处理的 HUVEC 中 miR-126 表达显著降低,而给予 miR-126 模拟物可明显阻断 ox-LDL 诱导的 HUVEC 损伤;该研究表明 miR-126 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路恢复细胞自噬功

能,减轻 AS 的内皮损伤。以上研究结果说明,miRNA 可以通过多种信号通路参与 AS 炎症调节。

3 miRN 通过调控血管新生参与 ICVD 侧支循环的建立

脑侧支循环是指当脑动脉发生狭窄甚至闭塞或者其他原因而导致正常脑供血受限时,能够代偿灌注脑缺血区的辅助血管结构。脑侧支循环可分为三级:一级侧支循环是指 Willis 环;二级侧支循环包括眼动脉、软脑膜动脉及其他颅内外远端动脉之间建立的吻合支;三级侧支循环为缺血区周围形成的新生血管^[27]。脑侧支循环对 ICVD 疾病的发生发展、治疗及预后有着重要的影响。Marks 等^[28]在研究侧支循环对接受血管内治疗的急性脑梗死患者的影响中发现,侧支循环良好患者的 NIHSS 评分、脑梗死体积以及溶栓后再灌注情况均显著优于侧支循环不良患者,且脑梗死再灌注及侧支循环均不良者更易发生脑梗死体积的扩大。越来越多研究表明,miRNA 与 ICVD 侧支循环建立也有着密切的关系。

一级、二级侧支循环是生理存在的脑动脉,当它们无法维持脑组织的正常血供,动脉之间将会建立新生血管之间的吻合,即三级侧支循环。miRNA 不仅参与 ICVD 的 AS 炎症性调控过程,同时也在缺血后脑血管的再生中发挥着重要作用。血管生成是一个复杂且高度调控的过程,包括内皮细胞活化、增殖、迁移、发芽,基底膜形成以及新生血管的成熟等步骤^[29],是 ICVD 生理功能恢复的重要因素。多项研究表明 miRNA 具有调控血管新生的作用。Fan 等^[30]通过建立大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 小鼠模型,发现 miR-384-5p 可以负调节 DLL4 的表达,通过 Notch 信号通路促进缺血性脑卒中小鼠内皮祖细胞的增殖和血管生成,同时抑制内皮祖细胞的凋亡。而 Zhang 等^[31]研究发现,胆固醇修饰的 miR-210 可以显著上调 MCAO 小鼠模型脑缺血病变区域的整合素 $\beta 3$ 、CD34 (内皮细胞标记物) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达,从而促进缺血性脑损伤区域的血管生成。另一项研究证实,miR-26a 可以通过 PI3K/AKT 和 MAPK/ERK 途径上调低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达,介导 VEGF 的转录活性并促进脑微血管内皮细胞的管腔形成和细胞增殖,从而促进脑梗死大鼠模型的血管生成^[32]。以上研究结果表明,miRNA 可以通过介导

Notch 信号通路与 VEGF 信号通路促进新生血管形成,从而参与 ICVD 侧支循环的形成过程,改善缺血缺氧造成的脑损伤。

4 miRNA 在 ICVD 中的潜在应用价值

4.1 循环 miRNA 作为 ICVD 诊断、治疗、预后的潜在生物标记物

多项证据表明,血液中多种循环 miRNA 的表达水平在 ICVD 发生后出现差异性变化,有可能成为新的诊断性生物学标记物^[33-34]。Tiedt 等^[35]通过对急性脑梗死 (acute ischemic stroke, AIS) 患者和健康对照受试者血浆样本中的循环 miRNA 进行综合评估,发现循环系统中的 miR-125a-5p、miR-125b-5p 和 miR-143-3p 与 AIS 有关,具有显著的敏感性 (85.6%)、特异性 (76.3%) 和更高的曲线下面积 (AUC) 值 (0.90); 而常规诊断的多模式头颅 CT 扫描的敏感性及神经元特异性烯醇化酶、白细胞介素 6 的 AUC 值均明显低于这 3 种 miRNA。Chen 等^[36]研究发现循环外泌体 miR-223 的增加与 AIS 的发生、严重程度和短期预后相关, AIS 患者发病 72 h 内外周血外泌体 miR-223 的表达水平显著高于健康对照者,且增高水平与美国国立卫生研究院卒中量表 (NIHSS) 评分呈正相关; 随访 3 个月, miR-223 高表达的 AIS 患者预后较差。Huang 等^[37]对颈动脉粥样硬化 (carotid atherosclerosis, CAS) 患者外周血中的 miRNA 和促炎因子的表达水平进行研究,发现 CAS 患者 miRNA-146a 和促炎因子 (肿瘤坏死因子 α 和白介素 6) 的表达水平有统计学差异,并且与 CAS 狭窄程度及斑块易损性呈正相关。Wu 等^[38]通过采用高通量 TaqMan 低密度阵列 (TLDA) 筛选技术和个体定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测方法进行一项病例对照研究,发现短暂性脑缺血发作 (TIA) 和缺血性脑卒中 (IS) 患者的某些循环 miRNAs 有着独特的表达特征; TIA 患者血清 miR-23b-3p、miR-29b-3p 和 miR-181a-5p 表达显著上调,而 IS 患者血清 miR-21-5p、miR-23b-3p、miR-29b-3p 和 miR-181a-5p 表达显著上调,其中 miR-21-5p、miR-23b-3p 和 miR-29b-3p 在 TIA 和 IS 患者血清中存在差异性表达,这对 ICVD 的疾病鉴别具有重要的意义。此外,该研究团队还发现这些循环 miRNAs 的表达水平对 TIA 后继发卒中风险和 IS 的神经功能缺损严重程度密切相关。这些临

床研究结果表明,循环 miRNA 对缺血性脑血管病的诊断和病情预测具有重要的潜在价值。

4.2 循环 miRNA 作为评估 ICVD 侧支循环建立情况的潜在生物标记物

循环 miRNA 分子有可能作为预测 ICVD 患者侧支循环建立的标记物。Jin 等^[39]通过研究促血管生成和抗血管生成的 miRNA 在 AIS 患者中的表达情况,结果显示与对照组相比, AIS 患者外周血中的 miRNA-126、miRNA-130a 和 miRNA-378 表达均降低,而循环 miRNA-185、miRNA-218 和 miRNA-222 均表达升高; 此外, miR-101、miR-126、miR-206、miR-218、miR-222 和 miR-378 与 NIHSS 评分相关,可用于评估 AIS 的疾病严重程度。范崇桂等^[40]通过探讨 AIS 患者血清 miRNA 表达水平与脑侧支循环建立的关系,发现 AIS 患者的血清 miR-7、miR-200b 表达水平较健康对照组有差异性降低,且在不同分级侧支循环的患者中存在显著差异,三级侧支循环组血清 miR-7、miR-200b 水平明显低于一级、二级侧支循环组,这提示血清 miR-7、miR-200b 水平有望用于患者侧支循环建立情况的预测,为临床制定合理的治疗策略提供参考作用。彭彬等^[41]通过对 80 例 AIS 患者的循环 miRNA 水平进行研究发现,脑侧支循环不良组抑制血管新生的循环 miR-15b、miR-92a 表达水平显著高于良好组; 而脑侧支循环良好组促血管新生的循环 miR-126、miR-132、miR-210 较不良组表达显著上调,表达均具有统计学差异性。这提示 AIS 患者体内促血管新生的 miRNAs 水平的升高有助于脑侧支循环的建立,较高水平的促血管新生的 miRNAs 表达可能是脑侧支循环建立的必要条件。Wu 等^[42]研究发现, AIS 患者血浆 miR-99b 水平与 VEGF 水平呈负相关,提示 miR-99b 下调可能参与脑梗死后脑组织新生血管形成过程。综上所述,相关循环 miRNAs 的表达水平对了解 ICVD 患者脑侧支循环建立的情况具有重要的预测价值。由此猜测,对某些特定的 miRNAs 进行调控,及提高促血管生成的 miRNAs 表达和减少抗血管生成的 miRNAs 表达,可为临床 ICVD 的治疗提供新思路。

5 结语

miRNA 参与 ICVD 的动脉粥样硬化炎症和血管新生等过程,在 ICVD 疾病的发生发展及侧支循环建立中发挥着重要的调节作用。同时由于 miRNA 可稳定存在于循环血液中不易被降解,因此具有作

为 ICVD 诊断性生物学指标的潜力。目前,虽然对 miRNA 与 ICVD 的关系的相关研究已经取得一定的成果,但 miRNA 在 ICVD 生理病理过程中的作用机制有待进一步阐明,在临床的应用仍具有一定的局限性。对 miRNA 在 ICVD 中的分子生物学机制进行深入研究,积极寻找有效的生物分子标志物和治疗靶点,具有重要的临床价值。总之,miRNA 作为 ICVD 发生发展过程中的一种新型调控因子,为其发病机制的研究提供了新的思路,并在其诊疗及预后判断等各方面显示出良好的临床应用前景。

参考文献:

- [1] Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2021, 143(8): e254-e743.
- [2] Liu X, Feng Z, Du L, et al. The potential role of microRNA-124 in cerebral ischemia injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 120.
- [3] Bao Y, Li S, Ding Y, et al. MiRNA: a potential target for gene diagnosis and treatment of atherosclerotic stroke [J]. *Int J Neurosci*, 2021, 131(3): 283-288.
- [4] Bartel DP. Metazoan microRNAs [J]. *Cell*, 2018, 173(1): 20-51.
- [5] Çakmak HA, Demir M. MicroRNA and cardiovascular diseases [J]. *Balkan Med J*, 2020, 37(2): 60-71.
- [6] Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 2007-2018.
- [7] Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, et al. MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in ischemic stroke-a comprehensive review and bioinformatic analysis [J]. *Cells*, 2018, 7(12): 249.
- [8] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 158-164.
- [9] Rust R, Hofer AS, Schwab ME. Stroke promotes systemic endothelial inflammation and atherosclerosis [J]. *Trends Mol Med*, 2018, 24(7): 593-595.
- [10] Cheng D, Talib J, Stanley CP, et al. Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(7): 1448-1457.
- [11] Liang S, Hu J, Zhang A, et al. miR-155 induces endothelial cell apoptosis and inflammatory response in atherosclerosis by regulating Bmal1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 128.
- [12] Canfrán-Duque A, Rotllan N, Zhang X, et al. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(9): 1244-1262.
- [13] Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation [J]. *FASEB J*, 2018, 32(8): 4070-4084.
- [14] Su Y, Yuan J, Zhang F, et al. MicroRNA-181a-5p and microRNA-181a-3p cooperatively restrict vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 365.
- [15] Dong H, Cui B, Hao X. MicroRNA22 alleviates inflammation in ischemic stroke via p38 MAPK pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(1): 735-744.
- [16] Wei Q, Tu Y, Zuo L, et al. MiR-345-3p attenuates apoptosis and inflammation caused by oxidized low-density lipoprotein by targeting TRAF6 via TAK1/p38/NF- κ B signaling in endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117142.
- [17] Zhu Y, Xian X, Wang Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 80.
- [18] Tian D, Sha Y, Lu JM, et al. MiR-370 inhibits vascular inflammation and oxidative stress triggered by oxidized low-density lipoprotein through targeting TLR4 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 6231-6237.
- [19] Xiao Q, Zhu X, Yang S, et al. LPS induces CXCL16 expression in HUVECs through the miR-146a-mediated TLR4 pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 143-149.
- [20] Viecelli Dalla Sega F, Fortini F, Aquila G, et al. Notch signaling regulates immune responses in atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1130.
- [21] Sun P, Li L, Liu YZ, et al. MiR-181b regulates atherosclerotic inflammation and vascular endothelial function through Notch1 signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 3051-3057.
- [22] An TH, He QW, Xia YP, et al. MiR-181b antagonizes atherosclerotic plaque vulnerability through modulating macrophage polarization by directly targeting Notch1 [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 6329-6341.
- [23] Gao ZF, Ji XL, Gu J, et al. MicroRNA-107 protects against inflammation and endoplasmic reticulum stress of vascular endothelial cells via KRT1-dependent Notch signaling pathway in a mouse model of coronary atherosclerosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 12029-12041.
- [24] Qin JZ, Wang SJ, Xia C. MicroRNAs regulate nitric oxide release from endothelial cells by targeting NOS3 [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2018, 46(3): 275-282.
- [25] Yan H, Wang S, Li Z, et al. Upregulation of miRNA-155 expression by OxLDL in dendritic cells involves JAK1/2 kinase and transcription factors YY1 and MYB [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1371-1378.
- [26] Tang F, Yang TL. MicroRNA-126 alleviates endothelial cells injury in atherosclerosis by restoring autophagic flux via inhibiting of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1482-1489.
- [27] Liu L, Ding J, Leng X, et al. Guidelines for evaluation and management of cerebral collateral circulation in ischaemic stroke

- 2017 [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2018, 3(3): 117-130.
- [28] Marks MP, Lansberg MG, Mlynash M, et al. Effect of collateral blood flow on patients undergoing endovascular therapy for acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(4): 1035-1039.
- [29] Xue C, Shen Y, Li X, et al. Exosomes Derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(7): 456-465.
- [30] Fan J, Xu W, Nan S, et al. MicroRNA-384-5p promotes endothelial progenitor cell proliferation and angiogenesis in cerebral ischemic stroke through the Delta-like ligand 4-mediated Notch signaling pathway [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2020, 49(1): 39-54.
- [31] Zhang H, Wu J, Wu J, et al. Exosome-mediated targeted delivery of miR-210 for angiogenic therapy after cerebral ischemia in mice [J]. *J Nanobiotechnology*, 2019, 17(1): 29.
- [32] Liang Z, Chi YJ, Lin GQ, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [33] Mirzaei H, Momeni F, Saadatpour L, et al. MicroRNA: relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2): 856-865.
- [34] Kadir RRA, Alwjaj M, Bayraktutan U. MicroRNA: an emerging predictive, diagnostic, prognostic and therapeutic strategy in ischaemic stroke [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 24.
- [35] Tiedt S, Prestel M, Malik R, et al. RNA-Seq identifies circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as potential biomarkers for acute ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2017, 121(8): 970-980.
- [36] Chen Y, Song Y, Huang J, et al. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke [J]. *Front Neuro*, 2017, 8: 57.
- [37] Huang P, He XY, Xu M. The role of miRNA-146a and proinflammatory cytokines in carotid atherosclerosis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6657734.
- [38] Wu J, Fan CL, Ma LJ, et al. Distinctive expression signatures of serum microRNAs in ischaemic stroke and transient ischaemic attack patients [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(5): 992-1001.
- [39] Jin F, Xing J. Circulating pro-angiogenic and anti-angiogenic microRNA expressions in patients with acute ischemic stroke and their association with disease severity [J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(11): 2015-2023.
- [40] 范崇桂, 付国惠, 闪海霞, 等. 急性缺血性脑卒中病人血清 miR-7 和 miR-200b 表达水平及与脑侧支循环分级的关系探讨 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(4): 670-674.
- [41] 彭彬, 吴大玉, 孙家兰, 等. 急性脑梗死早期血中 miRNAs 水平与脑侧支循环建立的关系 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2016, 33(2): 100-103.
- [42] Wu X, Zhang X, Li D, et al. Plasma level of miR-99b may serve as potential diagnostic and short-term prognostic markers in patients with acute cerebral infarction [J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(3): e23093.

[收稿日期]2021-04-19

(上接第 131 页)

- [37] 张玉娇, 杜娟娟, 侯应龙. 非编码 RNA 与心房颤动的重构机制及临床转化前景 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2020, 34(5): 497-499.
- [38] Wang Y, Liu B. Circular RNA in diseased heart [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1240.
- [39] Xiao J, Zhang Y, Tang Y, et al. hsa-miR-4443 inhibits myocardial fibroblast proliferation by targeting THBS1 to regulate TGF- β 1/ α -SMA/collagen signaling in atrial fibrillation [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(4): e10692.
- [40] She J, Guo M, Li H, et al. Targeting amino acids metabolic profile to identify novel metabolic characteristics in atrial fibrillation [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(19): 2135-2146.
- [41] Zhou J, Sun L, Chen L, et al. Comprehensive metabolomic and proteomic analyses reveal candidate biomarkers and related metabolic networks in atrial fibrillation [J]. *Metabolomics*, 2019, 15(7): 96.
- [42] Kuhlisch C, Pohnert G. Metabolomics in chemical ecology [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32(7): 937-955.
- [43] Puchades-Carrasco L, Pineda-Lucena A. Metabolomics in pharmaceutical research and development [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 35: 73-77.

[收稿日期]2021-09-16

吴晗, 于波, 孙欢. 急性心肌梗死后非梗死区心肌功能障碍研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 138-146.
Wu H, Yu B, Sun H. Research progress of non-infarct myocardial dysfunction after acute myocardial infarction [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 138-146.
doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 021

急性心肌梗死后非梗死区心肌功能障碍研究进展

吴 晗, 于 波*, 孙 欢

(吉林大学中日联谊医院心内科, 长春 130033)

【摘要】 急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)对心脏结构与功能产生严重的不利影响,这些影响不但存在于缺血梗死区,也存在于非梗死区域。非梗死区的心肌功能障碍广泛存在于心肌梗死患者,非梗死区功能异常也是心肌梗死患者预后的重要预测因子。一系列的临床研究和动物实验结果提示了针对非梗死区心肌对维护心功能的重要性。由此可见,对非梗死区心肌功能障碍的表现、机制和干预方法等的深入研究可为有效保存心肌功能、改善心肌梗死患者长期预后提供新的途径。我们就急性心肌梗死后的非梗死心肌相关的临床研究和动物实验机制研究做一综述,以期对心肌梗死的治疗和新的干预思路研究提供依据和启迪。

【关键词】 急性心肌梗死;非梗死区心肌;心功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0138-09

Research progress of non-infarct myocardial dysfunction after acute myocardial infarction

WU Han, YU Bo*, SUN Huan

(Cardiovascular Medicine, China-Japan Union Hospital Of JiLin University, Changchun 130033, China)

【Abstract】 Acute myocardial infarction (AMI) can cause dramatic remodeling of the heart function and structure. These effects not only exist in the infarcted area, but also in the non-infarcted area. Myocardial dysfunction in the non-infarcted zone widely exists in patients with myocardial infarction, and the abnormal function of the non-infarcted area is an important predictor for the prognosis of AMI patients. Several related clinical and animal studies have also suggested that the regulation of non-infarcted areas is important to maintain cardiac function. Hence, studies on the manifestation, mechanism, and treatment of myocardial dysfunction in the non-infarcted area can provide valuable insights and guidance for myocardial function preservation in myocardial infarction patients. We reviewed the clinical and animal studies related to non-infarcted myocardium after acute myocardial infarction to provide ideas for the treatment and new intervention ideas of AMI.

【Keywords】 acute myocardial infarction; non-infarcted myocardium; cardiac function

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后,心脏重构涉及整个心室的结构改变,包括整体收缩功能受损和心腔扩张^[1]。左室重构被认为是心力衰竭和死亡的主要原因,不良重构在心梗

后数小时内即可发生^[2],可持续数周至数月。而当左室射血分数<50%时,收缩末期容积表现出比左室射血分数更优的预测价值^[3]。人们普遍认为心肌梗死对心脏结构与功能的影响主要集中在梗死

【基金项目】 吉林省科技厅项目(20200403091SF)。

【作者简介】 吴晗(1996—),女,硕士研究生,研究方向:心血管内科临床与研究。E-mail: wuhan19@mails.jlu.edu.cn

【通信作者】 于波(1969—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:心血管内科临床与研究。E-mail: yubo6912@163.com

区,但研究者逐渐观察到非梗死区心肌(non-infarcted myocardium, NIM)也可受到影响。早期的研究认为重塑期间左心室扩张和离心性肥大与 NIM 之间节段性功能差异的持续存在相关^[4]。新近的研究对于 NIM 在与心脏整体功能的关系方面取得了突破性新认识,并发现了 NIM 功能障碍是导致整体心功能丧失的重要原因。NIM 功能障碍可能继发于梗死区的形态及功能重构^[5]。Yan 等^[6]研究表明非梗死区范围,特别是梗死交界区(adjacent non-infarcted myocardium, ANM)的范围,是心肌梗死后死亡率的一个强有力的预测因子,同时该类区域收缩功能的恢复可以使心梗后的整体心功能受益^[7]。NIM 在形态、力学、电活动等方面,具有不同于梗死区的特点。然而目前的临床和基础研究集中在对 NIM 的失调机制和诊疗上,其功能改变的病理生理机制尚未完全明确,同时 NIM 的功能改变对于心肌梗死患者的预后及不良事件的发生尚未引起足够重视^[6]。因此,更好地了解 NIM 的重构过程及其对心功能改变的影响对于改进目前的治疗方法和指导临床决策,达到减少心梗后充血性心力衰竭的发展意义重大。本文将 NIM 的相关进展进行综述,以期提高对心肌梗死病人非梗死区心肌保护重要性的认识。

1 流行病学

目前关于 NIM 的功能改变尚缺少大规模的临床研究,但从目前相关研究结果来看心肌梗死后 NIM 功能改变并不在少数。2019 年一篇关于 NIM 的纵向应变研究中,所有位于非梗死区的节段中,约 37% 在 1 周出现了应变的异常,而其中一半的患者都出现了 NIM 应变的降低^[8]。在一篇关于灌注-收缩不匹配的研究中得出结论:超过一半的运动减退的 NIM 左心室节段不是由“罪魁祸首”冠状动脉供血的^[9]。虽然目前还没有大规模的临床研究,但迄今为止观察到的 NIM 功能减退并不是个例现象,关于具体的流行病学数据需要进一步的大规模研究数据证实。

2 梗死区与非梗死区的界定和检测方法

目前对于心肌梗死后梗死区及 NIM 的检测方法并不完全统一,NIM 包括 ANM 及远隔非梗死区(remote non-infarcted myocardium, RNM):一般认为与梗死区解剖上直接相邻,伴有或不伴有功能改变

的心肌为 ANM;而其余解剖上远离梗死区的心肌为 RNM。由于应用的检测方法不尽相同,其敏感度也各不相同,以下为常用的区分梗死区与 NIM 的方法。

2.1 缺血坏死的运动及病理染色

在动物实验中,人为的造成急性心肌梗死模型,后取离体心肌进行切片、固定、染色。根据区域心肌的染色情况不同,判定不同区域的血流量,心肌存活情况等变化^[10]。一些动物研究中根据心肌灌注断层显像判定心肌的缺血程度,以此定义梗死区及 NIM^[11]。在此类方法中,人为造成目标血管的闭塞,应用单星蓝溶液组织染色判定缺血及坏死程度,并以此为依据界定梗死区及 NIM。三苯基氯化四唑溶液(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)灌注基于坏死心肌细胞的心肌脱氢酶活性丧失对梗死区、非梗死区进行判定^[2]。该方法用于动物实验中,在离体心肌中进行判定,因此临床应用时具有局限性。大鼠心肌梗死模型中,经磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)测量术后 6 周收缩末期无运动和径向增厚的区域为梗死区^[12],Kramer 等^[13]应用绵羊梗死模型于术后 6 个月应用 MRI 测量变薄的组织判定为梗死区域,余为 NIM。

2.2 根据梗死相关动脉的空间分布判定

冠状动脉各分支的供血范围及其与心室各节段的对应关系已经被诸多文献报道^[14-15],其中一些充分考虑了冠脉走行变异对供血区域的影响^[16]。根据冠状动脉病变与心室节段的对应关系来判断梗死区与 NIM 的做法不在少数,一般认为罪犯血管供血区域为梗死相关区域,并结合磁共振^[8]或冠状动脉解剖^[9]等对梗死区、NIM 进行判定。

2.3 结合磁共振延迟强化判定

此类方法根据心肌强化程度的不同界定 NIM。在一些动物实验中,晚期钆增强心脏磁共振成像(late gadolinium enhancement cardiac magnetic resonance, LGE CMR)图像中的梗死范围和梗死质量是根据信号强度来定义 NIM^[17]。另一种利用 CMR 来进行 NIM 的判定方法为根据瘢痕组织所占比例判定^[18],瘢痕组织 $\geq 25\%$ 的节段被认为是梗死区,而瘢痕组织 $\leq 25\%$ 的节段,并与梗死区直接相连被认为是 ANM,其余心肌为 RNM。另外 LGE-CMR 可判定微血管阻塞区域(定义为心内膜下低强化区域,周围为高强化),在有些研究中将微血管阻塞区域判定为梗死区的一部分^[6]。

2.4 根据正电子发射断层显像-X 线计算机体层成像 (positron emission tomography-computed tomography, PET-CT) 代谢率判定

PET-CT 可以根据葡萄糖利用率比值判定梗死区域,计算血流与代谢比值^[19],并根据此来进行 NIM 的判定。血流指数>80%的地区被认为是正常的^[19],血流与代谢比值>1.2 被认为是匹配模式,其中血流量减少的区域(即 PET 上的匹配或不匹配模式)被认为是梗死区。梗死相关区域周围的一排长方体被标记为 ANM,其余心肌被认为是 RNM。

3 非梗死区心肌功能障碍的病理生理与评价方法

3.1 非梗死区组织学改变

急性心肌梗死后组织水平的改变不止局限于梗死区,经报道 NIM 的心肌细胞可出现不成比例的细胞肥大,ANM 心肌细胞体积大于 RNM,这些区域的机械功能障碍被认为与细胞肥大有关^[20]。在正常灌注的 ANM 中观察到凋亡的空泡化心肌细胞,这与 caspase-3 的上调有关^[21]。ANM 心肌细胞比 RNM 区心肌更长^[22]。Masson 组织染色示 ANM 区的心肌组织水肿、组织间隙增大,以及心肌纤维的断裂、溶解和结缔组织增生^[23]。

3.2 非梗死区灌注及冠状动脉血流储备改变

关于 NIM 的血流灌注及微血管的改变目前逐渐受到研究者关注。梗死心肌中的微血管功能障碍在心肌梗死的慢性期可起着增加梗死范围、阻碍左心室功能并促进左心室重构的功能作用。据报道,即使在由正常冠状动脉供应的 RNM 区域,微血管功能也受到了损害^[24]。NIM 心肌微血管功能障碍可表现为更广泛的坏死和心功能恶化^[25]。在 2020 年一篇关于基于 CT 灌注成像的心肌血流量研究中得出了相似的结论:研究显示急性心肌梗死后,受损心肌可能有不同程度的损伤和广泛的心肌微循环损害,结果表明,心肌微血管损伤与心肌损伤程度密切相关,RNM 至梗死区的灌注梯度降低^[26]。尽管 NIM 的微血管灌注是受损的,但只根据灌注的改变似乎并不能解释 NIM 功能改变的原因。Qiu 等^[9]研究中提及一些急性心肌梗死的患者心室扩张的范围可能超过罪犯血管供血区域,实时心肌灌注造影结果显示约有 38.0% 的运动不足的心室节段有正常的心肌灌注,同时 Jackson 等^[21]的研究也表明收缩功能下降的 ANM 区域并未观察到明显的灌注受损,且在该部分心肌中,增加血流量

并未观察到收缩功能的改善。Schmidt 等^[27]观察到在注射造影剂后 ANM 区域的血流动力学与 RNM 区域的血流动力学是相同的,这表明 ANM 区域内的毛细血管灌注和/或密度得到了充分的保护。这些证据都提示急性心肌梗死后的患者广泛的功能异常与心肌微循环灌注缺陷之间的关系有待进一步阐明。此外,新的动物实验表明梗死后的血管生成反应始于 ANM 区域,并延伸到坏死的梗死核心。这种反应在梗死后 2~4 d 即可发生^[28]。

3.3 非梗死区机械应力和收缩功能改变

ANM 区域的壁应力升高^[20,29],这被认为与神经体液激活因素一起刺激了细胞肥大。左心室容积与室壁厚度比例增加,提示壁应力升高。由于几何因素的变化,梗死区和 NIM 交界处的壁应力可能最大。Jackson 等^[30]研究表明急性心肌梗死后交界区心肌的心肌壁应力立即增加,这种增加主要是由于心内膜曲率的减少,应力的改变被认为与收缩功能障碍有一定关系。梗死区和 ANM 之间周向应变和周向应变达峰时间有显著差异^[17],这也提示了在存活组织和梗死组织的交界处心肌的机械应力增加。

Yang 等^[31]在动物实验中发现 AMI 后 24 h NIM 出现收缩降低,Karthikeyan 等^[11]在动物实验中应用 CMR 定量评价急性心肌梗死后局部力学改变,证实与梗死前相比,NIM 的收缩期壁厚较基线减少。同时 NIM 区域降低了心肌的速度、周向应变和应变率,这反应了区域运动的减弱。Kramer 等^[32]利用 MRI 评估急性前壁心肌梗死患者收缩功能,发现再灌注后 1 周内出现的 NIM 收缩功能障碍在 8 周内得到了显著改善,这被认为与及时的再灌注治疗及血管紧张素转换酶抑制剂的应用缓解了心肌顿抑相关。

ANM 区域的收缩功能障碍在急性心肌梗死后较早出现,并且其严重程度已被证实是不利重构过程的重要病理生理学特征之一^[33]。Jackson 等^[30]在绵羊心尖梗死模型中观察到灌注正常 ANM 的收缩力下降,且该功能下降区域在 8 周内不断扩大,这被认为与心肌梗死后左室不良重构密切相关。在 ANM 区域,收缩变形的径向和周向峰值应变时间明显较梗死区提前^[34]。

Ito 等^[35]发现心肌梗死后经皮冠状动脉成形术后 1 个月 RNM 出现了代偿性过度收缩,相似的结论出现在 Jaarsma 等^[36]研究中,他们发现约 67% 的患

者入院 12 h 内出现了 RNM 的运动亢进。而 Husser 等^[37]应用 CMR 分析梗死面积及收缩期室壁增厚,显示 ST 段抬高型心肌梗死的患者发生心梗后 1 周时,无论梗死面积大小如何,RNM 收缩与对照组均无差异。6 个月后仅在小面积梗死中可观察到 RNM 轻微的过度收缩,在中度和大面积梗死患者中,RNM 运动与对照组无明显差异。以上研究表明心肌梗死对 RNM 局部收缩力的变化及机制仍具争议性(部分相关研究可见表 1),相关问题有待进一步阐明。

3.4 非梗死区电活动改变

梗死后心肌可能具有明显的空间异质性,研究证明部分患者的 ANM 区域分布着岛状存活心肌^[27],这可能会造成传导缓慢的区域,从而成为发生致命性折返性心律失常的基质。ANM 区存在岛

状存活心肌的患者心率变异性分析的极低频频段(very low frequency, VLF)降低——被认为是室性心律失常风险的评价指标,这一指标在 ANM 区域不存在岛状存活心肌的患者中明显升高^[18],而多变量分析显示,ANM 区域岛状存活心肌的存在是 VLF 最强的独立预测因子。针对 ANM 区传导速度的动物实验研究中,在距梗死边界±2 mm 的 ANM 区域中,起搏成功率和 ECP 形态发生了明显变化,ANM 区域的刺激与其内的低振幅电活动和周围心肌的延迟激活有关,但该区域传导速度并未降低^[38]。这可能提示着这些区域中的心脏电活动异质性明显增加,随之而来的折返性心律失常的风险也相应增加。

3.5 非梗死区心肌的代谢改变

对于 NIM 的代谢改变较早的研究提示 NIM 葡

表 1 非梗死区心肌功能障碍的研究列表
Table 1 Research list of non-infarct myocardial dysfunction

作者 Author	研究类型 Article type	研究目的 Research purpose	非梗死区判定 Determination of NIM	研究结论 Research conclusion
Geshi 等 ^[24]	临床研究 Clinical research	NIM 的微血管功能障碍与心肌梗死后左心室重构相关性 Relationship between impaired microvascular function in NIM and left-ventricular remodeling in patients with myocardial infarction	梗死相关动脉的空间分布 Distribution of IRA	NIM 的微血管损伤可能与左心室重构有关 Microvascular impairment in NIM might have contributed to left-ventricular remodeling
Gavara 等 ^[8]	临床研究 Clinical research	通过 CMR 评估心肌动力学及其预后意义 Characterize myocardial dynamics and prognostic implications by CMR	梗死相关动脉的空间分布 Distribution of IRA	NIM 纵向应变降低与更严重的短期和长期结构损伤相关 The reduce of NIM longitudinal strain is associated with more severe short and long term structural damage
Wong 等 ^[18]	临床研究 Clinical research	探讨 STEMI 后交界区与室性心律失常风险相关性 To investigate the correlation between peri-infarct region and the risk of ventricular arrhythmia after STEMI	心血管磁共振 Cardiac magnetic resonance	交界区的存在与 STEMI 后心律失常风险升高的替代标志物相关 Presence of peri-infarct region correlated with a surrogate marker of heightened arrhythmia risk following STEMI
Husser 等 ^[37]	临床研究 Clinical research	探讨 STEMI 后远隔心肌功能 To evaluate remote myocardial function after STEMI	梗死相关动脉的空间分布 Distribution of IRA	远端心肌与 STEMI 后心肌收缩力无明显差异。 In remote myocardium there was no difference in contractility compared to controls after STEMI
Yan 等 ^[6]	临床研究 Clinical research	探讨梗死周围区与心肌梗死后死亡率相关性 To investigate the correlation between peri-infarct zone and post-MI mortality after STEMI	心血管磁共振 Cardiac magnetic resonance	梗死周围区具有更好的预后价值 The peri-infarct zone provides incremental prognostic value

注:STEMI: ST 段抬高型心肌梗死;CMR:心血管磁共振;NIM: 非梗死区心肌;IRA:梗死相关动脉。
Note. STEMI, ST-elevation myocardial infarction. CMR, Cardiac magnetic resonance. NIM, Non-infarct myocardium. IRA, Infarct-related artery.

葡萄糖摄取增加, Fragasso 等^[39]针对 35 例既往心肌梗死患者研究中, 显示 9 名没有表现出明显的灌注缺陷患者中 NIM 的葡萄糖摄取增加。Glogar 等^[40]研究认为, 由于 ANM 侧支循环的增加, ANM 的代谢变化晚于梗死区出现, 且变化幅度小于梗死区。

可见梗死区与非梗死区心肌在力学、功能、组织和形态等方面存在不同的病理生理变化, 此种变化势必对心肌梗死患者心功能异常产生影响, 也是今后改善心肌梗死病人心功能和预后的干预要点。

4 非梗死区心肌功能障碍的机制

关于 NIM 的功能改变, 特别是 ANM 的力学、电活动等功能障碍及其扩展、恶化有较多的解释。冠状动脉闭塞后即刻 NIM 间的区域功能差异被归因于急性心肌梗死后局部壁应力分布的差异, 而后 ANM 区域可能在生化和细胞水平上发生根本性改变, 可表现为心肌的肥大和凋亡。NIM 的功能改变是进行性过程, 是由于拉伸引起的心肌细胞凋亡最终导致整体性心室功能障碍^[41]。

Hu 等^[42]研究提示 ANM 心肌能量产生的异常可能是持续的心肌细胞功能障碍的原因之一。动物实验研究显示 ANM 区域的 ATP 含量下降, 心肌肌酸激酶异构体蛋白表达的降低也更为严重。ATP 含量和 ATP 生产关键酶表达的下降提示 ANM 区域的能量不足可能导致了从代偿性左室重构向充血性心力衰竭的转变。心肌梗死后, NIM 功能的异常可能与酪氨酸激酶途径激活的区域差异有关^[22]。同样 Yang 等^[43]研究发现 ANM 区域内存在大量提示整体线粒体功能障碍和高能磷酸盐穿梭和利用受损的变化, 这可能导致 ANM 心肌能量异常和收缩功能障碍。

蛋白质组学分析表明, ANM 区域还存在一些可能导致细胞损伤和凋亡的蛋白质水平变化^[43]。如肌营养不良蛋白(DMD)-肌聚糖复合物的组成部分, 包括 DMD 本身, 在 ANM 区域显著下调, 这可能使心肌膜容易受到损伤, 同时蛋白质组学分析也证实, 在 ANM 区域中, 共伴侣蛋白 Bcl-2 相关的 *athanogene 3* (BAG3) 的表达显著下调。BAG3 被证明与 Hsc70 相互作用, 对于维持肌原纤维的完整性至关重要^[44]。ANM 区域中 DMD-肌聚糖复合物和 BAG3 成分的下调表明, 心肌梗死后不能保持肌膜和肌原纤维的完整性可能是导致该组织细胞死亡增加的原因之一。在 ANM 区域, 金属蛋白酶及其

组织抑制剂相关的调节因子活性改变被认为是导致基质重构的机制之一^[45-46]。Cheng 等^[47]认为心肌牵张导致氧化应激和诱导细胞凋亡, 可能在心室重构过程中发挥一定作用。

炎症的参与可能和 NIM 的功能改变密切相关, 最近研究的证据表明, 炎症标志物的显著增加和 ANM 功能障碍的出现都可以预测死亡风险, 而这两种现象是密切相关的, 且心肌梗死后 ANM 区域炎症反应的增强与室性心律失常底物的产生和心源性猝死的易感性有关^[48]。

关于 NIM 微血管障碍的机制有诸多解释, 部分观点认为 RNM 的微循环改变可能是更广泛坏死的一部分, 研究认为微血管系统在梗死区和 NIM 区域之间共享, 微循环的改变可能是局部神经体液反射介导的血管收缩的结果。在心脏选择性表达血管紧张素 II 1 型受体的转基因心肌梗死大鼠模型中^[49], NIM 心肌微血管密度降低, 提示梗死后肾素-血管紧张素系统的激活直接导致 RNM 区域的微血管功能障碍。实验研究表明, 急性冠脉闭塞激活了冠脉间反射, 增加了由正常冠状动脉灌注的 NIM 的 α -肾上腺素能活性^[50-51], 这些报道提示神经机制可能与 NIM 微循环血流抑制和左心室功能不全有关。

动物研究为组织异质性在心肌梗死后心律失常发生中的潜在作用提供了有价值的见解。电重构发生在 ANM 区域, 来自既往心肌梗死和药物难治性室性心动过速患者的心肌标本的组织学检查进一步佐证了这一点^[52], 发现存活的心肌细胞孤立的束状交织在纤维组织中。这些存活的细胞可以作为潜在的通道, 在纤维组织内形成折返回路, 从而引发室性心动过速。ANM 区域坏死和存活心肌细胞夹杂可能是一个重要的致心律失常底物^[27]。有研究示 ANM 区域心肌细胞间 I_{Na} 电流密度下降和失活的不一致性增加了电生理异质性, 容易发生跨壁心肌间的冲动传导速度不一致而造成壁内冲动折返, 从而诱发折返性室性心律失常^[53]。(本次综述所涉及部分动物研究见表 2)。

5 临床意义

目前, 多数心肌梗死研究的焦点主要集中在梗死区, 但对于 NIM 的病理生理变化及其意义仍缺乏有力的探索。众多报道都证明心肌梗死后 NIM 功能也会受到累及, NIM 与梗死区在多种方面均存在不同的病理生理变化(见表 3), 可表现为收缩能力

表 2 非梗死区心肌功能障碍的动物研究列表
Table 2 Animal research list of non-infarct myocardial dysfunction

作者 Author	动物模型 Animal models	研究目的 Research purpose	评估对象 Evaluation object	研究结论 Research conclusion
Kramer 等 ^[13]	绵羊心尖部梗死模型 Anteroapical infarcts in sheep model	探讨左心室重构过程中 ANM 与 RNM 的功能差异 To investigate the differences in function between ANM and RNM during left ventricular remodeling	梗死节段和非梗死节段长度 The lengths of infarcted and NIM segments	左室重构过程与 ANM 与 RNM 的节段功能持续存在差异有关 Left ventricular remodeling are associated with persistent differences in segmental function between ANM and remote RNM
Soleimanifard 等 ^[54]	猪心肌梗死模型 Porcine myocardial infarction	探讨基于 CMR 的 3D 应变的增量值 To investigate the incremental value of CMR-based 3D strain	三维区域应变 Three-dimensional regional strain	三维应变可识别 ANM 3D strain can accurately identifies ANM
Schuleri 等 ^[17]	猪心肌梗死模型 Porcine myocardial infarction	描述 ANM 区域瘢痕形态和局部功能的早期时间变化 To characterize early temporal changes in scar morphology and regional function in the ANM	NIM 面积及周向应变 NIM area and regional circumferential strain	ANM 的重塑特征可能为心肌梗死后危及生命的心律失常和心源性猝死的发生提供见解 Remodeling characteristics of the ANM may provide insights into the development of life threatening arrhythmias and sudden cardiac death post-MI
Yang 等 ^[43]	猪心肌梗死模型 Porcine myocardial infarction	观察梗死后 ANM 重构的过程 To observe postinfarction remodeling of ANM after MI	蛋白质组学分析 Quantitative proteomics approach	心肌梗死后的 ANM 区域蛋白质发生改变 Protein changes in ANM after MI
Hu 等 ^[42]	猪心肌梗死模型 Porcine myocardial infarction	探讨心梗后 ANM 区能量代谢变化 To investigate the changes of energy metabolism in ANM	高能磷酸盐和线粒体酶亚基 High-energy phosphates and mitochondria subunits	ANM 与 RNM 能量代谢呈现出区域异质性 The energy metabolism show regional heterogeneity in ANM and RNM zone

注:CMR:心血管磁共振; NIM: 非梗死区心肌; ANM: 梗死交界区; RNM:远隔非梗死区。
Note. CMR, Cardiac magnetic resonance. NIM, Non-infarct myocardium. ANM, Adjacent non-infarcted myocardium. RNM, Remote non-infarcted myocardium.

表 3 梗死区、非梗死区心肌病理生理学改变
Table 3 Pathophysiological changes in infarct and non-infarcted myocardium

心肌类型 Type of myocandium	力学改变 Mechanical changes	功能改变 Function change	形态改变 Morphological change	组织学改变 Histological change
梗死区心肌 Infarct myocardium	径向应变和纵向应变均显著降低 ^[11] Radial and longitudinal strain had significantly reduced	收缩功能丧失 ^[12] Systolic dysfunction	平均室壁厚度明显减少 ^[55] Mean wall thickening decreased significantly	由坏死的心肌细胞组成,明显心肌瘢痕形成 ^[11] Consists of necrosis of myocardial cells, obvious myocardial scarring
非梗死区心肌 Non-infarcted myocardium	ANM 区径向、纵向应变均降低。RNM 径向应变增加而纵向应变无明显差异 ^[11] Radial and longitudinal strain had both decreased in ANM, radial strain increased but longitudinal strain shows no significant change in RNM	ANM 和 RNM 壁厚减少,收缩和松弛速度降低 ^[11] The ANM and RNM zone had reduced wall thickening and lower contractile and relaxation velocities	ANM 区室壁厚度减少,远端节段室壁厚度明显增加 ^[55] Mean wall thickening decreased in ANM, but increased significantly in remote area	存活细胞和非存活细胞的混合区域,心肌组织水肿、组织间隙增大,心肌纤维的断裂、溶解和结缔组织增生 ^[11, 23] Containing a mixture of viable and nonviable cells, myocardial tissue edema, tissue space enlargement, myocardial fiber rupture, dissolution and connective tissue hyperplasia

注:ANM: 梗死交界区; RNM:远隔非梗死区。
Note. ANM, Adjacent non-infarcted myocardium. RNM, Remote non-infarcted myocardium.

的下降、力学及代谢改变、微血管灌注受损、不良重构进行性扩展及恶性心律失常发生的增加等等。值得提出的是经研究证明以上改变并不是一过性的,而是持续进展的^[29],这种持续进展被认为和左室整体不良重构密切相关,ANM 的延伸对患者梗死后心室重构发生有重要的促进作用。左室重构时左心室扩大和偏心性肥厚与 ANM 与 RNM 节段功能的持续差异有关,因此,对梗死面积进一步扩大的预防和控制梗死交界区面积扩大是改善心肌梗死后心功能障碍的新途径,值得我们思考和探索。

尽管近年来冠状动脉血运重建的成功率很高,但危及生命的室性心律失常仍然是心肌梗死后死亡的重要原因。应用 CMR 检测到 ANM 区域存在组织异质性,这种异质性可能代表存活的心肌细胞与不存活的纤维组织混合的区域,被认为是潜在的心律失常发生的标志物。许多研究调查了 CMR 检测到的心肌梗死后异质性对预后的价值,心肌梗死 LGE 的异质性与长期预后不良存在显著的相关性^[18]。ANM 的功能障碍对各种原因的死亡率以及非致命性心律失常的结果有显著的预测作用;即使将年龄和左室射血分数作为混杂因素进行调整后,ANM 面积占总梗死面积的百分比仍与全因死亡率显著相关^[34]。可见,探索 NIM 的功能与分布能够对心肌梗死患者的心律失常发生风险和远期预后评价提供依据,并为进一步提高诊疗水平提供新的途径。

由 CMR 定义的 ANM 范围是心肌梗死后死亡率的独立预测因子,这为发现高风险人群和治疗提供了新的可能。NIM 的功能改变可能成为一种有价值的风险分层工具,以指导针对心肌梗死后个体患者量身定做的最佳治疗。

由此可见,关于急性心肌梗死后功能障碍区域的研究和探索具有重要意义。NIM 可在没有明显的灌注缺损的情况下出现功能损害,可以表现为收缩功能的受损,室壁功能障碍,局部应变的降低以及电活动的异常等。NIM 的功能损害可能有多种因素的相关,其中包括应激、全身炎症反应、细胞重构与凋亡、细胞外基质的改变及局部心肌应力的改变等。由此可见,我们对 NIM 功能障碍及其机制的探索有着重要意义的指导作用,从而为改善心肌梗死患者预后提供新的途径和方法。

参考文献:

[1] McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, et al. Left ventricular

remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion [J]. *Circulation*, 1986, 74(4): 693-702.

[2] Migrino RQ, Zhu X, Morker M, et al. Myocardial dysfunction in the periinfarct and remote regions following anterior infarction in rats quantified by 2D radial strain echocardiography: an observational cohort study [J]. *Cardiovasc Ultrasound*, 2008, 6: 17-29.

[3] White HD, Norris RM, Brown MA, et al. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1987, 76(1): 44-51.

[4] Kramer CM, Lima JA, Reichek N, et al. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling [J]. *Circulation*, 1993, 88(3): 1279-1288.

[5] Kramer C, Rogers W, Theobald T, et al. Remote noninfarcted region dysfunction soon after first anterior myocardial infarction. A magnetic resonance tagging study [J]. *Circulation*, 1996, 94(4): 660-666.

[6] Yan A, Shayne A, Brown K, et al. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality [J]. *Circulation*, 2006, 114(1): 32-39.

[7] Zhang Z, Sun K, Saloner DA, et al. The benefit of enhanced contractility in the infarct borderzone: a virtual experiment [J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 86.

[8] Gavara J, Rodriguez-Palomares J, Rios-Navarro C, et al. Longitudinal strain in remote non-infarcted myocardium by tissue tracking CMR: characterization, dynamics, structural and prognostic implications [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2021, 37(1): 241-253.

[9] Qiu Q, Abdelghany M, Subedi R, et al. Discrepant myocardial microvascular perfusion and mechanics after acute myocardial infarction: Characterization of the “Tako-tsubo effect” with real-time myocardial perfusion contrast echocardiograph [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 276: 1-7.

[10] Lima J, Becker L, Melin J, et al. Impaired thickening of nonischemic myocardium during acute regional ischemia in the dog [J]. *Circulation*, 1985, 71(5): 1048-1059.

[11] Karthikeyan B, Sonkawade S, Pokharel S, et al. Tagged cine magnetic resonance imaging to quantify regional mechanical changes after acute myocardial infarction [J]. *Magn Reson Imaging*, 2020, 66: 208-218.

[12] Espe E, Aronsen J, Eriksen G, et al. Assessment of regional myocardial work in rats [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2015, 8(2): e002695.

[13] Kramer C, Lima J, Reichek N, et al. Regional differences in function within noninfarcted myocardium during left ventricular remodeling [J]. *Circulation*, 1993, 88(3): 1279-1288.

[14] Pereztol-Valdés O, Candell-Riera J, Santana-Boado C, et al. Correspondence between left ventricular 17 myocardial segments and coronary arteries [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26(24): 2637

- 2643.
- [15] Ortiz-Pérez J, Rodríguez J, Meyers S, et al. Correspondence between the 17-segment model and coronary arterial anatomy using contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2008, 1(3): 282-293.
 - [16] Cerci R, Arbab-Zadeh A, George R, et al. Aligning coronary anatomy and myocardial perfusion territories: an algorithm for the CORE320 multicenter study [J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2012, 5(5): 587-595.
 - [17] Schuleri K, Centola M, Evers K, et al. Cardiovascular magnetic resonance characterization of peri-infarct zone remodeling following myocardial infarction [J]. J Cardiovasc Magn Reson, 2012, 14: 24.
 - [18] Wong D, Weightman M, Baumert M, et al. Electro-mechanical characteristics of myocardial infarction border zones and ventricular arrhythmic risk: novel insights from grid-tagged cardiac magnetic resonance imaging [J]. Eur Radiol, 2012, 22(8): 1651-1658.
 - [19] Bogaert J, Bosmans H, Maes A, et al. Remote myocardial dysfunction after acute anterior myocardial infarction: impact of left ventricular shape on regional function: a magnetic resonance myocardial tagging study [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(6): 1525-1534.
 - [20] Kramer C, Rogers W, Park C, et al. Regional myocyte hypertrophy parallels regional myocardial dysfunction during post-infarct remodeling [J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(9): 1773-1778.
 - [21] Jackson B, Gorman J, Moainie S, et al. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40(6): 1160-1167, 1168-1171.
 - [22] Melillo G, Lima J, Judd R, et al. Intrinsic myocyte dysfunction and tyrosine kinase pathway activation underlie the impaired wall thickening of adjacent regions during postinfarct left ventricular remodeling [J]. Circulation, 1996, 93(7): 1447-1458.
 - [23] 谭伟江, 王静, 李想, 等. 藏麻小型猪心肌梗模型的建立及梗死边缘区的基因表达谱分析 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 558-566.
 - [24] Geshi T, Nakano A, Uzui H, et al. Relationship between impaired microvascular function in the non-infarct-related area and left-ventricular remodeling in patients with myocardial infarction [J]. Int J Cardiol, 2008, 126(3): 366-373.
 - [25] Cheng R, Wei G, Yu L, et al. Coronary flow reserve in the remote myocardium predicts left ventricular remodeling following acute myocardial infarction [J]. Yonsei Med J, 2014, 55(4): 904-911.
 - [26] Yang M, Xu H, Zhang L, et al. Myocardial perfusion assessment in the infarct core and penumbra zones in an *in vivo* porcine model of the acute, sub-acute, and chronic infarction [J]. Eur Radiol, 2021, 31(5): 2798-2808.
 - [27] Schmidt A, Azevedo C, Cheng A, et al. Infarct tissue heterogeneity by magnetic resonance imaging identifies enhanced cardiac arrhythmia susceptibility in patients with left ventricular dysfunction [J]. Circulation, 2007, 115(15): 2006-2014.
 - [28] Wu X, Rebol M, Korf-Klingebiel M, et al. Angiogenesis after acute myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2021, 117(5): 1257-1273.
 - [29] Walker J, Ratcliffe M, Zhang P, et al. MRI-based finite-element analysis of left ventricular aneurysm [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(2): 692-700.
 - [30] Jackson B, Gorman J, Salgo I, et al. Border zone geometry increases wall stress after myocardial infarction: contrast echocardiographic assessment [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(2): 475-479.
 - [31] Yang Z, Berr SS, Gilson WD, et al. Simultaneous evaluation of infarct size and cardiac function in intact mice by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging reveals contractile dysfunction in noninfarcted regions early after myocardial infarction [J]. Circulation, 2004, 109(9): 1161-1167.
 - [32] Kramer C, Rogers W, Theobald T, et al. Dissociation between changes in intramyocardial function and left ventricular volumes in the eight weeks after first anterior myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 1997, 30(7): 1625-1632.
 - [33] Wenk J, Klepach D, Lee L, et al. First evidence of depressed contractility in the border zone of a human myocardial infarction [J]. Ann Thorac Surg, 2012, 93(4): 1188-1193.
 - [34] Inoue Y, Yang X, Nagao M, et al. Peri-infarct dysfunction in post-myocardial infarction: assessment of 3-T tagged and late enhancement MRI [J]. European radiology, 2010, 20(5): 1139-1148.
 - [35] Ito S, Suzuki T, Hosokawa H, et al. Increased hyperkinesis in noninfarcted areas during short-term follow-up in patients with first anterior acute myocardial infarction treated by direct percutaneous transluminal coronary angioplasty [J]. Jpn Heart J, 1999, 40(5): 549-560.
 - [36] Jaarsma W, Visser C, Eenige van M, et al. Prognostic implications of regional hyperkinesis and remote asynergy of noninfarcted myocardium [J]. Am J Cardiol, 1986, 58(6): 394-398.
 - [37] Husser O, Chaustre F, Sanchis J, et al. Function of remote non-infarcted myocardium after STEMI: analysis with cardiovascular magnetic resonance [J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2012, 28(8): 2057-2064.
 - [38] Trew M, Engelman Z, Caldwell B, et al. Cardiac intramural electrical mapping reveals focal delays but no conduction velocity slowing in the peri-infarct region [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 317(4): H743-H753.
 - [39] Fragasso G, Chierchia S, Landoni C, et al. Regional glucose utilization in infarcted and remote myocardium: its relation to coronary anatomy and perfusion [J]. Nucl Med Commun, 1998, 19(7): 625-632.
 - [40] Glogar D. Definition and significance of the area at risk in myocardial infarct and the ischemic border zone in acute myocardial infarct [J]. Acta Med Austriaca Suppl, 1986, 36: 1-40.

- [41] Guccione J, Moonly S, Moustakidis P, et al. Mechanism underlying mechanical dysfunction in the border zone of left ventricular aneurysm: a finite element model study [J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(2): 654-662.
- [42] Hu Q, Wang X, Lee J, et al. Profound bioenergetic abnormalities in peri-infarct myocardial regions [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2): H648-657.
- [43] Yang L, Gregorich Z, Cai W, et al. Quantitative proteomics and immunohistochemistry reveal insights into cellular and molecular processes in the infarct border zone one month after myocardial infarction [J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(5): 2101-2112.
- [44] Knöll R, Hoshijima M, Chien K. Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2003, 81(12): 750-756.
- [45] Wilson E, Moainie S, Baskin J, et al. Region-and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling [J]. *Circulation*, 2003, 107(22): 2857-2863.
- [46] 李广斌, 谷岩, 孟庆楠, 等. 大鼠心肌梗死后非梗死区基质重构及相关调节因子变化的研究 [J]. *天津医药*, 2011, 39(5): 452-454, 484.
- [47] Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5): 2247-2259.
- [48] Quinaglia e Silva JC, Coelho-Filho OR, Andrade JM, et al. Peri-infarct zone characterized by cardiac magnetic resonance imaging is directly associated with the inflammatory activity during acute phase myocardial infarction [J]. *Inflammation*, 2014, 37(3): 678-685.
- [49] de Boer RA, Pinto YM, Suurmeijer AJ, et al. Increased expression of cardiac angiotensin II type (AT₁) receptors decreases myocardial microvessel density after experimental myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(2): 434-442.
- [50] Feldman RL, Macdonald RG, Nichols WW, et al. Effects of acute coronary occlusion on hemodynamics in an adjacent coronary artery in dogs [J]. *Am J Cardiol*, 1984, 54(8): 1103-1107.
- [51] Brown AM. Excitation of afferent cardiac sympathetic nerve fibres during myocardial ischaemia [J]. *J Physiol*, 1967, 190(1): 35-53.
- [52] de Bakker J, van Capelle F, Janse M, et al. Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation [J]. *Circulation*, 1988, 77(3): 589-606.
- [53] 张铁军, 李学斌, 李霞, 等. 心肌梗死 1 周后梗死边缘区心室肌细胞快钠通道电流跨壁异质性的变化 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2009, 1(03): 221-224, 230.
- [54] Soleimanifard S, Abd-Elmoniem K, Sasano T, et al. Three-dimensional regional strain analysis in porcine myocardial infarction: a 3T magnetic resonance tagging study [J]. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2012, 14: 85.
- [55] Pahlm U, Ubachs J, Heiberg E, et al. Regional wall function before and after acute myocardial infarction; an experimental study in pigs [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014, 14: 118.

[收稿日期] 2021-03-13

汪贝贝, 张文波, 蒋鹏程. 长链非编码 RNA 参与调控细胞程序性死亡的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 147-154.

Wang BB, Zhang WB, Jiang PC. Advances in research on lncRNAs involved in the regulation of programmed cell death [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 147-154.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 022

长链非编码 RNA 参与调控细胞程序性死亡的研究进展

汪贝贝, 张文波*, 蒋鹏程*

(江苏大学附属人民医院普外科, 江苏 镇江 212002)

【摘要】 细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)是一种受基因调控的细胞死亡形式,在肿瘤等疾病的发生发展中有重要作用,根据其发生机制及形态特征可分为凋亡、坏死性凋亡、铁死亡、焦亡、自噬等。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是转录物大于 200 个核苷酸的非编码 RNA,通过直接或间接影响细胞内分子及蛋白的表达参与 PCD 的调控。本文就 lncRNA 参与调控 PCD 的相关文献进行总结,有望为 lncRNA 和 PCD 的进一步研究提供新的切入点,为相关临床疾病的诊疗及预防提供新的思路。

【关键词】 程序性死亡;长链非编码 RNA;肿瘤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0147-08

Advances in research on lncRNAs involved in the regulation of programmed cell death

WANG Beibei, ZHANG Wenbo*, JIANG Pengcheng*

(Department of General Surgery, People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China)

【Abstract】 Programmed cell death (PCD) is a form of cell death regulated by genes. It plays an important role in the occurrence and development of tumors and other diseases. According to its occurrence, mechanism of action, and morphological characteristics, it can be divided into apoptosis, necroptosis, ferroptosis, pyroptosis and autophagy, among others. Long noncoding RNAs are noncoding RNAs of more than 200 nucleotides in length, which participate in the regulation of PCD by directly or indirectly affecting the expression of intracellular proteins and other molecules. This paper summarizes relevant literature on lncRNAs' involvement in the regulation of PCD, which is expected to provide different pathways for further research on lncRNAs and PCD, as well as new ideas for diagnosis, treatment, and prevention of related clinical diseases.

【Keywords】 programmed cell death; lncRNA; tumor

细胞死亡在机体的生长发育过程中不可或缺,为意外细胞死亡和调节性细胞死亡(regulated cell death, RCD),在生理条件下, RCD 又被称为细胞程

【基金项目】 镇江市重点研发计划社会发展面上项目(SH2018057, SH2018072, SH2020024, SH2021035)。

【作者简介】 汪贝贝(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:消化道肿瘤。E-mail: wangbeibei0610@163.com

【通信作者】 张文波(1982—),男,副研究员,博士,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤。E-mail: wb.zan@hotmail.com

蒋鹏程(1969—),男,主任医师,博士,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤。E-mail: pc_jsu@yahoo.com

* 共同通信作者

序性死亡(programmed cell death, PCD), 根据发生机制及生化形态特征, PCD 包含凋亡(apoptosis)、坏死性凋亡(necroptosis)、铁死亡(ferroptosis)、焦亡(pyroptosis)、自噬(autophagy)等多种形式^[1]。而根据细胞是否发生破裂, 也可分为溶解性细胞死亡和非溶解性细胞死亡两类^[2]。不少研究表明 PCD 可显著调控炎症、肿瘤等疾病的发生发展, 而作为下游因子, PCD 在分子水平、蛋白水平、葡萄糖水平、线粒体功能等方面可受诸多因子调控, 其中长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 是关键的 upstream 调控分子之一^[3]。

长链非编码 RNA 是转录物长于 200 nt 的 RNA, 曾经被认为是“转录噪音”序列、RNA 聚合酶 II 的副产物。尽管无法翻译成蛋白质, 但 lncRNA 从作为基因表达的调节器, 到将遗传密码子翻译成蛋白质序列, 都扮演着功能分子的角色, 其在细胞核内参与遗传、转录的调控, 在细胞质中可充当 miRNA 的竞争性内源 RNA(ceRNA) 影响 mRNA 翻译, 并参与 mRNA 后续的稳定以及降解过程的调节^[4]。lncRNA 在细胞的增值、迁移等多种生物学过程中发挥重要作用, 同时 PCD 作为研究的热点问题, 近年来有较多 lncRNA 参与其调控的研究报道, 但目前尚缺乏归纳总结, 本文就相应问题的最新研究展开综述, 以期对细胞程序性死亡的调控和 lncRNA 的功能研究提供新的思路。

1 lncRNA 与凋亡

凋亡是在一系列酶的参与下、受基因调控的主动且有序的过程, 具有不同于坏死的形态学变化的一类 PCD, 细胞凋亡及其失调是许多疾病的病理生理过程的基础, 包括细胞内稳态、组织重塑和肿瘤发生^[5]。凋亡主要包含线粒体途径和死亡受体途径两类经典途径。

线粒体途径中, 在细胞应激或发育信号作用下, Bcl-2 家族蛋白的表达或功能受到相应调节, 3 种促进凋亡的 Bcl-2 效应蛋白——Bax、Bak 和 Bok 可直接引起线粒体外膜通透性(MOMP) 增加, 从而将线粒体膜间隙蛋白释放到细胞质中, 启动凋亡; 而抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白包括 Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1 和 BFL/A1 等, 及单个 BH 区的 BH3 蛋白 Bid、Bim、Bad 和 Noxa 等则产生相反的效应^[6]。细胞中 Bcl-2 蛋白的特异性和动态相互作用决定了 MOMP 的发生与否。而在死亡受体途径中, 肿瘤坏死因子受体

(TNFR) 与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、Fas 配体(Fas L) 等配体结合后, 由细胞凋亡抑制因子(cellular inhibitor of apoptosis protein, cIAP) 1 和肿瘤坏死因子受体相关因子(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF) 2 对受体相互作用蛋白激酶(receptor interacting serine/threonine protein kinase, RIPK) 1 进行了泛素化标记, 再经去泛素化酶(cylindromatosis, CYLD) 作用, 形成肿瘤坏死因子受体相关死亡域蛋白(TNFR-associated death domain, TRADD)/凋亡促进蛋白(Fas-associated protein with death domain, FADD)/半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(caspase) 8/RIPK1/RIPK3 和 TRADD/FADD/caspase-8 两种复合体, 当前者中 caspase-8 激活时, 使得 caspase-3/7 成熟, 或水解 Bid, 促进细胞凋亡, 而后者可通过 FADD 直接使得 caspase-8 成熟, 导致凋亡^[7]。

lncRNA 可以通过影响凋亡相关蛋白的表达, 参与线粒体途径的调控。有研究用高糖处理 lncRNA CA7-4 和 si-CA7-4 转染后的血管内皮细胞, 发现 CA7-4 升高了 Bax 和裂解的多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(poly ADP-ribose polymerase-1, PARP1) 的水平, 促进血管内皮细胞的凋亡^[8]。此外, Li 等^[9] 研究发现 miR-296-5p 直接结合 Bax mRNA 的 3' 非翻译区, 在 mRNA 和蛋白质水平上抑制 Bax 表达, 而 lncRNA KCNQ1OT1 作为一种有效的细胞凋亡促进因子, 通过使 miR-296-5p 海绵化, 上调 Bax, 促进了神经母细胞瘤细胞凋亡。

lncRNA 亦可通过死亡受体途径调节凋亡的发生发展。He 等^[10] 发现 lncRNA GAS5 的过表达显著上调 caspase-3 蛋白表达水平、促进平滑肌细胞凋亡且抑制其增殖, 减少了平滑肌细胞的数量, 从而参与调控腹主动脉瘤的形成。

lncRNA 还可以通过各种其它机制调节细胞凋亡, 如 Jiang 等^[11] 发现高水平的 lncRNA RP11-468E2.5 表达可通过抑制 JAK/STAT 信号通路来负调节信号转导和 STAT5/6 的表达, 从而抑制了大肠癌细胞的增殖并促进其凋亡。

2 lncRNA 与坏死性凋亡

坏死性凋亡是由 RIPK1、RIPK3 和人混合系列蛋白激酶样结构域(mixed lineage kinase domain like protein, MLKL) 介导的一种受调控的坏死细胞死亡形式, 在凋亡缺乏的条件下可被激活^[12]。

在 TNFR1 参与的信号通路的研究中, TNF α 与 TNFR1 的结合会触发如 NF- κ B 通路、细胞凋亡和坏死性凋亡的激活, 亦会招募 TRADD、TRAF2/5、RIPK1、cIAP1 组成复合体 I。cIAP1 对 RIPK1 的多聚泛素化所募集的复合物 TAK1 (TAK1、TAB1 和 TAB2), 可解离激活转录因子 NF- κ B^[13], 而 CYLD 对 RIPK1 去泛素化作用或抗坏死蛋白 (A20) 泛素编辑复合物抑制 NF- κ B 活化, 并形成 Necrosome 复合体, 包含 caspase-8、TRADD、RIPK1、RIPK3 和 FADD^[14]。caspase-8 的活性对于确定细胞的命运至关重要, 当缺失或被抑制时, RIPK1 和 RIPK3 会互相激活磷酸化, 进一步活化 Necrosome 复合体, 激活下游的 MLKL 蛋白, 致使膜通透性增强, 损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 渗出; 此外还会造成线粒体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 累积, 线粒体分裂, 细胞发生坏死性凋亡^[15-16]。而当 caspase-8 激活的情况下, caspase-8 会抑制 RIPK1 和 RIPK3 的磷酸化, Necrosome 复合体失活, 导致细胞凋亡。

有研究表明, 在敲低 lncRNA TRINGS 或缺乏葡萄糖所诱导的死亡细胞内 ATP 水平显著降低, 高迁移率族蛋白 B1 和乳酸脱氢酶的释放显著增加, 表明 TRINGS 低表达导致缺糖下的坏死性细胞死亡, 且在形态学观察中, 发现了细胞质膜破坏的坏死性凋亡表型的细胞, 证明了这一结果^[17-18]。在缺乏葡萄糖时, p53 激活 lncRNA TRINGS, 上调的 TRINGS 与糖原合酶激酶-3 β (GSK3 β) 竞争性地结合丝氨酸-苏氨酸激酶受体相关蛋白 (STRAP), 从而减弱了 STRAP 和 GSK3 β 之间的相互作用, TRINGS 通过抑制 STRAP/GSK3 β /NF- κ B 信号传导途径, 使癌细胞免于坏死。

随着 lncRNA 上的 miRNA 识别元件的发现, miRNA-lncRNA 的相互作用增加了多方面转录后基因调控的复杂性^[19]。报道较多的为 lncRNA 作为 ceRNA 与 miRNA 相互作用。为了研究 lncRNA3037/miR-15a 轴在坏死性凋亡中的作用, Li 等^[20]发现敲除 lncRNA 3037 显著提高了 RIPK1、RIPK3、p-MLKL、Bax 和 caspase-3 的表达, 降低了 miR-15a 靶基因抗凋亡蛋白 (BCL2) 和抗坏死蛋白 (A20) 的表达从而增加细胞凋亡率和坏死率。同样的, lncRNA107053293 可作为 miR-148a-3p 的 ceRNA, 调控靶基因 Fas 相关分子 1 的表达, 介导下游基因 RIPK1 和 RIPK3 的表达, 诱导气管细胞发生

坏死性凋亡^[21]。研究表明, 敲除在肝细胞癌中高表达的 lncRNA00176 时, 会使肿瘤抑制因子 miR-9 和 miR-185 释放, 从而影响细胞周期, 造成肝癌细胞坏死性凋亡^[22]。

MiRNA 和 lncRNA 作为两种主要的调节性非编码 RNA, 不仅可以彼此相互作用, 还可以作用于多种细胞内成分, 参与细胞凋亡和坏死等 PCD 调节^[23], lncRNA 是否通过与其它 ncRNAs 的相互作用从而参与调控坏死性凋亡, 有待进一步探索。

3 lncRNA 与铁死亡

2012 年 Dixon 等^[24]首次提出一种铁依赖性的调节性细胞死亡模式, 通过不同的信号传导通路, 最终导致细胞内部脂质 ROS 物质的积累、脂质过氧化, 从而诱导细胞死亡, 被定义为铁死亡。

在较成熟的还原性谷胱甘肽 (glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 调节通路中, 胱氨酸通过细胞膜表面的胱氨酸-谷氨酸反转运受体 (System Xc) 转移至细胞内, 进一步形成 GSH, 再经 GPX4 形成氧化型谷胱甘肽。这个过程会辅助 GPX4 去除多不饱和脂肪酸的过氧化, 从而抑制铁死亡的发生^[25]。循环铁与转铁蛋白以三价铁的形式结合, 然后通过转铁蛋白受体 1 (TFR1) 进入细胞, 通过还原及脱蛋白, 形成二价铁离子, 再经芬顿反应, 产生大量羟自由基, 最终造成 ROS 的累积, 促进铁死亡的发生。此外, 肿瘤抑制蛋白 p53 可以通过抑制 System Xc 摄取胱氨酸, 从而影响 GPX4 的活性, 导致细胞抗氧化能力下降、脂质 ROS 积累和铁死亡^[26]。而 Erastin 不仅可以通过抑制 System Xc 摄取胱氨酸, 还可以激活 p53、影响脂质代谢等形式参与铁死亡的调控^[27-28]。

在铁死亡中 lncRNA 可以扮演 ceRNA 的角色, Wang 等^[29]证明在肺癌中 lncRNA LINC00336 的过表达降低了铁浓度、脂质 ROS 和线粒体超氧化物的表达, 并增加了线粒体膜电位。淋巴特异性解旋酶 (LSH) 通过失活 p53 诱导类似胚胎致死性异常视觉基因的 RNA 结合蛋白 1 表达, 后者通过与 LINC00336 相互作用的转录调控提高了 LINC00336 的表达水平。总之, LINC00336 吸收 miR-6852 作为 ceRNA, 从而增加胱硫醚 β 合成酶 (cystathionine β -synthase, CBS; 转硫途径活性的标志) 的 mRNA 水平, 刺激细胞增殖, 集落形成和肿瘤形成, 并抑制肺癌细胞的铁死亡。同样, Lu 等^[30]发现 miR-214 可

以与 lncRNA PVT1、p53 和 TFR1 结合,miR-214 既可通过降低 p53 水平从而抑制铁死亡的发生,亦可与 TFR1 的 3' UTR 结合,部分地通过 TFR1 调节铁进入细胞内,参与铁死亡的调控。研究表明,lncRNA PVT1 作为 miR-214 的海绵,通过 miR-214 介导的 p53 和 TFR1 途径调节脑缺血再灌注中铁死亡的发生发展。

铁死亡还可以与其他类型的程序性死亡紧密相关。LINC00618 通过上调 Bax 蛋白和裂解的 caspase-3 蛋白表达水平来促进细胞凋亡。敲除 LINC00618 显著降低了脂质 ROS 水平,敲除组细胞在经长春新碱(VCR)和 caspase 抑制剂 VAD 处理后,较对照组细胞的脂质 ROS 水平显著升高。然而,当 VCR 和 Erastin 加入这些细胞时,它们对 VCR 诱导的铁死亡没有显著影响,表明铁死亡激活剂不会改变 VCR 诱导的铁死亡和凋亡,而 LINC00618 诱发的铁死亡依赖于 VCR 诱发的凋亡。过表达 LINC00618 的细胞中 LSH 和溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)的表达水平均降低,LSH 与 SLC7A11 的启动子区域结合,增强 SLC7A11 的转录,表明 LINC00618 可抑制 LSH 诱导的 SLC7A11 的表达,促进依赖于细胞凋亡的铁死亡发生^[31]。

4 lncRNA 与焦亡

2001 年 Cookson 等^[32]观察到一种 caspase-1 依赖性的死亡的现象出现在被感染的巨噬细胞中,将其命名为细胞焦亡,不同于细胞凋亡,焦亡的形态学变化在体外没有 DNA 片段化,但存在细胞核凝聚和细胞肿胀,最终破裂。

细胞焦亡有经由 NOD 样受体的经典途径及通过 JAK/STAT1 的非经典途径两类,在细胞在受到病原体或者外部损伤后,会分别激活 JAK 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin, NLRP; NOD 样受体蛋白)/凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)/Pro-caspase-1 复合体。后者水解形成为成熟的 caspase-1,而 JAK 则传递到下游的 STAT1,形成 STAT1 二聚体,入核激活 caspase-4/11 的转录,成熟的 caspase-1 或者 caspase-4/11 和 caspase-5 的复合体,水解 Gasdermin D(GSDMD),生成的 GSDMD-PFD 可以在膜上形成多聚体管孔,引起细胞内渗透压的变化、大量的 DAMPs 分子涌出、细胞肿胀而破

裂死亡^[33]。在缺乏 GSDMD 的情况下,caspase-1 可以裂解并激活半胱氨酸蛋白酶,并且还可以裂解并激活 Bid 以参与 MOMP。因此,在没有 GSDMD 的情况下,caspase-1 激活会导致细胞凋亡^[34]。

近年来,lncRNA 参与焦亡过程调控的研究报道很多,Yang 等^[35]发现 lncRNA KCNQ10T1 可以作为 miR-214-3p 的 ceRNA,增强糖尿病心肌病中 caspase-1 的表达来加速高糖诱导的成纤维细胞的焦亡;且在抑制 KCNQ10T1 后,GSDMD-N 蛋白表达水平发生逆转而呈严重下降趋势。类似的调控方式在糖尿病性角膜内皮功能障碍中被报道^[36]。除此之外,最新研究发现 lncRNA MIAT 可与 CASP1 竞争结合 miR-342-3p,从而减轻对 miR-342-3p 靶基因 CASP1 表达的抑制作用,从而促进 caspase-1 介导的人视网膜外膜细胞焦亡^[37]。无独有偶,Liang 等^[38]发现 lncRNA MEG3 通过海绵吸附 miR-485 抑制黑色素瘤缺乏因子 2(absent in melanoma 2, AIM2)的表达,缺乏 MEG3 可抑制 caspase-1 信号转导,降低 AIM2、ASC、裂解的 caspase-1 和 GSDMD-N 的表达,敲除 MEG3 可抑制氧糖剥夺后再复糖复氧所诱导的焦亡和炎症反应。

lncRNA 还可以通过介导 NLRP 的表达参与焦亡的调控过程。在缺氧心肌细胞中,人脐间充质干细胞分泌的 lncRNA KLF3-AS1 通过作为 ceRNA 与 miR-138-5p 结合,促进沉默信息调节因子 1(Sirt1)的表达,后者可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活,从而下调焦亡的表达^[39]。Wan 等^[40]报道了过表达的 lncRNA H19 与程序性细胞死亡因子 4 竞争 miR-21,形成 ceRNA 网络,H19 介导其触发了 NLRP3/NLRP6 炎性小体的相互激活,募集活化的 caspase-1 来切割 GSDMD,从而引发小胶质细胞焦亡。而 lncRNA GAS5 既参与凋亡的调控,GAS5 的 DNA 甲基转移酶 1 甲基化通过影响 NLRP3 轴也参与调控心肌成纤维细胞焦亡^[41]。

另外还有其他方式参与焦亡的调控,如 Toll 样受体 4 在脊髓损伤后被激活,进一步磷酸化 STAT1 并促进了 lncRNA-F630028O10Rik 的表达,该 lncRNA 充当 miR-1231-5p/Col1a1 轴的 ceRNA,并通过激活 PI3K/AKT 途径增强脊髓损伤后的小胶质细胞焦亡^[42]。

5 lncRNA 与自噬

自噬是指在病原体因素、内质网应激下真核细

胞通过形成双膜限制的自噬小体,将受损或多余的物质从细胞质中隔离出来,并与溶酶体融合,分解的物质可以再利用,以完成自身代谢需要、细胞器的更新、维持细胞稳态的过程^[43]。

在哺乳动物中,巨自噬是研究最为广泛的一种经典类型,另外还有微自噬和分子伴侣介导的自噬。不同的自噬相关基因(autophagy related genes, ATG)蛋白组成复合物,作为自噬机制的调节核心,负责自噬的诱导、自噬小体的形成、运输以及与溶酶体的融合^[44]。自噬的启动始于 UNC-51 样激酶-1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1) 复合物的激活,当雷帕霉素复合物 1 (mammalian target of rapamycin1, mTORC1) 的活性受抑制,ATG13 的快速去磷酸化作用可以促进自身与 ULK-1、粘着斑激酶家族相互作用蛋白和 ATG101 之间形成稳定的复合物。该复合物调节 PI3K 复合物向内质网的转运,从而促进隔离膜的成核和组装;ATG12-ATG5-ATG16L1 复合物移至噬菌体装配位点,并使微管相关蛋白 1-轻链 3 (亦被称为 ATG 8 或 LC3) 与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 结合形成 ATG 8-PE 复合物,这促进了自噬体膜的伸长并形成自噬体,随后与溶酶体融合而发育成熟^[45-46]。自噬在细胞生存和死亡中均扮演着重要角色,且与凋亡存在 Beclin1、p53、ROS 等共同的调节因子。自噬不仅能够促进或抑制凋亡,甚至可与凋亡同时发生,或在特定情况下相互转化或协同作用^[47]。下文中我们将主要探讨 lncRNA 参与自噬样死亡的调控。

部分 lncRNA 通过影响雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达,参与自噬过程的调控。lncRNA FA2H-2 通过在转录水平抑制了 MLKL 的表达,从而抑制了 mTOR 依赖性信号通路的激活促进动脉粥样硬化中自噬的发生发展^[48]。P53 作为常见的抑癌基因,通过激活 mTOR 的上游因子,参与自噬的调节,Liu 等^[49]研究发现,lncRNA CAIF 通过与 p53 蛋白直接相结合,阻断其介导的心肌素转录,下调心肌素的表达水平,抑制了 p53-心肌素信号转导的心肌细胞自噬。

某些 lncRNA 通过介导自噬小体的形成参与自噬的调控。Li 等^[50]发现 lncRNA ZNNT1 的过表达显著增加了葡萄膜黑色素瘤细胞中 LC3-I 到 LC3-II 的转化以及自噬底物受体 SQSTM1 (又称 p62) 的降解,促进细胞自噬。相反,Zhang 等^[51]报道了 lncRNA CRNDE 下调 LC3-II 的表达显著抑制胃癌细

胞自噬。除了针对 LC3 之外,一些 lncRNA 还介导了 ATG 的表达,有研究发现 lncRNA PVT1 通过上调 LC3-II 的表达水平而减少 p62 的含量,而消耗 ATG14 可以恢复胰腺癌细胞中的这些影响,最终表明 PVT1/miR-619-5p 轴通过调节 ATG14 促进自噬活性^[52];类似的,lncRNA EIF3J-DT 通过直接结合来增强 ATG14 mRNA 的稳定性,并通过与 miR-188-3p 竞争性结合来阻止 ATG14 mRNA 的降解,从而上调 ATG14 的表达,促进自噬^[53]。

除此之外一些研究者证实 lncRNA H19 通过抑制了 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 3B 直接与 Beclin1 (参与形成 PI3K 复合体) 启动子的区域结合,上调了 Beclin1 的表达水平并促进了自噬^[54]。

6 其它类型的细胞程序性死亡

除上文所述之外还有报道较少的 RCD^[1]。如依赖性细胞死亡 (parthanatos)、内在性细胞死亡 (entotic cell death)、网织状细胞死亡 (netotic cell death)、溶酶体依赖性细胞死亡 (lysosome-dependent cell death, LCD)、自噬依赖性细胞死亡 (autophagy-dependent cell death)、碱死亡 (alkaliptosis) 和氧自由基诱导死亡 (oxeiptosis)。这些 PCD 的具体机制尚在研究中,目前虽未有 lncRNA 参与其调控的报道,但不同类型 PCD 之间存在关联,如溶酶体膜透化不仅发生在 LCD 中,还可以在细胞凋亡、铁死亡等其它 PCD 中放大细胞死亡信号传导,使得细胞死亡途径变得更加复杂^[55]。临床方面如碱死亡在胰腺癌中的作用被开始挖掘^[56],近几年来一种新概念 PANoptosis 出现在研究的视野中,它是一种独特的、生理相关的炎症性程序性细胞死亡途径,由特定的触发因子激活,结合了凋亡、坏死性凋亡、焦亡三种类型 PCD 的关键因子,在免疫领域发挥了相应的临床价值^[57]。相信陆续会有更多的相关报道,这些细胞程序性死亡与 lncRNA 的相互作用机制也未尝不可作为新的研究方向。

7 总结与展望

PCD 作为近年来研究的热点领域,在炎症、肿瘤等方面均有着突破性的进展,而 lncRNA 不仅在基因的表达过程中充当调节因子,同样也参与了 PCD 的调控,本文综述了近年来 lncRNA 与几种常见的 PCD 相互作用的研究进展(见表 1),这对研究

表 1 lncRNA 在细胞程序性死亡中的作用
Table 1 Role of lncRNA in programmed cell death

PCD 类型 Types of PCD	lncRNA	机制 Mechanism	调控结果 Regulated results	参考文献 References
凋亡 Apoptosis	CA7-4	上调 Bax 和裂解的 PARP1 的表达水平 The expression levels of Bax and CI-PARP1 were up-regulated	促进 Motivate	[8]
	KCNQ1OT1	竞争性结合 miR-296-5p, 上调 Bax Competitive binding of miR-296-5p, up-regulated Bax	促进 Motivate	[9]
	GAS5	上调 caspase-3 的表达 Upregulated caspase-3 expression	促进 Motivate	[10]
	RP11-468E2.5	抑制 JAK/STAT 通路, 负调节 STAT5/6 的表达 Inhibition of JAK/STAT pathway and negative regulation of STAT5/6 expression	促进 Motivate	[11]
	MEG3	抑制细胞中 NF- κ B, caspase-3 和 Bax 的表达 Inhibit the expression of NF- κ B, caspase-3 and Bax in cells	抑制 Inhibition	[58]
	LINC00618	上调 Bax 和裂解的 caspase-3 水平 Upregulated Bax protein and CI-caspase-3 protein levels	促进 Motivate	[31]
坏死性凋亡 Necroptosis	TRINGS	抑制 STRAP/GSK3 β /NF- κ B 信号传导途径 Inhibit STRAP/GSK3 β /NF- κ B signaling pathway	抑制 Inhibition	[17]
	3037	作为 miR-15a 的 ceRNA, 调控 BCL2 和 A20 表达 As ceRNA of Mir-15A, regulates the expression of BCL2 and A20	抑制 Inhibition	[20]
	107053293	作为 miR148a-3p 的 ceRNA, 介导 RIPK1/3 的表达 As a ceRNA of miR148A-3p, regulates the expression of RIPK1/3	促进 Motivate	[21]
	00176	抑制 miR-9 和 miR-185 的释放 Inhibit the release of miR-9 and miR-185	抑制 Inhibition	[22]
铁死亡 Ferroptosis	LINC00336	吸附 miR-6852 作为 ceRNA, 增加 CBS 的 mRNA 水平 miR-6852 was adsorbed as ceRNA to increase the mRNA level of CBS	抑制 Inhibition	[29]
	PVT1	作为 miR-214 的 ceRNA, 介导 p53 和 TFR1 As the ceRNA of miR-214, regulates the expression of p53 and TFR1	促进 Motivate	[30]
	LINC00618	抑制 LSH 诱导的 SLC7A11 的表达 Inhibit the expression of SLC7A11 induced by LSH	促进 Motivate	[31]
	P53RRA	与 G3BP1 相互作用, 将更多的 p53 保留在细胞核中 Interacts with G3BP1 to retain more p53 in the nucleus	促进 Motivate	[59]
焦亡 Pyroptosis	KCNQ1OT1	作为 miR-214-3p 的 ceRNA, 增加 caspase-1 的表达 As a ceRNA of miR-214-3p to increase the expression of caspase-1	促进 Motivate	[35]
	MIAT	拮抗 miR-342-3p 对 CASP1 的抑制作用 It antagonized the inhibitory effect of miR-342-3p on CASP1	促进 Motivate	[37]
	MEG3	通过 MEG3/miR-485/AIM2 轴, 激活 caspase-1 Caspase-1 is activated by MEG3/Mir-485/AIM2 axis	促进 Motivate	[38]
	KLF3-AS1	作为 miR-138-5p 的 ceRNA, 促进 Sirt1 表达 As a ceRNA of miR-138-5p to promote the expression of Sirt1	抑制 Inhibition	[39]
	H19	介导的 ceRNET 使 NLRP3/NLRP6 相互激活 Regulated ceRNET makes NLRP3/NLRP6 mutually active	促进 Motivate	[40]
	GAS5	通过 DNMT1 甲基化介导 NLRP3 NLRP3 is regulated by DNMT1 methylation	促进 Motivate	[41]
	F630028O10Rik	作为 STAT1 的下游, 激活 PI3K/AKT 途径 Regulated by STAT1 to activate the PI3K/AKT pathway	促进 Motivate	[42]
	FA2H-2	抑制了 mTOR 依赖性信号通路的激活 Inhibited the activation of mTOR dependent signaling pathways	促进 Motivate	[48]
	CAIF	阻断 p53 介导的心肌素转录 Blocking p53-mediated myocardin transcription	抑制 Inhibition	[49]
	ZNNT1	促进 LC3-I 到 LC3-II 的转化及 SQSTM1 的降解 Promote the transformation of LC3-I to LC3-II and the degradation of SQSTM1	促进 Motivate	[50]
自噬 Autophagy	CRNDE	与 SRSF6 结合, 下调 LC3-II 的表达 Combined with SRSF6, LC3-II expression was down-regulated	抑制 Inhibition	[51]
	PVT1	靶向 miR-619-5p, 调节 ATG14 Targeting miR-619-5p and regulating ATG14	促进 Motivate	[52]
	EIF3J-DT	作为 miR-188-3p 的 ceRNA, 上调 ATG14 的表达 As the ceRNA of miR-188-3p to increase the expression of ATG14	促进 Motivate	[53]
	H19	通过 H19/SAHH/DNMT3B 轴, 调节 DNA 甲基化 DNA methylation is regulated by the H19/SAHH/DNMT3B axis	促进 Motivate	[54]

lncRNA 参与调控 PCD 的机制的进一步探索以及发掘新的研究方向有一定的意义。同一种的 lncRNA, 如 MEG3、H19 等参与不同类别的 PCD。不同类型的 PCD 之间亦存在相互作用、有些存在类似的调节因子, 如铁死亡被认为依赖于自噬的发生, 两者之间存在 p53、STAT3、GPX4 等近 10 种共有的调节蛋白; ROS 诱导既可以参与坏死性凋亡, 也介导铁死亡的发生, 但目前未见有 lncRNA 直接或间接参与调控此类关键因子, 从而串联多种 PCD 的研究报道。同时 lncRNA 作为肿瘤诊断及治疗的潜在靶点被相继报道, 而另一些如 lncRNA ZNNT1 既诱导自噬又抑制了肿瘤的发生, lncRNA 通过一种或是多种 PCD 在肿瘤发生发展中的具体机制, 仍需深入研究。lncRNA 与 PCD 的关系或将为肿瘤及其它疾病的诊疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Tang D, Kang R, Berghe TV, et al. The molecular machinery of regulated cell death [J]. *Cell Res*, 2019, 29(5): 347–364.
- [2] Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 678–695.
- [3] Jiang N, Zhang X, Gu X, et al. Progress in understanding the role of lncRNA in programmed cell death [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 30.
- [4] Zhang X, Hong R, Chen W, et al. The role of long noncoding RNA in major human disease [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 92: 103214.
- [5] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239–257.
- [6] Green DR, Llamhi F. Cell death signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(12): a006080.
- [7] Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(3): a006049.
- [8] Zhao X, Su L, He X, et al. Long noncoding RNA CA7-4 promotes autophagy and apoptosis via sponging MIR877-3P and MIR5680 in high glucose-induced vascular endothelial cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(1): 70–85.
- [9] Li MM, Liu XH, Zhao YC, et al. Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes apoptosis in neuroblastoma cells by regulating miR-296-5p/Bax axis [J]. *Febs j*, 2020, 287(3): 561–577.
- [10] He X, Wang S, Li M, et al. Long noncoding RNA GAS5 induces abdominal aortic aneurysm formation by promoting smooth muscle apoptosis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(19): 5558–5576.
- [11] Jiang L, Zhao XH, Mao YL, et al. Long non-coding RNA RP11-468E2.5 curtails colorectal cancer cell proliferation and stimulates apoptosis via the JAK/STAT signaling pathway by targeting STAT5 and STAT6 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 465.
- [12] Shan B, Pan H, Najafov A, et al. Necroptosis in development and diseases [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(5–6): 327–340.
- [13] Peltzer N, Darding M, Walczak H. Holding RIPK1 on the ubiquitin leash in TNFR1 signaling [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(6): 445–461.
- [14] Negroni A, Colantoni E, Cucchiara S, et al. Necroptosis in intestinal inflammation and cancer: new concepts and therapeutic perspectives [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1431.
- [15] Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 35: 14–23.
- [16] Chen J, Kos R, Garssen J, et al. Molecular insights into the mechanism of necroptosis: the necrosome as a potential therapeutic target [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1486.
- [17] Khan MR, Xiang S, Song Z, et al. The p53-inducible long noncoding RNA TRINGS protects cancer cells from necrosis under glucose starvation [J]. *Embo j*, 2017, 36(23): 3483–3500.
- [18] Khan MR, Wu M, Liu G. Tumor-suppressive or tumor-supportive: for p53, that is the question [J]. *Mol Cell Oncol*, 2018, 5(3): e1408537.
- [19] Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Tastsoglou S, et al. DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(D1): D101–D110.
- [20] Li X, Chen M, Shi Q, et al. Hydrogen sulfide exposure induces apoptosis and necroptosis through lncRNA3037/miR-15a/BCL2-A20 signaling in broiler trachea [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 699: 134296.
- [21] Wang W, Shi Q, Wang S, et al. Ammonia regulates chicken tracheal cell necroptosis via the lncRNA-107053293/MiR-148a-3p/FAF1 axis [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 386: 121626.
- [22] Tran DDH, Kessler C, Niehus SE, et al. Myc target gene, long intergenic noncoding RNA, linc00176 in hepatocellular carcinoma regulates cell cycle and cell survival by titrating tumor suppressor microRNAs [J]. *Oncogene*, 2018, 37(1): 75–85.
- [23] Su Y, Wu H, Pavlosky A, et al. Regulatory non-coding RNA: new instruments in the orchestration of cell death [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(8): e2333.
- [24] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [25] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [26] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57–62.
- [27] Zhao Y, Li Y, Zhang R, et al. The role of Erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5429–5441.
- [28] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 88.

- [29] Wang M, Mao C, Ouyang L, et al. Long noncoding RNA linc00336 inhibits ferroptosis in lung cancer by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(11): 2329–2343.
- [30] Lu J, Xu F, Lu H. LncRNA PVT1 regulates ferroptosis through miR-214-mediated TFR1 and p53 [J]. *Life Sci*, 2020, 260: 118305.
- [31] Wang Z, Chen X, Liu N, et al. A nuclear long non-coding RNA linc00618 accelerates ferroptosis in a manner dependent upon apoptosis [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 263–274.
- [32] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113–114.
- [33] Kayagaki N, Dixit VM. Rescue from a fiery death: A therapeutic endeavor [J]. *Science*, 2019, 366(6466): 688–689.
- [34] Green DR. The coming decade of cell death research: five riddles [J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1094–1107.
- [35] Yang F, Qin Y, Lv J, et al. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1000.
- [36] Zhang Y, Song Z, Li X, et al. Long noncoding RNA KCNQ1OT1 induces pyroptosis in diabetic corneal endothelial keratopathy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(2): C346–C359.
- [37] Yu X, Ma X, Lin W, et al. Long noncoding RNA MIAT regulates primary human retinal pericyte pyroptosis by modulating miR-342-3p targeting of CASP1 in diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 202: 108300.
- [38] Liang J, Wang Q, Li JQ, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes cerebral ischemia-reperfusion injury through increasing pyroptosis by targeting miR-485/AIM2 axis [J]. *Exp Neurol*, 2020, 325: 113139.
- [39] Mao Q, Liang XL, Zhang CL, et al. LncRNA KLF3-AS1 in human mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorates pyroptosis of cardiomyocytes and myocardial infarction through miR-138-5p/Sirt1 axis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 393.
- [40] Wan P, Su W, Zhang Y, et al. LncRNA H19 initiates microglial pyroptosis and neuronal death in retinal ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(1): 176–191.
- [41] She Q, Shi P, Xu SS, et al. DNMT1 methylation of LncRNA GAS5 leads to cardiac fibroblast pyroptosis via affecting NLRP3 axis [J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 1065–1076.
- [42] Xu S, Wang J, Jiang J, et al. TLR4 promotes microglial pyroptosis via lncRNA-F630028010Rik by activating PI3K/AKT pathway after spinal cord injury [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(8): 693.
- [43] Wollert T. Autophagy [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(14): R671–R677.
- [44] Wang L, Ye X, Zhao T. The physiological roles of autophagy in the mammalian life cycle [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2019, 94(2): 503–516.
- [45] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728–741.
- [46] Zhao YG, Zhang H. Autophagosome maturation: an epic journey from the ER to lysosomes [J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(3): 757–770.
- [47] 李发靖, 陈鹏, 杨仁华, 等. LncRNA 调控细胞自噬的分子机制及在神经系统疾病中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 111–116, 122.
- [48] Guo FX, Wu Q, Li P, et al. The role of the LncRNA-FA2H-2-MLKL pathway in atherosclerosis by regulation of autophagy flux and inflammation through mTOR-dependent signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(9): 1670–1687.
- [49] Liu CY, Zhang YH, Li RB, et al. LncRNA CAIF inhibits autophagy and attenuates myocardial infarction by blocking p53-mediated myocardial transcription [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 29.
- [50] Li P, He J, Yang Z, et al. ZNNT1 long noncoding RNA induces autophagy to inhibit tumorigenesis of uveal melanoma by regulating key autophagy gene expression [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1186–1199.
- [51] Zhang F, Wang H, Yu J, et al. LncRNA CRNDE attenuates chemoresistance in gastric cancer via SRSF6-regulated alternative splicing of PICALM [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 6.
- [52] Zhou C, Yi C, Yi Y, et al. LncRNA PVT1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer via activating Wnt/ β -catenin and autophagy pathway through modulating the miR-619-5p/Pygo2 and miR-619-5p/ATG14 axes [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 118.
- [53] Luo Y, Zheng S, Wu Q, et al. Long noncoding RNA (lncRNA) *EIF3J-DT* induces chemoresistance of gastric cancer via autophagy activation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4083–4101.
- [54] Wang J, Xie S, Yang J, et al. The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 81.
- [55] Wang F, Gómez-sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death [J]. *Traffic*, 2018, 19(12): 918–931.
- [56] Liu J, Kuang F, Kang R, et al. Alkalptosis: a new weapon for cancer therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(5): 267–269.
- [57] Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes [J]. *Cell*, 2021, 184(1): 149–168.
- [58] Zhang Y, Zou Y, Wang W, et al. Down-regulated long non-coding RNA MEG3 and its effect on promoting apoptosis and suppressing migration of trophoblast cells [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(4): 542–550.
- [59] Mao C, Wang X, Liu Y, et al. A G3BP1-interacting lncRNA promotes ferroptosis and apoptosis in cancer via nuclear sequestration of p53 [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 3484–3496.

[收稿日期]2021-07-09