

郭红,王少玮,谢文静,等. 槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素心肌损伤的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 1-9.

Guo H, Wang SW, Xie WJ, et al. Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.001

槲皮素通过 Pink1/Parkin 信号通路减轻阿霉素 心肌损伤的作用机制研究

郭 红,王少玮,谢文静,周 俊,蒋书云,刘金成,杨 剑,金 屏*

(空军军医大学西京医院心血管外科,西安 710032)

【摘要】 目的 阿霉素(doxorubicin, Dox)的临床应用受到其剂量依赖的心脏毒性的限制,本研究拟探究槲皮素(Quercetin, Que)在 Dox 诱导的细胞毒性中的作用机制。**方法** 将小鼠随机分为 Con 组、Que 处理组、Dox 组、Dox-Que 组,将分离的乳鼠心肌原代细胞(neonatal mouse cardiomyocytes, nmCMs)随机分为 Dox-Vehicle 组、Dox-Que 组、Dox-Que-SB 组、Dox-SB 组及 Dox-3 MA 组。细胞活力以 CCK-8 试剂盒检测、同时检测 ATP 生成及 ROS 生成,此外以 Western blot 方法检测线粒体自噬标志蛋白的表达情况。**结果** 在体研究证实,Que 可通过抑制线粒体自噬并降低心肌纤维化抵抗 Dox 诱导的心肌毒性。体外研究表明,Dox 处理可显著降低 nmCMs 细胞活性,ATP 含量及增加 ROS 生成,同时线粒体自噬被显著激活($P<0.05$),Que 预处理可通过抑制线粒体自噬的激活而缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤,并降低 ROS 生成及增加线粒体 ATP 含量。我们进一步的研究证实 Que 对线粒体自噬的抑制作用是 Pink1/Parkin 分子通路介导的,而 SB 处理可通过激活线粒体自噬而部分抵消 Que 对 Dox 诱导的心肌毒性的保护作用。**结论** Que 通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬的激活,促进 ATP 生成及降低 ROS 活性,缓解 Dox 引起的心肌毒性。

【关键词】 槲皮素;线粒体自噬;Pink1;Parkin

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0001-09

Protective role of Quercetin on Pink1/Parkin-dependent mitophagy against doxorubicin-induced cardiotoxicity

GUO Hong, WANG Shaowei, XIE Wenjing, ZHOU Jun, JIANG Shuyun, LIU Jincheng, YANG Jian, JIN Ping*
(Department of Cardiovascular Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective The clinical application of doxorubicin (Dox) is limited by its dose-dependent cardiotoxicity. This study was established to elucidate the mechanism by which Quercetin (Que) acts in Dox-induced cytotoxicity. **Methods** Mice were randomly divided into a Con group, Que group, Dox group and Dox-Que group. Neonatal mouse cardiomyocytes were isolated and randomly divided into a Dox-Vehicle group, Dox-Que group, Dox-Que-SB group, Dox-SB group and Dox-3 MA group. Cell viability was detected by CCK-8 kit, while ATP content and ROS production were determined simultaneously. In addition, Western blot was used to determine the expression of mitophagy marker proteins. **Results** *In vivo* studies confirmed that Que can reduce Dox-induced cardiotoxicity by inhibiting

[基金项目] 国家自然科学基金(81870216)。

[作者简介] 郭红(1983—),女,研究方向:心肌保护。E-mail: guo_hongxj@126.com

[通信作者] 金屏(1984—),男,副主任医师,硕士,研究方向:心肌保护。E-mail: bohua001@126.com

mitophagy and reducing myocardial fibrosis. *In vitro* studies showed that Dox treatment significantly reduced the cell activity of neonatal mouse cardiomyocytes and ATP content, increased ROS production, and significantly activated mitophagy ($P < 0.05$). Que pretreatment alleviated Dox-induced cardiomyocyte injury by inhibiting the activation of mitophagy while reducing ROS production and increasing mitochondrial ATP content. Our study further confirmed that the inhibitory effect of Que on mitophagy was mediated by the Pink1/Parkin-dependent signaling pathway, and that SB treatment partially offset the protective effect of Que on Dox-induced cardiotoxicity by activating mitophagy. **Conclusions** Que can inhibit Pink1/Parkin-mediated mitophagy activation, promote ATP production, reduce ROS production and alleviate Dox-induced cardiotoxicity.

【Keywords】 Quercetin; mitophagy; Pink1; Parkin

阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种有效的蒽环类抗生素,可用于治疗白血病、淋巴瘤和多种实体肿瘤^[1],但其剂量依赖性的心脏毒副作用限制了 Dox 的临床应用^[2]。Dox 引起的心脏毒性是一种复杂的包括线粒体氧化应激在内的多因素过程,主要表现为线粒体功能被抑制,进而导致心肌细胞损伤^[3]。

线粒体约占心肌细胞体积 30% 以上,以满足心脏持续的能量需求^[4]。线粒体质量控制是调控线粒体大小、形态及生物活性等的重要调控机制^[5-6],当受损的线粒体不能恢复到健康状态时,线粒体自噬(mitophagy)便成为细胞凋亡和坏死之前移除受损的线粒体并维持细胞活力的最后保障^[7]。其中丝氨酸/苏氨酸激酶 1(Pink1)及 E3 连接酶 Parkin 介导的线粒体自噬在 Dox 诱导心肌毒性线粒体功能障碍的消除中起关键作用^[8],然而其机制尚待进一步阐明。

槲皮素(Quercetin, Que)属于一种黄酮类化合物,存在于多种蔬菜食品包括苹果、红茶、绿茶、洋葱、红酒、红葡萄、柑橘类水果、樱桃、不同浆果如覆盆子、越橘和蔓越莓、花椰菜和其他多叶绿色蔬菜^[9]。在植物中由苯丙氨酸经苯丙烷途径产生,具有抗癌、抗糖尿病、抗炎和抗氧化(清除自由基)等多种生物学功能^[10-11]。有研究证实,Que 可通过酸水解法及酶转化法等方法进行分离提纯,并通过绘制标准溶液曲线,以紫外分光光度计法进行浓度测定^[12]。此外,Que 对于心血管疾病具有重要的预防和治疗效果^[13],如 Que 对 Dox 诱导的心脏毒性的保护作用^[14],然而其对心肌细胞的保护作用是否通过 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬未见报道。

本研究拟建立 Dox 诱导的小鼠及 nmCMs 细胞毒性模型^[15],验证 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬在 Que 缓解 Dox 心肌毒性中的具体作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

所有的实验方案均经第四(空军)军医大学实验动物中心福利与伦理委员会的批准(20200445),并按照美国国立卫生研究院实验动物使用指南实施。本研究中使用 SPF 级,8 周龄,体重为 20~22 g 的雄性 C57BL/6J 小鼠,共计 40 只;1~3 d(1.5~2 g)大小的 C57BL/6J 乳鼠(SPF 级),共计 50 只。均由空军军医大学动物实验中心饲养并提供[SCXK(陕)2019-001][SYXK(陕)2019-001],在研究中均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Que 标准品(货号:SQ8030)及 Que(货号:Q8010)均购买自 Solarbio 公司(中国);CCK-8 细胞毒性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(货号:G021-1);DOX 购自 Tocris 公司(Bristol,英国,货号:2252);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(货号:ZB2301)、山羊抗鼠(货号:ZB-2305)二抗购自北京中山金桥生物技术有限公司;胎牛血清(货号:16010159)、双抗(货号:15140163)、DMEM 培养基(货号:11965092)(美国)、GAPDH 抗体(货号:51332)、Pink1(货号:46421)、Parkin(货号:4211)、P62(货号:23214)、LC3(货号:4108)及 Beclin1(货号:3495)购自 CST 公司(美国);线粒体自噬激动剂 SB-203580(货号:HY-10256)及线粒体自噬抑制剂 3-Methyladenine(3 MA)(货号:HY-19312)购自 MedChemExpress(MCE,美国);Pierce 原代心肌细胞分离试剂盒(thermo fisher scientific,美国);线粒体分离试剂盒(abcam,美国);蛋白酶抑制剂(南京建成,中国);Bradford 试剂盒(Pierce Biotechnology,美国)。Olympus 荧光显微镜(Olympus,日本);Image Lab(Bio-Rad 公司,美国);SpectraMax M5 分光光度计(美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠在体实验与原代心肌模型建立及实验分组

将 Dox 以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 溶解后制成 10 mmol/L 储备液。实验动物随机分为如下 4 组: (1) 对照组 (Con): 实验小鼠以正常饮食喂养。(2) 槲皮素处理组 (Que): 小鼠以 50 mg/kg Que 灌胃处理 1 周^[16]。(3) 阿霉素组 (Dox): 小鼠隔天以 3 mg/kg 剂量腹腔注射 Dox, 持续 2 周。(4) 阿霉素-槲皮素组 (Dox-Que): 小鼠以 50 mg/kg Que 灌胃处理 1 周, 随后隔天以 3 mg/kg 剂量腹腔注射 Dox, 持续 2 周。所有药物处理结束后饲养 4 周。离体实验将分离的乳鼠心肌原代细胞 (nmCMs) 细胞以随机数字表法随机组, 药物处理情况如下: (1) 对照组 (Vehicle): nmCMs 细胞未作任何处理。(2) 槲皮素组 (Que): nmCMs 细胞分别以 10 μ mol/L 或 20 μ mol/L Que 预处理 22 h。(3) 阿霉素组 (Dox): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 及 DMSO 稀释液共同处理 24 h^[17]。(4) 阿霉素-槲皮素组 (Dox-Que): nmCMs 细胞以 20 μ mol/L Que 预处理 22 h^[18], 再以 10 μ mol/L Dox 及 DMSO 稀释液共同处理 24 h。(5) 阿霉素-槲皮素-线粒体自噬激动剂组 (Dox-Que-SB): nmCMs 细胞以 20 μ mol/L Que 预处理 22 h, 再以 10 μ mol/L Dox 及 10 μ mol/L SB 共同处理 24 h。(6) 阿霉素-线粒体自噬激动剂组 (Dox-SB): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 及 10 μ mol/L SB 共同处理 24 h。(7) 阿霉素+3-甲基腺嘌呤组 (Dox-3 MA), nmCMs 细胞以 10 μ mol/L Dox 处理 16 h 随后以 5 mmol/L 3 MA 共同处理 8 h^[19]。(8) 线粒体自噬激动剂组 (SB): nmCMs 细胞以 10 μ mol/L SB 处理 24 h。

1.3.2 乳鼠心肌原代细胞分离培养

采用 Pierce 原代心肌细胞分离试剂盒分离 1~3 d 大小的 C57BL/6J 小鼠心肌原代细胞^[20]。新生小鼠心脏解剖后, 立即与心肌细胞分离酶 1 和酶 2 在 37℃ 孵育 30~35 min, Hanks 平衡盐溶液洗涤两次, 然后转移至 DMEM 高糖培养基中。将分离的乳鼠心肌细胞置于培养皿中, 37℃, 5% CO₂ 孵育, 剩余的组织以相同的方法处理, 直到没有残留。混合细胞悬液, 收集非贴壁细胞并计数, 随后将细胞转移至 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 μ g/mL) 的 DMEM 中。以进行下一步实验。

1.3.3 成鼠心肌组织及 nmCMs 细胞线粒体分离

使用线粒体分离试剂盒分离成年小鼠心肌组织及 nmCMs 线粒体。所有程序都按照操作说明进行。剪碎心肌组织, nmCMs 用预冷的 PBS 缓冲液清洗。在 3000 r/min 的转速下, 将上清液转移到新管中。在 12377 r/min 的转速下再次离心, 收集含有胞浆蛋白的上清液。然后将含有线粒体的颗粒在添加蛋白酶抑制剂混合物的分离缓冲液中清洗, 并在 12377 r/min 的转速下收集以供进一步使用。

1.3.4 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 检测

利用阳离子荧光染料 JC-1 对线粒体膜电位进行检测。用药物处理后, 将细胞与 JC-1 工作液在 37℃, 避光孵育 30 min, 随后以 PBS 清洗 3 次, 再以 SpectraMax M5 (美国) 分光光度计读取数值。数据以药物处理组与对照组的比值表示。

1.3.5 Western blot 检测

使用预冷的 RIPA 裂解缓冲液处理 nmCMs 细胞。采用 Bradford assay 试剂盒测定蛋白质含量。将处理后的细胞分别收集提取细胞总蛋白, 以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样本, 随后转移至 PVDF 膜, 之后以 5 g/100 mL 脱脂牛奶在室温下孵育 2 h, 再加入相应的一抗抗体于 4℃ 孵育过夜。TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 与兔二抗孵育 2 h。再次清洗后用化学发光系统进行检测, 蛋白定量分析使用 Image Lab 软件 (Bio-Rad)。

1.3.6 ATP 水平检测

按照操作说明分离 nmCMs 细胞线粒体后, 随后以 ATP 检测试剂盒检测线粒体内 ATP 含量。

1.3.7 细胞活力检测

将分离的 nmCMs 接种于 96 孔板, 接种浓度为 5×10^3 个/孔, 以前述方法分别进行处理后, 避光向各孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37℃ 孵育 90 min 后在 450 nm 波长下测量 OD 值。细胞活力以药物组细胞 OD 与 Con 组细胞 OD 分别减去空白 OD 值后的比值表示。

1.3.8 组织病理学分析

小鼠麻醉后, 去除心脏并以 PBS 冲洗, 随后将心脏组织于 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 再以石蜡包埋后切成 3 μ mol/L 切片, 苏木精伊红染色 (hematoxylin and eosin, HE), 并以 Masson's 三色染色法评估心肌纤维化程度。染色结果以 Image J 软件定量后分析。

1.4 统计学方法

所有值均以平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。实验组之间的差异是通过单向或双向 ANOVA 分析确定, 然后进行 Tukey post hoc 检验。 t 检验用于组间单因素比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Que 对 Dox 处理后心肌形态学改变及对 ROS 生成、MMP 及线粒体 ATP 含量的影响

心脏组织的组织病理学检查显示, Con 组和 Que 治疗组小鼠的心肌形态和肌原纤维正常(图 1A、1B)。在 Dox 处理的心脏切片中观察到肌原纤维变性和破坏。Que 处理显著改善了 Dox 诱导的这些损伤。Masson's 三色染色的进一步研究显示, 与正常对照组相比, Dox 处理显著诱导心肌纤维化, 而用 Que 治疗的心肌纤维化在 Dox 处理的心脏组织中被显著抑制(图 1A~1C)。心肌纤维化定量分析显示 Que 能显著降低 Dox 诱导的心肌纤维化($P < 0.05$)。如图 1D, 相对于 Con 组, Dox 可显著增加心肌组织的 ROS 生成, Que 预处理可降低 ROS 生成量

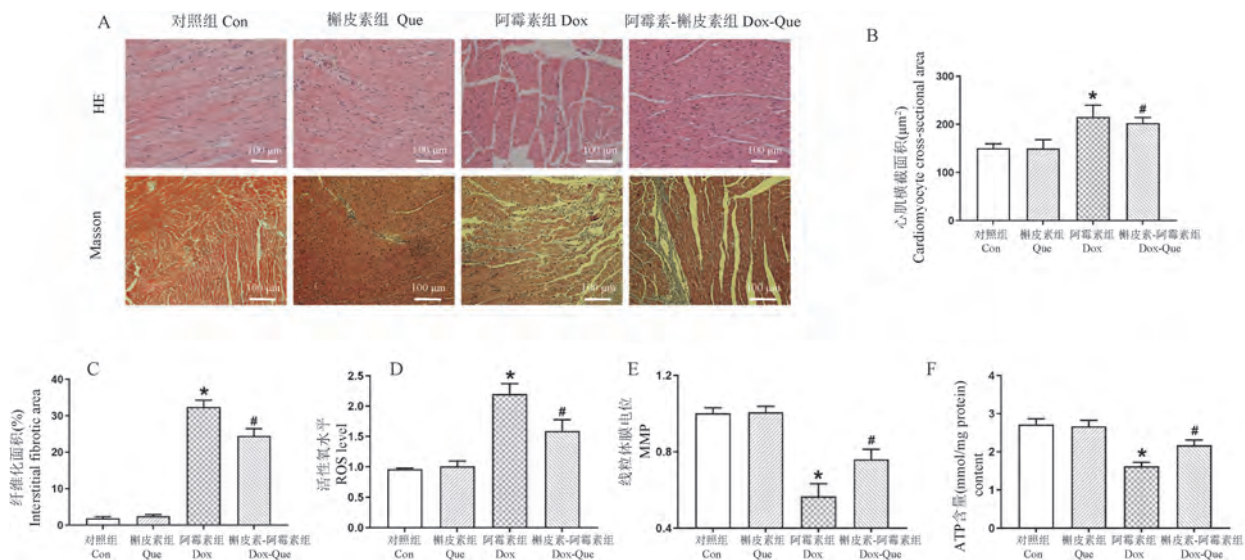
($P < 0.05$), 而 Que 单独处理未见对 ROS 生成有显著改变。对不同处理条件的小鼠心肌组织检测发现, Dox 处理相对于 Con 组, 可显著降低 MMP 含量及线粒体 ATP 生成量($P < 0.05$), 这种降低的趋势可被 Que 预处理逆转($P < 0.05$)(图 1E~1F)。

2.2 Que 对线粒体自噬关键蛋白表达的调节作用

对不同处理组线粒体自噬标志蛋白的检测发现, 如图 2 所示, Dox 处理相对于 Con 组, 可显著增加 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬及标志蛋白 Beclin1 及 LC3II 的表达而降低 P62 蛋白表达量($P < 0.05$), 以促进线粒体自噬的激活, Que 可通过抑制 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬的激活 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬($P < 0.05$), 保护小鼠心肌组织抵抗 Dox 引起的细胞毒性。

2.3 Que/SB 对 nmCMs 细胞活力及 LDH 活性的影响

如图 3A 所示, 10 $\mu\text{mol/L}$ Dox 处理 6 h 可见细胞活力较未加入 Dox 或 Que 组显著降低, 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 预处理后, 可显著增加细胞活力以逆转 Dox 引起的细胞毒性损伤($P < 0.05$), 而 Que 单独处理未见对 nmCMs 细胞有显著影响。通过对不同处理组

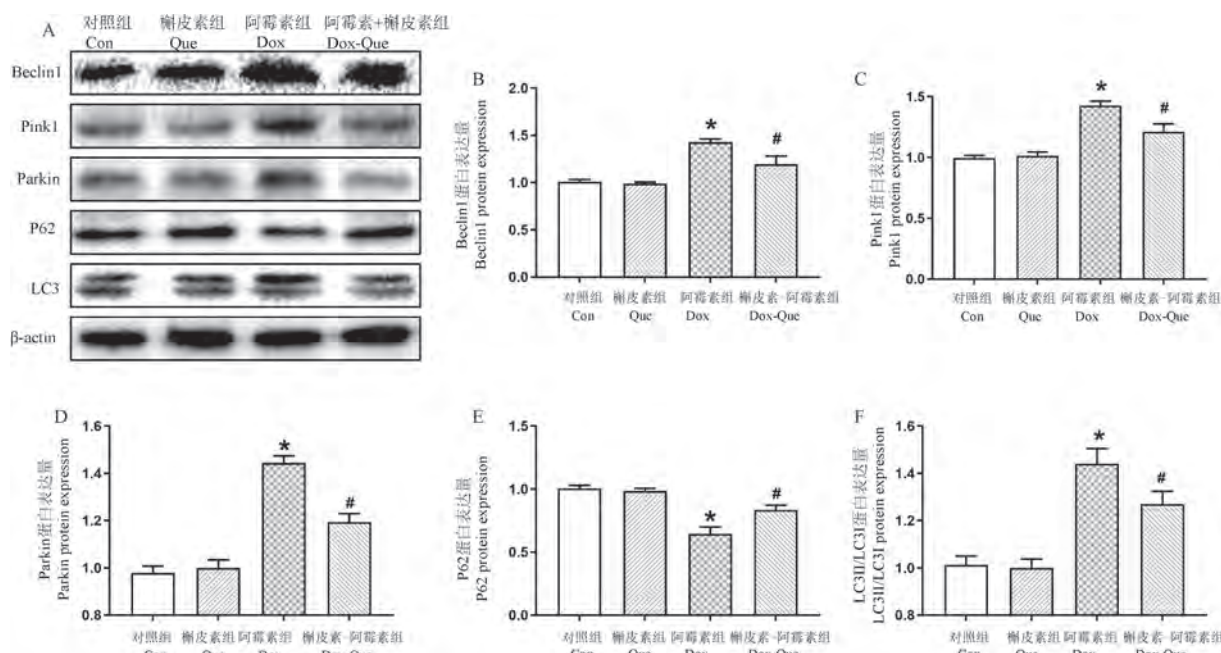


注: A: Que 对 Dox 诱导的心肌组织形态及纤维化的影响。上侧表示 HE 染色, 下侧表示 Masson 染色; B: 心肌细胞横截面积; C: 心脏纤维化区域; D: ROS 水平; E: 线粒体膜电位; F: ATP 含量。与对照组相比, * $P < 0.05$; 与槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 1 Que 可显著减轻 Dox 引起的心肌纤维化, 降低 ROS 生成与上调 MMP、ATP 含量 ($n = 5$)

Note. A, Effects of Que on cardiac morphology and fibrosis in Dox-induced cardiomyopathy. The upper panel represents images with HE staining, the lower panel indicates cardiac fibrosis with Masson's trichrome staining. B, Cardiomyocyte cross-sectional area. C, Cardiac fibrosis area. D, ROS level. E, MMP production. F, ATP content. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with Dox group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Que treatment significantly attenuates Dox-induced cardiotoxicity, reducing ROS level and increasing MMP and ATP content

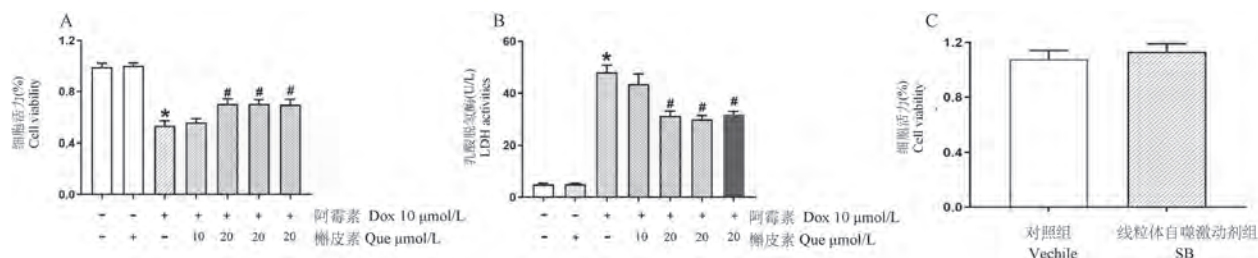


注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析;B~F:Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与对照组相比, * $P < 0.05$;与槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 2 Que 对心肌组织中线粒体自噬标志蛋白表达的影响 ($n = 3 \sim 5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B~F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with Dox group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Que alleviates mitophagy marker protein expression in myocardial



注:A:Dox 和 Que 对细胞活力的影响;B:Dox 和 Que 对 LDH 活性的影响;C:SB(SB-203580)对细胞活力的影响。与对照组相比, * $P < 0.05$;与槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 Dox、Que 及 SB 对细胞活力与 LDH 的影响 ($n = 3 \sim 5$)

Note. A, The effective of Dox and Que on cell viability. B, The effective of Dox and Que on LDH activity. C, The effective of SB on cell viability. Compared with Vehicle group, * $P < 0.05$. Compared with Dox group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of Que, Dox and SB on cell viability and LDH activity

细胞培养上清液的检测发现(图 3B),Dox 可引起 LDH 浓度的显著增加,加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Que 后 LDH 浓度较单独加入 Dox 后显著降低($P < 0.05$),但这种降低趋势并未随 Que 浓度增加而改变。此外,SB 单独处理并未改变 nmCMs 细胞活力(图 3C)。

2.4 Que/SB 对 Dox 诱导下 nmCMs 细胞 ROS 生成、MMP 及线粒体 ATP 生成量的影响

如图 4A 所示,相对于 Dox 组,Que 预处理可显著降低 LDH 含量($P < 0.05$),而 SB 加入则部分抵消

了 Que 对 LDH 活性的抑制作用($P < 0.05$)。如图 4B 所示,与 Dox 组相比较,Que 预处理可显著降低线粒体 ROS 生成,而 SB 则降低了 Que 对 ROS 生成的抑制作用($P < 0.05$),单独加入 SB 未见对 Dox 处理细胞线粒体 ROS 生成有显著改变。

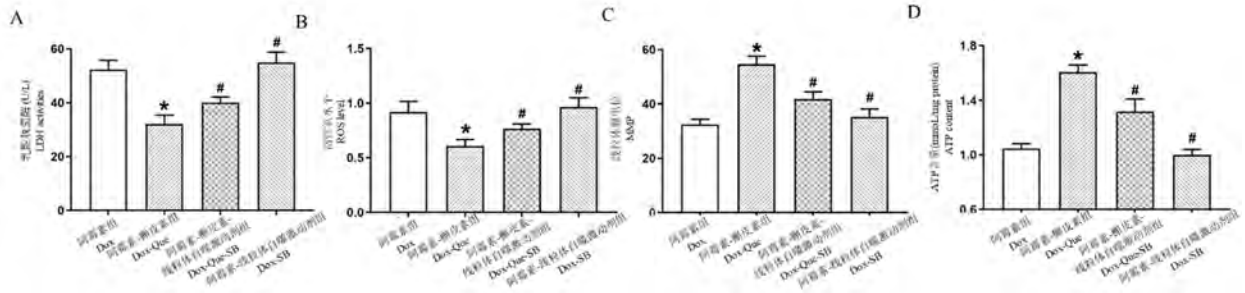
此外(图 4C、4D),对不同条件下细胞 MMP 及 ATP 含量的检测发现,Que 预处理可显著增加 nmCMs 细胞 MMP 及 ATP 生成($P < 0.05$),而 SB 可部分抵消 Que 对 MMP 及 ATP 生成的促进作用($P <$

0.05)。SB 对 Dox 处理的 nmCMs 细胞 MMP 及 ATP 生成则未见改变。

2.5 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬对 Dox 引起的心肌细胞毒性具有重要的调节作用

如图 5 所示, nmCMs 细胞分别以 Dox、Que 或 SB 处理后, 对线粒体自噬相关蛋白的检测发现, Dox 可通过激活 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬, 诱导细胞损伤, 以 Que 预处理则可部分抵消 Dox 诱导的

细胞毒性, 这种保护作用是通过抑制线粒体自噬的激活而实现的。而 SB 则通过促进 Pink1/Parkin 的激活, 进而显著逆转 Que 对 Dox 诱导的细胞毒性的保护作用。此外, 通过线粒体自噬抑制剂 3 MA 处理 nmCMs 细胞后发现, Que 及 3 MA 均可显著抑制 Dox 诱导的线粒体自噬, 降低心肌细胞损伤(图 6)。提示 Que 抵抗 Dox 诱导的细胞毒性是通过 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬实现的。

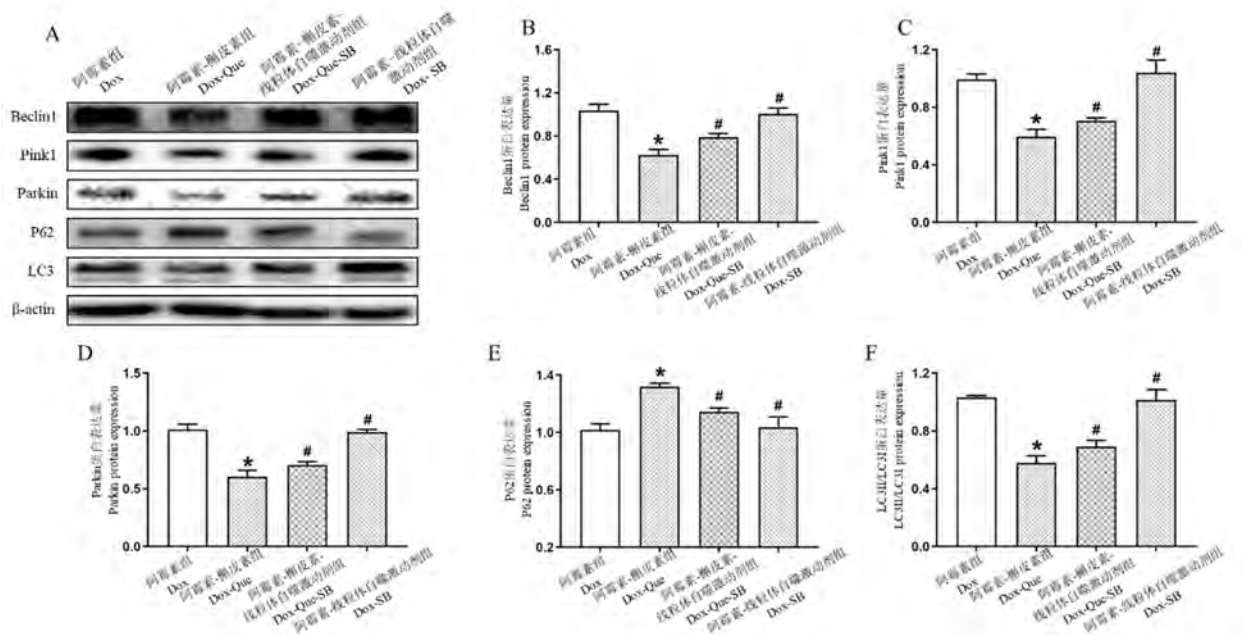


注: A: 乳酸脱氢酶活性; B: ROS 水平; C: 线粒体膜电位产生; D: ATP 含量。与阿霉素组相比, * $P < 0.05$; 与阿霉素-槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 Que 通过调节 LDH、ROS、MMP 及 ATP 含量抵抗 Dox 诱导的心肌细胞损伤($n=3\sim5$)

Note. A, LDH activities. B, ROS level. C, MMP production. D, ATP content. Compared with Dox group, * $P < 0.05$. Compared with Dox-Que group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Que protected nmCMs against Dox-induced cardiomyocytes injury via regulating LDH level, ROS level, MMP and ATP content

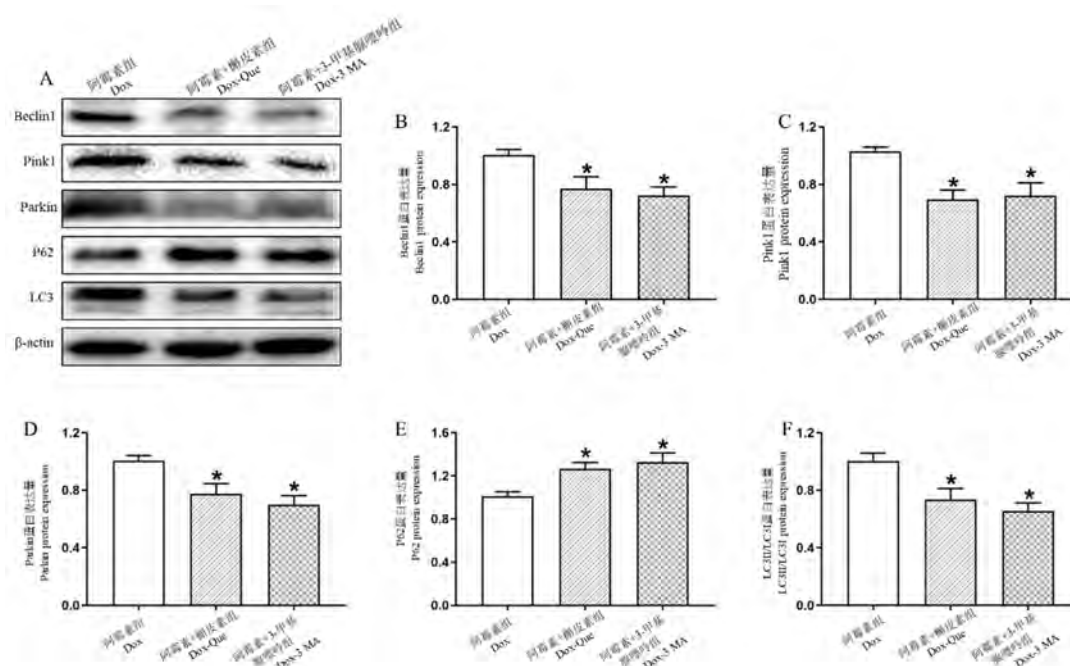


注: A: 用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析; B~F: Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与阿霉素组相比, * $P < 0.05$; 与阿霉素-槲皮素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 Que 通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬, 缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤($n=3\sim5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B~F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Dox group, * $P < 0.05$. Compared with Dox-Que group, # $P < 0.05$.

Figure 5 Que protects mitochondrial hemostasis by inhibiting Pink1/Parkin-dependent mitophagy against Dox-induced cardiotoxicity



注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白图像进行分析;B~F:Beclin1、Pink1、Parkin、P62 和 LC3 的表达。与阿霉素组相比,* $P<0.05$ 。

图 6 Que 及 3 MA 均可显著抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬,缓解 Dox 诱导的心肌细胞损伤($n=3\sim5$)

Note. A, Representative protein images by Western blot from different groups. B ~ F, Expression of Beclin1, Pink1, Parkin, P62 and LC3. Compared with Dox group, * $P<0.05$.

Figure 6 Que and 3 MA significantly inhibited Pink1/Parkin-dependent mitophagy against Dox-induced cardiotoxicity

3 讨论

本研究通过对小鼠及分离的 nmCMs 细胞建立 Dox 损伤模型后发现,Que 可保护小鼠心肌组织 nmCMs 细胞并降低 Dox 对细胞的毒性作用,降低纤维化,其作用机制主要是通过抑制 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬与降低线粒体 ROS 产生,及促进 ATP 合成量的增加来实现的。我们的研究结果证实,Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬有助于 Que 保护小鼠心脏功能并抵抗 Dox 诱导的心肌毒性,从而为临床用药提供部分理论参考。

Dox 诱导的心肌毒性主要机制之一便与线粒体功能障碍有关,导致细胞内 ROS 增加和氧化应激。线粒体是细胞暴露于 Dox 后受损最严重的细胞内细胞器,其内膜中 Dox 积累的重要因素之一是与心磷脂的高亲和力结合有关,后者已知可维持线粒体的结构、功能、能量代谢和细胞存活^[21]。我们的研究证实,Dox 诱导可显著降低心肌组织/细胞 ATP 含量及增加线粒体 ROS 生成,而 Que 预处理可通过增加线粒体 ATP 生成及降低 ROS 生成抵抗 Dox 诱导的细胞毒性,降低心肌纤维化程度。

线粒体自噬是一个进化上保守的细胞进程,能去除功能失调或多余的线粒体,以维持线粒体功能稳态^[22]。Pink1 是 2001 年发现的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在其 N 端含有一个线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting sequence, MTS),在跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD) 旁边还存在一个外部线粒体定位信号 (outer mitochondrial localization signal, OMS)。Parkin 是 1998 年发现的一种 E3 泛素化连接酶,细胞功能正常时,由于线粒体内吞、蛋白酶切割和蛋白酶体降解,Pink1 持续维持在低水平,在细胞损伤时 Pink1 则积累于线粒体外膜并从胞浆中招募 Parkin 于线粒体,从而激活线粒体自噬^[23]。Pink1 依赖的线粒体自噬在细胞重编程过程中防止线粒体蓄积起关键作用^[24]。且线粒体质量控制对于心脏功能调节及防止疾病损伤和发展至关重要。如在心肌梗死后,Parkin 介导的线粒体自噬对心脏具有保护作用,缺乏 Parkin 的小鼠对心肌梗死更敏感,并且心脏中线粒体功能异常。另一项研究表明,Pink1/Parkin 途径的激活可调节线粒体自噬,抵抗脓毒症导致的心功能损伤^[24]。此外,Pink/Parkin 介导的线粒体自噬异常与 Dox 诱导

的心肌细胞毒性显著相关^[8]。因此,线粒体自噬的调节对心脏功能的维持具有重要作用。我们的研究证实,Dox 诱导可显著激活线粒体自噬,即上调线粒体自噬标志蛋白 Pink1、Parkin、及 LC3II 的表达而抑制 P62 蛋白活性,Que 预处理则显著降低 Pink1、Parkin、及 LC3II 的表达与增加 P62 的蛋白表达量,提示 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬在 Que 抵抗 Dox 诱导的线粒体损伤中有非常重要的作用。

Que 是一种天然的多酚化合物,在饮食中含量丰富。Que 已被证明对人体具有许多有益的作用,包括在心血管系统如心脏的缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)损伤中具有重要的保护作用^[16,25]。Que 对蒽环类药物诱导的心脏毒性或其他类型的心脏疾病的保护作用主要通过其抗氧化、抗炎作用实现的^[26]。且已被众多的研究证实,在对啮齿动物的研究中发现,在给与 Dox 前 5~7 d 口服 Que,可显著缓解前者引起的心肌毒性进而预防心功能损伤^[9]。在对 SD 大鼠接受为期 2 周的 Dox 治疗中发现,在化疗前 15 d 并在化疗期间同时每日给予高剂量 Que,可显著降低血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平以,以改善 Dox 引起的心功能损伤^[14]。我们的研究表明,Que 预处理可以降低 Dox 诱导的 ROS 生成增加及促进线粒体 ATP 生成。此外,Que 的心肌保护作用被证实与缓解线粒体功能损伤具有重要相关性^[18]。我们在研究中发现,Dox 可诱导心肌组织/细胞线粒体自噬相关蛋白 Pink1、Parkin 及 LC3 的激活与 P62 活性降低,Que 预处理后可部分缓解 Dox 损伤状态下,Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬的激活,保护线粒体功能免受 Dox 诱导的细胞毒性损伤,而这种保护作用可被线粒体自噬激活剂 SB 而抵消。

我们的研究结果证实,Que 对 Dox 诱导的心肌毒性具有保护作用。其潜在的保护作用机制是通过抑制 Pink1/Parkin 依赖的线粒体自噬实现的。SB 处理可部分抵消 Que 的保护作用。且 3 MA 与 Que 处理均可显著降低心肌细胞线粒体自噬。因此,Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬可能为 Dox 诱导的心肌毒性的潜在治疗靶点。此外,由于 Que 来源广泛且易于获得,对 Que 的心肌保护作用进行深入研究,有望成为减轻抗癌药物 Dox 引起的心肌毒性的重要治疗策略。

参考文献:

- [1] Wallace KB, Sardao VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2020, 126(7): 926-941.
- [2] Renu K, VG A, PB T, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 241-253.
- [3] Studneva I, Palkeeva M, Veselova O, et al. Protective effects of a novel agonist of galanin receptors against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2019, 19(2): 136-146.
- [4] Yang M, Linn BS, Zhang Y, et al. Mitophagy and mitochondrial integrity in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(9): 2293-2302.
- [5] Zhang Y, Whaley-Connell AT, Sowers JR, et al. Autophagy as an emerging target in cardiorenal metabolic disease: From pathophysiology to management [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 1-22.
- [6] 张颖颖, 段然, 陈永学, 等. 布比卡因致心肌 21 细胞线粒体损伤大鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 13-18.
- [7] Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(1): 18-26.
- [8] Yin J, Guo J, Zhang Q, et al. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 51: 1-10.
- [9] Navarro-Hortal MD, Varela-Lopez A, Romero-Marquez JM, et al. Role of flavonoids against adriamycin toxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111820.
- [10] Andres S, Pevny S, Ziegenhagen R, et al. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(1): 1700447.
- [11] Colunga Biancatelli RML, Berrill M, Catravas JD, et al. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19) [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1451.
- [12] Jeszka-Skowron M, Krawczyk M, Zgoła-Grzeskowiak A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals [J]. *J Food Compost Anal*, 2015, 40: 70-77.
- [13] Guo X, Chen M, Zeng H, et al. Quercetin attenuates ethanol-induced iron uptake and myocardial injury by regulating the angiotensin II-L-type calcium channel [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(5): 1700772.
- [14] Zakaria N, Khalil SR, Awad A, et al. Quercetin reverses altered energy metabolism in the heart of rats receiving adriamycin chemotherapy [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(2): 109

- 119.
- [15] Wu S, Lu Q, Ding Y, et al. Hyperglycemia-driven inhibition of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ induces diabetic cardiomyopathy by promoting mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes *in vivo* [J]. Circulation, 2019, 139 (16): 1913-1936.
- [16] Tang J, Lu L, Liu Y, et al. Quercetin improve ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* study via SIRT1/PGC-1 α signaling [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(6): 9747-9757.
- [17] du Pre BC, Dierickx P, Crnko S, et al. Neonatal rat cardiomyocytes as an *in vitro* model for circadian rhythms in the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 112: 58-63.
- [18] Chen X, Peng X, Luo Y, et al. Quercetin protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress and improving mitochondrial function via 14-3-3 γ [J]. Toxicol Mech Methods, 2019, 29(5): 344-354.
- [19] Liang H, Su X, Wu Q, et al. LncRNA 2810403D21Rik/Mirf promotes ischemic myocardial injury by regulating autophagy through targeting miR26a [J]. Autophagy, 2020, 16(6): 1077-1091.
- [20] Mu J, Zhang D, Tian Y, et al. BRD4 inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy *in vivo* [J]. J Mol Cell Cardiol, 2020, 149: 1-14.
- [21] Wenningmann N, Knapp M, Ande A, et al. Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring [J]. Mol Pharmacol, 2019, 96(2): 219-232.
- [22] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology [J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1013-1022.
- [23] Wang L, Lu G, Shen HM. The long and the short of PTEN in the regulation of mitophagy [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 299.
- [24] Naik PP, Birbrair A, Bhutia SK. Mitophagy-driven metabolic switch reprograms stem cell fate [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(1): 27-43.
- [25] Wang L, Tan A, An X, et al. Quercetin dihydrate inhibition of cardiac fibrosis induced by angiotensin II *in vivo* and *in vitro* [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110205.
- [26] Ferenczyova K, Kalocayova B, Bartekova M. Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1585.

[收稿日期]2021-03-14

李磊,吴东良,李尚点,等. 基于数据挖掘的慢性阻塞性肺疾病模型应用分析[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 10-17.
Li L, Wu DL, Li SD, et al. Application analysis of a chronic obstructive pulmonary disease model by data mining [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 10-17.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.002

基于数据挖掘的慢性阻塞性肺疾病模型应用分析

李磊^{1,2}, 吴东良^{1,2}, 李尚点^{1,2}, 阎玥², 史琦², 李春雷², 李友林^{2*}

(1.北京中医药大学,北京 100029;2.中日友好医院 中医肺病二部,国家中医药管理局重点研究室(肺病慢性咳嗽),
中医药防治过敏性疾病北京市重点实验室(BZ0321),中日友好医院呼吸中心,国家呼吸疾病临床研究中心,北京 100029)

【摘要】 目的 探索慢性阻塞性肺疾病(COPD)动物模型的造模要素,为本模型的建立和评价的规范化和标准化提供方法学参考和建议。**方法** 以慢性阻塞性肺疾病合并动物模型为主题词在中国知网、万方数据库中进行搜索近十年相关文献(2011年1月~2021年7月),整理归纳模型中涉及的动物种别、造模方法与周期、检测指标、给药时间、阳性对照药及证候造模情况等内容,建立数据库进行统计分析。**结果** 共纳入176篇文献,COPD模型中应用最多的是SD大鼠(83次,47.16%)、Wistar大鼠(59次,33.52%)和C57小鼠(14次,7.95%),倾向于雄性(140次,79.55%);造模方式多选用烟雾暴露联合脂多糖(91次,52%)或单纯烟雾暴露(34次,19.43%),造模周期多为3个月内(147次,83.52%);检测最多的指标为肺组织病理(137次,24.82%)、肺功能(79次,14.31%)、一般状况(63次,11.41%)、肺泡灌洗液(56次,10.14%)等;在含有阳性对照药的46项研究中,应用最多的是氨茶碱(7次),其次为地塞米松和固本咳喘片(各4次);18项涉及证候造模的研究中频次最高的是肺气虚证(8次)。**结论** 现有COPD模型多采用烟雾暴露联合脂多糖滴注或单纯烟雾暴露方法造模,选用SD/Wistar大鼠或C57小鼠作为实验动物,周期在3个月内,能够有效提升COPD造模的成功率,模型评价指标建议综合肺组织病理、肺功能、一般状况和肺泡灌洗液等结果。但目前仍缺乏对不同造模方式的比较以及造模所用具体参数的确立,有待进一步探究。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;动物模型;数据挖掘

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0010-08

Application analysis of a chronic obstructive pulmonary disease model by data mining

LI Lei^{1,2}, WU Dongliang^{1,2}, LI Shangdian^{1,2}, YAN Yue², SHI Qi², LI Chunlei², LI Youlin^{2*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. 2. the 2nd Department of Pulmonary Disease, China-Japan Friendship Hospital, Key Unit of State Administration of Traditional Chinese Medicine (Pneumonopathy Chronic Cough and Dyspnea), Beijing Key Laboratory of Prevention and Treatment of Allergic Diseases with Traditional Chinese Medicine (BZ0321), Center of Respiratory Medicine, National Clinical Research Center for Respiratory Diseases, Beijing 100029)

【Abstract】 Objective To explore the modeling elements of an animal model of chronic obstructive pulmonary disease, which may provide a methodological reference to establish this model. **Methods** We searched for literature from January 2011 to July 2021 in CNKI and Wanfang databases using an animal model of chronic obstructive pulmonary disease combined with animal models as the subject words, and sorted out the animal species and model involved in the model. Then, we established a database for statistical analysis with method, cycles, detection indicators, administration time and

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(81904184)。

【作者简介】 李磊(1993—),男,博士研究生,研究方向:中医内科学。E-mail:20190941239@bucm.edu.cn

【通信作者】 李友林(1961—),男,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中医药防治肺系及过敏性疾病的临床与基础研究。

E-mail:lyl19610721@163.com

positive control drugs. **Results** A total of 176 articles were included. The most commonly used animals for the COPD model were SD rats (83 times, 47.16%), Wistar rats (59 times, 33.52%), and C57 mice (14 times, 7.95%), which tended to be male (140 times, 79.55%). Most modeling method were smoke exposure combined with lipopolysaccharide (91 times, 52%) or simple smoke exposure (34 times, 19.43%). The modeling cycle was mostly within 3 months (147, 83.52%). The most detected indicators were lung histopathology (137 times, 24.82%), lung function (79 times, 14.31%), general condition (63 times, 11.41%), and alveolar lavage fluid (56 times, 10.14%). **Conclusions** Using SD/Wistar rats or C57 mice as experimental animals under smoke exposure combined with lipopolysaccharide instillation or simple smoke exposure within 3 months effectively improves the success rate of COPD models. Model evaluation indicators suggest that the result of lung histopathology, lung function, general condition and alveolar lavage fluid should be integrated.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; animal model; data mining

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary emphysema, COPD) 是全世界主要的呼吸系统健康问题,通常是由长期吸入有毒颗粒或气体 (如香烟烟雾), 及宿主因素相互作用所致, 其中至少 80% 病例是由吸入烟草烟雾引发^[1], 在工业国家甚至可达到 95% 以上^[2]。尽管 COPD 是一种复杂的异质性疾病, 主要特征是慢性气道炎症 (支气管炎) 和/或肺气肿、粘液堵塞、气道感觉神经敏感以及肺功能下降, 但其早期症状不显易被忽视, 待其发展加重或并发症发生方被识别, 加之目前无有效阻止本病诱发或进展的治疗方法, 故其致残率和死亡率高, 在全球主要死因中位列第三^[3]。目前估计 COPD 已影响全球 3.28 亿人, 在未来 20 年内, 它将成为主要的死亡原因之一^[4], 尽管构成了主要的公共卫生问题, 但相关研究仍缺乏资金^[5]。COPD 防治当中的许多疾病负担和医疗保健占用都与其合并症和感染病毒或细菌恶化的管理有关^[6]。应用吸入糖皮质激素和支气管扩张药有益于改善 COPD 患者症状和延缓病情恶化, 但临床疗效有限, 无法逆转组织病变或改变驱动慢性进展的因素, 并且对肺功能下降的影响有限^[7]。加深对 COPD 发生和发展的分子途径和反应的理解, 将有助于急需的有效治疗药物的开发^[8]。然而, 获取 COPD 患者全程信息尤为困难, 并且多数临床病例通常仅代表疾病过程中特定时间的“快照”^[6], 故本目标的实现需要建立于动物研究基础之上, 亟需建立符合临床实际情况且准确反映疾病病理生理的 COPD 动物模型。因此, 本文借助数据挖掘方式, 对最近 10 年涉及 COPD 模型建立的文献进行检索并整理分析, 以期 COPD 模型的开发所涉及的实验动物的特征选择, 造模方法与周期及结局评价等多重建模因素提供参考。

1 材料和方法

1.1 数据来源

以“慢性阻塞性肺疾病”合并“动物模型”为主题词在中国知网、万方数据库中进行搜索, 时间为 2011 年 1 月~2021 年 7 月 22 日。收集 COPD 动物模型相关研究的文献。总共 523 篇文献, 其中知网 224 篇, 万方 299 篇, 删除重复后剩余 455 篇, 通过阅读题目及摘要, 筛选出 227 篇, 再经详细查阅后删除综述类、评论类及重复文献或无法提取数据的文献, 剩余 176 篇。

1.2 筛选标准

纳入标准: 在检索范畴内, 选取 COPD 动物模型的实验文献, 语种不限; 排除标准: 综述类文献, 会议论文和学位论文, 重复发表的仅取 1 次。另外, 联合的疾病或证型不限, 给予药物干预与否不限, 少数信息不全 (如动物年龄、体重等) 的文献亦纳入分析, 最终从 523 篇文献中纳入 176 篇有效文献, 包括 17 篇英文文献, 159 篇中文文献。

1.3 数据处理

实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动物实验技术》进行规范, 统一处理具有不同名称的动物种类。将收集的文献中涉及的动物种别、造模方法与周期、检测指标、给药时间、阳性对照药与证候情况等以统一格式录入 Microsoft Excel 2013, 采取双人录入方法, 确保信息的质量控制, 并进行整理归纳, 建立 COPD 动物模型的数据库。

1.4 统计学方法

应用 Microsoft Excel 2013 对 COPD 动物模型的数据库中的信息进行统计分析, 定量或定性归纳造模要素, 由于部分信息不全或未进行详细描述, 故各项数据的总和可能不等, 以具体统计结果为准。

2 结果

2.1 实验动物种别

将 176 篇有效文献中应用的实验动物种类及性别进行汇总统计发现,主要包括 3 类实验动物,即大鼠、小鼠、小型猪,其中使用最多的是 SD 大鼠(83 次,47.16%),其次为 Wistar 大鼠(59 次,33.52%),C57 小鼠(14 次,7.95%),豚鼠(6 次,3.41%),小型猪(4 次,2.27%),BALB/c 小鼠(3 次,1.70%),其他小鼠包括 A/J 小鼠、KM 小鼠、叙利亚金黄仓鼠和金黄地鼠,共 5 次(2.84%),未知大鼠(2 次,1.14%);实验动物性别以雄性为主,共 140 次,占比 79.55%,雌雄各半(雌雄同用)或雌性则较少,分别为 24 次和 8 次,占比 13.64%和 4.55%,4 项研究未对性别进行描述,见表 1。

2.2 造模周期与方式

在 176 篇文献中,共有 175 篇文献明确写有造

模方法,将其进行分类规范后统计得出,造模方式中应用最多的是烟雾暴露联合脂多糖(91 次,52%),其他>3 次的造模方式主要有 4 种,包括单纯烟雾暴露 34 次(19.43%),脂多糖 6 次(3.43%),烟雾暴露联合肺炎克雷伯杆菌 5 次(2.86%),烟雾暴露联合弹性蛋白酶 4 次(2.29%),详见表 2。

在应用烟雾暴露的 147 篇文献中,48 篇未对烟熏箱进行描述,剩余文献中使用自制烟熏箱 84 次(84.85%),使用非自制烟熏箱 15 次(15.15%),其中两项应用仅鼻暴露系统^[9-10]。

COPD 作为常见慢性病之一,造模周期(model period, MP)较长,可分为 30 d 以内、30~60 d、60~90 d、90~120 d、120~150 d、150 d 6 个时间段,统计发现,造模周期多在 3 个月内,其中 MP≤30 d 最多,共 75 次(42.61%),30 d<MP≤60 d 和 60 d<MP≤90 d 均为 36 次,各占比 20.45%,见表 3。

表 1 慢阻肺模型实验动物种别频数分布
Table 1 Types distribution of experimental animals for COPD

动物种类 Animal species	频次 Frequency	体重 Body weight	性别 Gender	频次 Frequency
SD 大鼠 SD rats	83	以(200±20) g 为主 Mainly (200±20) g	雄性 Male	140
Wistar 大鼠 Wistar rats	59	以(200±20) g 为主 Mainly (200±20) g	雌雄各半/同用 Male and female	24(19/5)
C57 小鼠 C57 mice	14	以 18~25 g 为主 Mainly 18~25 g	雌性 Female	8
豚鼠 Guinea pig	6	以 350~400 g 为主 Mainly 350~400 g	未描述 Not described	4
小型猪 Miniature pig	4	以(25±5) kg 为主 Mainly (25±5) kg	/	/

表 2 慢阻肺造模方式分类及使用频次
Table 2 Classification and frequency of use of COPD models

造模方法 Method	频次 Frequency	百分比(%) Percentage
烟雾暴露联合脂多糖 Smoke exposure combined with lipopolysaccharide	91	52.00
烟雾暴露 Smoke exposure	34	19.43
脂多糖 Lipopolysaccharide	6	3.43
烟雾暴露联合肺炎克雷伯杆菌 Smoke exposure combined with <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	2.86
烟雾暴露联合弹性蛋白酶 Smoke exposure combined with elastase	4	2.29

2.3 检测指标

将 176 篇文献中的全部检测指标进行分类统计,若同一组织被用于检测不同的指标,如肺组织既做病理检测又做免疫组化,则分别进行统计;若同一组织被用于检测多个同类型指标,如肺组织同时检测 IL-6、IL-8、TNF- α 等,则把这些指标统一归属于肺组织匀浆指标。一般状况包括皮毛、食量、活动度、精神状态、舌象、爪色等宏观特征,呼吸系统特征和体重单独计数。统计结果发现,共有 21 种不同类型的指标,累计频数 552 次,其中检测较多的依次是肺组织病理(137 次,24.82%)、肺功能(79 次,14.31%)、一般状况(63 次,11.41%)、肺泡灌洗液(56 次,10.14%)、血清(46 次,8.33%)、肺组织匀浆(42 次,7.61%)等,详见表 4。

2.4 模型给药时间、阳性对照药及评估指标

将所有文献归纳统计发现,共有 89 项研究涉及给药干预,但仅有 46 项含有阳性对照药,给药时间选择多为 28 d(13 次,28.26%),其次为 14 d(8 次,17.39%);阳性对照药的应用方面较为繁杂,共涉及 26 不同药物,其中两项研究应用了两种阳性对照药物,分别予以计数,应用最多的阳性对照药是氨茶碱(7 次),其次为地塞米松和固本咳喘片(各 4 次),见表 5。

在使用药物及阳性对照药物的文献中,给药效果的评估指标较多,其中使用频次由多到少排名前五的依次是肺组织病理(28 次,60.87%)、肺组织免疫组化(26 次,56.52%)、一般状况(22 次,47.83%)、肺功能(20 次,43.48%)、血清(19 次,41.30%),见表 6。

2.5 模型证候造模情况

纳入的文献中仅有 18 篇涉及证候造模,包括了 7 个证型,即肺气虚证、脾虚证、肺脾两虚证、阴虚痰饮证、痰湿/热证、痰瘀阻肺证、寒燥证,以虚证较多,其中造模频次最高的证候是肺气虚证,共 8 篇,见图 1。

表 3 慢阻肺模型造模周期

Table 3 Modeling cycle of COPD model

造模周期(d) Model period	频次 Frequency	百分比(%) Percentage
MP $\leq$ 30	75	42.61
30 < MP $\leq$ 60	36	20.45
60 < MP $\leq$ 90	36	20.45
90 < MP $\leq$ 120	10	5.68
120 < MP $\leq$ 150	7	3.98
其他 Other	12	6.82

表 4 慢阻肺模型检测指标分类及使用频次

Table 4 Classification and frequency of use of COPD model test indicators

检测指标 Detection indicator	频次 Frequency	累计频数 Cumulative frequency	百分比(%) Percentage
肺组织病理 Lung tissue pathology	137	552	24.82
肺功能 Lung function	79	552	14.31
一般状况 General condition	63	552	11.41
肺泡灌洗液 Alveolar lavage fluid	56	552	10.14
血清 Serum	46	552	8.33
肺组织匀浆 Lung tissue homogenate	42	552	7.61
肺组织免疫组化 Lung tissue immunohistochemistry	26	552	4.71
体重 Body weight	21	552	3.80
肺组织 Real-time PCR Lung tissue Real-time PCR	14	552	2.54
肺组织免疫印迹 Western blot of lung tissue	14	552	2.54
动脉血气 Arterial blood gas	10	552	1.81
膈肌相关检测 Diaphragm related tests	10	552	1.81
肺组织其他检测 Other tests of lung tissue	9	552	1.63
全血或外周血 Whole blood or peripheral blood	7	552	1.27
肺形态 Lung shape	6	552	1.09
呼吸系统体征 Respiratory system signs	3	552	0.54
支气管面积/厚度 Bronchus area/thickness	3	552	0.54
肺指数 Lung index	2	552	0.36
胸部 CT Chest CT	2	552	0.36
肺动脉压 Pulmonary artery pressure	1	552	0.18
肺组织 MRI MRI of lung tissue	1	552	0.18

表 5 慢阻肺模型给药时间与阳性对照药情况

Table 5 Duration of drug administration and positive control drugs

给药时间(d) Delivery time	频次 Frequency	阳性对照药 Positive control drugs	频次 Frequency
28	13	氨茶碱 Aminophylline	7
14	8	地塞米松 Dexamethasone	4
30	6	固本咳喘片 Gubenkechuan tablets	4
7	4	盐酸莫西沙星、阿奇霉素、桂龙咳喘宁、沙美特罗替卡松粉、噻托溴铵、泼尼松、罗红霉素胶囊、强的松混悬液、布地奈德、盐酸班布特罗片 Moxifloxacin hydrochloride, Azithromycin, Guilong Kechuanning, Salmeterol, Salmeterol, Tiotropium Bromide, Prednisone, Roxithromycin capsules, Prednisone suspension, Budesonide, Bambu Hydrochloride Trophies	2
15, 21, 60	2	罗氟司特、Endostar、红霉素、脾氨肽、辛伐他汀、盐酸法舒地尔注射、Akt 激活剂 SC79、文拉法辛、硝苯地平、通宣理肺片、孟鲁司特钠、羧甲司坦、塞来昔布 Roflumilast, Endostar, Erythromycin, spleen aminopeptide, Simvastatin, Fasudil hydrochloride injection, Akt activator SC79, Venlafaxine, nifedipine, Tongxuan Lifei tablets, Montelukast sodium, Carboxysteine, Celecoxib	1
32, 45, 49, 55, 56, 84, 90, 93, 210	1	/	/

表 6 给药后效果评估指标的分类及使用频次

Table 6 Classification and frequency of use of evaluation indexes after administration

检测指标 Detection indicator	频次 Frequency	累计频数 Cumulative frequency	百分比(%) Percentage
肺组织病理 Lung tissue pathology	28	46	60.87
肺功能 Lung function	20	46	43.48
一般状况 General condition	22	46	47.83
肺泡灌洗液 Alveolar lavage fluid	14	46	30.43
血清 Serum	19	46	41.30
肺组织匀浆 Lung tissue homogenate	10	46	21.74
肺组织 Real-time PCR Lung tissue Real-time PCR	4	46	8.70
肺组织蛋白印迹 Western blot of lung tissue	8	46	17.39
肺组织免疫组化 Lung tissue immunohistochemistry	11	46	23.91
肺泡平均内衬间隔、肺泡数 Average alveolar lining interval, number of alveoli	2	46	4.35
全血细胞计数、呼吸频率、温水游泳时间、气道黏膜上皮病变评分、气管壁炎症细胞浸润病变评分、气道酚红排泄量、止咳/抗炎实验、平喘/化痰实验、脾/胸腺指数、支气管形态学、骨骼肌组织 Real-time PCR、骨骼肌组织蛋白印迹、肺组织自噬情况、肺组织细胞凋亡情况、平均肺动脉压、右心肥厚指标、肺组织外观、肺组织超微结构、肺体积比、平均肺泡面积、血气分析、肺血流动力学、肺重、肺指数、气管上皮胶原面积、海马组织 Real-time PCR、海马组织蛋白印迹 Complete blood count, respiratory rate, warm water swimming time, airway mucosal epithelial lesion score, tracheal wall inflammatory cell infiltration lesion score, airway phenol red excretion, antitussive, anti-inflammatory test, anti-asthma, phlegm test, spleen index, thymus index, bronchial morphology, skeletal muscle tissue Real-time PCR, skeletal muscle tissue Western blot, lung tissue autophagy, lung tissue cell apoptosis, average pulmonary artery pressure, right heart hypertrophy index, lung tissue appearance, lung tissue ultramicro Structure, lung volume ratio, average alveolar area, blood gas analysis, lung hemodynamics, lung weight, lung index, tracheal subepithelial collagen area, hippocampal tissue Real-time PCR, hippocampal tissue Western blot	均为 1 All 1	46	2.17

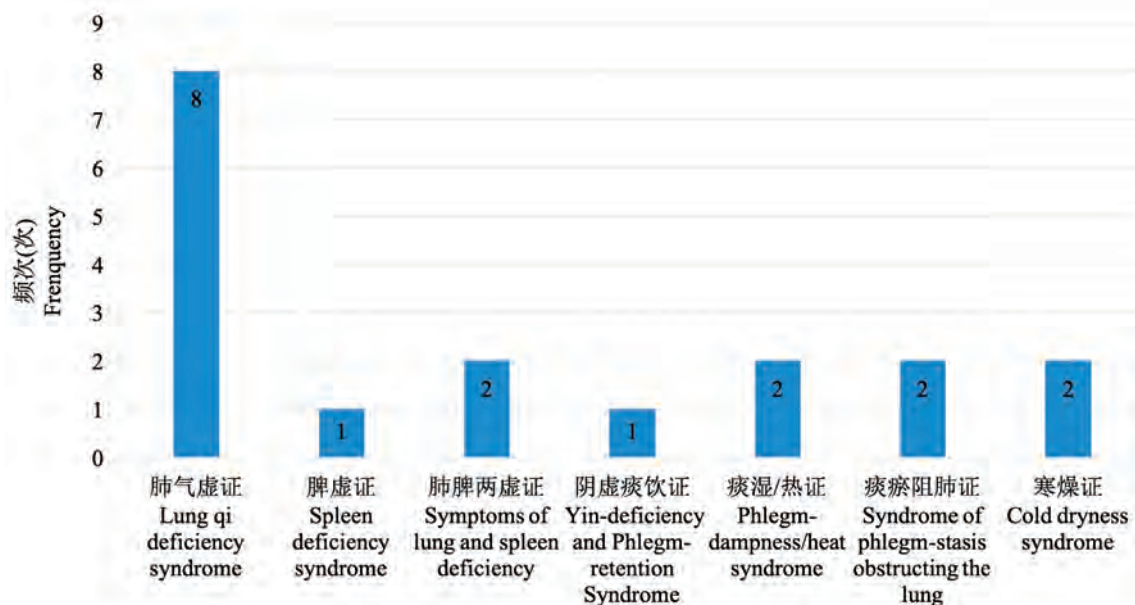


图1 慢阻肺实验动物模型证候造模情况

Figure 1 Syndrome modeling of experimental animal model of COPD

3 讨论

COPD 动物模型应是与人类 COPD 临床病症特点高吻合度的疾病模型,但目前尚未完全实现。造模的首要考虑因素为模型动物的选择,动物种类方面涉及鼠类、兔子、猪、狗等^[11]。通过表 1 可知,COPD 模型的建立多使用 SD 大鼠、Wistar 大鼠和 C57 小鼠。既往研究发现,大鼠体积和肺表面积较大故便于操作,烟雾暴露后易出现纤维化沉积,但其缺点在于与人类的遗传相似性较低,单足体气道结构,粘膜纤毛清除率较高,没有杯状细胞,粘膜腺很少^[12-16],大鼠支气管炎症的介导体与人类不同,且对熏烟诱导的肺气肿样损伤的抵抗力较强^[17];小鼠具有遗传异质性,对肺损伤可出现多种反应,成本低,种类丰富,但限于专一鼻呼吸,体积小使肺参数测量困难,粘膜下腺数目少单足体气道分支,难以复制重度 COPD^[18-21]。Vlahos 等^[22]学者综合了繁殖周期、饲养成本、可操作性与基因信息等因素认为小鼠是最常见选择,研究还发现小鼠性别对烟雾的耐受性差异明显,雌性较雄性小鼠的对烟雾抵抗力差^[23],若同一项研究中雌雄同用,造模后肺部损伤程度可能不同,故多数研究仅用雄性小鼠,这与本研究调查结果相一致。

理想的 COPD 动物模型应再现人类疾病的主要特征^[24],慢支和肺气肿是其最主要特征。由表 2 得知,COPD 最常用的造模方式为烟雾暴露联合脂多

糖或单纯烟雾暴露,前者更能模拟人类 COPD 急性加重期的病理特点,后者与稳定期基本特点相似^[25]。脂多糖是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要促炎性糖脂成分,有研究发现它与烟雾暴露联合可引发气道炎症和肺功能的显著改变^[26],能较好复制感染引起的 COPD 急性发作^[27],这与 COPD 的主要病因一致,即烟雾和气道感染,而且经鼻吸入脂多糖是一种模拟人类 COPD 发育的方法,该方法表现出细菌定植和急性加重^[15]。与单纯烟雾暴露的小鼠相比,应用脂多糖有助于在更短的时间内建立肺气肿特征小鼠模型^[28],并更好重现了 COPD 的肺部炎症特征,小气道病变和气道重塑更为明显,病理生理改变与人类类似,更加符合本病自然发病过程^[29]。本研究还发现烟雾暴露时多选择自制染毒箱,但其相关参数不明或描述甚少,如箱体体积、通风孔面积,以及烟雾中 CO 含量、NO 含量、温度和湿度等;同时,既往研究中对不同实验动物或建模方法的成功率鲜有提及,这些因素影响了模型的稳定性和可重复性,限制了模型规范化的形成。在造模周期方面,整体上周期偏长,多在 3 个月内,以 30 d 以内居多(表 3),部分研究单纯烟雾暴露周期长达 6 个月或以上^[30-31]。

COPD 模型应具备慢性支气管炎、黏液分泌过多、小气道重塑、肺气肿、肺功能受损等特征,这些特征可从肺功能、肺组织病理、肺泡灌洗液、血清或肺组织匀等指标检测中验证。临床上 1 秒率是人群

COPD 确诊的金标准,但其在动物模型评价方面的地位有待进一步深入探究。虽然目前尚无统一模型判定标准,但几乎所有研究均包括病理形态学指标,因其对气道重塑和肺实质的破坏程度的敏感性比肺功能强^[32],其中平均线性截距,破坏指数和凋亡指数尤为重要^[33]。本研究亦发现,肺组织病理是模型评价应用最多的指标,其次为肺功能及动物一般状况(表 4),若 3 者变化方向趋于一致,且变化情况与 COPD 人群吻合度较高,则更能体现模型构建的成功性。

COPD 模型的建立最主要的目的之一即为开发新药,故涉及给药时间和阳性对照药的选择。从表 5 得知,目前研究中给药时间多为 28 和 14 d, COPD 属慢性病,病程较长,故可探索延长给药时间,当然,这与给药剂量相关,因为不同药物对机体发生作用的剂量和致毒效力不同。严格来讲,需经过药效学实验、急性毒性实验和长期毒性实验来确定给药剂量和时间,但很少有文献述及给药时间确立的缘故,故本结果须慎重解释。本研究结果提示,阳性对照药之西药多选用氨茶碱、地塞米松,中药则多用固本咳喘片。在中医证候方面,研究涉及相对较多的是稳定期虚证^[34-35],即肺气虚证、脾虚证和肺脾两虚证(图 1)。现有指南中涵盖的证型未能全面复制于动物模型,且病证结合模型的评价指标缺乏特异性和稳定性,不同证候判断方面仅依靠症状,无法实现宏观指标的等效替代,同时缺乏特异性微观指标;再者,缺乏对病证结合模型的干预顺序及稳定性的探究,如先进行证候造模后进行 COPD 造模,或二者颠倒,亦或同时进行,目前偏于先病后证,但临床中 COPD 患者在疾病形成前往往已有证候存在,因此有必要探索在烟雾暴露前进行证候造模因素的干预,查验证候对 COPD 模型建立的影响。此外,还需考虑模型所处疾病分期,合并症的建立情况及模型死亡率,毕竟现有文献很少报道造模期间的实验动物的死亡率。临床实践中, COPD 分为急性加重期和稳定期,但在模型评价方面缺乏本病不同时期的特异性指标,尽管部分研究^[34,36-38]对此进行初步探索,但尚无定论。目前造模方式往往难以达到急性期的状态,甚至仅达到稳定期的 1、2 级状态^[39]。

本文通过对最近 10 年 COPD 模型相关文献数据分析发现,选用 SD/Wistar 大鼠或 C57 小鼠作为实验动物,采用烟雾暴露联合脂多糖滴注或单纯烟

雾暴露造模,周期在 3 个月内,能够有效提升 COPD 造模的成功率。模型评价指标建议综合肺组织病理、肺功能、一般状况和肺泡灌洗液等结果。当然,具体研究时当视研究目的、实验条件等选用不同的造模方法。总之,结合临床研究获得的知识,单用或联用烟雾暴露的动物模型是寻找 COPD 及其不同疾病时期或合并症新疗法的重要工具^[6]。期望通过本文的简要阐述能为 COPD 的模型建立和受试药物评价提供一些方法学的参考。

参考文献:

- [1] Summary NW. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [J]. AM J Resp Crit Care, 2001, 163(5): 1256-1276.
- [2] Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms [J]. Eur Respir J, 2003, 22(4): 672-688.
- [3] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [4] Tanner L, Single AB. Animal models reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: translating pre-clinical data into clinical relevance [J]. J Innate Immun, 2020, 12(3): 203-225.
- [5] Lopez-Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD [J]. Respirology, 2016, 21(1): 14-23.
- [6] Vlahos R, Bozinovski S. Preclinical murine models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 759: 265-271.
- [7] Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions [J]. Brit J Pharmacol, 2011, 163(1): 29-43.
- [8] Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(7): 543-559.
- [9] Davidson PK, Herbert M, Antczak P, et al. A systems biology approach reveals a link between systemic cytokines and skeletal muscle energy metabolism in a rodent smoking model and human COPD [J]. Genome Med, 2014, 6(8): 59.
- [10] Domínguez-Fandos D, Peinado VI, Puig-Pey R, et al. Pulmonary inflammatory reaction and structural changes induced by cigarette smoke exposure in the guinea pig [J]. Copd, 2012, 9(5): 473-484.
- [11] 李磊, 李春雷, 孙会卓, 等. 基于中西医临床病证特点的慢性阻塞性肺疾病稳定期动物模型分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(17): 4575-4580.
- [12] Zheng H, Liu Y, Huang T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke [J]. Toxicol Lett, 2009, 189(3): 225-234.

- [13] He F, Liao B, Pu J, et al. Exposure to ambient particulate matter induced COPD in a rat model and a description of the underlying mechanism [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45666.
- [14] Wang L, Xu Z, Chen B, et al. The role of vascular endothelial growth factor in small-airway remodelling in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 41202.
- [15] Nie YC, Hao W, Li PB, et al. Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: to establish a suitable model for study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(5): 349–356.
- [16] Zhang X, Zheng H, Zhang H, et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke [J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 717–725.
- [17] 辛亚男. 慢性阻塞性肺疾病动物模型的研究进展 [J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(1): 118–120.
- [18] Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice [J]. *Science*, 1997, 277(5334): 2002–2004.
- [19] Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, et al. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice [J]. *Dis Model Mech*, 2012, 5(3): 333–341.
- [20] Bhat TA, Kalathil SG, Bogner PN, et al. Second-hand smoke induces inflammation and impairs immunity to respiratory infections [J]. *J Immunol*, 2018, 200(8): 2927–2940.
- [21] Patel DF, Peiro T, Shoemark A, et al. An extracellular matrix fragment drives epithelial re-modeling and airway hyperresponsiveness [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(455): eaaq0693.
- [22] Vlahos R, Bozinovski S. Modelling COPD co-morbidities in preclinical models [J]. *Respirology*, 2018, 23(12): 1094–1095.
- [23] Tam A, Bates JH, Churg A, et al. Sex-related differences in pulmonary function following 6 months of cigarette exposure; implications for sexual dimorphism in mild COPD [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164835.
- [24] 张迪, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 83–88.
- [25] 周凤, 李德富, 袁良, 等. 两种不同方法建立的小鼠慢性阻塞性肺疾病模型的比较研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42(5): 367–371.
- [26] Li Z, Wang J, Wang Y, et al. Bone morphogenetic protein 4 inhibits liposaccharide-induced inflammation in the airway [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(11): 3283–3294.
- [27] Shu J, Li D, Ouyang H, et al. Comparison and evaluation of two different methods to establish the cigarette smoke exposure mouse model of COPD [J]. *Rep*, 2017, 7(1): 15454.
- [28] Mizutani N, Fuchikami JI, Takahashi M, et al. Pulmonary emphysema induced by cigarette smoke solution and lipopolysaccharide in guinea pigs [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(9): 1559–1564.
- [29] 宋小莲, 王昌惠, 白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较 [J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(3): 246.
- [30] Zheng HG, Li YN, Huang T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 189(3): 225–234.
- [31] 郭思佳, 封继宏, 吴健广, 等. 补肺颗粒对慢性阻塞性肺疾病稳定期模型小鼠肺组织炎症反应的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(6): 1314–1317.
- [32] Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1): L1.
- [33] Liang GB, He ZH. Animal models of emphysema [J]. *Chin Med J*, 2019, 132(20): 2465.
- [34] 张葵, 滕久祥, 彭芝配. 肺气虚证稳定期慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2009, 15(3): 179–181.
- [35] 曹福凯, 郭建辉, 梁栋, 等. 健脾益肺口服液对慢阻肺“肺脾气虚证”大鼠免疫功能的影响 [J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2184–2186.
- [36] 武红莉, 冯淬灵, 武维屏. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道炎症与重塑的实验研究 [J]. *中日友好医院学报*, 2006, 20(2): 95–98.
- [37] 郭爱敏. 慢性阻塞性肺疾病患者稳定期的功能状态及其相关因素 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2010.
- [38] 王东, 王瑛, 刘又宁. 流感嗜血杆菌致慢性阻塞性肺疾病急性发作动物模型的建立 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2011, 10(2): 156–160.
- [39] Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD [J]. *Clin Sci*, 2014, 126(4): 253–265.

[收稿日期] 2021-10-13

罗福龙,李文举,吴小会,等. 连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制 LPS 诱导的炎症作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 18-26.

Luo FL, Li WJ, Wu XH, et al. *Forsythia suspensa* extract inhibits LPS-induced inflammation by regulating macrophage apoptosis and polarization [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 18-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.003

连翘提取物通过调节巨噬细胞凋亡和极化抑制 LPS 诱导的炎症作用

罗福龙^{1,2,3},李文举^{1,2,3},吴小会⁴,钟武^{2,3},范蓓¹,贯东艳¹,王凤忠^{1*},王琼^{1*}

(1.中国农业科学院农产品加工研究所,北京 100193;2.西南医科大学附属医院急诊科,四川 泸州 646000;
3.四川省康复医院,成都 611139;4.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘要】 目的 研究连翘提取物(FSE)对脂多糖(LPS)诱导炎症的抑制作用,以及 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化模型建立。**方法** MTT 法检测 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞的毒性作用;倒置显微镜检测不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的细胞形态变化,酶标仪检测细胞上清液的一氧化氮(NO)生成量;荧光显微镜检测细胞内活性氧(ROS)和细胞凋亡的荧光强度;Real-time PCR 法检测巨噬细胞中 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、Arginase-1 和 CD206 mRNA 的表达水平。**结果** MTT 结果发现 FSE 在 50 μ g/mL 浓度时无细胞毒性,LPS 作用 36 h 时,不同浓度 FSE 对 LPS 刺激的细胞形态变化和 NO 生成有抑制作用,同时 FSE 可以抑制 LPS 刺激后活性氧(ROS)的减少和细胞的凋亡,Real-time PCR 结果显示,用不同浓度(100、250、500、750 ng/mL) LPS 处理细胞 24 h,或者用 500 ng/mL 浓度的 LPS 处理细胞不同时间后,RAW264.7 细胞 M1 型标记基因(TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、IL-6)mRNA 的表达水平明显升高,RAW264.7 细胞 M2 型标记基因(IL-10、Arginase-1、CD206)mRNA 的表达水平明显降低;FSE 可降低 LPS 诱导的 M1 型标记基因 mRNA 的表达水平,升高 M2 型标记基因 mRNA 的表达水平。**结论** FSE 可通过抑制 RAW264.7 细胞凋亡和促进 RAW264.7 细胞的极化来抑制 LPS 诱导的炎症反应。

【关键词】 连翘提取物;RAW264.7 细胞;M1/M2 亚型;炎症;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0018-09

Forsythia suspensa extract inhibits LPS-induced inflammation by regulating macrophage apoptosis and polarization

LUO Fulong^{1,2,3}, LI Wenju^{1,2,3}, WU Xiaohui⁴, ZHONG Wu^{2,3}, FAN Bei¹, GUAN Dongyan¹, WANG Fengzhong^{1*}, WANG Qiong^{1*}

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China.

2. Department of Emergency Medicine, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000.

3. Sichuan Rehabilitation Hospital, Chengdu 611139; 4. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

【基金项目】中国农业科学院农产品加工研究所创新工程院所重点任务(CAAS-ASTIP-2020-IFST);国家重点研发计划(2016YFE0131800);泸州市-西南医科大学联合课题(2019LZXNYDJ32)。

【作者简介】罗福龙(1995—),男,硕士研究生,研究方向:急诊医学。E-mail:1275128366@qq.com

【通信作者】王琼(1975—),女,博士,研究员,博士生导师,研究方向:食药资源神经精神调节作用研究。E-mail:luyiwangqiong@163.com
王凤忠(1972—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:食品功能因子研究利用与功能食品开发。

E-mail:wangfengzhong@sina.com * 共同通信作者

【Abstract】 Objective We investigated the inhibitory effect of *Forsythia suspensa* extract (FSE) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and establishment of an LPS-induced polarization model of RAW264.7 cells. **Methods** MTT assays were used to assess cytotoxic effects of FSE and LPS on RAW264.7 cells. Inverted microscopy was used to assess morphological changes of cells after stimulation with LPS and various concentrations of FSE. An enzyme marker was used to detect nitric oxide (NO) in culture supernatants. Fluorescence microscopy was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) and apoptosis. ; Real-time PCR was used to detect iNOS expression in macrophages. iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, Arginase-1 and CD206 mRNA expression was measured by Real-time PCR. **Results** FSE was not cytotoxic at 50 $\mu\text{g/mL}$. At 36 h of LPS stimulation, various concentrations of FSE inhibited LPS-induced morphological changes, NO production and FSE inhibited LPS-induced the reduction of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis. Expression of M1-type marker genes (TNF- α , IL-1 β , iNOS and IL-6) in RAW264.7 cells was significantly increased after treatment with various concentrations (100, 250, 500 and 750 ng/mL) of LPS for 24 h or with 500 ng/mL LPS for various times. The mRNA levels of M2 marker genes (IL-10, Arginase-1 and CD206) were significantly decreased in RAW264.7 cells. FSE decreased the expression of LPS-induced M1 marker genes and increased expression of M2 marker genes. **Conclusions** FSE inhibits LPS-induced inflammatory responses by inhibiting RAW264.7 cell apoptosis and promoting polarization.

【Keywords】 *Forsythia suspensa* extract; RAW264.7 cells; M1/M2 subtype; inflammation; apoptosis

炎症的发生发展是一个时刻变化的过程,主要通过自身免疫系统实现对机体的自我保护作用^[1]。炎症反应在人体内普遍存在,不仅可以减轻和消除有害因子对人体的损伤,还可以促进后期的组织修复,但免疫系统的过度激活,会促使炎症因子的大量释放,形成“细胞因子风暴”^[2],发生严重的不良反应,甚至危及生命。

巨噬细胞作为炎症性疾病最主要的免疫防御细胞,可以释放促炎介质促进炎症因子的形成^[3]。巨噬细胞的可塑性和功能极化作用在炎症反应中发挥着重要作用^[4],巨噬细胞在特定微环境下,可以发生 M1 和 M2 表型的转化,在炎症反应的早期, M1 型巨噬细胞可以分泌多种促炎因子,如诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-12 (IL-12)、IL-6、IL-1 β 等,通过增强其自身的抗原提呈能力来激活 I 型免疫反应,引起组织细胞损伤阻止炎症反应进程。与之相反, M2 型巨噬细胞可以分泌多种炎症抑制因子,如 IL-10、IL-4、精氨酸酶-1 (Arginase-1)、CD206 等,通过抑制炎症反应的发展,促进组织损伤的自我修复过程^[5-6]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可以模拟炎症反应的早期阶段,通过诱导 M1 型巨噬细胞的分化^[7-8],促进炎症的发生。

中药免疫调节在炎症过程中发挥着重要作用,其内在机制可能与巨噬细胞 M1 和 M2 表型的平衡有关。连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl. 是木犀科连翘属植物,连翘果实作为中药在我国被广泛应用^[9],但连翘对巨噬细胞凋亡和

极化的研究鲜有报道。因此,本研究采用 LPS 诱导体外培养 RAW264.7 巨噬细胞的极化模型,探讨了连翘提取物 (FSE) 对 LPS 诱导的巨噬细胞 ROS 和细胞凋亡,以及 M1/M2 型相关标志基因的影响,初步探讨 FSE 在巨噬细胞发挥抗炎作用的内在机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞来自于北京大学医学部。

1.2 主要试剂与仪器

连翘产自山西,购自北京太洋树康药业有限责任公司 (批号 2012054),经水提、浓缩、喷雾干燥、粉碎而成;DMEM 培养基 (Thermo Scientific, 批号 11965092);胎牛血清 (Gibco, 批号:10099141);LPS (Sigma 公司, 批号 12880);一氧化氮检测试剂盒 (碧云天, 批号: S0021);Hoechst33342 (碧云天, 批号: C1022);DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针 (索莱宝, 批号: D6470);MTT 试剂盒 (索莱宝, 批号: M1020);EASYspinPlus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (艾德莱, 批号: RN28);反转录试剂盒 (普洛麦格, 批号: A5000);NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus (novoprotein, 批号: E096-01B);Real-time PCR 引物 (北京擎科生物科技有限公司)。

细胞培养箱 (美国, Thermo 公司, 型号: Thermo 371);酶标仪 (美国, Molecular Devices 公司, 型号: spectra MAX190);荧光倒置显微镜 (日本, Olympus

公司,型号:IX71);RT-PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,型号:ABI 7500);可见紫外分光光度计(上海尤尼柯公司,型号:WFZ UV-2100);低温高速离心机(德国,Eppendorf 公司,型号:5430R)。

1.3 实验方法

1.3.1 RAW264.7 的培养与分组

RAW264.7 细胞复苏后,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,5% 的 CO₂、37℃ 恒温培养箱培养细胞,每隔 24 h 观察细胞状态并换液和传代,取对数生长期细胞进行实验,以每毫升 1×10⁴ 个的细胞密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL;或以每毫升 1×10⁶ 个细胞密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。接种 24 h 后进行实验,实验设置对照组, LPS 组(500 ng/mL),加药组(6.25、12.5、25、50 μg/mL),首先加入不同剂量连翘提取物作用 2 h,再每孔加入 500 ng/mL 的 LPS 溶液共同刺激 36 h。

1.3.2 MTT 法检测 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞的毒性作用

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,加入不同浓度的 FSE 和 LPS 作用 36 h,每孔加入 10% 的 MTT 溶液 100 μL,培养 4 h 后,吸去孔内培养液。每孔加入 110 μL 二甲亚砜,置摇床上低速震荡 10 min,使结晶物充分溶解。490 nm 检测各孔的吸光度。

1.3.3 倒置显微镜观察细胞形态

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞接种于 96 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。然后加入 LPS 以及不同浓度 FSE 作用 36 h,用倒置显微镜观察各组细胞形态变化。

1.3.4 细胞上清液一氧化氮(NO)生成量测定

取处于对数生长期的 RAW264.7 细胞密度接种于 96 孔板。药物处理 36 h 后,取各组细胞上清液 50 μL 分别加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II 液各 50 μL,酶标仪 540 nm 检测各组的吸光度。

1.3.5 细胞内活性氧(ROS)和细胞凋亡测定

将对数生长期的 RAW264.7 细胞,接种于 6 孔板中,药物处理完成后,加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA 或 Hoechst33342 溶液,稀释比例为 1:1000,使其终浓度为 10 μmol/L,置于 37℃ 细胞培养箱内避光孵育 30 min,用无血清培养基洗 3 次,荧光显微镜观察细胞形态并拍照,用 Image-Pro Plus 分析荧光强度。

1.3.6 总 RNA 的提取、mRNA 的逆转录及 Real-time PCR

提取 RNA 方法参照试剂盒说明书进行,得到 RNA 溶液。按照逆转录试剂盒,以逆转录 cDNA 第一链合成,然后以 cDNA 为模板扩增目标基因的基因编码段,以鼠 GAPDH 为内参照,应用 2^{-ΔΔCt} 法计算各基因的相对表达量。扩增条件如下:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 20 s,60℃ 延伸 1 min,40 个循环。本实验所用引物由北京擎科生物科技有限公司从 NCBI 中获得,引物用 Primer 6 和 Oligo 7 设计,并由北京擎科生物科技有限公司合成(表 1)。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间差异比较采用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,*P*<0.05 为具有显著性差异,*P*<0.01 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 FSE 和 LPS 对细胞活性的影响

实验结果显示,相比于对照组细胞,100、200 μg/mL 浓度的 FSE 细胞活力分别为(67.13±3.25)%、(41.49±2.78)%,FSE 浓度依赖性的抑制细胞增殖,在 FSE 低于 50 μg/mL 的浓度处理下,FSE 对细胞的增殖没有明显的抑制作用,细胞存活率没有显著性变化,故选用低于 50 μg/mL 浓度范围进行后续实验(图 1A)。相比于对照组细胞,LPS 浓度在 100~1500 ng/mL 均对细胞的增殖没有明显

表 1 Real-time PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列(5' - 3') Primer sequence
TNF-α	Forward: TCTTCTCATTCCTGCTTGTTG
	Reverse: GGTCTGGGCCATAGAACTGA
iNOS	Forward: GAGGCCAGGAGGAGAGATCCG
	Reverse: TCCATGCAGACAACCTTGCTGTTG
IL-1β	Forward: AAATACCTGTGGCCTTGGGC
	Reverse: CTTGGGATCCACACTCTCCAG
IL-6	Forward: CCAGAGATACAAAGAAATGATGG
	Reverse: ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT
IL-10	Forward: GTGGAGCAGGTGAAGAGTGA
	Reverse: TCGGAGAGAGGTACAAACGAG
Arginase-1	Forward: GTGAAGAACCCACGGTCTGT
	Reverse: GCCAGAGATGCTTCCAACCTG
CD206	Forward: CTTCCGGCCTTTGGAATAAT
	Reverse: TAGAAGAGCCCTTGGCTTGA
GAPDH	Forward: GGCTGTATTCCCTCCATCG
	Reverse: CCAGTTGGAACAATGCCATGT

的抑制作用(图 1B)。

2.2 FSE 降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 产生

为研究 FSE 对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后的 NO 生成的影响,用不同浓度的 LPS 刺激细胞 36 h。结果发现,与对照组相比,在 500 ng/mL 的 LPS 刺激细胞时,NO 生成量最大,随着 LPS 浓度的增高,NO 生成量逐渐下降(图 2A),故后续实验采用 500 ng/mL 的 LPS 作为诱导浓度。在 500 ng/mL 的 LPS 刺激下,研究了 FSE 对细胞 NO 生成量的作用。结果发现 6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 FSE 可以降低 LPS 刺激后细胞内 NO 生成量(图 2B)。

2.3 FSE 对 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察到细胞生长状态,正常组的细胞是不规则的圆形;LPS 组的细胞形态相对于正常细胞较大,长出不规则触角,变成梭形,细胞明显

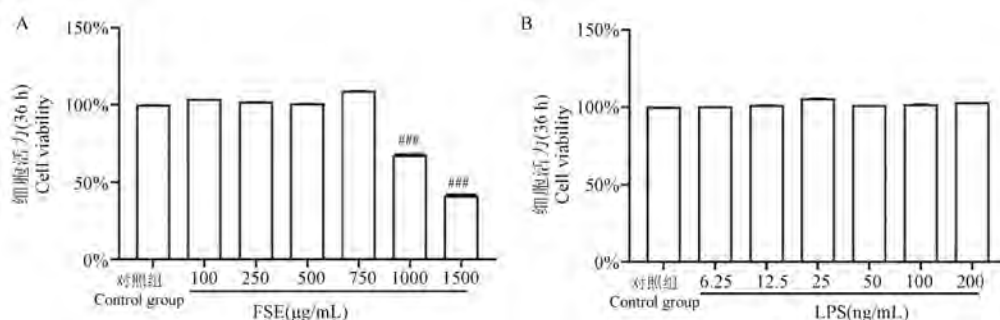
诱导贴壁;各给药组细胞形态均趋于正常,有部分细胞恢复为半贴壁的圆形细胞(图 3)。

2.4 FSE 对 LPS 诱导的细胞内 ROS 的影响

首先,在荧光显微镜下分别测得在 3、6、12、24 h 的绿色荧光强度。在 500 ng/mL 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 3~6 h 时,荧光强度与对照组比明显升高,但 LPS 刺激细胞 24 h 时,荧光强度与对照组相比明显减少(图 4A)。再用 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 FSE 作用细胞 24 h,与 LPS 组相比,FSE 组荧光强度明显升高(图 4B、4C)。

2.5 FSE 对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响

为得到 LPS 刺激之后 RAW264.7 细胞的凋亡情况,在 Hoechst33342 染色的 3、6、12、24 h 分别在荧光显微镜下的蓝色荧光强度。结果发现,在 24 h 荧光强度差异最为明显(图 5A)。接下来,用 12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的 FSE 作用 24 h,与模型组相比,FSE 组荧光强度明显下降(图 5B、5C)。

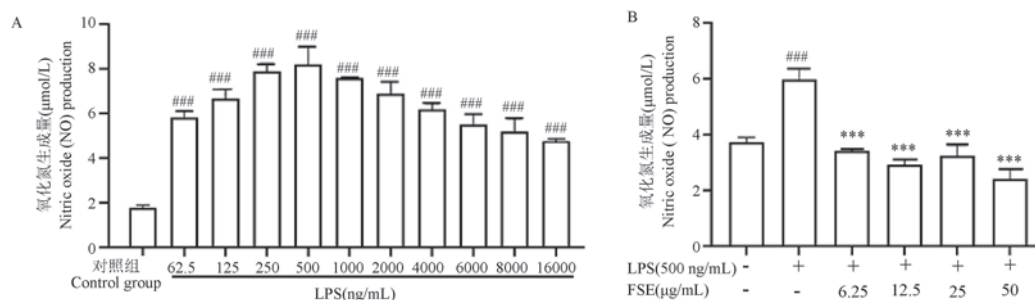


注:A:FSE 对 RAW264.7 细胞活性的影响;B:LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响。与对照组相比,### $P < 0.001$ 。

图 1 FSE 和 LPS 对 RAW264.7 细胞活性的影响

Note. A, Effect of FSE on the activity of RAW 264.7 cells. B, Effect of LPS on the activity of RAW 264.7 cells. Compared with the control group, ### $P < 0.001$

Figure 1 Effects of FSE and LPS on the activity of RAW 264.7 cells



注:A:不同浓度的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 NO 生成量;B:不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后细胞 NO 生成量的影响。与对照组相比,### $P < 0.001$;与 LPS 组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 2 FSE 降低 LPS 刺激后 NO 的产生

Note. A, NO production of RAW264.7 cells stimulated by different concentrations of LPS. B, Effects of different concentrations of FSE on cell NO production stimulated by LPS. Compared with the control group, ### $P < 0.001$. Compared with the LPS group, *** $P < 0.001$.

Figure 2 FSE reduces NO production after LPS stimulation

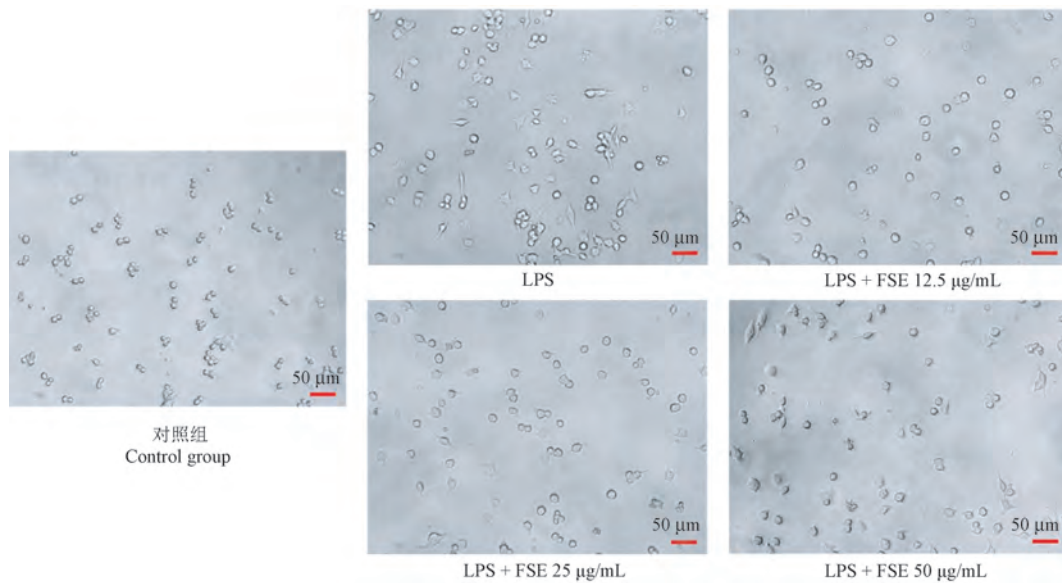
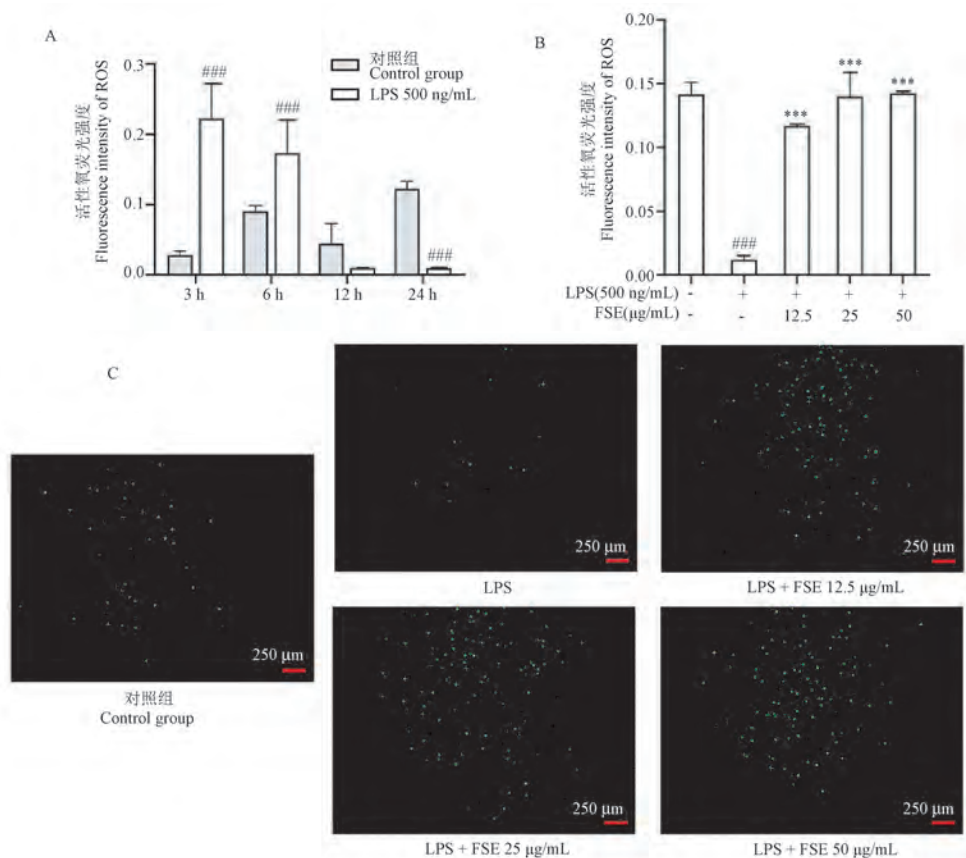


图 3 FSE 对 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞形态的影响

Figure 3 Effect of FSE on the morphology of RAW264.7 cells induced by LPS

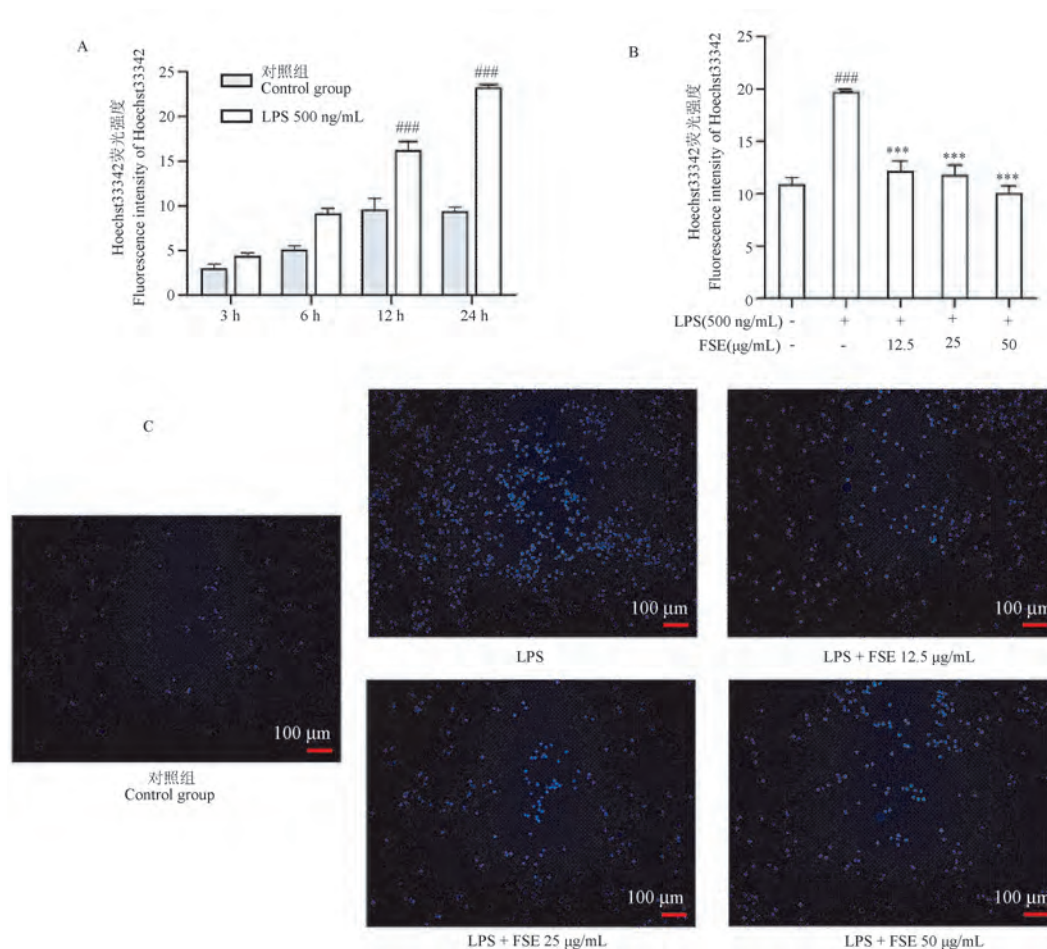


注:A:不同浓度 LPS 刺激 RAW264.7 细胞后 ROS 产生的作用时间;B、C:不同浓度的 FSE 降低 LPS 刺激后 ROS 的产生。与对照组相比, ### $P < 0.001$;与 LPS 组相比, *** $P < 0.001$ 。

图 4 FSE 升高 LPS 刺激后 ROS 的产生

Note. A, Time of ROS production after different concentrations of LPS stimulated RAW264.7 cells. B, C, Different concentrations of FSE reduce the production of ROS stimulated by LPS. Compared with the control group, ### $P < 0.001$. Compared with the LPS group, *** $P < 0.001$.

Figure 4 FSE reduces ROS production after LPS stimulation



注:A:不同浓度 LPS 刺激 RAW264.7 细胞凋亡的作用时间;B、C:不同浓度的 FSE 减少 LPS 刺激后的细胞凋亡。与对照组相比, $^{###}P<0.001$;与 LPS 组相比, $^{***}P<0.001$ 。

图 5 FSE 减少 LPS 刺激后的细胞凋亡

Note. A, Time of apoptosis of RAW264.7 cells stimulated by different concentrations of LPS. B, C, Different concentrations of FSE reduce apoptosis stimulated by LPS. Compared with the control group, $^{###}P<0.001$. Compared with the LPS group, $^{***}P<0.001$.

Figure 5 FSE reduces apoptosis stimulated by LPS

2.6 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化的浓度和时间研究

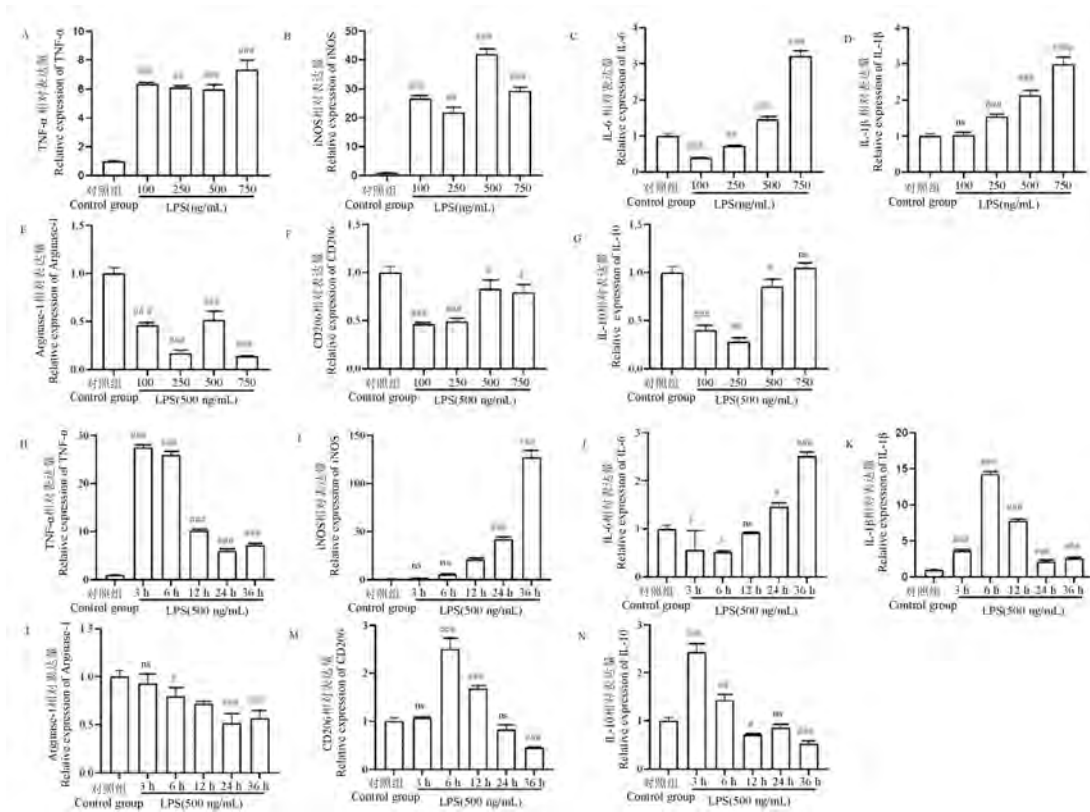
为了研究不同 LPS 浓度对 RAW264.7 细胞极化的影响,分别用 100、250、500、750 ng/mL 的 LPS 作用细胞 24 h,与对照组相比, TNF- α 、iNOS mRNA 表达水平在不同 LPS 浓度下均显著增高; IL-6 mRNA 表达水平在 100 ng/mL 和 250 ng/mL 的 LPS 作用下降低,在 500 ng/mL 和 750 ng/mL 的 LPS 作用下显著增高; IL-1 β mRNA 表达水平在 250 ng/mL 的 LPS 下逐渐增高; IL-10 mRNA 表达水平在 100 ng/mL 和 250 ng/mL 的 LPS 作用下显著降低; CD206 mRNA、Arginase-1 表达水平在不同 LPS 浓度下显著降低(图 6A~6G)。

为了研究 LPS 作用不同时间对 RAW264.7 细胞极化的影响,在 500 ng/mL 的 LPS 作用细胞后,

分别得到 M1 表型基因(TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、IL-6)和 M2 表型基因(IL-10、CD206、Arginase-1)不同时间点的 mRNA 表达水平。结果发现, TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平在 6 h 时显著增高, iNOS 和 IL-6 mRNA 表达水平在 36 h 时显著增高, IL-10、CD206 mRNA 表达水平在 36 h 时显著降低, Arginase-1 mRNA 表达水平在 24 h 时显著降低(图 6H~6N)。

2.7 FSE 对 LPS 诱导的细胞极化的影响

为了进一步研究 FSE 对细胞极化的调节作用,将 FSE 加入 500 ng/mL 的 LPS 刺激细胞 36 h。结果显示, FSE 可以降低 LPS 诱导上调的基因(IL-1 β 、IL-6、iNOS) mRNA 表达水平,同时可以升高 LPS 诱导下调基因(CD206、IL-10) mRNA 表达水平(图 7)。

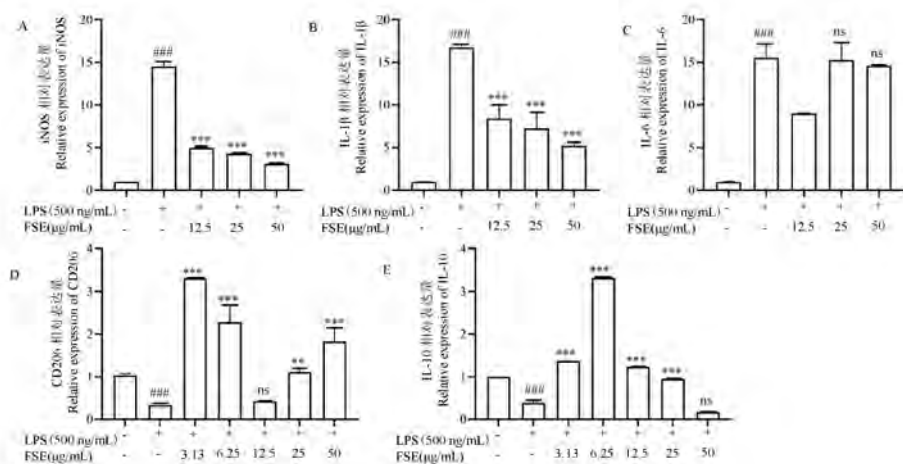


注:A~G:500 ng/mL 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞极化的作用时间;H~N:不同浓度的 LPS 刺激 24 h 后 RAW264.7 的细胞极化。与对照组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$ 。

图 6 LPS 刺激 RAW264.7 细胞极化的时间和浓度

Note. A~G, Polarization time of RAW264.7 cells stimulated by 500 ng/mL LPS. H~N, Cell polarization of RAW264.7 after 24 hours stimulated by different concentrations of LPS. Compared with the control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$.

Figure 6 Time and concentration of LPS stimulated RAW264.7 cell polarization



注:A~C:不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞 M1 表型的极化调节;D~E:不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的 RAW264.7 细胞 M2 表型的极化调节。与对照组相比, $^{###}P<0.001$;与 LPS 组相比, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 7 不同浓度的 FSE 对 LPS 刺激后的细胞极化的调节

Note. A~C, Polarization regulation of FSE at different concentrations on M1 phenotype of RAW264.7 cells stimulated by LPS. D~E, Polarization regulation of FSE at different concentrations on M2 phenotype of RAW264.7 cells stimulated by LPS. Compared with the control group, $^{###}P<0.001$. Compared with the LPS group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 7 Regulation of FSE at different concentrations on cell polarization stimulated by LPS

3 讨论

炎症反应在人体内普遍存在,参与了慢性阻塞性肺病、炎症性肠病、神经退行性疾病、心血管疾病、消化性疾病以及糖尿病等多种疾病的发生发展^[9-10]。这些炎症性疾病给社会带来了相当大的经济负担,缩短了患者的平均预期寿命^[11-12],目前,非甾体抗炎药作为抑制炎症症状的常用药物,长期使用会产生胃肠道等各种副作用^[13],因此,迫切需要研究可靠、有效的替代药物来预防和治疗各种疾病。

连翘作为传统中药,具有抗炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、神经系统保护等诸多作用。具有较大的临床药用价值,现已分离出 300 多种化学成分,包括苯乙醇苷类、木脂素类、酚酸类、黄酮类、萜类及挥发油、C₆-C₂ 天然醇及其苷类等^[14],其中主要化学成分为苯乙醇苷类和木脂素类^[15],目前分离得到苯乙醇苷类成分包括连翘酯苷 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、毛柳苷、车前草苷 A、木通苯乙醇苷 A、B 等^[16-17]。木脂素类成分主要包括连翘苷、连翘脂素、牛蒡子苷元、松脂素、表松脂素、落叶松脂素、异落叶松脂素、Cedrusin、连翘兰 A、连翘兰 B、异橄榄脂素^[18],其中连翘酯苷 A 和连翘苷为 2020 版《中国药典》连翘含量测定的指标性成分^[19]。连翘提取物均有抑制炎症反应的作用,其水提物、甲醇提取物、乙醇提取物以及挥发油等可以抑制多种炎症模型^[20-23],连翘各极性部位提取物的含量差别较大,其中水提取物提取率最高^[24],连翘提取物主要通过 NF- κ B 信号通路、JAK/STAT 信号通路、MAPK 信号通路,调控炎症过程中的多种酶及炎性介质的产生^[25],从而抑制炎症反应。

活性氧(ROS)作为体内炎症反应的重要活性成分,主要由 NADPH 氧化酶(Nox)产生,通过激活下游信号级联反应来扩大炎症的二级信使^[26-27],ROS 也可以过激活非特异性免疫系统消除病原体和修复损伤组织^[28],研究发现 LPS 可以促进 ROS 的产生^[29],本研究中,LPS 在刺激 RAW264.7 细胞后 3~6 h 时,细胞内 ROS 大量产生,但是在 LPS 刺激细胞 24 h 时,细胞内 ROS 产生减少,而 FSE 可以增加 LPS 刺激 24 h 时的 ROS 产生。

此外,ROS 通过磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 途径触发多种细胞内反应^[29],调节细胞的凋亡过程^[30]。ROS 对巨噬细胞发挥双向调节作用,ROS 既

可以促进巨噬细胞的凋亡,又可以抑制巨噬细胞的凋亡,这可能与 cAMP 激活 cAMP 依赖性蛋白激酶有关^[31]。在 LPS 诱导 24 h 时,ROS 的产生量显著减少,RAW264.7 细胞凋亡显著增加。FSE 可以增加 LPS 刺激 24 h 时的 ROS 产生量,并且减少 LPS 刺激 24 h 时的细胞凋亡,FSE 发挥抗炎作用可能是通过增加巨噬细胞内的 ROS,抑制其自身细胞的凋亡,进而发挥巨噬细胞的免疫调节功能。

近年来,巨噬细胞的极化参与多种疾病过程的调节,如免疫性神经炎^[32]、炎症性肠病^[33]、糖尿病和肥胖症^[34]、类风湿性关节炎^[35]等,巨噬细胞的极化可以通过 LPS 诱导为 M1 型或者通过 IL-4 诱导为 M2 型巨噬细胞^[36-37],本文研究了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞极化的模型,在不同浓度的 LPS 以及 LPS 作用不同时间中,M1 和 M2 表型的基因表达水平存在差异,为 RAW264.7 细胞极化的模型提供了新思路。进一步研究发现 FSE 可显著降低 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 M1 表型 IL-1 β 、iNOS、IL-6 mRNA 表达水平,FSE 同时明显升高 M2 表型 CD206、IL-10 mRNA 表达水平,以发挥抗炎的作用。

综上所述,FSE 可通过抑制 RAW264.7 细胞的凋亡以及促进 M2 型巨噬细胞的表达,从而抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,从细胞凋亡和巨噬细胞极化功能角度进一步阐明连翘发挥抗炎作用的内在机制,对其临床应用提供了很好的参考。

参考文献:

- [1] Tasneem S, Liu B, Li B, et al. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti-inflammatory agents [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 139: 126-140.
- [2] Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, et al. Into the eye of the cytokine storm [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2012, 76(1): 16-32.
- [3] Yi YS. Folate receptor-targeted diagnostics and therapeutics for inflammatory diseases [J]. *Immune Netw*, 2016, 16(6): 337-343.
- [4] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10): 986-995.
- [5] Daniel B, Nagy G, Czimmerer Z, et al. The nuclear receptor PPAR γ controls progressive macrophage polarization as a ligand-insensitive epigenomic ratchet of transcriptional memory [J]. *Immunity*, 2018, 49(4): 615-626.
- [6] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 3: 787-795.
- [7] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al. M-1/M-2 macrophages and

- the Th1/Th2 paradigm [J]. J Immunol, 2000, 12: 6166-6173.
- [8] Liu L, Guo H, Song A, et al. Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF- κ B and MAPK pathways [J]. BMC Immunol, 2020, 21(1): 32.
- [9] Liu Z, Ren Z, Zhang J, et al. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases [J]. Front Physiol, 2018, 9: 477.
- [10] Aksentijevich M, Lateef SS, Anzenberg P, et al. Chronic inflammation, cardiometabolic diseases and effects of treatment: Psoriasis as a human model [J]. Trends Cardiovas Med, 2020, 30(8): 472-478.
- [11] Jacobs P, Bissonnette R, Guenther LC. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases-focusing on work productivity and disability [J]. J Rheumatol Suppl, 2011, 88: 55-61.
- [12] Utzeri E, Usai P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(22): 3954-3963.
- [13] 郭强, 王智民, 林丽美, 等. 连翘属药用植物化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 74-79.
- [14] 周明月, 霍金海, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的连翘叶化学成分分析 [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2582-2587.
- [15] 宋小俊. 连翘不同部位化学成分研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(2): 220-222.
- [16] 陈梦莹, 李钦, 韩晶晶, 等. 老翘的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(12): 2066-2072, 2093.
- [17] 宋建平, 张立伟. 连翘木脂素研究进展 [J]. 文山学院学报, 2019, 32(6): 28-34.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社; 2020.
- [19] 刘建洲, 张立伟. 基于人呼吸道上皮细胞炎症模型的连翘提取物抗炎活性实验研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 1248.
- [20] Zhao P, Piao X, Pan L, et al. *Forsythia suspensa* extract attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory liver injury in rats via promoting antioxidant defense mechanisms [J]. Anim Sci J, 2017, 88(6): 873.
- [21] Lee SE, Lim C, Kim H, et al. A study of the anti-inflammatory effects of the ethyl acetate fraction of the methanol extract of *Forsythiae fructus* [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2016, 13(5): 102.
- [22] Wang JM, Cui Y, Chen SQ, et al. *In vivo* evaluation of ethanol extract of *Forsythia suspensa* (thunb.) vahl (fruit) in anti-inflammatory and analgesic activities [J]. J Invest Med, 2017, 65(7): A73.
- [23] 陈泽文, 王学方, 李晓, 等. 连翘不同极性部位的抗炎活性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, 18: 124-128.
- [24] 余元勋. 中国分子白血病学 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社; 2016.
- [25] 白关亚, 何盼, 李媛媛, 等. 青翘不同极性部位抗炎作用的谱效关系分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 1-6.
- [26] Yang CS, Kim JJ, Lee SJ, et al. TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1 [J]. J Immunol, 2013, 190(12): 6368-6377.
- [27] Hong HY, Jeon WK, Kim BC, et al. Up-regulation of heme oxygenase-1 expression through the Rac1/NADPH oxidase/ROS/p38 signaling cascade mediates the anti-inflammatory effect of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in murine macrophages [J]. FEBS Lett, 2008, 582(6): 861-868.
- [28] Blaser H, Dostert C, Mak TW, et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(4): 249-261.
- [29] Chen L, Liu P, Feng X, et al. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(12): 3178.
- [30] Walls M, Mehta PP, Baxi SM, et al. Abstract 4479: Targeting non-small cell lung cancer cells harboring a PIK3CA mutation by a novel and oral PI3K selective inhibitor, PF-4989216 [J]. Cancer Res, 2011, 71: 4479-4479.
- [31] 黄行许, 陈练波, 马晓冬, 等. ROS 对小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2000, 16(5): 334-338.
- [32] Han R, Xiao J, Zhai H, et al. Dimethyl fumarate attenuates experimental autoimmune neuritis through the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2/hemoxygenase-1 pathway by altering the balance of M1/M2 macrophages [J]. J Neuroinflamm, 2016, 13(1): 97.
- [33] Akihito H, Yuji N, Tomohisa T, et al. BTB and CNC homolog 1 (bach1) deficiency ameliorates TNBS colitis in mice [J]. Inflamm Bowel Dis, 2013, 16(4): 740-753.
- [34] Feng B, Ping J, Nie Y, et al. Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24358.
- [35] Wang Y, Han CC, Cui D, et al. Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 50: 345-352.
- [36] Ye Y, Xu Y, Lai Y, et al. Long non-coding RNA cox-2 prevents immune evasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by altering M1/M2 macrophage polarization [J]. J Cell Biochem, 2018, 3: 2951-2963.
- [37] Kimbrough D, Wang SH, Wright LH, et al. HDAC inhibition helps post-MI healing by modulating macrophage polarization [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 119: 51-63.

[收稿日期] 2021-11-15

王兴,陈子琪,李林,等. 真武汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K-AKT 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 27-33, 57.

Wang X, Chen ZQ, Li L, et al. Effect of Zhenwu decoction on cardiomyocyte apoptosis and the PI3K-AKT pathway in rats with congestive heart failure [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 27-33, 57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.004

真武汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K-AKT 通路的影响

王 兴¹, 陈子琪¹, 李 林^{2*}, 廖金花¹, 王晓琳¹, 刘江源¹, 廖东华^{1*}

(1.江西中医药大学, 南昌 330000; 2.江西中医药大学附属医院, 南昌 330006)

【摘要】 目的 观察真武汤对冠脉结扎心衰大鼠模型的治疗作用及对心衰大鼠心肌病理形态学及心肌细胞凋亡的影响,探讨其对凋亡相关蛋白及 PI3K-AKT 信号通路的影响。**方法** 术后 4 周采用随机数字表法将存活的大鼠分为 6 组,每组 7 只:(1)假手术组:术后 4 周给予生理盐水灌胃 28 d;(2)模型组:造模 4 周后予生理盐水灌胃 28 d;(3)阳性对照组:造模 4 周后予氯沙坦钾 5 mg/kg 灌胃 28 d;(4)真武汤低剂量组:造模 4 周后予真武汤生药量 6 g/kg 灌胃 28 d;(5)真武汤中剂量组:造模 4 周后予真武汤生药量 12 g/kg 灌胃 28 d;(6)真武汤高剂量组:造模 4 周后予真武汤生药量 18 g/kg 灌胃 28 d。观察各组大鼠造模前后心电图、彩超变化、心肌细胞凋亡、心肌形态学变化、心肌组织 PI3K、AKT1、p-AKT1 蛋白水平变化、免疫组化 Bax、Bcl-2、Caspase3、8、9 变化及腹主动脉血 BNP 变化。**结果** (1)心电图显示经过冠脉结扎心衰模型制备大鼠心电图 ST 段抬高,提示造模成功;(2)心衰大鼠左心质量指数、BNP 水平显著升高,彩超提示 LVEF、LVFS 均明显下降,其余各组左心质量指数、BNP 水平、LVEF、LVFS 均有改善($P<0.01$);(3)HE 染色提示模型组心肌纤维排列紊乱、断裂,同时并伴随着心肌细胞肿胀、肥大,有炎性细胞浸润,其余各组存在不同程度的缓解。TUNEL 染色提示模型组凋亡现象严重,经真武汤及阳性药干预后凋亡现象减轻;(4)免疫组化结果提示与模型组相比,各给药组大鼠 Bcl-2 升高,Bax、Caspase3、8、9 下降,其中真武汤中剂量组各蛋白表达与假手术无明显差异;(5)与假手术组相比,模型组 PI3K、p-AKT1、AKT1 表达均升高,真武汤可抑制 PI3K、p-AKT1、AKT1 蛋白量的表达($P<0.05$)。**结论** 真武汤可能通过调控 PI3K-AKT 通路减轻 HF 大鼠心肌细胞凋亡及心肌病理改变,增强 HF 大鼠心肌收缩力,进而延缓大鼠心衰进程。

【关键词】 心力衰竭;真武汤;心肌凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0027-07

Effect of Zhenwu decoction on cardiomyocyte apoptosis and the PI3K-AKT pathway in rats with congestive heart failure

WANG Xing¹, CHEN Ziqi¹, LI Lin^{2*}, LIAO Jinhua¹, WANG Xiaolin¹, LIU Jiangyuan¹, LIAO Donghua^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China.

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【基金项目】 国家自然科学基金(81960820);江西省自然科学基金(20202BABL206141);“全国中医药创新骨干人才”培养项目;江西省研究生创新专项资金项目(YC2020-S386)。

【作者简介】 王兴(1994—),男,湖南衡阳,在读硕士研究生,研究方向:心衰病的中医现代化治疗研究。E-mail:378293663@qq.com

【通信作者】 廖东华(1972—),男,副教授,硕士研究生导师,研究方向:从事中医药项目管理与人才培养研究。E-mail:605536398@qq.com

李林(1982—),男,主任中医师,硕/博士研究生导师,研究方向:心衰病的中医现代化治疗研究。E-mail:lilin330000@126.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To observe the therapeutic effect of Zhenwu decoction on myocardial pathomorphology and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure induced by coronary artery ligation, and to explore its effect on apoptosis-related proteins and the PI3K-AKT signaling pathway. **Methods** At 4 weeks after the operation, surviving rats were randomly divided into six groups with seven rats in each group as follows. (1) Sham operation group: normal saline was administered intragastrically for 28 days at 4 weeks after the operation. (2) model group: normal saline was administered intragastrically for 28 days after 4 weeks. (3) positive control group: 5 mg/kg losartan potassium was administered for 28 days after 4 weeks. (4) Zhenwu decoction low dose group: after 4 weeks, 6 g/kg Zhenwu decoction crude drug was administered for 28 days. (5) Zhenwu decoction middle dose group: 12 g/kg Zhenwu decoction crude drug was administered intragastrically for 28 days after 4 weeks. (6) Zhenwu decoction high dose group: 18 g/kg Zhenwu decoction crude drug was administered intragastrically for 28 days after 4 weeks. Changes in the electrocardiogram, color ultrasound, cardiomyocyte apoptosis, myocardial morphology, PI3K, AKT1 and p-AKT1 protein levels in myocardial tissue, immunohistochemical changes of Bax, Bcl-2, caspase 3, 8, 9 and BNP in the abdominal aorta were observed before and after modeling. **Results** (1) The ST segment of the heart failure model was elevated after coronary artery ligation, indicating that model establishment was successful. (2) The left ventricular mass index and BNP level of heart failure rats were increased significantly, and LVEF and LVFS were decreased significantly, whereas the left the ventricular mass index, BNP level, LVEF and LVFS were improved in the other groups. (3) Myocardial fibers in the model group were disordered and broken accompanied by cardiomyocyte swelling, hypertrophy. and inflammatory cell infiltration, which were relieved to various degrees in the other groups. Apoptosis in the model group was significant, which was alleviated after by Zhenwu decoction and positive control group drugs. (4) Compared with the model group, Bcl-2 was increased, and Bax and Caspase 3, 8, 9 were decreased in each treatment group. There was no significant difference in protein expression between Zhenwu decoction middle dose and sham operation groups. (5) Compared with the sham operation group, PI3K, p-AKT1 and AKT1 expression in the model group was increased, and Zhenwu decoction suppressed protein expression of PI3K, p-AKT1 and AKT1. **Conclusions** Zhenwu decoction reduces cardiomyocyte apoptosis and myocardial pathological changes in HF rats by regulating the PI3K-AKT pathway, enhancing myocardial contractility, and delaying the progression of heart failure.

【Keywords】 heart failure; Zhenwu decoction; myocardial apoptosis

心力衰竭(heart failure, HF)是多种原因导致心脏结构和/或功能的异常改变,使心室收缩和/或舒张功能发生障碍,从而引起的一组复杂临床综合征,是各种心脏疾病的严重表现和晚期阶段,是心脏病患者死亡的主要原因。目前我国约有 850 万 HF 患者,患病率逐年上升,再住院率日趋上涨,死亡率居高不下^[1-2]。中医学认为温阳益气,化痰利水为治疗此病的主要法则^[3],真武汤源于《伤寒论》,由附子、生姜、白芍、白术、茯苓组成,为温阳利水,标本兼治的代表性方剂,临床应用广泛。为了进一步探究真武汤治疗 HF 的机制,本研究通过构建冠脉结扎心衰大鼠模型,观察真武汤对冠脉结扎心衰大鼠模型的治疗作用及对心衰大鼠心肌病理形态学及心肌细胞凋亡的影响,探讨其对凋亡相关蛋白及 PI3K-AKT 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6~7 周龄,SPF 级 SD 大鼠,雄性,共 48 只,体重

220~250 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],动物饲养于江西中医药大学实验动物科技中心[SYXK(赣)2017-0004],将它们安置在恒定的室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 3)%。12 h/12 h 昼夜循环,动物自由进食饮水。实验动物使用经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(JZLLSC20210059),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

真武汤颗粒剂(组成:附子,白芍,白术,茯苓,生姜,江西中医药大学附属医院提供,全方生药量 62 g);氯沙坦钾片(浙江华海药业股份有限公司,0000005951)。

PI3 Kinase p110 α (C73F8) Rabbit mAb(美国 CST 公司, #4249); Anti-AKT1 antibody [ST48-09](杭州华安生物, ET1609-47); Phospho-Akt1 (S124) antibody(杭州华安生物, ET1701-36); Bcl-2 抗体(abcam, ab32124); Caspase3 抗体(abcam, ab13847); Bax 抗体(abcam, ab32503); Caspase8 抗

体(华安生物, RT1099); Caspase9 抗体(abcam, ab184786);二抗 goat anti-rabbit IgG-HRP(爱必信生物, abs20040); ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司, MM-0067R1); DAB 浓缩型试剂盒(北京索莱宝, DA1010); Tunel 试剂盒(Roche 公司, 11684817910)。

正置显微镜(徕卡显微系统有限公司); 恒温烘箱(上海一恒科学仪器有限公司); 石蜡切片机(徕克公司); 摊片机(徕克公司); 冰冻切片机(thermo); 脱水机(武汉俊杰电子有限公司); 包埋机(武汉俊杰电子有限公司); Western blot 系统(美国 Bio-Rad); Bio-Rad 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad); 高通量组织研磨器(宁波新芝生物); 离心机(湖南湘仪); 酶标仪(BioTek 仪器); DW3000 型小动物人工呼吸机(安徽正华仪器设备有限公司); MD3000 型生理信号采集系统(淮北正华仪器设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模方法

造模方法参考文献^[4], 实验前禁食 12 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 进行麻醉后将其固定在鼠板上, 行经口气管插管术后接小动物呼吸机, 调频率为 80 次/分, 吸呼比 1:2, 潮气量 4.5 L。连接心电图机, 测量术前心电图。沿着胸骨左缘约 3 mm 纵行剪开胸部皮肤 4 cm, 逐层钝性分离皮下、肌肉, 暴露肋骨及肋间肌, 在第三肋间剪开肋间肌, 利用自制的开胸器撑开肋骨, 开胸后撕破心包膜, 暴露心脏, 于肺动脉圆锥及左心耳交界处下方 2 mm 处用 6-0 缝线结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending artery, LAD), 结扎后关胸, 逐层缝合肌肉皮肤, 测量术后心电图, 心电图提示 ST 段升高则造模成功。测量心电图后拔出气管插管, 术后每天每千克予青霉素 24 万单位, 共 5 d, 预防感染。假手术组大鼠开胸后立即缝合。

1.3.2 实验分组

术后 4 周采用随机数字表法将存活的大鼠分为 6 组, 每组 7 只, 分组如下: (1) 假手术组: 术后 4 周给予生理盐水灌胃 28 d; (2) 模型组: 造模 4 周后予生理盐水灌胃 28 d; (3) 阳性对照组: 造模 4 周后予氯沙坦钾 5 mg/kg 灌胃 28 d; (4) 真武汤低剂量组: 造模 4 周后予真武汤生药量 6 g/kg 灌胃 28 d; (5) 真武汤中剂量组: 造模 4 周后予真武汤生药量 12 g/kg 灌胃 28 d; (6) 真武汤高剂量组: 造模 4 周后予真

武汤生药量 18 g/kg 灌胃 28 d。

1.3.3 心脏彩超测定

本实验小动物超声影像系统 Vevo2100 型由江西中医药大学动物科技中心实验室提供。用异氟烷吸入麻醉, 应用 MS250 超声探头进行心脏超声影像分析。测量射血分数(LVEF); 短轴缩短率(LVFS%)。

1.3.4 样本制备及计算左心室质量指数(LVMI)

取材前称体重, 大鼠麻醉后, 于腹主动脉取血, 静置离心后分离血清, 置于-80℃冰箱以备 ELISA 检测。开胸取心脏, 冰生理盐水洗净, 滤纸吸干, 沿房室沟剪掉两心房, 剪掉主、肺动脉, 紧贴室间隔右侧剪下右心室游离壁, 剩余部分即为左心室。称取左心室质量腹主动脉取血分离血清, 计算左心室质量/体重, 即 LVMI。在结扎部位以下处经横断面切取心肌组织置于 4% 多聚甲醛固定。剩余左室心肌梗死边缘组织放入冻存管内, 置于液氮中冷冻保存以备蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。LVMI = 大鼠左心室质量/大鼠体重。

1.3.5 心脏组织 HE 染色

心肌组织固定后常规包埋切片, 脱蜡, 常规 HE 染色, 封片, 显微镜下观察病理改变。

1.3.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡水平

将蜡块切成厚度为 5 μm 的切片, 脱蜡后进行 TUNEL 染色。中性树胶封片, 显微镜下观察切片中心肌细胞的凋亡水平。

1.3.7 免疫组织化学染色法:

免疫组化染色步骤参照试剂盒说明书进行。检测心肌凋亡代表性蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase3、Caspase8、Caspase9, 显微镜 400 倍视野下随机采取 5 个视野, 应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行结果分析。

1.3.8 ELISA 测定

按照说明书操作步骤进行检测大鼠血清中 BNP 的含量。

1.3.9 Western blot 检测蛋白表达

取 20 μg 各组左室心肌匀浆蛋白样品, 用 SDS-PAGE 分离, 然后转至 PVDF 膜上, 于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h; 将 PVDF 膜与相应的一抗在 4℃ 下孵育过夜, 洗膜后二抗孵育(37℃, 1 h), 再次洗膜后发光并使用 Image Lab 软件分析结果。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参照蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件, 进行多组间比较

用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计,组间两两比较用方差分析后的 LSD 检验。实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。实验图采用 GraphPad Prism8 软件绘制。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及心电图表现

大鼠造模后心电图可见明显 ST 段抬高,提示造模成功(图 1)。术后喂养 4 周,模型组大鼠可见精神萎靡、活动量减少、四肢及尾部稍有浮肿,各给药组和模型对照组比较精神状态较好,活动较自如,四肢及尾部浮肿减轻。

2.2 对大鼠心脏形态学指标的影响

如表 1 所示,与假手术组相比,模型组大鼠 LVMI 值显著升高($P<0.01$),提示模型组出现明显的左室肥厚。LVEF 值和 LVFS 值显著下降($P<0.01$),侧面证明大鼠造模成功。与模型组比较,各给药组 LVMI 值均显著降低($P<0.01$),其中中药中剂量组效果最优,且优于阳性药组;各给药组 LVEF

值、LVFS 值均较模型组升高,其中中药中剂量组显著升高($P<0.01$),中药低、高剂量组升高明显($P<0.05$),阳性药组无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠彩超图见图 2。

2.3 对大鼠 HE 染色的影响

相较于假手术组,模型组心肌纤维排列紊乱、断裂,同时并伴随着心肌细胞肿胀、肥大,有炎性细胞浸润,与模型组比较,真武汤低、中、高剂量组及阳性药组心肌细胞肿胀、炎性细胞浸润存在不同程度的减轻,心肌纤维排列较模型组整齐(图 3)。

2.4 TUNEL 染色观察各组大鼠心肌组织中心肌细胞凋亡水平比较

如图 4 所示,可见凋亡细胞核被染成棕黄色,正常细胞核呈蓝色。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中形态不规则,大小不一致的心肌细胞核明显增多,提示心肌细胞凋亡情况严重,与模型组比较,真武汤低、中、高及阳性药对照组形态和大小正常的蓝色细胞核明显增多,提示经真武汤或氯沙坦钾干预后凋亡现象改善。

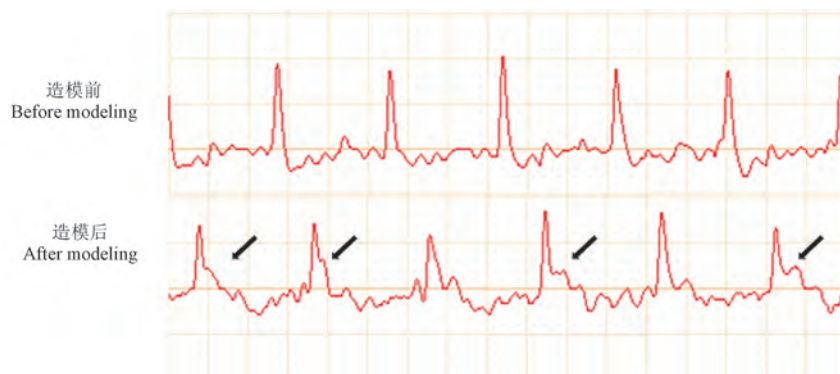


图 1 大鼠心电图

Figure 1 Rat ECG

表 1 心脏形态学指标

Table 1 Cardiac morphological indexes

分组 Groups	LVMI (g/kg)	LVEF (%)	LVFS (%)
假手术组 Sham operation group	1.4850 $\pm$ 0.1450**	78.11 $\pm$ 3.46**	48.09 $\pm$ 3.54**
模型组 Model group	2.0135 $\pm$ 0.1808 ^{##}	40.81 $\pm$ 7.84 ^{##}	21.15 $\pm$ 4.51 ^{##}
阳性对照组 Positive control group	1.7580 $\pm$ 0.1947** ^{##}	45.10 $\pm$ 6.80 ^{##}	23.60 $\pm$ 4.19 ^{##}
低剂量中药组 Low dose Chinese medicine group	1.8019 $\pm$ 0.1795** ^{##}	50.55 $\pm$ 12.23* ^{##}	27.39 $\pm$ 7.79* ^{##}
中剂量中药组 Medium dose Chinese medicine group	1.7395 $\pm$ 0.0607** ^{##}	55.61 $\pm$ 9.47** ^{##}	30.63 $\pm$ 6.37** ^{##}
高剂量中药组 High dose Chinese medicine group	1.7858 $\pm$ 0.1628** ^{##}	52.32 $\pm$ 7.08* ^{##}	28.29 $\pm$ 4.73* ^{##}

注:与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与假手术组相比,^{##} $P<0.01$ 。

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

2.5 心衰心肌组织中 Bcl-2、Bax、Caspase3、Caspase8、Caspase9 表达差异

如表 2 所示,与假手术组比较,模型组 Bcl-2 表达显著下降 ($P < 0.01$), Bax、Caspase3、Caspase8、Caspase9 表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,低剂量组 Bcl-2 表达增强 ($P < 0.05$),中、高剂量组及阳性对照组增强显著 ($P <$

0.01)。真武汤低、中、高剂量组及阳性药对照组 Bax、Caspase3、Caspase8、Caspase9 蛋白表达降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其中中药中剂量组 Bcl-2、Bax、Caspase3、Caspase8、Caspase9 蛋白表达与假手术无明显差异,提示真武汤可有效抑制心衰大鼠过度凋亡,中剂量真武汤抗凋亡效果最佳。

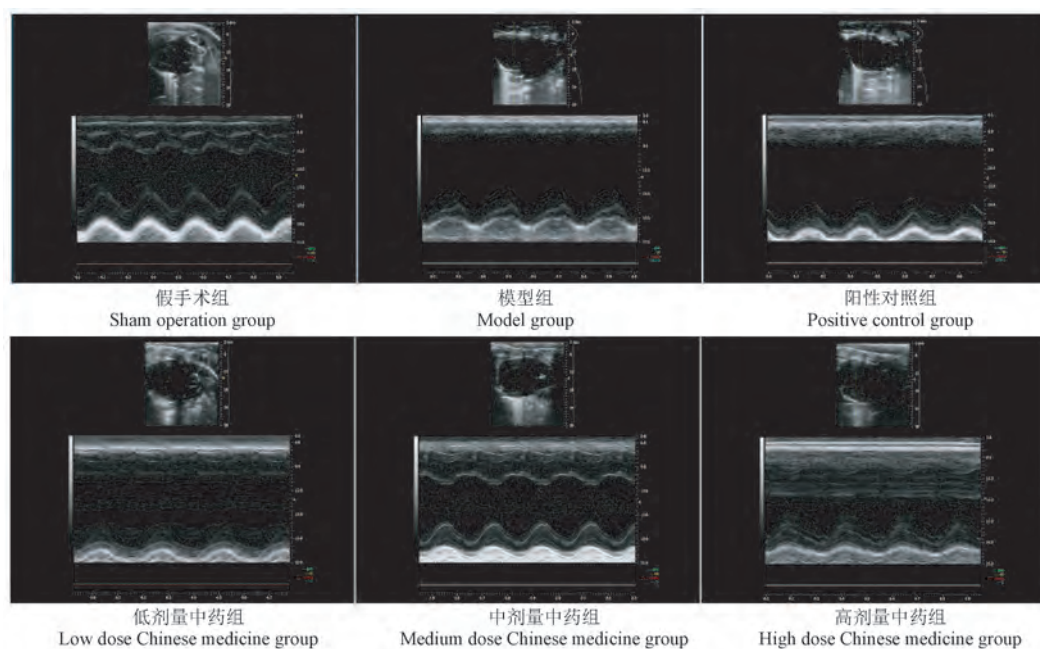


图 2 各组大鼠心脏彩超图

Figure 2 Color Doppler echocardiography of rats in each group

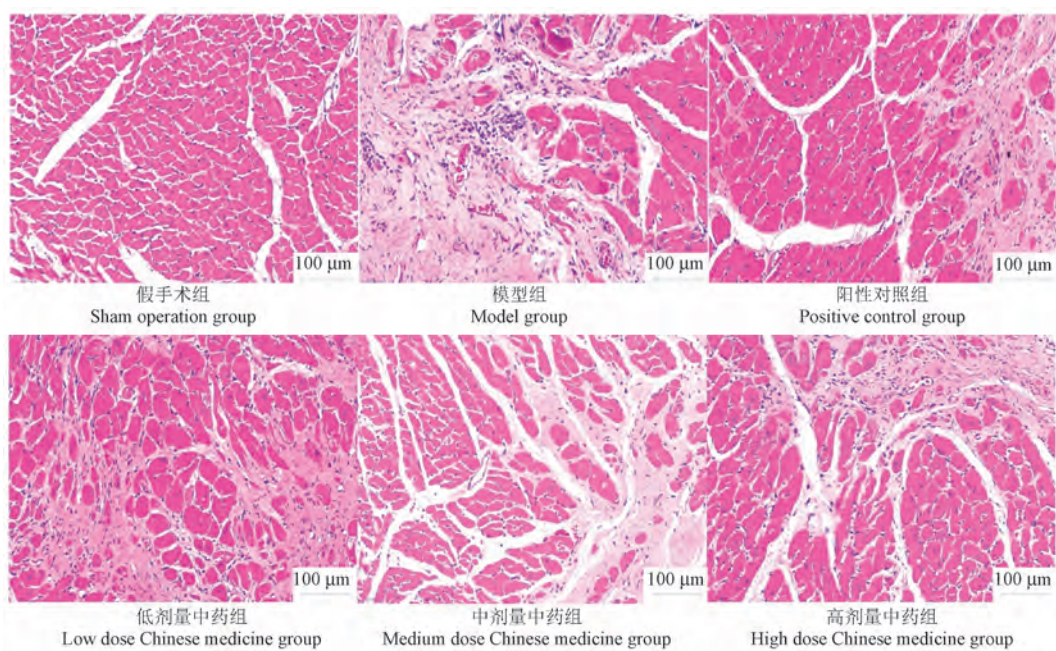


图 3 各组大鼠 HE 染色图

Figure 3 HE staining diagram of rats in each group

2.6 对大鼠 BNP 水平和 PI3K、AKT1、p-AKT1 表达的影响

相比于假手术组,模型组 BNP 水平显著升高 ($P<0.01$),其余各组较模型组不同程度下降 ($P<0.01$),中药中剂量下降最为显著 ($P<0.01$)。结果提示心衰大鼠模型造模成功,真武汤及氯沙坦均能有效降低大鼠 BNP 水平,以中剂量效果最为显著

(图 5A)。

与假手术组相比,模型组 PI3K、p-AKT1、AKT1 表达均升高,与模型组比较,真武汤低、中、高剂量组 PI3K、AKT1、p-AKT1 表达均下降,差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且真武汤各剂量组 PI3K、p-AKT1、AKT1 表达水平与假手术组无明显差异 ($P>0.05$) (图 5B~5E)。

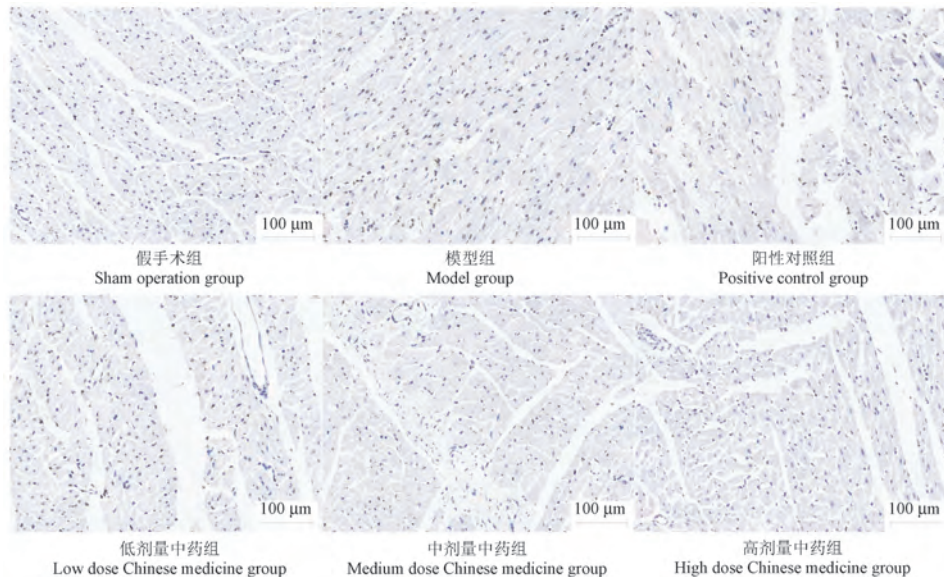
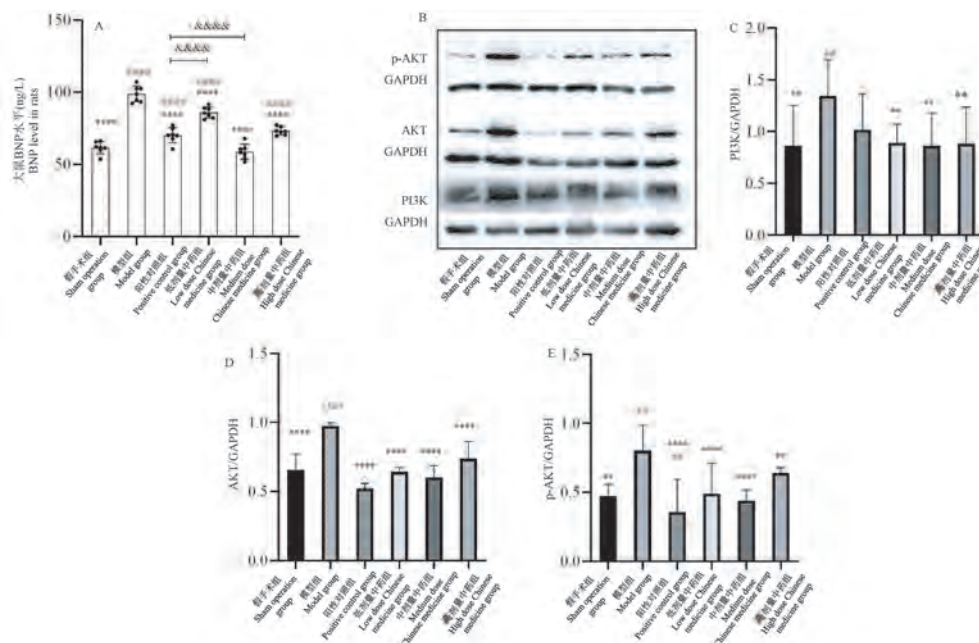


图 4 各组大鼠 TUNEL 染色

Figure 4 TUNEL staining of rats in each group



注:与假手术组相比, $^{###}P<0.05$, $^{####}P<0.01$;与模型组相比, $^{**}P<0.05$, $^{****}P<0.01$;与阳性对照组相比, $^{&&}P<0.05$, $^{&&&&}P<0.01$ 。

图 5 各组大鼠 BNP 水平和 Western blot 结果

Note. Compared with the sham operation group, $^{###}P<0.05$, $^{####}P<0.01$. Compared with the model group, $^{**}P<0.05$, $^{****}P<0.01$. Compared with the positive control group, $^{&&}P<0.05$, $^{&&&&}P<0.01$.

Figure 5 BNP level and Western blot results of rats in each group

表 2 免疫组化分析结果 (IOD/area)
Table 2 Results of immunohistochemical analysis (IOD/area)

分组 Groups	Bcl-2	Bax	Caspase3	Caspase8	Caspase9
假手术组 Sham operation group	0.258±0.047 **	0.080±0.028 **	0.107±0.043 **	0.068±0.032 **	0.082±0.040 **
模型组 Model group	0.161±0.072 ##	0.235±0.054 ##	0.216±0.062 ##	0.196±0.049 ##	0.201±0.588 ##
阳性对照组 Positive control group	0.237±0.059 ** #	0.129±0.052 ** ##	0.165±0.041 * ##	0.101±0.026 ** #	0.105±0.042 **
低剂量中药组 Low dose Chinese medicine group	0.207±0.032 * #	0.157±0.037 ** ##	0.145±0.058 ** #	0.100±0.048 ** #	0.108±0.034 **
中剂量中药组 Medium dose Chinese medicine group	0.239±0.063 **	0.107±0.049 **	0.111±0.588 **	0.072±0.039 **	0.094±0.040 **
高剂量中药组 High dose Chinese medicine group	0.214±0.062 ** #	0.124±0.036 ** ##	0.167±0.631 * ##	0.087±0.039 **	0.115±0.263 ** #

注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与假手术组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

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

3 讨论

从中医学角度讨论,心衰多见本虚重而标实亦重、虚实夹杂,互相裹挟之症,以心气心阳虚惫为本,水饮、瘀血、痰浊乃标实之候^[5]。心气心阳虚衰,推动和温煦的功能疲惫,进而导致血瘀的病理状态,瘀血阻滞,血不利则为水,随着病情迁延,虚实互为因果,水饮、痰浊、瘀血为盛,阴胜则阳病,继而加重心阳之虚衰,心脏之虚累及五脏,致使心、肾、脾阳衰惫,无力行水化气,而致水饮内停,饮停于内,或射肺,或凌心,或溢于肌肤,临床所见则为喘、为悸、为肿^[5-7]。故而心衰病证的病机关键是阳虚水泛,温阳益气,化痰利水为治疗此病的主要法则^[8-9]。

真武汤为温阳利水代表方,临床研究已证实,真武汤治疗 HF 通过改善心脏射血分数 (LVEF)、每搏输出量 (SV)、心搏量指数 (SVI)、心脏指数 (CI) 等从而减轻临床症状^[10-11]。

本研究选用结扎大鼠冠状动脉左前降支法构建 HF 模型,此方法与临床上由冠状动脉阻塞所引起的心肌梗死的病理特征相符,是较理想的构建 HF 动物模型的方法,也是目前研究 HF 常用的动物模型之一^[12-13]。在模型组中,大鼠出现明显的左室肥厚, LVEF<50%, HF 标志物 BNP 水平明显上升 ($P<0.01$),判断心衰模型建立成功^[1,14]。

实验结果表明,真武汤能明显改善 HF 大鼠 LVEF、LVFS、LVMI,增强 HF 大鼠心肌收缩力,缓解 HF 大鼠左室肥厚程度。病理结果显示心衰大鼠心肌细胞明显肿胀、肥大及炎性细胞浸润,改善 HF 大鼠心肌纤维化,并能有效降低心衰大鼠血清 BNP 水

平,抑制心衰大鼠心肌细胞过度凋亡。在真武汤各剂量组比较中,真武汤中剂量组各方面表现均优于低、高剂量组。另外,有研究指出真武汤方中君药附子的毒效网络具有极高的相似性,其强心作用也是其心脏毒性的原因^[15]。以上提示真武汤干预 HF 可能在某一剂量区域内存在正向的量效关系,且与方中附子的剂量有关。

心肌细胞凋亡是心肌细胞丢失的主要原因,在心室重塑和随后的 HF 过程中起着关键作用。细胞的凋亡主要包括死亡受体介导和线粒体介导两种途径,死亡受体介导途径通过形成死亡诱导信号复合物 (DISC) 激活 Caspase8,进而发生级联反应活化 Caspase3 等导致凋亡事件。线粒体介导途径通过影响线粒体膜通透性,促使线粒体内凋亡启动因子释放至胞质形成凋亡复合体 (apoptosome),激活 Caspase9,进而通过级联反应激活 Caspase3 等发生凋亡。Caspase8 和 Caspase9 的激活是这两种途径最关键的过程^[16]。Bcl-2 家族的抗凋亡和促凋亡成员与线粒体凋亡通路密切相关。Bcl-2 和 Bax 是一组典型的抗凋亡蛋白和促凋亡分子,它们作用于线粒体外膜,导致凋亡启动因子的释放^[17]。PI3K/AKT 信号通路是参与细胞增殖调控的重要通路,过往研究认为短期激活 PI3K/AKT 可抑制细胞凋亡因子,增强血管生成,调节 Ca^{2+} 内流,促进心肌细胞能量的代谢以及抑制炎症反应的进行等过程促进生理性肥厚,保护心肌免受损伤,而长期激活则可引起病理性肥厚和心力衰竭^[18]。

本研究发现 HF 大鼠 PI3K、p-AKT1、AKT1 表达显著升高,同时伴有 Bax、Caspase3、Caspase8、

(下转第 57 页)

吴文棋,庄旭辉,王姝晨,等. PD98059 抑制哮喘中 TGF- β 1 诱导的人支气管上皮细胞上皮间质转化进程 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 34-40.

Wu WQ, Zhuang XH, Wang SC, et al. PD98059 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial cells in asthma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 34-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.005

PD98059 抑制哮喘中 TGF- β 1 诱导的人支气管上皮细胞上皮间质转化进程

吴文棋^{1,2}, 庄旭辉^{1,3}, 王姝晨^{1,3}, 李静静^{1,4}, 王霞^{1,3}, 王勇³, 马武华^{3*}

(1.广州中医药大学, 广州 510006; 2.中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科, 广州 510000;
3.广州中医药大学第一附属医院麻醉科, 广州 510006; 4.晋城市人民医院麻醉科, 山西 晋城 048000)

【摘要】 目的 探究 PD98059 对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导人支气管上皮细胞 BEAS-2B 上皮间质转化 (EMT) 进程的影响及可能的分子机制。**方法** 本研究采用人支气管上皮细胞 (BEAS-2B), 使用 TGF- β 1 诱导 BEAS-2B 上皮间质转化模型, 使用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 探究抑制 ERK/MAPK 信号转导是否影响 EMT 进程。通过免疫荧光检测 BEAS-2B 气道重塑模型 α -SMA 蛋白的表达及定位; CCK-8 法检测各组细胞存活率; Edu 实验检测各组细胞增殖能力水平; transwell 实验检测各组细胞迁移能力水平; Western blot 检测各组 EMT 标志蛋白表达及 ERK/MAPK 通路的激活情况。**结果** 与正常组相比, 模型组 α -SMA 表达增加, α -SMA 在 BEAS-2B 细胞胞质上表达。PD98059 在 40 μ mol/L 浓度与 5 ng/mL TGF- β 1 共处理抑制 BEAS-2B 细胞生长 ($P < 0.05$)。与三组 Edu 阳性率无显著差异 ($P > 0.05$)。与正常组相比, 模型组迁移细胞数增加 ($P < 0.05$), 上皮间质化标志蛋白表达增加 ($P < 0.05$), p-ERK 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), PD98059 可以明显减少迁移细胞数 ($P < 0.05$), 抑制上皮间质化标志蛋白的表达 ($P < 0.05$) 及 ERK 通路的激活 ($P < 0.05$)。**结论** TGF- β 1 可能通过 ERK/MAPK 通路促进人支气管上皮细胞上皮间质转化进程, PD98059 可以通过抑制 ERK/MAPK 通路的激活抑制支气管上皮细胞 EMT 进程。

【关键词】 哮喘; PD98059; ERK/MAPK; 上皮间质转化; 气道重塑

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0034-07

PD98059 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of human bronchial epithelial cells in asthma

WU Wenqi^{1,2}, ZHUANG Xuhui^{1,3}, WANG Shuchen^{1,3}, LI Jingjing^{1,4}, WANG Xia^{1,3}, WANG Yong³, MA Wuhua^{3*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China. 2. Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000. 3. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006.
4. Jincheng Department of Anesthesiology, Municipal People's Hospital, Jincheng 048000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of PD98059 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced human bronchial epithelial cells BEAS-2B and the possible molecular mechanism. **Methods** Human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were used for the BEAS-2B EMT model established

【基金项目】 国家自然科学基金 (81673922, 82074357)。

【作者简介】 吴文棋 (1996—), 男, 硕士, 研究方向: 针刺治疗哮喘的机制。E-mail: vinciuwork@outlook.com

【通信作者】 马武华 (1967—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 针刺治疗哮喘的机制。E-mail: gzmwh@aliyun.com

with TGF- β 1, and the ERK1/2 inhibitor PD98059 was used to explore whether inhibition of ERK/MAPK signal transduction affects the EMT process. Immunofluorescence was used to detect the expression and location of α -SMA protein in the BEAS-2B airway remodeling model. CCK-8 assays were used to assess the cell survival rate. An Edu proliferation assay was used to assess cell proliferation. Transwell assays were used to assess cell migration. Western blot was used to detect the expression of EMT marker proteins and activation of the ERK/MAPK pathway. **Results** Compared with the control group, α -SMA expression in the model group was increased, and α -SMA was expressed in the cytoplasm of BEAS-2B cells. Cotreatment with 40 μ mol/L PD98059 and 5 ng/mL TGF- β 1 inhibited BEAS-2B cell growth ($P < 0.05$). There was no significant difference in Edu-positive cells among the three groups ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the number of migrating cells ($P < 0.05$), expression of EMT marker proteins ($P < 0.05$), and expression of p-ERK protein were increased in the model group ($P < 0.05$). PD98059 significantly reduced the number of migrating cells ($P < 0.05$) and inhibited the expression of EMT marker proteins ($P < 0.05$) and activation of the ERK pathway ($P < 0.05$).

Conclusions TGF- β 1 promotes the EMT of human bronchial epithelial cells via the ERK/MAPK pathway. PD98059 inhibits EMT of bronchial epithelial cells by suppressing activation of the ERK/MAPK pathway.

【Keywords】 asthma; PD98059; ERK/MAPK; epithelial-mesenchymal transition; airway remodeling

支气管哮喘(bronchial asthma)是在儿童及成人中最常见的慢性非传染性疾病之一,据统计全球共有 3.34 亿哮喘患者^[1]。流行病学显示我国成人及儿童哮喘发病率均呈逐年上升趋势,给医疗系统和社会都造成了巨大负担^[2]。气道重塑(airway remodeling)是慢性哮喘的重要病理特征,是导致哮喘患者持续气道阻塞,糖皮质激素等治疗不敏感的重要因素^[3-4]。已有大量研究证实,在支气管哮喘患者中,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在气道重塑的发展进程中起关键作用^[5-6]。因此,寻找有效的干预目标及靶标分子来抑制支气管上皮细胞 EMT 进程,以改善气道重塑并提高糖皮质激素类药物的敏感性,对改善支气管哮喘患者疾病转归及生活质量至关重要。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路包含 3 种不同的级联通路,这些级联根据其 MAPK 关键蛋白命名,包括细胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinases, ERK)、Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)、和 p38-MAPK。据报道,ERK/MAPK 通路与细胞增殖、分化、迁移、衰老和凋亡有关^[7]。有研究报道 ERK/MAPK 作为关键信号转导通路参与各类纤维化疾病中的 EMT 进程^[8-9]。本研究旨在验证 ERK/MAPK 信号转导在哮喘气道重塑模型/支气管上皮细胞 EMT 进程中的激活情况,并探讨 ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 对该进程的影响,为通路抑制剂的临床应用积累基础的实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人支气管上皮细胞 BEAS-2B(购于美国生物标准品资源中心)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司;重组 TGF- β 1 购于 peptotec 公司;CCK-8 试剂 MedChemExpress 公司、PD98059 购于 MedChemExpress 公司;Edu 细胞增殖试剂盒、Cy3 抗兔 IgG 购于上海碧云天生物技术有限公司;transwell 迁移板购于 Corning 公司;vimentin 一抗、 α -SMA 一抗、GAPDH 一抗购于 CST 公司;p-ERK1/2 一抗、ERK1/2 一抗购于上海艾比玛特生物医药有限公司。

Multiskan GO 酶标仪购于赛默飞公司;BG-gdsAUTO710PRO 化学发光成像系统购于北京百晶生物技术有限公司;IX73 倒置荧光显微镜显微镜购于日本奥林巴斯株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养、分组及处理

将 BEAS-2B 细胞培养于 10% FBS 和 1% 青/链霉素配置的 DMEM 高糖培养基中,培养条件 37℃、5% CO₂;重组 TGF- β 1 使用 10 mmol/L citric acid 溶解配置为 50 μ g/mL 溶液,后用细胞培养液配置为 5 ng/mL 溶液。PD98059 使用 DMSO 溶解为 40 mmol/L 溶液储存于 -20℃ 冰箱,并用细胞培养液配置为 2.5、5、10、20、40 μ mol/L 溶液。实验分组:正常组(Con 组),模型组(TGF- β 1 5 ng/mL),干预组(TGF- β 1 5 ng/mL + PD98059 2.5~40 μ mol/L)。

1.3.2 细胞免疫荧光观察细胞 α -SMA 蛋白表达定位情况

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个/孔接种于 96 孔板, 设置正常组, 模型组 (TGF- β 1 5 ng/mL), 培养 24 h 后, 对细胞进行不同的处理干预 72 h。弃去培养液, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 使用封闭液室温孵育 1 h, 加入兔抗多克隆抗体 (1:200) 过夜, Cy3 抗兔 IgG 孵育 1 h, DAPI 孵育 10 min 后在倒置荧光显微镜显微镜下采集分析图像。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活力

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个/孔接种于 96 孔板, 设置空白组、正常组 (Con 组)、模型组 (TGF- β 1 5 ng/mL), 干预组 (TGF- β 1 5 ng/mL+PD98059 2.5~40 μ mol/L, 共 5 个浓度梯度)。培养 24 h, 待细胞贴壁后更换为含 5 ng/mL TGF- β 1 及 2.5、5、10、20、40 μ mol/L PD98059 的细胞培养液, 设置 3 个复孔, 在培养箱孵育 72 h。处理结束后, 每组每孔加入 CCK-8 10 μ L, 在培养箱孵育 2 h 后在酶标仪下测 450 nm 下吸光度值, 细胞存活率 (%) = ((A 实验孔-A 空白孔)/(A 对照孔-A 空白孔)) $\times$ 100%。

1.3.4 Edu 检测细胞增殖活性

将 BEAS-2B 细胞以 3000 个细胞/孔接种于 96 孔板, 设置正常组, 模型组 (TGF- β 1 5 ng/mL), 干预组 (TGF- β 1 5 ng/mL+PD98059 10 μ mol/L), 培养 24 h 后, 参考课题组以往研究及前人研究对细胞进行不同的处理干预 72 h^[10-11]。干预结束后每组每孔加入 50 μ mol/L Edu 试剂, 根据预实验结果, 在培养箱孵育 4 h。严格按照 Edu 细胞增殖试剂盒说明书操作, 其结果由 Edu 阳性细胞 (绿色) 与 hoechst 33442 阳性细胞 (蓝色) 的比率表示细胞增殖率。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力

细胞分组及处理同 1.3.4, 将 BEAS-2B 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 对细胞进行不同的处理干预 72 h。将处理完毕的细胞用胰酶消化后, 用无血清培养基配成每毫升 7000 个细胞的细胞悬液, 加入 300 μ L 细胞悬液到 Transwell 小室, 下室加入含有 10% FBS 的 DMEM 培养液 700 μ L, 培养箱孵育 12 h 后, 将小室风干, 结晶紫染色 15 min, 在显微镜观察并随机计数 3 个视野的细胞。

1.3.6 Western blot 检测 EMT 标志蛋白及 ERK/MAPK 蛋白表达情况

细胞分组及干预同 1.3.5, 每孔加入 RIPA 裂

解液, 细胞刮刀刮取细胞, 4 $^{\circ}$ C 15000 r/min 离心。取上清液, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 5 $\times$ Loading Buffer 后煮沸使蛋白变性。配置 SDS-PAGE 凝胶。经电泳、转膜、室温下使脱脂奶粉封闭 1 h 后, 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜, 室温孵育二抗 1 h, 化学发光仪发光成像, Image J 分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。数据使用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 进行展示。各组正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验。如实验数据符合正态性分布, 检验多组数据组间差异采用单因素方差分析 (One way ANOVA)。当方差齐, 多组间两两组间比较采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 dunnett's T3 检验。P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 α -SMA 蛋白在支气管上皮细胞及气道重塑/上皮间质化细胞模型表达、定位

结果如图 1 所示, 与正常组相比, TGF- β 1 (5 ng/mL) 可使细胞 α -SMA 表达增多, 表现为细胞胞质红色荧光更亮更密。结果提示 TGF- β 1 成功诱导 BEAS-2B 细胞上皮间质转化模型。

2.2 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞存活率的影响

结果如图 2 所示, 与正常组相比, 模型组的细胞存活率没有影响 ($P>0.05$)。与模型组相比, PD98059 与在 2.5、5、10、20 μ mol/L 浓度与 TGF- β 1 共孵育处理对细胞存活率没有影响 ($P>0.05$)。而 PD98059 浓度增加到 40 μ mol/L 时, 可对 BEAS-2B 活性产生明显抑制作用 ($P<0.05$)。

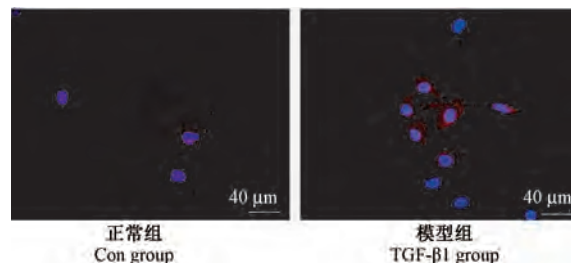


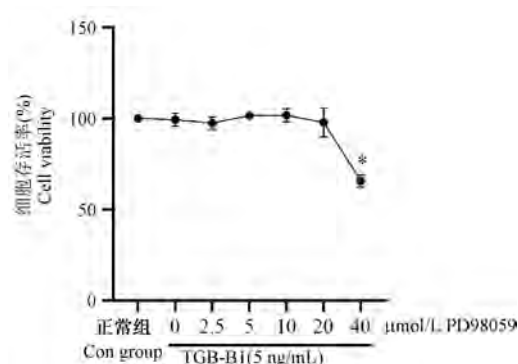
图 1 α -SMA 蛋白在支气管上皮细胞及气道重塑/上皮间质化细胞模型表达、定位

Figure 1 Expression and localization of α -SMA in bronchial epithelial cells and airway remodeling/epithelial mesenchymal cell models

表 1 各组细胞增殖能力比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of proliferation ability among groups

组别 Groups	阳性细胞率(%) Edu positive cell rate	<i>F</i>	<i>P</i>
正常组 Con group	44.42±2.42	0.314	0.742
模型组 TGF-β1 group	42.01±6.93		
干预组 TGF-β1+PD98059 group	41.43±4.29		



注:与正常组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞细胞存活率的影响

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

Figure 2 Effect of PD98059 and TGF-β1 on the survival rate of bronchial epithelial cells

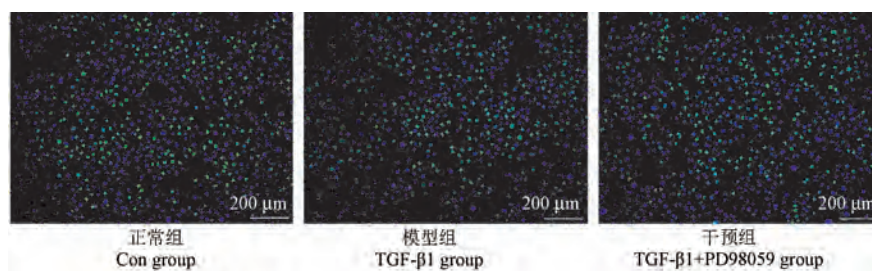


图 3 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响

Figure 3 Effect of PD98059 and TGF-β1 on the proliferation of bronchial epithelial cells

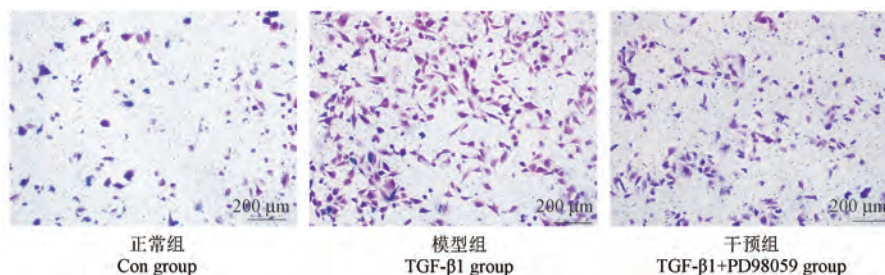


图 4 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞迁移能力的影响

Figure 4 Effect of PD98059 and TGF-β1 on the migration of bronchial epithelial cells

2.3 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响

为排除增殖对细胞迁移的结果造成的影响,使用 Edu 增殖试剂盒检测各组细胞增殖情况。结果如图 3 所示:正常组 Edu 阳性率为(44.42±2.42),模型组 Edu 阳性率为(42.01±6.93),干预组 Edu 阳性率为(41.43±4.29)。3 组间 Edu 阳性率无显著差异($P > 0.05$)。结果提示 TGF-β1 及 PD98059 对 BEAS-2B 细胞增殖无影响(表 1)。

2.4 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞增殖能力的影响

结果如图 4 所示:与正常组相比,模型组细胞迁移数明显增加($P < 0.05$),与模型组相比,PD98059 干预后 BEAS-2B 细胞迁移数明显减少($P < 0.05$)。结果表明 PD98059 能抑制 TGF-β1 诱导的细胞迁移(表 2)。

2.5 PD98059 及 TGF-β1 对支气管上皮细胞 EMT 标志蛋白和 ERK/MAPK 通路蛋白表达的影响

结果如图 5 所示:与正常组相比,模型组细胞 vimentin、α-SMA 和 p-ERK 表达升高($P < 0.05$),与模型组相比,PD98059 干预后 BEAS-2B 细胞 vimentin、α-SMA 和 p-ERK 表达下降($P < 0.05$)。结果表明 PD98059 能抑制 TGF-β1 诱导的细胞 EMT 和 ERK/MAPK 通路激活(表 3)。

表 2 各组细胞迁移能力比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of migration ability among groups

组别 Groups	迁移率 (%) Migration rate	F	P
正常组 Con group	100.00 $\pm$ 0.00		
模型组 TGF- β 1 group	231.47 $\pm$ 19.65*	91.321	<0.001
干预组 TGF- β 1+PD98059 group	157.76 $\pm$ 6.46 [#]		

注:与正常组相比, * P <0.05;与模型组相比, [#] P <0.05。

Note. Compared with Con group, * P <0.05. Compare with TGF- β 1 group, [#] P <0.05.

表 3 各组细胞蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of protein expression level among groups

组别 Groups	Vimentin	α -SMA	p-ERK
正常组 Con group	0.47 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.15	0.16 $\pm$ 0.09
模型组 TGF- β 1 group	1.09 $\pm$ 0.08*	1.36 $\pm$ 0.05*	0.64 $\pm$ 0.10*
干预组 TGF- β 1+PD98059 group	0.85 $\pm$ 0.01 [#]	0.77 $\pm$ 0.07 [#]	0.35 $\pm$ 0.11 [#]
F	114.680	62.232	16.411
P	0.000	0.000	0.004

注:与正常组相比, * P <0.05;与模型组相比, [#] P <0.05。

Note. Compared with Con group, * P <0.05. Compare with TGF- β 1 group, [#] P <0.05.

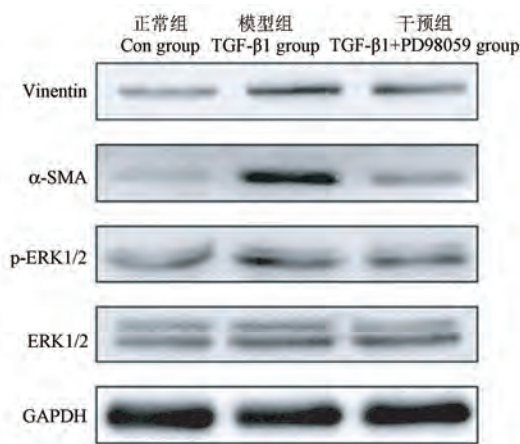


图 5 PD98059 及 TGF- β 1 对支气管上皮细胞 EMT 标志蛋白和 ERK/MAPK 通路蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of PD98059 and TGF- β 1 on the expression of EMT protein and ERK/MAPK pathway protein in bronchial epithelial cells

3 讨论

本研究以 TGF- β 1 诱导人支气管上皮细胞 EMT 模型,检测 TGF- β 1 干预及 TGF- β 1 及 PD98059 联

合干预 BEAS-2B 细胞的细胞活力、增殖能力、迁移能力及 EMT 进程标志蛋白表达情况。

本研究参考 Doerner 等^[10]报道建立 TGF- β 1 诱导支气管上皮细胞 BEAS-2B 上皮间质转化模型,模拟临床患者哮喘气道重塑的情况。观察到 BEAS-2B 细胞 α -SMA 蛋白、vimentin 蛋白表达增多,细胞迁移能力增加而且不影响细胞增殖,提示细胞造模成功。在 TGF- β 1 造模后,加入 ERK/MAPK 通路抑制剂 PD98059 作为干预组,在文献报道中,PD98059 在 BEAS-2B 上的干预剂量从 10 ~ 30 μ mol/L 不等^[12-14],且 Tian 等^[13]报道 PD98059 在 30 μ mol/L 时已经对细胞活力产生抑制作用。因此,本研究设置浓度梯度检测 PD98059 对 BEAS-2B 细胞活性的影响。结果发现 PD98059 浓度增加到 40 μ mol/L 时,可对 BEAS-2B 活性产生明显抑制作用。为控制 PD98059 对细胞活性抑制而可能带来的影响,PD98059 采用 10 μ mol/L 浓度用作后续实验。

上皮间质转化是一种生物学过程,上皮细胞通过转变为间质细胞,失去细胞间的紧密连接,获得的迁移能力和分泌细胞外基质的能力,伴随着 E-cadherin 的减少以及间质细胞来源蛋白:vimentin 和 α -SMA 等的增加^[15]。其中 α -SMA 负责构成间质细胞纤维的主要成分,参与细胞骨架的重塑^[16]。近年来,随着对上皮间质转化研究的不断深入,由 TGF- β 1 诱导的上皮间质转化在哮喘患者气道重塑中的作用愈发受到关注^[17-18]。TGF- β 1 作为在炎症和细胞外基质调节因素中的核心因子,已被证实与哮喘炎症与重塑起关键作用^[19]。

气道重塑作为慢性哮喘的重要病理特征,其典型变化包括上皮损伤、粘液腺增生、上皮基底膜沉积、血管生成和气管平滑肌增加^[20]。气道重塑是长期过敏源暴露及气管炎性损伤的结果^[21],是导致哮喘患者激素治疗不敏感的重要因素。因此探索气道重塑发生发展的分子机制及潜在的治疗靶点是支气管哮喘研究领域亟需解决的重难点。

在本研究中,我们发现 TGF- β 1 诱导 BEAS-2B 中 p-ERK1/2 表达明显上升,通过使用 PD98059 抑制 ERK/MAPK 可以抑制细胞迁移、 α -SMA 蛋白、vimentin 蛋白的表达,进而抑制 EMT 进程。ERK/MAPK 通路是所有 MAPK 信号转导通路中最重要信号级联通路,其中分为 ERK1~5 五个亚族,而 ERK1/2 途径是目前研究最火热的 MAPK 途径^[22]。

ERK1/2 亚族能被生长因子或者激素刺激并激活 Raf/MEK/ERK 级联通路, 最终激活下游 MAPK 信号并且发生磷酸化入核, 导致相应的基因转录^[23]。最近的研究发现抑制 ERK/MAPK 通路可以在癌症、纤维化等疾病中发挥治疗作用。此外, 考虑到 ERK/MAPK 通路参与细胞增殖生长过程^[24], 因此本研究筛选出对细胞活力与增殖能力无影响的药物浓度参与 Transwell 实验, 证明了 PD98059 抑制 TGF- β 1 诱导的迁移细胞数增多与抑制细胞增殖无关, PD98059 通过抑制 BEAS-2B 迁移能力导致迁移细胞数的减少。本研究结果提示 ERK 通路在支气管上皮细胞 EMT 中发挥重要作用, 通过抑制 ERK/MAPK 通路介导的 EMT 可能成为治疗支气管哮喘患者的一个潜在的靶点。与之类似的是, 张爱芝等^[25]研究发现激活大鼠平滑肌细胞可以有效促进 cyclinD1 和气道重塑。Zha 等^[26]报道 PD98059 可以通过抑制肾小管上皮细胞的 EMT 进程, 减轻肾纤维化。以上研究与本研究结果一致, 说明了 PD98059 通过抑制 EMT 进程在治疗哮喘气道重塑中的潜在价值。

本研究的不足之处在于我们的实验仅在 ERK/MAPK 通路上对 TGF- β 1 诱导的支气管上皮细胞 EMT 进行研究与分析, 但事实上, MAPK 通路中 P38 通路及 JNK 通路也参与了该过程^[5]。我们计划在未来拓展研究, 试图更加充分的认识气道重塑中 EMT 的发展进程。

综上所述, 本研究发现 TGF- β 1 可能通过 ERK/MAPK 通路促进人支气管上皮细胞上皮间质转化进程, PD98059 可以通过抑制 ERK/MAPK 通路的激活抑制支气管上皮细胞 EMT 进程。

参考文献:

- [1] Papi A, Brightling C, Pedersen SE, et al. Asthma [J]. Lancet, 2018, 391(10122): 783-800.
- [2] 农英, 林江涛, 王文巧, 等. 我国城区支气管哮喘患者疾病认知与控制水平关系的多中心调查 [J]. 中华医学杂志, 2017, 97(18): 1425-1429.
- [3] 何婷, 钱佩瑶, 洪敏, 等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 117-123.
- [4] Morimoto Y, Hirahara K, Kiuchi M, et al. Amphiregulin-producing pathogenic memory T helper 2 cells instruct eosinophils to secrete osteopontin and facilitate airway fibrosis [J]. Immunity, 2018, 49(1): 134-150.
- [5] Song Y, Wang Z, Jiang J, et al. DEK-targeting aptamer DTA-64 attenuates bronchial EMT-mediated airway remodelling by suppressing TGF- β 1/Smad, MAPK and PI3K signalling pathway in asthma [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 13739-13750.
- [6] 朱晓华, 李秋根. 哮喘气道重塑中上皮间质转化及其分子调控 [J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(5): 566-570.
- [7] Sun Y, Liu WZ, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2015, 35(6): 600-604.
- [8] Geng XQ, Ma A, He JZ, et al. Ganoderic acid hinders renal fibrosis via suppressing the TGF- β /Smad and MAPK signaling pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(5): 670-677.
- [9] 邹梦林, 胡星星, 张铭杨, 等. ERK1/2 信号通过钙蛋白酶调控结缔组织生长因子参与肺纤维化的形成 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(5): 720-724.
- [10] Doerner AM, Zuraw BL. TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids [J]. Respir Res, 2009, 10: 100.
- [11] 任晓杰. 基于 TGF- β 和 Notch 信号通路探讨针刺调控哮喘动物模型气道重塑的机制 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [12] Liu Y, Tang J, Yuan J, et al. Arsenite-induced downregulation of occludin in mouse lungs and BEAS-2B cells via the ROS/ERK/ELK1/MLCK and ROS/p38 MAPK signaling pathways [J]. Toxicol Lett, 2020, 332: 146-154.
- [13] Tian X, Xie G, Ding F, et al. LPS-induced MMP-9 expression is mediated through the MAPKs-AP-1 dependent mechanism in BEAS-2B and U937 cells [J]. Exp Lung Res, 2018, 44(4-5): 217-225.
- [14] Sivanantham A, Pattarayan D, Bethunaickan R, et al. Tannic acid protects against experimental acute lung injury through downregulation of TLR4 and MAPK [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6463-6476.
- [15] Hackett TL. Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012, 12(1): 53-59.
- [16] Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases [J]. J Pathol, 2003, 200(4): 500-503.
- [17] Tang J, Liu J, Zhang X. The role of osthole on TGF- β -induced lung epithelium apoptosis injury and epithelial-mesenchymal transition-mediated airway remodeling in pediatric asthma [J]. J Healthc Eng, 2022, 2022: 7099097.
- [18] Guo Y, Yuan X, Hong L, et al. Promotor hypomethylation mediated upregulation of miR-23b-3p targets pten to promote bronchial epithelial-mesenchymal transition in chronic asthma [J]. Front Immunol, 2021, 12: 771216.
- [19] Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, et al. Transforming

- growth factor- β 1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling [J]. *Allergy*, 2012, 67(10): 1193-1202.
- [20] Hough KP, Curtiss ML, Blain TJ, et al. Airway remodeling in asthma [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 191.
- [21] 张星东. 过敏性哮喘动物模型在致敏、哮喘发作和气道高反应性等方面的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(9): 1-7.
- [22] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [23] 刘梦琪, 张文文, 陈晓伟, 等. PD98059 抑制 MAPK/ERK 信号通路对胃癌细胞生物学功能的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2019, 31(1): 15-21.
- [24] Wang Y, Yang L, Yang Y, et al. Liver kinase B1 (LKB1) regulates proliferation and apoptosis of non-small cell lung cancer A549 cells via targeting ERK signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 65-74.
- [25] 张爱芝, 张焕萍, 蔺鹏翔. ERK 活化对哮喘大鼠气道重塑及 CyclinD1 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(3): 26-29.
- [26] Zha D, Wu S, Gao P, et al. Telmisartan attenuates uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular cells [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 3851718.
- [收稿日期] 2021-11-24

幼年生活忽视模型大鼠前额叶皮层不同类型神经元特异性的兴奋性变化差异研究

幼年是大脑发育的关键时期,幼年生活忽视可对神经系统和情绪发展产生不可逆的影响。近年有文献报道包括前额叶皮层、眶额叶和杏仁核等脑区参与该情绪行为的神经过程。北京协和医学院-中国医学科学院医学实验动物研究所秦川教授团队前期工作已证实,前额叶皮层谷氨酸能神经元参与调节幼年生活忽视模型大鼠的焦虑等行为,前额叶皮层神经元的内在兴奋性变化可能是模型大鼠行为表型及其性别差异的基础。本文进一步探究大鼠前额叶皮层谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元在雄性和雌性大鼠之间的不同神经兴奋性改变特征,为疾病模型动物的行为学症状探究相应的神经机制。

本研究建立大鼠母子分离早期断乳模型(maternal separation with early weaning, MSEW)作为幼年生活忽视的疾病模型,通过全细胞脑片膜片钳记录大鼠前额叶皮层谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元,并检测各组内在兴奋性的改变。结果表明,以神经元动作电位和幅度、阈值和个数作为检测指标,前额叶谷氨酸能神经元和 GABA 能神经元表现出不同特征的神经电生理改变:谷氨酸能神经元兴奋性在雄性模型组明显上升,更易激发动作电位,雌性模型组无明显差异。不同于谷氨酸能神经元,GABA 能神经元的兴奋性表现为单个动作电位阈值绝对值在雄性和雌性模型组增加,不易激发动作电位。

综上所述,大鼠母子分离早期断乳模型的前额叶皮层表现为神经元特异性的兴奋性改变,同时具有雌雄差异,进一步造成前额叶皮层的兴奋-抑制平衡改变,为大鼠母子分离早期断乳的情绪行为学表型提供神经功能基础。

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(3): 274-280; <https://doi.org/10.1002/ame2.12252>)

刘秀娟,盛蕾,张念云,等. 不同运动方式对大鼠骨骼肌 MSTN 和 IGF1 的影响比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 41-48.

Liu XJ, Sheng L, Zhang NY, et al. Comparison of the effects of different exercise modes on MSTN and IGF1 of rat skeletal muscle [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 41-48.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.006

不同运动方式对大鼠骨骼肌 MSTN 和 IGF1 的影响比较

刘秀娟¹, 盛蕾^{2*}, 张念云³, 王子艺¹, 申雪纯¹

(1.南京体育学院运动健康学院,南京 210014;2.南京体育学院科研处,南京 210014;
3.南京体育学院科学实验中心,南京 210014)

【摘要】 目的 探究不同运动方式对大鼠骨骼肌生长因子 MSTN 和 IGF1 的影响,为选择合适的运动方式以改善骨骼肌功能提供理论依据。**方法** SD 大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为安静对照组、持续游泳运动组、高强度间歇游泳运动组和负重爬梯运动组。各运动组进行为期 8 周的运动训练后,与安静对照组一起麻醉处死,收集样本。记录各组大鼠的体重、腓肠肌质量,HE 染色观察腓肠肌的横截面积变化,ELISA 方法检测大鼠血清 MSTN、IGF1 和胰岛素 (insulin) 的水平,Western blot 方法检测大鼠腓肠肌 MSTN、IGF1、p70S6K 的表达。**结果** 3 个运动组的大鼠体重均显著低于安静对照组 ($P<0.01$),持续游泳运动组腓肠肌质量显著低于安静对照组 ($P<0.05$),其他两组大鼠腓肠肌质量没有显著变化 ($P>0.05$);3 个运动组腓肠肌横截面积显著低于安静对照组 ($P<0.05$),爬梯运动组和高强度间歇游泳运动组腓肠肌横截面积显著高于持续游泳运动组 ($P<0.05$)。ELISA 结果显示,3 个运动组血清 IGF1 水平均显著低于安静对照组 ($P<0.01$),而 MSTN 和 insulin 水平均没有显著变化。爬梯运动组腓肠肌 MSTN 蛋白表达显著低于安静对照组 ($P<0.01$),而 IGF1 和 p70S6K 的蛋白表达显著高于安静对照组 ($P<0.01$),持续游泳运动组腓肠肌 p70S6K 的蛋白表达也显著高于安静对照组 ($P<0.05$)。**结论** 3 种运动方式相比,爬梯运动和高强度间歇游泳运动虽然都上调腓肠肌质量指数,但对骨骼肌 MSTN 和 IGF1 的影响不同。爬梯运动下调 MSTN 的表达,上调 IGF1 和 p70S6K 的表达,而高强度间歇游泳运动对骨骼肌 MSTN、IGF1 和 p70S6K 的影响不显著。爬梯运动可能通过降低 MSTN 并增加 IGF1 和 p70S6K 的蛋白表达增加腓肠肌横截面积。

【关键词】 运动方式;骨骼肌;MSTN;IGF1;p70S6K;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0041-08

Comparison of the effects of different exercise modes on MSTN and IGF1 of rat skeletal muscle

LIU Xiujuan¹, SHENG Lei^{2*}, ZHANG Nianyun³, WANG Ziyi¹, SHEN Xuechun¹

(1. Department of Sports and Health, Nanjing Sports Institute, Nanjing 210014, China.

2. Research Office, Nanjing Sports Institute, Nanjing 210014. 3. Department Science Experiment Center, Nanjing Sports Institute, Nanjing 210014)

【基金项目】 国家自然科学基金(31900844);江苏省高校自然科学基金(17KJB180008);南京体育学院重点实验室——运动人体科学实验室课题(SYS202106)。

【作者简介】 刘秀娟(1984—),女,副教授,博士,研究方向:运动生物化学。E-mail:lxjqmb2006@163.com

【通信作者】 盛蕾(1963—),女,研究员,博士生导师,研究方向:运动健康与促进。E-mail:735888670@163.com

【Abstract】 Objective This study aimed to explore the effects of different exercise modes on skeletal muscle growth factors MSTN and IGF-1 in rats and to provide a theoretical basis for choosing appropriate exercise modes to improve skeletal muscle function. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into four groups, each with 12 rats, namely quiet control, continuous swimming exercise, high-intensity intermittent swimming exercise, and ladder exercise groups. After 8 weeks of exercise training, rats were sacrificed by overdosed anesthesia together with the quiet control group, and samples were collected for testing. The body weight and gastrocnemius muscle weight of each group were recorded. Cross-sectional area changes of the gastrocnemius muscle were observed by HE staining. Serum levels of MSTN, IGF-1 and insulin were measured by ELISA. MSTN, IGF-1 and p70S6K expression in the gastrocnemius muscle of rats was detected by Western blot. **Results** The weights of rats in the three exercise groups were significantly lower than that of the quiet control group ($P < 0.01$). The weight of the gastrocnemius in the continuous swimming exercise group was significantly lower than that of the quiet control group ($P < 0.05$), and the weight of the gastrocnemius in the other two groups did not change significantly ($P > 0.05$). The gastrocnemius cross-sectional area of the three exercise groups was significantly lower than that of the quiet control group ($P < 0.05$). The gastrocnemius cross-sectional area of ladder exercise and high-intensity intermittent exercise groups was significantly higher than that of the continuous swimming group ($P < 0.05$). Serum IGF-1 levels of the three exercise groups were significantly lower than that of the quiet control group ($P < 0.01$), while MSTN and insulin levels did not change significantly. MSTN protein expression in the gastrocnemius of the ladder exercise group was significantly lower than that of the quiet control group ($P < 0.01$), while IGF-1 and p70s6k protein expression was significantly higher than in the quiet control group ($P < 0.01$). p70S6K protein expression in the gastrocnemius of the continuous swimming exercise group was also significantly higher than that in the quiet control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Ladder exercise and high-intensity intermittent swimming exercise both increased the gastrocnemius mass index, but their effects on MSTN and IGF1 in skeletal muscle were different. Ladder exercise downregulated MSTN expression and upregulated IGF1 and p70S6K expression, whereas high-intensity intermittent swimming exercise had no significant effect on MSTN, IGF-1 or p70S6K in skeletal muscle. Ladder climbing may increase the cross-sectional area of gastrocnemius muscle by reducing MSTN and increasing IGF-1 and p70S6K.

【Keywords】 exercise modes; skeletal muscle; MSTN; IGF1; p70S6K; rat

肌肉减少症是常见的由衰老引发的疾病,而运动锻炼可以很好的对抗衰老带来的肌肉质量减少及功能降低。肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 1, IGF1)是骨骼肌生长的重要调节因子,对骨骼肌的功能起重要的调节作用。长期以来运动对 MSTN 影响的报道很多,主要集中在急性运动^[1-2]、力竭运动及恢复期^[3]、跑台运动^[4]及运动结合饮食干预^[5]等方面,对血液或骨骼肌 MSTN 的 mRNA 和蛋白的影响^[6]结论多样,存在争议。由于 MSTN 是分泌型蛋白,检测其 mRNA 的表达并不能说明其对骨骼肌的调节功能。IGF1 是肌肉生长的重要刺激因子,可以通过胰岛素(insulin)信号途径促进肌肉的肥大。有关运动对 IGF1 的影响多关注抗阻运动的影响^[1,7-8],但在同一实验设计中对比不同运动方式对骨骼肌生长调节因子 MSTN 和 IGF1 的影响鲜见研究报道。基于此,本研究拟通过在同一实验设计中,对大鼠进行不同运动方式干预,对比不同的运动方式对 MSTN 和 IGF1 的影响,为探索运动对骨骼肌表型的影响提供理论支撑,为人们选择运动锻炼

方式以改善肌肉状态提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,10 周龄,体重约为 (400 ± 50) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司[SCXK(沪)2017-0011],饲养于江苏省农业科学院实验动物中心动物房[SYXK(苏)2020-0024],饲养条件:室内温度 $(23 \pm 3)^\circ\text{C}$,相对湿度 50%~60%,12 h/12 h 光照/黑暗交替,分笼饲养,自由进食进水。本研究动物实验经本校动物实验伦理委员会批准(SKJDW-2020-04),并在实验过程中严格按照实验动物 3R 原则进行。

1.2 主要试剂与仪器

MSTN ELISA kit (DGDF80, R&D Systems, USA); insulin ELISA kit (ELR-insulin-1, Rio-Biotech, USA); IGF1 ELISA kit (CEK1604 Rat, bioworld); anti-MSTN/Myostatin (abcam, ab203076); anti-IGF1 (bioworld, BS60538); anti-p70S6K (bioworld, BS3634); anti-alpha tubulin (abcam, ab7291); 20%

的乌拉坦溶液(南京木林森生物科技有限公司)。珠式样品研磨仪(OMNI Bead Ruptor 24, OMNI 公司, 美国);全自动酶标仪(TECAN M200pro, TECAN 集团公司, 瑞士);石蜡切片机(Leica RM2125 RTS, Leica Biosystems, 德国);蛋白质电泳仪、转印系统及化学发光成像系统(Bio-Rad, 伯乐公司, 美国);正置光学显微镜(蔡司, Axio Imager 2, 德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

适应性喂养 1 周后,将大鼠随机分为 4 组,分别为安静对照组(Con 组)10 只,持续游泳运动组(CE 组)10 只,高强度间歇游泳运动组(HIIT 组)10 只,负重爬梯训练组(CLE 组)10 只。喂养过程中,及时记录大鼠进食、饮水及生长情况,记录每周体重。

1.3.2 训练方案

(1)持续性游泳和高强度间歇游泳运动方案

CE 组和 HIIT 组两组大鼠在宽敞的玻璃泳池中进行游泳训练,室温控制在 $(23 \pm 3)^{\circ}\text{C}$,水温 $(31 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,每周周一至周五 8:00 点开始训练,适应性训练 1 周。将负重砝码装在气球中按体重标准系在大鼠尾部。两组训练方案参照 Da 等^[9]的方案(表 1)。游泳过程中,若发现大鼠运动协调性下降,反复下沉时,立刻捞起大鼠休息 30 s。若大鼠浮于水面不动,则进行适当驱赶,以保证正常运动。训练结束后,立刻捞起大鼠,用毛巾擦干并用吹风机吹干大鼠身体。实验过程中,注意观察大鼠的运动能力、恢复情况等并做好记录。

(2)负重爬梯训练方案

CLE 组大鼠在高度为 1 m、宽度为 0.15 m、每级

台阶相距 0.02 m 的爬梯上进行训练,爬梯上方有平台休息区,下方有底座。训练方案参照 Tang 等^[10]的方案进行适当调整(表 2)。将负重砝码装在气球中按体重标准系在大鼠尾部。每周二至周六 14:00 点开始训练,适应性训练 1 周。每次训练 3 组,组间休息 2 min,每组重复 5 次,每次间歇 1 min。训练过程中,当大鼠爬到顶端平台后可休息 1 min,若大鼠出现偷懒不运动的现象,适当进行驱赶。实验过程中,每天观察大鼠的运动能力、疲劳情况等并做好记录。

1.3.3 取样

每周记录大鼠的体重,8 周训练结束后,用 20% 的乌拉坦溶液进行腹腔注射(1 mL/100 g)将大鼠麻醉处死,收集血液,血液经 3000 r/min,4℃ 离心后,分离血清置于-80℃超低温冰箱保存;分别收集左右两侧的腓肠肌,一侧肌肉投入多聚甲醛固定液中固定,用于组织学研究,另一侧肌肉置于液氮速冻,后转入-80℃超低温冰箱冻存,用于蛋白检测。

1.3.4 腓肠肌质量指数的计算公式

腓肠肌质量指数=腓肠肌质量(g)/体重(g)

1.3.5 腓肠肌组织 HE 染色

取腓肠肌组织样,用多聚甲醛固定 24 h,然后修剪组织块,并用石蜡包埋,切片,HE 染色后,显微镜下 10×40 倍观察并拍照,用 Image-pro plus 6.0 软件分析计算肌纤维横截面积(muscle fiber cross-sectional area, FCSA),并统计分析。

1.3.6 血清 MSTN、IGF1 和 insulin 的测定

血清 MSTN、IGF1 和 insulin 的检测严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

表 1 持续性游泳运动和高强度间歇游泳运动方案

Table 1 Continuous swimming exercise and high intensity interval swimming exercise scheme

周次 Weeks	持续性游泳训练 Continuous swimming training			高强度间歇游泳训练 High intensity interval swimming training			
	次数/天 Times/day	时长/次 Duration/time	负重 Load	次数/天 Times/day	时长/次 Duration/time	间歇 Intermittent	负重 Load
0	适应性训练 Adaptive training						
1	1	30 min	0%	5	1 min	1 min	5%
2	1	40 min	0%	5	1 min	1 min	7%
3	1	30 min	1%	5	1 min	1 min	8%
4	1	40 min	1%	5	1 min	1 min	10%
5	1	40 min	2%	14	20 s	10 s	13%
6	1	50 min	2%	14	20 s	10 s	14%
7	1	50 min	3%	14	20 s	10 s	15%
8	1	60 min	3%	14	20 s	10 s	16%

表 2 负重爬梯运动方案
Table 2 Load ladder-climbing exercise scheme

周次 Weeks	每天训练次数 Training times/once day	负重(体重%) Load (body weight%)
0	适应性训练 Adaptive training	
1	*	20%
2	#	20%
3	*	30%
4	#	30%
5	*	40%
6	#	40%
7	*	50%
8	#	50%

注: *: 奇数周, 由于负重增加, 每天训练 1 次; #: 偶数周, 由于负重不变, 除每天训练 1 次外, 每周三、周六 8:00 点增加训练 1 次。

Note. *, Odd weeks, due to increased load, training once a day. #, Indicates even-numbered weeks, due to the same weight load, in addition to training once a day, every Wednesday and Saturday at 8:00 O'clock an additional training.

1.3.7 蛋白检测

取腓肠肌组织 100 mg 左右, 加裂解液 1:10 (w/v), 冰浴匀浆, 冰上放置 10 min, 4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 吸上清, BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% SDS-PAGE 分离胶, 4% 浓缩胶。以 30 μg 蛋白样品量上样, 分离蛋白, 转印至 PVDF 膜, 封闭 1 h, 后, 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 遍, 室温孵育二抗 1 h, TBST 洗涤 3 遍, 化学发光检测, 并拍照。用 Image Lab 软件成像并对结果进行相对定量分析。

1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理, 各数据用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 定为差异显著性的界值。

2 结果

2.1 不同运动方式对大鼠体重及肌肉重量的影响

由图 1 可见, 3 种运动方式进行干预 8 周后, 大鼠的体重均显著低于安静对照组 ($P < 0.01$), 而 3 种运动方式对大鼠体重的影响没有显著差异 (图 1A)。持续游泳运动组腓肠肌质量显著低于安静对照组 ($P < 0.05$), 其他两组大鼠腓肠肌质量则没有显著差异 (图 1B)。3 个运动组相比, 高强度间歇游泳运动组和爬梯运动组腓肠肌质量显著高于持续游泳运动组 (图 1B, $P < 0.05$)。高强度间歇游泳运动组和爬梯运动组腓肠肌质量指数显著高于安静对照组 (图 1C, $P < 0.05$)。3 个运动组相比, 高强度间

歇游泳运动组和爬梯运动组腓肠肌质量指数显著高于持续游泳运动组 (图 1C, $P < 0.05$)。3 种运动方式干预 4 周后, 大鼠的体重均显著低于安静对照组 (图 1D, $P < 0.01$)。

2.2 不同运动方式对大鼠腓肠肌形态的影响

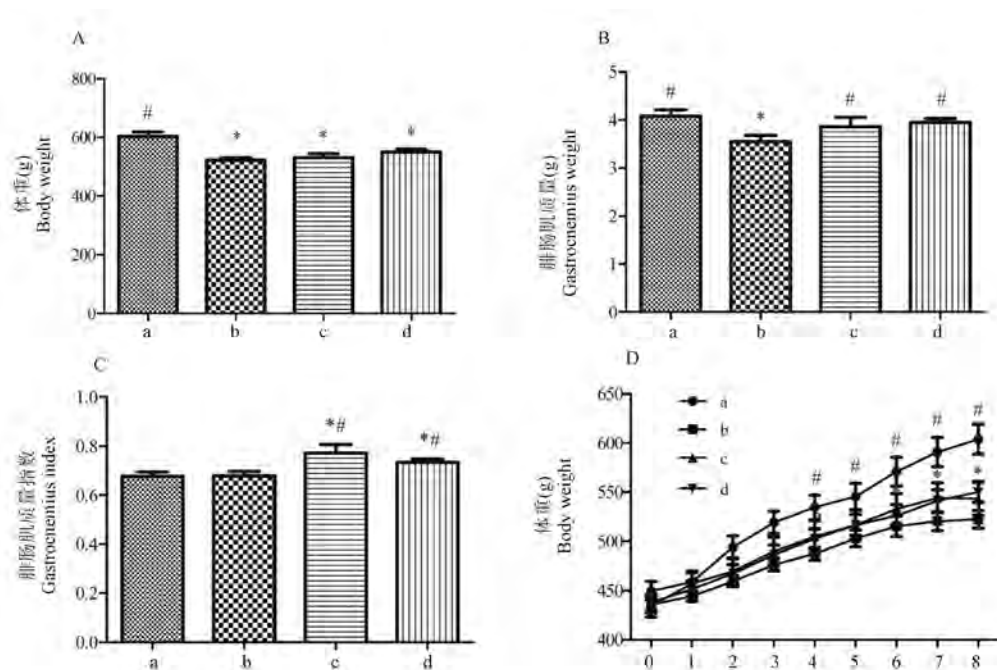
腓肠肌形态学观察显示 (图 2), 3 种运动方式干预, 大鼠的腓肠肌横截面积显著低于安静对照组 ($P < 0.01$)。3 个运动组相比, 高强度间歇游泳运动组和爬梯运动组腓肠肌横截面积显著高于持续游泳运动组的大鼠腓肠肌横截面积 ($P < 0.05$), 高强度间歇游泳运动组与爬梯运动组相比, 腓肠肌横截面积没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 不同运动方式对大鼠血液 MSTN、IGF1 和 insulin 水平的影响

图 3 结果显示, 3 个运动组血清 MSTN 和 insulin 水平与安静对照组没有显著差异 ($P > 0.05$), 而血清 IGF1 水平显著低于安静对照组 ($P < 0.01$)。3 个运动组相比, 血清 MSTN、insulin 和 IGF1 水平均没有显著差异。

2.4 不同运动方式对大鼠骨骼肌 MSTN、IGF1 和 p70S6K 蛋白表达的影响

如图 4 显示, 爬梯运动组的大鼠腓肠肌 MSTN 蛋白表达显著低于安静对照组 ($P < 0.01$), 持续游泳运动组与高强度间歇游泳运动组的大鼠腓肠肌 MSTN 蛋白表达与安静对照组没有显著差异; 高强度间歇游泳运动组的大鼠腓肠肌 IGF1 蛋白表达显著低于安静对照组 ($P < 0.01$), 爬梯运动组的大鼠腓肠肌 IGF1 蛋白表达显著高于安静对照组 ($P < 0.01$); 持续游泳运动组和爬梯运动组的大鼠腓肠肌 P70S6K 的蛋白表达显著高于安静对照组 ($P < 0.01$)。3 个运动组相比, 爬梯运动组的大鼠腓肠肌 MSTN 蛋白表达显著低于持续游泳运动组和高强度间歇游泳运动组 ($P < 0.01$); 爬梯运动组的大鼠腓肠肌 IGF1 蛋白表达显著高于持续游泳运动组和高强度间歇游泳运动组 ($P < 0.01$), 高强度间歇游泳运动组的大鼠腓肠肌 IGF1 蛋白表达显著低于持续游泳运动组和爬梯运动组 ($P < 0.01$); 高强度间歇游泳运动组的大鼠腓肠肌 P70S6K 蛋白表达显著低于持续游泳运动组和爬梯运动组 ($P < 0.01$), 且持续游泳运动组的大鼠腓肠肌 P70S6K 蛋白表达显著低于爬梯运动组 ($P < 0.01$)。

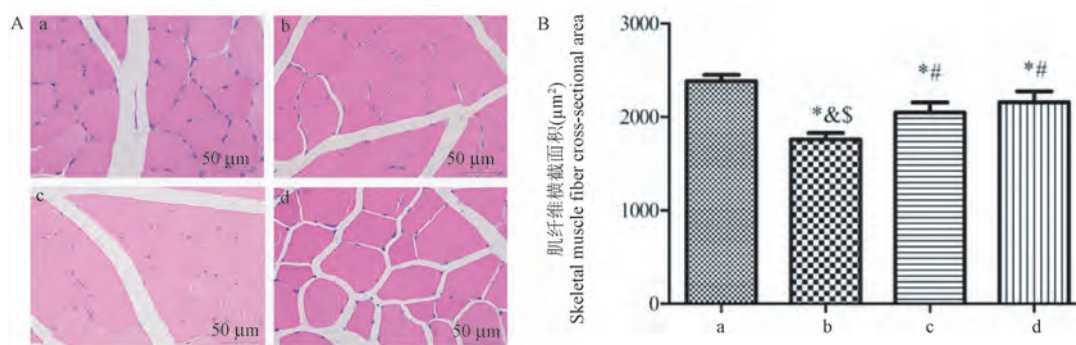


注:A:各组大鼠体重;B:各组大鼠腓肠肌质量;C:各组大鼠腓肠肌质量指数;D:各组大鼠体重变化曲线。a:安静对照组;b:持续游泳运动组;c:高强度间歇游泳组;d:负重爬梯训练组。与安静对照组相比, * $P < 0.05$;与持续游泳运动组相比, # $P < 0.05$ 。

图1 各组大鼠体重、腓肠肌质量和腓肠肌质量指数比较

Note. A, Weight of rats in each group. B, Weight of gastrocnemius muscle of rats in each group. C, Gastrocnemius muscle mass index of rats in each group. D, Weight change curve of rats in each group. a, Con group. b, CE group. c, HIIT group. d, CLE group. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with CE group, # $P < 0.05$.

Figure 1 Comparison of rat body weight, gastrocnemius weight and gastrocnemius mass index in each group

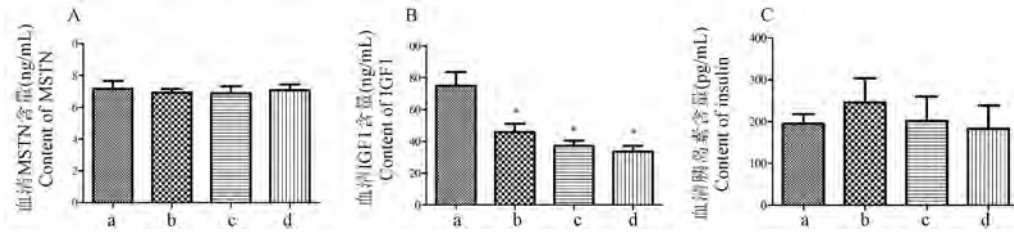


注:A:肌纤维的组织学结构;B:肌纤维横截面积统计图。a:安静对照组;b:持续游泳运动组;c:高强度间歇游泳组;d:负重爬梯训练组。与安静对照组相比, * $P < 0.05$;与持续游泳运动组相比, # $P < 0.05$;与高强度间歇游泳运动组相比, & $P < 0.05$;与负重爬梯训练组相比, § $P < 0.05$ 。

图2 各组大鼠腓肠肌横截面积比较

Note. A, Histological structure of muscle fibers. B, Muscle fiber cross-sectional area. a, Con group. b, CE group. c, HIIT group. d, CLE group. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with CE group, # $P < 0.05$. Compared with HIIT group, & $P < 0.05$. Compared with CLE group, § $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of cross-sectional area of gastrocnemius muscle of rats in each group

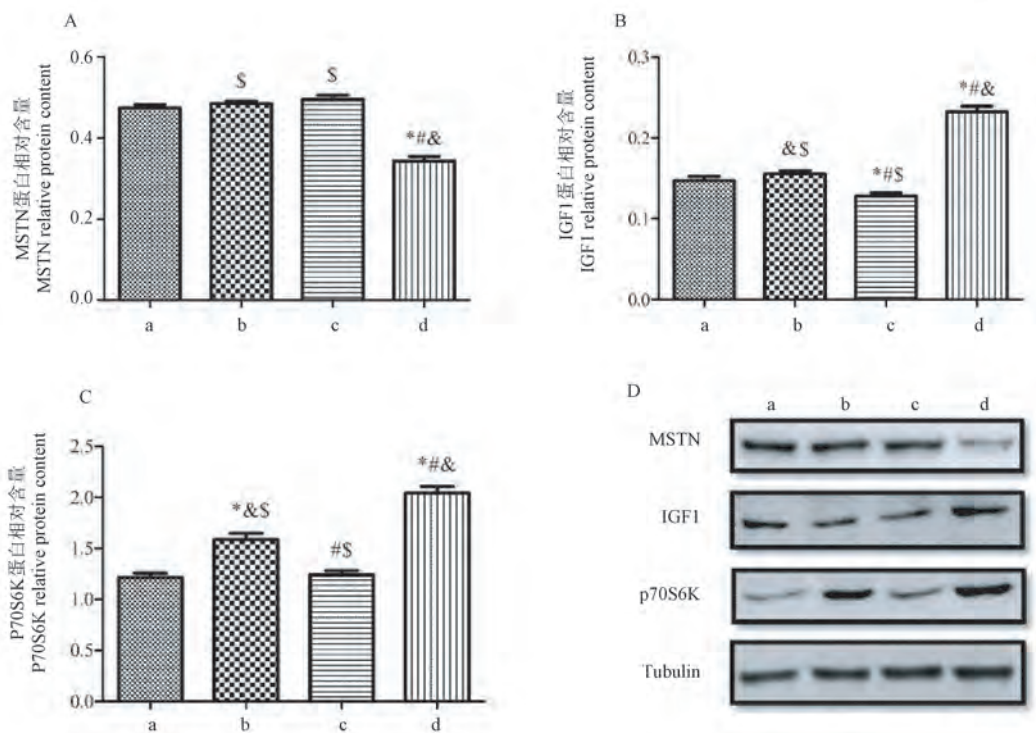


注:A:血清 MSTN 含量;B:血清 IGF1 含量;C:血清胰岛素含量。a:安静对照组;b:持续游泳运动组;c:高强度间歇游泳组;d:负重爬梯训练组。与安静对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠血清 MSTN、IGF1 和 insulin 水平比较

Note. A, Serum MSTN content. B, Serum IGF1 content. C, Serum insulin content. a, Con group. b, CE group. c, HIIT group. d, CLE group. Compared with Con group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Comparison of serum MSTN, IGF1 and insulin levels in rats of each group



注:A:MSTN 蛋白相对含量;B:IGF1 蛋白相对含量;C:P70S6K 蛋白相对含量;D:MSTN、IGF1 和 p70S6K 的蛋白表达条带。a:安静对照组;b:持续游泳运动组;c:高强度间歇游泳组;d:负重爬梯训练组。与安静对照组相比, * $P < 0.05$;与持续游泳运动组相比, # $P < 0.05$;与高强度间歇游泳运动组相比, & $P < 0.05$;与负重爬梯训练组相比, S $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠腓肠肌 MSTN、IGF1 和 p70S6K 蛋白表达比较

Note. A, Relative content of MSTN protein. B, Relative content of IGF1 protein. C, Relative content of P70S6K protein. D, Expression of MSTN, IGF1 and P70S6K protein in gastrocnemius muscle of rats in each group. a, Con group. b, CE group. c, HIIT group. d, CLE group. Compared with Con group, * $P < 0.05$. Compared with CE group, # $P < 0.05$. Compared with HIIT group, & $P < 0.05$. Compared with CLE group, S $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of MSTN, IGF1 and p70S6K protein expression in gastrocnemius muscle of rats in each group

3 讨论

长期以来,不同方式的运动干预对 MSTN 的影响存在争议^[11-15]。本研究将 3 种运动方式放在同

一个实验中进行比较,发现 3 种运动方式对血液 MSTN 的水平均没有显著影响,只有爬梯运动可以显著降低腓肠肌 MSTN 的蛋白表达。长期耐力运动和抗阻运动不同程度的降低 MSTN mRNA 水

平^[13-14],本研究没有检测 MSTN mRNA 的水平,但爬梯运动显著降低 MSTN 的蛋白水平,鉴于 MSTN 主要是蛋白水平发挥作用,并且 MSTN 的转录翻译受很多因素的调控,因此,只检测了其血清水平和腓肠肌蛋白的表达。对高强度间歇运动的研究显示,运动后即刻,血清中 MSTN 水平先升高后降低^[15]。而本研究发现,高强度间歇运动对血清 MSTN 水平没有显著影响,这可能与我们的检测时间有关;并且一次性抗阻训练和高强度间歇训练后骨骼肌 MSTN mRNA 水平显著降低^[16],这与我们的结果不相符。本研究中只发现爬梯运动组骨骼肌蛋白水平降低,而高强度间歇训练组 MSTN 没有显著变化,可能由于长期训练的适应性所致。这些研究之间的差异可能由采样时间、运动干预时间或运动后的差异,以及不同受试者或不同运动模式对全身循环中 MSTN 排出和/或清除的影响导致。本研究发现血液中的 MSTN 与腓肠肌 MSTN 的变化不同,可能的原因是 MSTN 不仅由骨骼肌分泌,脂肪组织及心肌等组织均可分泌少量的 MSTN,并且分泌进入血液的 MSTN 还需要修饰活化,由此可以解释运动对血清 MSTN 水平与骨骼肌 MSTN 影响的不同。

IGF1 和 MSTN 在骨骼肌的生长肥大方面起着相反的作用,IGF1 刺激骨骼肌的生长而 MSTN 抑制骨骼肌的生长肥大。研究发现,当 MSTN 缺乏和 IGF1 过量时,骨骼肌的生长和体脂的减少存在叠加效应,MSTN 和 IGF1 通过增加 AKT 和 S6K 的表达和磷酸化,调节骨骼肌的大小、肌纤维类型和脂肪的沉积^[17]。运动可以影响 IGF1 的表达,急性抗阻运动诱导大鼠和人的骨骼肌 IGF1 表达增加^[7,18]。这与我们的结果相符,爬梯运动显著上调骨骼肌 IGF1 的蛋白表达,而高强度间歇运动却显著降低 IGF1 的表达,分析原因可能与我们选择的运动干预方式有关,本研究中高强度间歇运动方案采用的是游泳训练,而非跑台或爬梯,可能对骨骼肌的影响受限。IGF1 与瘦体重质量的维持有关,研究显示长期抗阻运动显著降低血清 IGF1 水平^[19],这与我们的结果类似。我们的研究发现,3 种运动方式均显著降低了血清 IGF1 的水平。有研究报道骨骼肌的代谢与 IGF1 表达之间存在联系,而与血清 IGF1 浓度无关^[20],本研究中,3 种运动方式对血清 IGF1 和骨骼肌 IGF1 的影响不同,这与前人的研究相符,但其中的原因有待进一步研究阐明。

骨骼肌蛋白质的合成受几个细胞外和细胞内信号的调节。其中许多信号随着营养状态的不同(如胰岛素信号和氨基酸)而变化;运动也是影响此信号的因素之一^[21]。经典的蛋白质合成信号通路为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路。而核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)是 mTOR 信号的下游^[22]。运动尤其是抗阻运动可以促进 p70S6K 的表达和肌原纤维蛋白质合成增加。本研究中发现持续游泳运动和爬梯运动显著上调骨骼肌 p70S6K 的表达,而高强度间歇游泳运动对 p70S6K 的表达没有显著影响。由于 p70S6K 是 MSTN 和 IGF1 信号的下游,从腓肠肌蛋白的表达结果看,爬梯运动组和高强度间歇游泳运动组 p70S6K 的表达可能是 MSTN 和 IGF1 共同作用的结果,而在持续游泳运动组 p70S6K 的表达,IGF1 的作用可能占优势。

综合来看,3 种运动方式均能够降低大鼠的体重,但高强度间歇游泳运动和爬梯运动显著上调腓肠肌质量和腓肠肌质量指数,并且与持续游泳运动相比,二者也显著增加肌肉的横截面积。值得注意的是,持续游泳运动显著降低腓肠肌质量和横截面积,可能由于运动量过大,能耗过高所致。3 种运动方式相比,爬梯运动对骨骼肌的影响更为显著,它下调 MSTN 的表达,上调 IGF1 和 p70S6K 的表达,这些变化与上调的腓肠肌质量指数相吻合。高强度间歇运动虽然也上调腓肠肌质量指数,但其对 MSTN、IGF1 和 p70S6K 的影响不显著,提示本研究中采用的高强度间歇运动方案可能通过其他机制影响骨骼肌质量;也可能是爬梯运动作为下肢肌肉进行的力量训练模式,而在本研究中,高强度间歇运动和持续运动采用的是游泳运动方式,对下肢肌肉的影响可能没有爬梯运动明显。

综上所述,3 种运动方式中,高强度间歇运动和爬梯运动对大鼠腓肠肌的影响较为显著。爬梯运动可能通过下调 MSTN 的表达,上调 IGF1 和 p70S6K 的表达来促进腓肠肌的肥大;而高强度间歇运动对腓肠肌的影响可能存在其他机制,也可能受选取的运动干预方式的影响,具体机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 贺道远,曾凡星,朱一力,等. 急性运动后大鼠骨骼肌 Myostatin 和 IGF-1 基因表达呈反向变化[J]. 体育科学, 2008, 15(2): 54-58.
- [2] Mehdi K, Abdolhamid H, Mohsen G, et al. Acute interval

- waking with blood flow restriction could not increase ERK, p38 and decrease myostatin [J]. *J Sports Med Phys Fitness*, 2020, 60(1): 32–36.
- [3] 潘同斌, 唐芳, 李娜, 等. 力竭运动及恢复期间大鼠骨骼肌及心肌 MSTN、TGF- β 、PDGF 含量的变化 [J]. *中国运动医学杂志*, 2015, 34(11): 1076–1078.
- [4] 张靓, 刘小园, 杨洪涛. 跑台运动对比目鱼肌和腓肠肌肌肉生长抑制素表达的影响 [J]. *沈阳体育学院学报*, 2012, 31(5): 73–75.
- [5] 张靓, 杨洪涛, 曹玉仙, 等. 跑台运动对高脂饮食诱导的肥胖大鼠腓肠肌肌肉生长抑制素的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(5): 446–452.
- [6] Zohreh S, Mohammad F, Ebrahim B, et al. Effect of moderate and high-intensity endurance and resistance training on serum concentrations of MSTN and IGF-1 in old male Wistar rats [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2019, 38(2): 23–29.
- [7] Kido K, Ato S, Yokokawa T, et al. Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(16): 12907–12919.
- [8] 王静, 卢健. 抗阻练习模型大鼠骨骼肌中胰岛素生长因子 1 和肌肉生长抑制素的变化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(20): 3649–3652.
- [9] Da RG, Crisp AH, de Oliveira MR, et al. Effect of high intensity interval and continuous swimming training on body mass adiposity level and serum parameters in high-fat diet fed rats [J]. *ScientificWorldJournal*, 2016, 3(2): 11–18.
- [10] Tang L, Gao X, Yang X, et al. Ladder-climbing training prevents bone loss and microarchitecture deterioration in diet-induced obese rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(1): 85–93.
- [11] Kopple JD, Cohen AH, Wang H, et al. Effect of exercise on mRNA levels for growth factors in skeletal muscle of hemodialysis patients [J]. *J Ren Nutr*, 2006, 16(4): 312–324.
- [12] Hittel DS, Axelson M, Sarna N, et al. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2010, 42(11): 2023–2029.
- [13] Konopka AR, Douglass MD, Kaminsky LA, et al. Molecular adaptations to aerobic exercise training in skeletal muscle of older women [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(11): 1201–1207.
- [14] Kim JS, Petrella JK, Cross JM, et al. Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2007, 103(5): 1488–1495.
- [15] Kabak B, Belviranli M, Okudan N. Irisin and myostatin responses to acute high-intensity interval exercise in humans [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2018, 35(3): 21–27.
- [16] Pugh JK, Faulkner SH, Jackson AP, et al. Acute molecular responses to concurrent resistance and high-intensity interval exercise in untrained skeletal muscle [J]. *Physiol Rep*, 2015, 3(4): 12364–12377.
- [17] Hennebry A, Oldham J, Shavlakadze T, et al. IGF1 stimulates greater muscle hypertrophy in the absence of myostatin in male mice [J]. *J Endocrinol*, 2017, 234(2): 187–200.
- [18] Schwarz NA, Mckinley-Barnard SK, Spillane MB, et al. Effect of resistance exercise intensity on the expression of PGC-1 α isoforms and the anabolic and catabolic signaling mediators, IGF-1 and myostatin, in human skeletal muscle [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016, 41(8): 856–863.
- [19] Arnarson A, Gudny GO, Ramel A, et al. Insulin-like growth factor-1 and resistance exercise in community dwelling old adults [J]. *J Nutr Health Aging*, 2015, 19(8): 856–860.
- [20] Hamarneh SR, Murphy CA, Shih CW, et al. Relationship between serum IGF-1 and skeletal muscle IGF-1 mRNA expression to phosphocreatine recovery after exercise in obese men with reduced GH [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(2): 617–625.
- [21] Zeng F, Zhao H, Liao J. Androgen interacts with exercise through the mTOR pathway to induce skeletal muscle hypertrophy [J]. *Biol Sport*, 2017, 34(4): 313–321.
- [22] Esbjornsson M, Rundqvist HC, Mascher H, et al. Sprint exercise enhances skeletal muscle p70S6k phosphorylation and more so in women than in men [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 205(3): 411–422.

[收稿日期]2021-11-01

李培宁,刘香梅,黄静怡,等. 全塑型塑胶跑道面层材料对大鼠静式吸入毒性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 49-57.

Li PN, Liu XM, Huang JY, et al. Static inhalation toxicity of plastic racetrack surface materials in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 49-57.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.007

全塑型塑胶跑道面层材料对大鼠静式吸入毒性研究

李培宁¹, 刘香梅^{1*}, 黄静怡², 李光先¹, 刘颖¹, 孙侠¹, 何树锋¹, 梁俊杰¹, 刘冬虹¹

(1.广州质量监督检测研究院, 广州 511447; 2.华南农业大学, 广州 510000)

【摘要】 目的 研究全塑型塑胶跑道面层材料对大鼠静式吸入毒性。**方法** 将检疫合格的雌、雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 分别为 30 d 正常对照组、30 d 染毒组、90 d 正常对照组和 90 d 染毒组, 每组 16 只, 雌雄各半, 每天吸入 1 h, 分别染毒 30 d 和 90 d。实验结束后, 对各组大鼠进行剖检, 检测凝血、血常规、血生化指标, 计算脏器系数, 并对各脏器进行组织病理学检查。**结果** 与同期正常对照组比较, 30 d 染毒组雄鼠凝血酶时间 (TT) 缩短 ($P < 0.05$), 90 d 染毒组雌鼠活化部分凝血活酶时间 (APTT) 延长 ($P < 0.01$)。30 d 染毒组雌鼠血清 Ca、P 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 雄鼠血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 升高; 90 d 染毒组雌鼠血清 BUN、P 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 及 Na、Cl 降低 ($P < 0.01$), 雄鼠血清 BUN、总蛋白 (TP) 升高 ($P < 0.05$)。30、90 d 染毒组雄鼠肾上腺系数均增大 ($P < 0.01$)。30 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 3 例, 肺细小支气管上皮脱落 3 例, 肾囊肿 1 例, 睾丸个别曲细精管萎缩 1 例。90 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 6 例, 肺细小支气管上皮脱落 2 例, 肾上腺束状带细胞灶性肥大 1 例, 睾丸个别曲细精管萎缩 2 例, 肾个别肾小球毛细血管扩张 2 例, 肾囊肿 1 例、透明管型 4 例、矿化 1 例、肾盂积水 1 例。**结论** 在本实验条件下, 30 d 吸入暴露全塑型塑胶跑道面层材料对 SD 大鼠肝、肺、睾丸、肾影响较轻, 90 d 吸入暴露对大鼠肾损伤加重。

【关键词】 全塑型塑胶跑道面层材料; 吸入毒性; 大鼠; 血液学; 脏器毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0049-09

Static inhalation toxicity of plastic racetrack surface materials in rats

LI Peining¹, LIU Xiangmei^{1*}, HUANG Jingyi², LI Guangxian¹, LIU Ying¹, SUN Xia¹, HE Shufeng¹, LIANG Junjie¹,
LIU Donghong¹

(1. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China.

2. South China Agricultural University, Guangzhou 510000)

【Abstract】 Objective To study the static inhalation toxicity of plastic racetrack surface materials in rats. **Methods** SD rats that passed quarantine inspection were randomly divided into four groups, namely 30 day normal control, 30 day exposure group, 90 day normal control, and 90 day exposure groups with 16 males and females in each group. Rats were exposed to gases by inhalation for 30 or 90 days. At the end of inhalation exposure, blood coagulation, blood routine test, blood biochemistry, organ coefficient, and organ pathology were assessed. **Results** Compared with normal control group of the same sex, thrombin time of male rats was shortened in the 30 day exposure group ($P < 0.05$) and activated partial thrombin time of female rats was prolonged in the 90 day exposure group ($P < 0.01$). Serum Ca and P were decreased in female rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and serum creatinine and urea nitrogen (BUN) in rats were increased

[基金项目] 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515012494), 广东省市场监督管理局科技项目 (2020CZ03, 2021CZ04)。

[作者简介] 李培宁 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 毒理安全性评价。E-mail: lpn1117@163.com

[通信作者] 刘香梅 (1981—), 女, 本科, 副研究员, 研究方向: 毒理安全性评价。E-mail: 283830090@qq.com

in the 30 day exposure group. In the 90 day exposure group, serum BUN and P were increased ($P<0.05$, $P<0.01$), Na and Cl were decreased of female rats ($P<0.01$), whereas serum BUN and total protein were increased in male rats ($P<0.05$). The adrenal coefficient of male rats was increased in 30 and 90 day exposure groups ($P<0.01$). In the 30 day exposure group, there were three cases of mild steatosis of hepatocytes in the hepatic portal area, three cases of exfoliation of the bronchoalveolar epithelium, one case of renal cyst, and one case of individual convoluted tubule atrophy of testis. In the 90 day exposure group, there were six cases of mild steatosis of hepatocytes in the hepatic portal area, two cases of exfoliation of the bronchoalveolar epithelium, one case of cellular focal hypertrophy of adrenal zona fasciculata, two cases of individual convoluted tubule atrophy of the testis, two cases of individual glomerular telangiectasia of the kidney, one case of renal cyst, four cases of hyaline cast of the kidney, one case of mineralization, and one case of hydronephrosis.

Conclusions The effects on the liver, lung, testis, and kidney of SD rats were slight after 30 days of inhalation exposure, while kidney damage was aggravated after 90 days of inhalation exposure.

【Keywords】 plastic racetrack surface material; inhalation toxicity; rat; hematotoxicity; visceral toxicity

塑胶跑道面层材料是二十世纪六十年代中期发展起来的一种新型体育材料。近年来,随着我国经济水平不断提高,塑胶跑道铺设范围由体委系统扩大到大、中、小学等教育系统。国内塑胶跑道产业迅猛发展,种类也逐渐多样化,人接触的机会也逐渐增大。随之而来的“毒跑道”的报道却层出不穷,受害的小学生出现流鼻血、过敏、头晕、恶心等情况,引起了广泛的社会关注和媒体热议。由于塑胶跑道面层材料的成分复杂,在高温高湿条件下,容易释放挥发性有机化合物(VOCs)。而 VOCs 是一类对人体产生危害、高挥发性的有机化合物的总称,其成分复杂,具有刺激性气味,可通过呼吸、皮肤接触等途径接触人体^[1-4]。综合考虑 VOCs 的释放量、环境条件、人群活动时间及免疫力状况等多方面的因素,儿童、青少年等特殊人群更易受到影响。

目前,国外在塑胶跑道的安全性评价方面主要针对废旧回收橡胶的跑道或人工草皮场地,研究经皮毒性和吸入暴露风险^[5-6],考察塑胶面层材料的细胞毒性、致突变性或致癌性。而国内的研究集中在塑胶跑道主要有害物质的环境污染和释放量的检测研究上^[7-11],较少开展生物安全性评价和相关的健康风险评估,缺乏相关数据。且近年来报道的“毒跑道”,多数理化检测结果是合格的^[12]。考虑到塑胶跑道挥发的有害物质含量少、种类多,且相互之间有相加或协同作用,长期接触对人体产生的潜在健康危害不容忽视。因此,开展塑胶跑道面层材料的健康危害研究更加具有现实意义。

本研究结合塑胶跑道在室外条件下受环境影响的实际情况,选择全塑型塑胶跑道面层材料,开展其对幼龄大鼠 30 d 和 90 d 的吸入暴露,探讨全塑型塑胶跑道面层材料对大鼠的吸入毒性,以期对塑

胶跑道产业监管和政策制定、保障人民群众健康安全提供数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 SD 大鼠 64 只,雌雄各半,体重 40~60 g,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002],实验动物合格证号:44007200090249。动物饲养于广州质量监督检测研究院屏障设施[SYXK(粤)2018-0137],动物饲养环境的室温控制在 20℃~26℃,湿度控制在 40%~70%。本实验的动物使用经本院伦理委员会批准(2021-04-01),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)检测试剂盒及血常规检测试剂购自希森美康公司;白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司;碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、Ca、P、乳酸脱氢酶(LDH)购自日本和光纯药株式会社;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、肌酸激酶(CK)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)试剂盒购自广州市番禺区华鑫科技有限公司;Na、K、Cl 检测试剂购自日本常光株式会社。

凝血分析仪(CA-620,希森美康);全自动五分类动物血液分析仪(XT-2000iV,希森美康);全自动生化分析仪(7020,日立);电解质分析仪(EX-Z,日本常光);病理工作站(Thermo);染毒舱(8050F/54型,天津和普);空气采样器(GilAir-PLUS,美国吉利安);全自动热裂解仪(7890B-5977A,安捷伦);热脱附装置(TurboMatrix 350,瑞士 CTC);紫外可见分光光度计(UV-2550,岛津)。

全塑型塑胶跑道面层材料,由广州同欣康体设备有限公司提供,主要由聚醚、二苯基甲烷二异氰酸酯(MDI)、聚氨酯橡胶硫化剂莫卡(MOCA)、碳酸钙、氯化石蜡、消泡剂、EPDM 颗粒等配比而成,其有害物质释放量和有害物质含量均符合 GB 36246-2018《中小学合成材料面层运动场地》要求。

1.3 实验方法

1.3.1 染毒方法

参照 GB 36246-2018《中小学合成材料面层运动场地》附录 I^[10],设染毒舱载荷比为 $0.4\text{ m}^2/\text{m}^3$ 。采用静式吸入染毒,将大鼠置于全塑型塑胶跑道面层材料上方 5 cm 处,取面层材料 0.12 m^2 (即 $30\text{ cm}\times 40\text{ cm}$)置于 300 L 染毒舱内加热板上,加热 60°C 模拟高温挥发。期间染毒舱控制最低通风。

1.3.2 实验分组

将检疫合格的雌、雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,即 30 d 正常对照组、30 d 染毒组、90 d 正常对照组和 90 d 染毒组,每组 16 只,雌雄各半。每天染毒 1 h,每天更换面层材料。

1.3.3 染毒期间环境监测

监测有害物质释放量、染毒舱温度和湿度。

1.3.4 动物一般观察

染毒期间,每天观察动物临床表现。观察内容包括:皮肤、被毛、眼、黏膜、呼吸、肢体运动和行为的改变。

1.3.5 血液学检查

染毒结束,大鼠禁食不禁水过夜,腹主动脉采

血。柠檬酸钠抗凝,检测凝血指标 PT、APTT、TT; EDTA·2Na 抗凝,检测血常规指标。不抗凝血离心取血清,检测 ALT、AST、ALB、ALP、TP、TBIL、LDH、TC、TG、Cr、BUN、Na、K、Cl、Ca、P 等生化指标。

1.3.6 脏器毒性检测

染毒结束,处死大鼠,解剖取心脏、肝、脾、肺、肾、卵巢、睾丸、肾上腺、胸腺,并称重,按照下式计算脏器系数。

脏器系数(%) = 脏器重量(g)/体重(g) $\times 100\%$ 。

对脑、肺、气管、心脏、肝、肾、脾、睾丸、附睾、卵巢、肾上腺、胸腺进行组织病理学检查,经 4% 甲醛固定后,制片,石蜡包埋,苏木素-伊红染色,于光学显微镜下观察。

1.4 统计学方法

将所得数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS 25.0 统计软件中独立样本的 T 检验,对正常对照组与染毒组数据进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染毒环境监测

染毒期间,3 次检测全塑型塑胶跑道面层材料有害物质释放量、染毒舱温度和相对湿度。染毒舱温度和相对湿度均符合 GB 14925-2010《实验动物环境及设施》5.2.2 要求(温度 $20^\circ\text{C}\sim 26^\circ\text{C}$,湿度 $40\%\sim 70\%$)。见表 1。

表 1 全塑型塑胶跑道面层材料有害物质释放量、染毒舱温度和相对湿度

Table 1 Release amount of harmful substances, temperature and relative humidity of poison chamber of plastic runway surface material

项目 Indexes	检测结果 Results		
	1	2	3
有害物质释放量 Release amount of harmful substances	总挥发性有机化合物(TVOC)($\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$) Total volatile organic compounds(TVOC)	0.1	0.1
	甲醛($\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$) Formaldehyde	0.04	0.04
	苯($\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$) Benzene	<0.001	<0.001
	甲苯、二甲苯和乙苯总和($\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$) Total amount of toluene, xylene and ethylbenzene	0.01	0.01
	二硫化碳($\text{mg}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$) Carbon disulfide	<0.001	<0.001
	温度 $^\circ\text{C}$ Temperature	25	24
染毒舱 Intoxication tank	相对湿度%	44	44
	Relative humidity		

2.2 动物一般观察

实验期间至实验结束,未见大鼠有皮肤、被毛、眼、黏膜、呼吸、肢体运动和行为活动等方面的改变。

2.3 动物凝血功能

与同期正常对照组比较,30 d 染毒组雄鼠 TT

时间缩短 ($P<0.05$),90 d 染毒组雌鼠 APTT 延长 ($P<0.01$)。见表 2。

2.4 动物血常规

与同期正常对照组比较,30、90 d 染毒组雌雄性大鼠各项血常规指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表 2 大鼠凝血指标结果 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Results of coagulation indexes in rats

性别 Gender	组别 Groups	凝血指标 Coagulation indexes		
		PT(s)	APTT(s)	TT(s)
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	6.74±0.50	13.40±0.98	46.85±3.40
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	6.35±0.32	13.49±0.66	47.40±3.34
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	6.44±0.61	14.21±2.86	46.32±3.29
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	6.22±0.37	15.17±0.93**	48.97±5.44
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	7.18±0.32	14.86±1.19	55.95±2.31
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	7.37±0.43	16.96±2.22	58.77±2.81
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	7.06±0.33	14.64±2.12	52.82±2.66*
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	7.40±0.34	17.65±2.21	58.62±2.92

注:与同期正常对照组同性别大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Compared with normal control group at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 3 大鼠血常规结果 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Results of blood routine indexes in rats

性别 Gender	组别 Groups	血常规指标 Blood routine indexes			
		WBC ($10^9/L$)	RBC ($10^{12}/L$)	HGB (g/L)	PLT ($10^9/L$)
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	6.42±1.76	7.25±0.34	138.75±4.71	926.62±66.16
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	2.74±0.96	7.43±0.33	134.00±4.17	840.38±70.33
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	6.18±0.67	7.31±0.32	140.25±3.15	973.12±77.59
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	3.53±0.84	7.52±0.31	135.38±3.70	920.88±125.46
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	5.68±1.06	6.42±0.78	125.75±12.00	944.12±103.17
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	5.47±1.94	8.63±0.44	145.63±5.32	1009.63±164.44
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	5.51±1.50	6.67±0.78	128.62±13.98	987.75±75.29
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	6.59±2.24	8.86±0.32	147.75±5.50	1063.25±160.09

2.5 动物血生化

与同期正常对照组比较,30 d 染毒组雌鼠血清 Ca、P 降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。雄鼠血清 Cr、BUN 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), LDH 降低 ($P<0.01$), 但 LDH 水平降低无生物学意义;90 d 染毒组雌鼠血清 BUN、P 升高 ($P<0.01$) 及 Na、Cl 降低 ($P<0.01$), 雄

鼠血清 BUN、TP 升高 ($P<0.05$)。具体数据内容详见表 4、5。

2.6 大体解剖

与同期正常对照组比较,30 d 染毒组脑、心脏、肝、脾、肺、肾、肾上腺、气管、卵巢、睾丸和附睾组织,脏器位置、大小、形状、硬度、外观颜色均未见明

表 4 大鼠血清生化指标结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 4 Results of Serum biochemical indexes in rats

性别 Gender	组别 Groups	生化指标 Serumbiochemical indexes							
		AST (U/L)	ALT (U/L)	ALB (g/L)	ALP (U/L)	TP (g/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	LDH (U/L)	TC (mmol/L)
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	102.50 $\pm$ 12.29	45.50 $\pm$ 12.18	31.18 $\pm$ 1.40	191.38 $\pm$ 38.81	50.81 $\pm$ 2.58	1.08 $\pm$ 0.27	783.71 $\pm$ 197.40	1.75 $\pm$ 0.17
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	76.38 $\pm$ 8.40	35.00 $\pm$ 4.21	41.94 $\pm$ 3.28	49.00 $\pm$ 11.01	65.08 $\pm$ 3.39	1.51 $\pm$ 0.58	593.13 $\pm$ 166.80	2.58 $\pm$ 0.42
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	112.00 $\pm$ 12.57	47.13 $\pm$ 7.74	31.74 $\pm$ 1.29	187.88 $\pm$ 22.63	51.64 $\pm$ 2.33	1.10 $\pm$ 0.20	872.86 $\pm$ 127.84	1.64 $\pm$ 0.22
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	73.38 $\pm$ 26.26	38.50 $\pm$ 11.59	43.63 $\pm$ 3.23	41.38 $\pm$ 5.78	67.44 $\pm$ 4.00	1.81 $\pm$ 0.27	408.63 $\pm$ 263.25	2.33 $\pm$ 0.47
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	124.38 $\pm$ 25.59	40.13 $\pm$ 9.42	33.65 $\pm$ 1.74	85.25 $\pm$ 12.28	54.28 $\pm$ 2.70	0.95 $\pm$ 0.37	1326.71 $\pm$ 357.21	2.15 $\pm$ 0.36
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	75.63 $\pm$ 13.10	36.75 $\pm$ 7.32	29.74 $\pm$ 2.14	92.75 $\pm$ 15.58	53.85 $\pm$ 2.33	1.14 $\pm$ 0.27	581.63 $\pm$ 168.82	1.59 $\pm$ 0.44
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	113.13 $\pm$ 15.23	36.88 $\pm$ 7.10	34.04 $\pm$ 1.52	101.63 $\pm$ 18.01	53.59 $\pm$ 2.67	1.18 $\pm$ 0.21	887.00 $\pm$ 192.77**	2.03 $\pm$ 0.42
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	87.63 $\pm$ 15.00	39.13 $\pm$ 6.08	31.48 $\pm$ 1.39	83.13 $\pm$ 19.46	56.65 $\pm$ 2.42*	1.23 $\pm$ 0.29	676.00 $\pm$ 230.52	1.64 $\pm$ 0.30

注:与同期正常对照组同性别大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with normal control group at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 5 大鼠血清生化指标结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 5 Results of Serum biochemical indexes in rats

性别 Gender	组别 Groups	生化指标 Serumbiochemical indexes							
		TG (mmol/L)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)	Na (mmol/L)	K (mmol/L)	Cl (mmol/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.78 $\pm$ 0.30	28.00 $\pm$ 2.07	6.25 $\pm$ 0.64	140.41 $\pm$ 0.56	4.14 $\pm$ 0.35	101.91 $\pm$ 0.75	2.33 $\pm$ 0.09	3.55 $\pm$ 0.21
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	2.23 $\pm$ 0.14	19.13 $\pm$ 2.85	7.31 $\pm$ 1.33	145.99 $\pm$ 1.07	4.53 $\pm$ 0.42	106.50 $\pm$ 1.47	2.50 $\pm$ 0.06	1.79 $\pm$ 0.23
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.81 $\pm$ 0.26	28.00 $\pm$ 2.62	5.77 $\pm$ 0.76	141.16 $\pm$ 0.92	4.14 $\pm$ 0.26	101.80 $\pm$ 1.33	2.21 $\pm$ 0.09*	3.04 $\pm$ 0.20**
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	2.42 $\pm$ 0.34	18.63 $\pm$ 2.97	8.69 $\pm$ 1.05*	143.29 $\pm$ 1.14**	4.32 $\pm$ 0.34	102.94 $\pm$ 0.99**	2.57 $\pm$ 0.08	2.21 $\pm$ 0.25**
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.58 $\pm$ 0.21	30.75 $\pm$ 2.82	6.65 $\pm$ 0.73	142.08 $\pm$ 1.05	4.30 $\pm$ 0.36	102.23 $\pm$ 0.56	2.39 $\pm$ 0.04	2.53 $\pm$ 0.24
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	2.40 $\pm$ 0.41	18.50 $\pm$ 4.75	6.87 $\pm$ 1.53	144.61 $\pm$ 1.26	4.90 $\pm$ 0.52	105.31 $\pm$ 1.96	2.29 $\pm$ 0.07	2.33 $\pm$ 0.21
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.74 $\pm$ 0.14	36.25 $\pm$ 3.20**	7.72 $\pm$ 1.00*	142.79 $\pm$ 1.19	4.13 $\pm$ 0.15	102.79 $\pm$ 1.45	2.33 $\pm$ 0.08	2.46 $\pm$ 0.34
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	2.18 $\pm$ 0.35	18.50 $\pm$ 4.63	8.60 $\pm$ 1.19*	145.21 $\pm$ 1.40	4.73 $\pm$ 0.40	105.50 $\pm$ 1.53	2.36 $\pm$ 0.06	2.49 $\pm$ 0.12

注:与同期正常对照组同性别大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with normal control group at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

显异常改变,未见明显渗出、增生、水肿、萎缩等病变;90 d 染毒组可见 1 例雌鼠肾表面多个囊肿,2 例雄鼠肝表面见黄色斑块,其余脏器未见异常。

2.7 脏器系数

与同期正常对照组比较,30 d 染毒组雌鼠脏器官系数降低($P<0.01$),雄鼠肾上腺脏器官系数增大($P<0.01$);90 d 染毒组雌鼠肺和卵巢脏器官系数增大($P<0.05$),雄鼠肾上腺脏器官系数增大($P<0.05$)。

见表 6、表 7。

2.8 组织病理学

30 d 正常对照组大鼠脑、心脏、肝、肺、肾脏、气管、睾丸、附睾、卵巢、胸腺、肾上腺均未见明显病理异常。30 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 3 例(雌性 2 例,雄性 1 例),肺细小支气管上皮脱落 3 例(雌性 1 例,雄性 2 例),肾囊肿 1 例(雌性 1 例),睾丸个别曲细精管萎缩 1 例,其余脏器未见明显病理异常。

表 6 大鼠脏器系数结果(心脏、肝、脾、肺, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 6 Results of viscera coefficient in rats (heart, liver, spleen, lungs)

性别 Gender	组别 Groups	脏器系数(%) Viscera coefficient			
		心脏 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lungs
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.3823±0.0457	3.3799±0.1247	0.2484±0.0380	0.4690±0.0424
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	0.3225±0.0132	3.1336±0.2588	0.1958±0.0185	0.3607±0.0206
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.3710±0.0209	2.9500±0.2762 **	0.2399±0.0241	0.4379±0.0235
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	0.3274±0.0228	3.1151±0.2370	0.1929±0.0229	0.3858±0.0209 *
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.3512±0.0277	2.9953±0.1928	0.2319±0.0197	0.3861±0.0294
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	0.2881±0.0229	2.9646±0.2612	0.1664±0.0188	0.3039±0.0359
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.3707±0.0249	2.8544±0.1548	0.2331±0.0133	0.4015±0.0299
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	0.2923±0.0345	2.8187±0.3408	0.1613±0.0181	0.2892±0.0300

注:与同期正常对照组同性别大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Compared with normal control group at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 7 大鼠脏器系数结果(肾、肾上腺、胸腺、睾丸、卵巢, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 7 Results of viscera coefficient in rats (kidney, adrenal glands, thymus, testis, ovary)

性别 Gender	组别 Groups	脏器系数(%) Viscera coefficient				
		肾 Kidney	肾上腺 Adrenal glands	胸腺 Thymus	睾丸 Testis	卵巢 Ovary
♀	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.7596±0.0644	0.0289±0.0044	0.2485±0.0130	/	0.0591±0.0061
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	0.6627±0.0308	0.0224±0.0024	0.1204±0.0291	/	0.0386±0.0053
	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.7204±0.0347	0.0288±0.0050	0.2472±0.0359	/	0.0539±0.0071
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	0.6861±0.0660	0.0224±0.0024	0.1458±0.0341	/	0.0461±0.0050 *
	30 d 正常对照组 30 days normal control group	0.7583±0.0650	0.0150±0.0015	0.1975±0.0281	0.9985±0.0940	/
	90 d 正常对照组 90 days normal control group	0.6277±0.0461	0.0096±0.0010	0.0856±0.0191	0.6471±0.0713	/
♂	30 d 染毒组 30 days of exposure group	0.7795±0.0442	0.0202±0.0030 **	0.1953±0.0285	1.0506±0.1028	/
	90 d 染毒组 90 days of exposure group	0.6153±0.0728	0.0112±0.0013 *	0.0937±0.0211	0.6588±0.1150	/

注:与同期正常对照组同性别大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

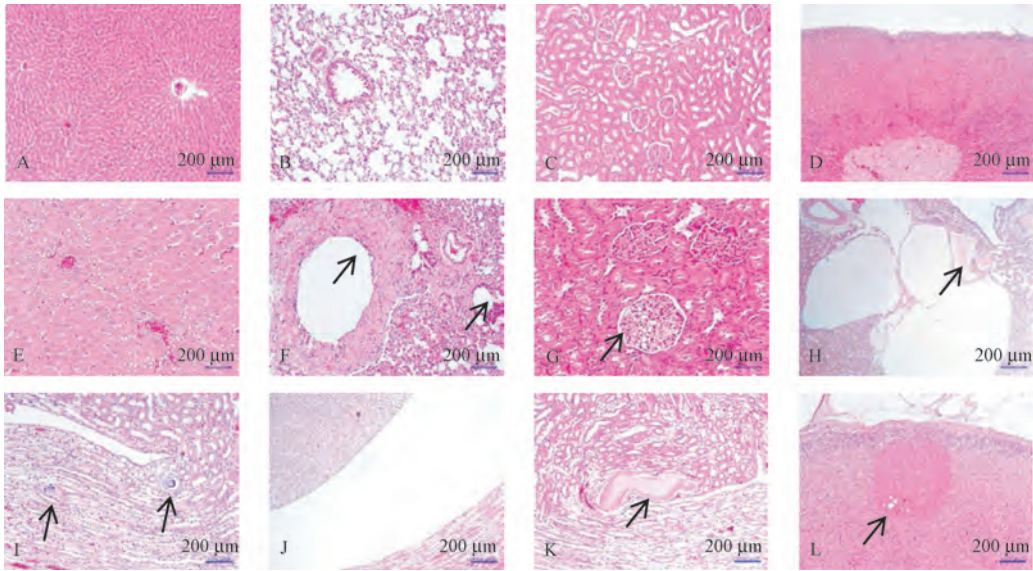
Note. Compared with normal control group at the same time, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

90 d 正常对照组大鼠脑、心脏、脾、肺、气管、睾丸、附睾、卵巢、胸腺、肾上腺均未见明显病理异常,肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 5 例(雌性 1 例,雄性 4 例),考虑为自发病变。90 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 6 例(雌性 1 例,雄性 5 例);肺细小支气管上皮脱落 2 例(雌雄各 1 例);肾个别肾

小球毛细血管扩张 2 例(雌性 2 例),肾囊肿 1 例(雌性 1 例),透明管型 4 例(雌性 3 例,雄性 1 例),矿化 1 例(雌性 1 例),肾盂积水 1 例(雄性 1 例);肾上腺束状带细胞灶性肥大 1 例(雌性 1 例);睾丸个别曲细精管萎缩 2 例,其余脏器未见明显病理异常。见表 8、图 1。

表 8 大鼠病理组织学检查结果
Table 8 Histopathological examination results of rats

组别 Groups	肝汇管区肝 细胞轻度 脂肪变性 Mild steatosis of hepatocytes in the hepatic portal area	肺细小支气 管上皮脱落 Exfoliation of bronchoalveolar epithelium	肾病理改变 Pathological changes of kidney					肾上腺束状 带细胞灶 性肥大 Cellular focal hypertrophy of adrenal zona fasciculata	睾丸个别曲 细精管萎 缩 Individual convoluted tubule atrophy of testis
			个别肾小球毛 血管扩张 Individual glomerular telangiectasia of kidney	肾囊肿 Renal cyst	透明 管型 Hyaline cast of kidney	矿化 Minerali- zation	肾盂积水 Hydrone- phrosis		
30 d 正常对照组 30 days normal control group	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90 d 正常对照组 90 days normal control group	雌 1 雄 4 ♀ 1 ♂ 4	0	0	0	0	0	0	0	0
30 d 染毒组 30 days of exposure group	雌 2 雄 1 ♀ 2 ♂ 1	雌 1 雄 2 ♀ 1 ♂ 2	0	雌 1 ♀ 1	0	0	0	0	雄 1 ♂ 1
90 d 染毒组 90 days of exposure group	雌 1 雄 5 ♀ 1 ♂ 5	雌 1 雄 1 ♀ 1 ♂ 1	雌 2 ♀ 2	雌 1 ♀ 1	雌 3 雄 1 ♀ 3 ♂ 1	雌 1 ♀ 1	雄 1 ♂ 1	雌 1 ♀ 1	雄 2 ♂ 2



注:A:正常肝;B:正常肺;C:正常肾;D:正常肾上腺;E:汇管区肝细胞轻度脂肪变性;F:肺细小支气管上皮脱落;G:肾小球毛细血管扩张;H:肾囊肿多个、肾透明管型;I:矿化;J:肾盂积水;K:肾透明管型;L:肾上腺束状带细胞灶性肥大。

图 1 大鼠组织病理学检查结果

Note. A, Normal liver. B, Normal lung. C, Normal kidney. D, Normal adrenal glands. E, Mild steatosis of hepatic cells in portal area. F, Exfoliation of bronchoalveolar epithelium. G, Glomerular telangiectasia of kidney. H, Multiple renal cysts and hyaline cast of kidney. I, Mineralization. J, Hydronephrosis. K, Hyaline cast of kidney. L, Cellular focal hypertrophy of adrenal zona fasciculata.

Figure 1 Histopathological examination results of rats

3 讨论

据报道,受“毒跑道”影响的 1000 多名小学生中,135 人肝功、肾功及尿酸指标异常,98 人凝血功能异常,9 人胸片上肺纹理改变^[13]。因此,研究塑胶跑道的吸入毒性,开展塑胶跑道面层材料的健康危害研究迫在眉睫。

如何真实客观地评价塑胶跑道面层材料对大鼠的影响,染毒方式最为重要。学者就相近暴露材料,如室内装修材料、建筑材料等,多采用典型空气污染复合物的方法评价其吸入毒性^[14-15]。我们认为,采用载荷比 $0.4 \text{ m}^2/\text{m}^3$,加热温度 60°C 的条件处理塑胶跑道面层材料更能模拟高温暴露。因此,本研究构建了全塑型塑胶面层材料的大鼠吸入染毒模型,从血液学和脏器组织病理学方面探讨其吸入毒性。

TT 反映的是血液中纤维蛋白原转为纤维蛋白的时间,而纤维蛋白原是由肝合成的,TT 的变化可能与动物的肝脏受到吸入毒性有关^[16]。APTT 反映了大鼠内源性凝血系统的和凝血功能的状态。本研究凝血结果显示,30 d 染毒组雄鼠 TT 时间缩短,90 d 染毒组雌鼠 APTT 延长,该两个指标的变化,与报道中学生凝血功能异常一致。

血清肌酐反映肾小球滤过功能,还可估计肾的损伤程度。血清尿素氮取决于肾的排泄能力,一定程度上反映肾小球滤过功能^[17-18]。本研究血生化结果显示,30 d 染毒组雄鼠 Cr、BUN 同时增加,90 d 染毒组雌、雄鼠 BUN 水平均增加,提示 30、90 d 吸入全塑型塑胶跑道面层材料导致大鼠肾小球滤过功能下降,对肾产生不良影响,与“毒跑道”事件报道中受害学生肾功能指标异常一致。

钙在机体通过肠管及肾排泄,同时也受到肾上腺分泌激素的调节,而肾是排泄磷的主要器官,Na、Cl 的调节代谢主要在肾,钙、磷的吸收和代谢受血清 pH 值、维生素 D、甲状旁腺激素及降钙素等的调控^[18]。30 d 染毒组雌鼠血清 Ca、P 水平下降,猜测可能是由于酸中毒或者维生素 D、甲状旁腺激素及降钙素等水平的改变,导致肾小管对 Ca 的重吸收降低,排磷增加。90 d 染毒组雌鼠血清 P 水平增加,Na、Cl 降低,可能与肾小球滤过率降低导致排泌磷酸盐、Na、Cl 的能力下降有关^[18]。

本研究组织病理学观察结果显示,30 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 3 例,肺细小支

气管上皮脱落 3 例,肾囊肿 1 例,睾丸个别曲细精管萎缩 1 例。结果提示,30 d 吸入暴露全塑型塑胶跑道面层材料对 SD 大鼠的肺、肝、睾丸、肾影响较轻。90 d 染毒组大鼠肝汇管区轻度肝细胞脂肪变性 6 例,肺细小支气管上皮脱落 2 例,肾上腺束状带细胞灶性肥大 1 例,睾丸个别曲细精管萎缩 2 例,肾个别肾小球毛细血管扩张 2 例、肾囊肿 1 例、透明管型 4 例、矿化 1 例、肾盂积水 1 例。结果提示,随着暴露时间延长,全塑型塑胶跑道层材料中发挥性有机化合物可引起大鼠肾损伤加重。

总之,血液毒性、脏器病理异常的产生是多因素、多种途径综合作用的结果,大鼠受全塑型塑胶跑道面层材料的吸入毒性的影响是复杂的,上述指标可为毒性评价提供一定的参考,具体损伤机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Huang YC, Tsuang W. Health effects associated with faulty application of spray polyurethane foam in residential homes [J]. *Environ Res*, 2014, 134: 295-300.
- [2] Tsuang W, Huang YC. Asthma induced by exposure to spray polyurethane foam insulation in a residential home [J]. *J Occup Environ Med*, 2012, 54(3): 272-273.
- [3] Boor BE, Järnström H, Novoselac A, et al. Infant exposure to emissions of volatile organic compounds from crib mattresses [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(6): 3541-3549.
- [4] Pinkerton LE, Yiin JH, Daniels RD, et al. Mortality among workers exposed to toluene diisocyanate in the US polyurethane foam industry: update and exposure-response analyses [J]. *Am J Ind Med*, 2016, 59(8): 630-643.
- [5] Norwegian Institute of Public Health and the Radium Hospital. Artificial turf pitches-an assessment of health risks for football players and the environment [R]. Oslo, 2006.
- [6] Turfgrass Producers International. An assessment of environmental toxicity and potential contamination from artificial turf using shredded or crumb rubber [R]. Woodland, 2006.
- [7] 王萍, 张艳艳, 陶兰天. 塑胶跑道面层有害物质释放的无损检验研究 [J]. *质量与认证*, 2020, 11(1): 77-79.
- [8] 刘干, 郑伟涛, 王虹. 聚氨酯塑胶跑道总挥发性有机化合物的检测及潜在健康影响分析 [J]. *科学技术与工程*, 2021, 21(6): 2539-2543.
- [9] 李枫. 塑胶跑道材料生命周期评价与毒跑道问题防控 [D]. 厦门: 厦门大学, 2018.
- [10] 中国国家标准化管理委员会. 中小学合成材料面层运动场地: GB 36246-2018 [S]. 2018.
- [11] 上海市化学建材行业协会、上海市消费者权益保护委员会. 学校运动场地塑胶面层有害物质限量: T/310101002-C003-2016 [S]. 2016.
- [12] 新浪教育网. 全国多省现疑似“毒跑道”事件检测结果均合

- 格 [EB/OL]. [2016-06-14]. <http://edu.sina.com.cn/zxx/2016-06-14/doc-ifsxzkzy5255366.shtml>.
- [13] 经济观察报. 校园“毒跑道”再现 浙江三门实验小学数百名学生身体指标异常 [EB/OL]. [2019-01-04]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1621699282899743383>.
- [14] 王凡. 典型室内空气复合污染物对多靶器官毒性评价研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2013.
- [15] 张红. 孕早期暴露低浓度家装污染联合高温环境对仔鼠中枢神经系统的影响 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
- [16] 郭素玲, 许德英. 肝脏病患者凝血系列指标分析 [J]. 中国现代医生, 2013, 51(19): 70-72.
- [17] 程笑, 杨滢霖, 李伟瀚, 等. 山柰酚对 LPS 诱导小鼠急性肾损伤作用及机制探讨 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 55(17): 1439-1442.
- [18] 周新, 府伟玲. 临床生物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.

[收稿日期]2021-12-22

(上接第 33 页)

Caspase9 表达上升, Bcl-2 表达降低, 而真武汤可显著降低 Bax、Caspase3、Caspase8、Caspase9 表达, 提高 Bcl-2 表达水平, PI3K、p-AKT1、AKT1 表达水平下降。提示真武汤可能通过调控 PI3K-AKT 通路, 抑制凋亡相关蛋白表达, 进而改善心室重构, 增强心肌收缩力, 延缓心衰进程。

参考文献:

- [1] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.
- [2] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要 [J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.
- [3] 祝珍珍, 袁灿宇, 袁智宇, 等. 心力衰竭的古病名探究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(11): 1509-1511.
- [4] 韩安邦, 张健, 路迎冬, 等. 芪苈强心胶囊对心肌梗死大鼠心肌纤维化及 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(1): 41-47.
- [5] 李家庚, 屈松柏. 实用中医心血管病学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1993.
- [6] 李立志. 陈可冀治疗充血性心力衰竭经验 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4(2): 136-138.
- [7] 李瑞, 杨培君, 张荣新. 充血性心力衰竭的中医病机探讨 [J]. 现代中医药, 2003, 1: 13-14.
- [8] 程丑夫, 张炜宁. 心衰的中医病证归属浅析 [J]. 山东中医药大学学报, 1998, 22(2): 3-5.
- [9] 张子彬, Tsung O, Cheng MD. 充血性心力衰竭 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1997.
- [10] 王远平, 熊杰, 严夏, 等. 真武汤加减治疗充血性心力衰竭的 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3679-3685.
- [11] 彭志林, 卢健棋, 温志浩, 等. 真武汤治疗心肾阳虚型慢性心力衰竭临床疗效的系统评价 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3101-3106.
- [12] Li H, Huang J, Liu C, et al. A new model of heart failure post-myocardial infarction in the rat [J]. J Vis Exp, 2021, 172: 1-5.
- [13] 李小茜, 何建成. 充血性心力衰竭中医证候动物模型研究思考 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 831-836.
- [14] McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. Eur Heart J, 2021, 42(36): 3599-3726.
- [15] 彭伟, 王琳, 傅超美, 等. 基于网络药理学的附子抗心力衰竭作用和心脏毒性的毒效二重性研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 523-529.
- [16] Zhang X, Xu X, Lu L, et al. A new Mfn-2 related synthetic peptide promotes vascular smooth muscle cell apoptosis via regulating the mitochondrial apoptotic pathway by inhibiting Akt signaling [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 1-14.
- [17] Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285(3): 416-431.
- [18] Chaanine AH, Hajjar RJ. AKT signalling in the failing heart [J]. Eur J Heart Fail, 2011, 13(8): 825-829.

[收稿日期]2021-11-01

刘兰,张东雪,张胜雷,等. miR-30b 在高磷诱导的血管平滑肌细胞凋亡中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 58-65.

Liu L, Zhang DX, Zhang SL, et al. High phosphorus promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells by inhibiting miR-30b [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 58-65.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.008

miR-30b 在高磷诱导的血管平滑肌细胞凋亡中的作用

刘 兰,张东雪,张胜雷*,白亚玲

(河北医科大学第四医院 肾内科,石家庄 050011)

【摘要】 目的 观察微小 RNA30b (microRNA 30b, miR-30b) 在高磷诱导的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 凋亡中的作用及机制。**方法** 体外培养大鼠胸主动脉 VSMCs, 分为正常组和高磷组 (给予 10 mmol/L β -甘油磷酸盐刺激)。采用实时荧光定量 PCR 检测各组 VSMCs miR-30b 表达、Western blot 法测定促凋亡基因 BAX、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达情况, 采用 MTT 法检测各组细胞的增殖情况、采用流式细胞法检测各组细胞的凋亡情况。为进一步验证 miR-30b 对 VSMCs 凋亡的影响, 给与转染 miR-30b 的抑制物 inhibitor-30b 和类似物 mimic-30b, 观察 VSMCs 增殖和凋亡情况以及 BAX、Bcl-2 表达情况。**结果** (1) 高磷对 VSMCs 凋亡的影响: 流式结果显示, 高磷组 VSMCs 凋亡细胞显著增多 ($P < 0.05$); MTT 结果显示, 高磷组细胞增殖减少 ($P < 0.05$); 高磷组 BAX 表达升高、Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$); 高磷组 miR-30b 的表达显著下降 ($P < 0.05$)。 (2) miR-30b 对 VSMCs 凋亡的影响: 转染 inhibitor-30b 后 VSMCs 凋亡细胞显著增多 ($P < 0.05$); 转染 inhibitor-30b 后 MTT 显示细胞增殖减少 ($P < 0.05$); 转染 inhibitor-30b 后, BAX 表达升高、Bcl-2 表达降低 ($P < 0.05$); 转染 mimic-30b 后 VSMCs 凋亡细胞显著减少 ($P < 0.05$); 转染 mimic-30b 后, BAX 表达降低、Bcl-2 表达升高 ($P < 0.05$)。**结论** 高磷可以诱导细胞凋亡, 其可能机制之一是高磷通过抑制 miRNA-30b 表达, 进而促进凋亡基因 BAX 表达, 降低抑凋亡基因 Bcl-2 表达, 导致 VSMCs 发生凋亡。

【关键词】 血管平滑肌细胞; 高磷; 凋亡; miR-30b; BAX

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0058-08

High phosphorus promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells by inhibiting miR-30b

LIU Lan, ZHANG Dongxue, ZHANG Shenglei*, BAI Yaling

(Department of Nephrology, the Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【Abstract】 Objective To observe the role and mechanism of miR-30b in apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by high phosphorus. **Methods** VSMCs from the rat thoracic aorta were cultured *in vitro* and divided into a normal group and high phosphorus group stimulated by 10 mmol/L β -glycerophosphate. Expression of miR-30b in VSMCs was quantified by Real-time PCR, and expression of pro-apoptotic protein BAX and anti-apoptotic protein Bcl-2 was determined by Western blot. Cell proliferation was assessed by MTT assays, and apoptosis was detected by flow cytometry. To verify the effect of miR-30b on VSMCs apoptosis, inhibitor-30b and mimic-30b were applied to observe changes in proliferation and apoptosis of VSMCs and expression of BAX and Bcl-2. **Results** (1) The effect of high phosphorus on apoptosis of VSMCs;

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题 (20180513, 20190702)。

[作者简介] 刘兰 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床内科学、肾脏病、血管钙化。E-mail: liulan807@163.com

[通信作者] 张胜雷 (1984—), 博士, 主治医师, 研究方向: 临床内科学、肾脏病、血管钙化。E-mail: lei06352511@126.com

Flow cytometry showed that apoptosis cells of VSMCs in high phosphorus group increased significantly ($P < 0.05$). The results of MTT showed that the proliferation of cells in high phosphorus group decreased ($P < 0.05$). The expression of BAX increased and Bcl-2 decreased in high phosphorus group ($P < 0.05$). The expression of miR-30b in high phosphorus group decreased significantly ($P < 0.05$). (2) Effect of miR-30b on apoptosis of VSMCs: After transfection of inhibitor-30b, the number of apoptotic cells in VSMCs increased significantly ($P < 0.05$). After transfection of inhibitor-30b, MTT assay showed that cell proliferation decreased ($P < 0.05$). The expression of BAX increased and the expression of Bcl-2 decreased after transfection of inhibitor-30b ($P < 0.05$). After mimic-30b transfection, the apoptotic cells of VSMCs decreased significantly ($P < 0.05$). After transfection of mimic-30b, the expression of BAX decreased and the expression of Bcl-2 increased ($P < 0.05$). **Conclusions** High phosphorus induces apoptosis. A possible mechanism is that high phosphorus inhibits miR-30b expression and then promotes expression of apoptosis gene BAX and decreases expression of anti-apoptosis gene Bcl-2, which leads to VSMCs apoptosis.

【Keywords】 vascular smooth muscle cells; high phosphorus; apoptosis; miR-30b; BAX

血管钙化能够增加心脏病、动脉粥样硬化斑块破裂、脑卒中的风险,是增加心血管疾病发病率和死亡率的重要危险因素^[1-2]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)凋亡是血管钙化的重要机制之一^[3]。此外,研究发现^[4], miRNAs 在细胞成骨转化、细胞转移及细胞凋亡中起重要作用。miR-30b 是 miR-30 家族的一员^[5],在人体组织中广泛表达,且已有报道显示,miR-30b 能够靶向调控人主动脉瓣膜间质细胞的钙化^[6]。但 miR-30b 在血管平滑肌细胞凋亡中的作用机制尚不明确。因此,本研究对大鼠 VSMCs 进行体外培养,在高磷环境中探讨 miR-30b 参与调节大鼠血管平滑肌细胞凋亡的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取 SPF 级雄性健康 SD 大鼠 6 只,4 周龄,体重约 80~100 g,由河北医科大学实验动物中心提供[SCXK(冀)2020-002],合格证编号:1305090。将实验动物饲养于河北医科大学第四医院实验动物中心[SYXK(冀)2018-001],环境温度 18℃~24℃,湿度 40%~60%,12 h/12 h 明/暗循环环境,饲料、饮水均经过高压灭菌处理。本研究已通过河北医科大学第四医院伦理委员会审核(2021KY044),所有动物实验操作均在 3R 原则的指导下给与实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养液(批号:31600-034)(美国 Gibco 公司);胎牛血清(批号:A0500-3210)(美国 Cegrogen 公司); β -甘油磷酸(批号:SLCD0875)(美国 Sigma 公司);RNA 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒(批号:R11068.5)(锐博生物公司);

miR-30b 的抑制物(批号:R11035.4)(锐博生物公司);GAPDH 抗体(批号:AP0063)(美国 Proteintech,公司);BAX 抗体(批号:50599-2-Ig)(美国 Proteintech 公司);Bcl-2 抗体(批号:AF6139)(美国 Affinity 公司);山羊抗兔二抗(批号:5220-0336)(美国 Seracare 公司)。

实时荧光定量 PCR 仪(批号:QuantStudio DX)(美国 life 公司);倒置相差显微镜(批号:Axio Observer D1)(日本 OLYMPUS 公司);细胞培养箱(批号:150i)(美国 Sheldon 公司);酶标仪(批号:Cytation III)(美国 Biotek 公司);蛋白电泳仪(批号:10025025 Rev A 12-0625 0312)(美国 BIO-RAD 公司);凝胶成像系统(批号:FR0146)(美国 Proteinsimple 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验模型的制备与分组

对实验大鼠进行称重,根据体重腹腔注射 200 mg/kg 的戊巴比妥钠进行麻醉,75%乙醇溶液浸泡消毒 10 min 后,经腹部中线纵行切口,依次分离进入胸腔,取大鼠胸主动脉,分离中膜层,剪成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块,均匀铺于瓶底,组织贴壁法对 VSMCs 行原代培养。贴壁细胞占底壁的 80%~90% 时进行传代,使用 PBS 液冲洗 2 次,胰酶消化 1 min,加入等量完全培养基,吹打混匀,收集细胞并离心后,按 1:2 进行传代培养。传代至第 3~4 代将细胞分为两组:正常组和高磷组(给予 10 mmol/L β -甘油磷酸盐),干预 7 d 后检测 miR-30b、BAX、Bcl-2 等指标的变化。为进一步验证 miR-30b 对 VSMCs 的作用,给予转染 miR-30b 的抑制物 inhibitor-30b,将细胞分为 3 组:(1)正常组:细胞未转染;(2)inhibitor-NC 组:转染 20 μ mol/L 抑制物的对照 inhibitor-NC 5 μ L;(3)inhibitor-30b 组:转染 20

$\mu\text{mol/L}$ 抑制物 inhibitor-30b 2.5 μL 。转染 72 h 后检测凋亡情况。为进一步验证高磷环境中 miR-30b 的作用,给予转染 miR-30b 的类似物 mimic-30b,将细胞分为 3 组:(1)高磷组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,细胞未转染;(2)高磷+mimic-NC 组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,转染 20 $\mu\text{mol/L}$ 类似物的对照 mimic-NC 5 μL ;(3)高磷+mimic-30b 组:10 mmol/L β -甘油磷酸盐培养,转染 20 $\mu\text{mol/L}$ 类似物 mimic-30b 5 μL 。转染 72 h 后检测凋亡情况。

1.3.2 细胞 SM22 α 免疫组化染色

取出细胞用 4% 的中性福尔马林固定 30 min, PBS 洗 3 次,0.3% Triton-100,作用 20 min, PBS 洗 3 次, H_2O_2 作用 15 min, PBS 洗 3 次,加入 5% 山羊清封闭在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,加入 SM22 α 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日, PBS 洗 3 次,加入二抗 A 液,作用 30 min, PBS 洗 3 次,加入二抗 B 液,作用 30 min, PBS 洗 3 次,加入 DAB 显色液作用 30 s,自来水洗 3 次,苏木素复染,脱水封片。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖能力

接种于 96 孔板中的血管平滑肌细胞融合达 60%~70% 给予刺激,每组设 3 个复孔。取 MTT (5 mg/mL) 各检测孔加入 20 μL ,培养箱中培养 4 h,弃去培养液,取二甲亚砜各检测孔加入 150 μL ,于室温振荡 10 min。酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度(A)值,记录结果。

1.3.4 流式细胞法检测细胞的凋亡

给予刺激后,收集细胞,根据试剂说明书进行 Annexin V-PE/7-AAD 双重染色,流式细胞仪检测,右上象限 Annexin V 为阳性、7-AAD 为阳性,为晚期凋亡细胞;右下象限 Annexin V 为阳性、7-AAD 为阴性,为早期凋亡细胞。实验重复 3 次。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 检测各组 miR-30b 表达
分别提取各组的 miR-30b。实验均重复 3 次。锐博生物提供的 miR-30b 和 U6 的引物,U6 为内参,反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环,重复 3 次。

1.3.6 Western blot 检测 Bcl-2、BAX 蛋白的表达

提取各组 VSMCs 的蛋白质,配制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(10%),加样 20 μg 蛋白质,进行电泳 1.5 h(95 V 恒压)。后转膜 1 h(恒压 95 V),洗膜 3 次,牛清(5%)封闭 1 h。加入一抗稀释液(BAX 1:2000, Bcl-2 1:1000, GAPDH 1:5000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日加二抗稀释液(1:5000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。使用蛋白成像系统照膜,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

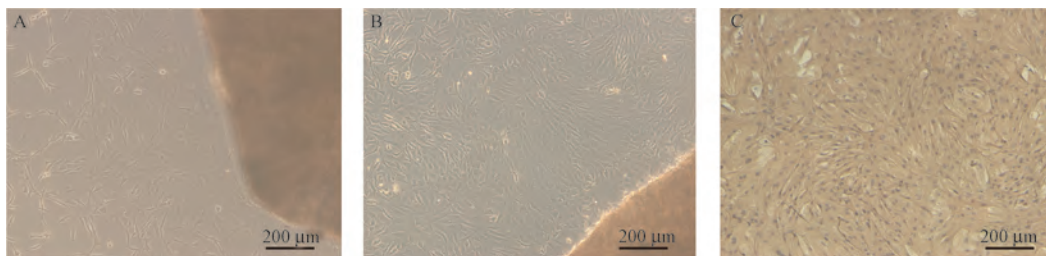
应用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计学处理,正态分布的计量资料结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高磷对 VSMCs 增殖凋亡的影响

2.1.1 VSMCs 的原代培养及细胞鉴定

VSMCs 原代培养第 3 天,即有血管平滑肌细胞从组织块周围爬出,长至第 7 天,组织块周围的细胞相互融合在一起,平行排列、呈束状,部分重叠在一起,呈“峰-谷”状生长。单个细胞呈梭形、不规则形,以梭形为主,细胞核为卵圆形。细胞 SM22 α 免疫组化染色可见细胞浆内呈棕黄色,胞质内的肌动蛋白被染成棕黄色,呈丝状沿细胞长轴平行分布细胞核为蓝色,SM22 α 染色为阳性,表明细胞为血管平滑肌细胞,见图 1。



注:A:原代培养第 3 天的组织块及爬出的血管平滑肌细胞;B:原代培养第 7 天的组织块及爬出的血管平滑肌细胞;C:血管平滑肌细胞 SM22 α 的免疫组化染色,呈棕黄色为阳性。

图 1 VSMCs 的原代培养及细胞鉴定

Note. A, Tissue block and crawled vascular smooth muscle cells on the 3rd day of primary culture. B, Tissue block and crawled vascular smooth muscle cells on the 7th day of primary culture. C, Immunohistochemical staining of SM22 α , a vascular smooth muscle cell, was brown and positive.

Figure 1 Primary culture and cell identification of VSMCs

2.1.2 高磷对大鼠 VSMCs 凋亡的影响

流式细胞仪结果显示,与正常组比较,高磷组细胞凋亡显著增多($t=-12.841, P<0.001$),有统计学差异($P<0.05$),见图 2。

2.1.3 高磷对大鼠 VSMCs 增殖的影响

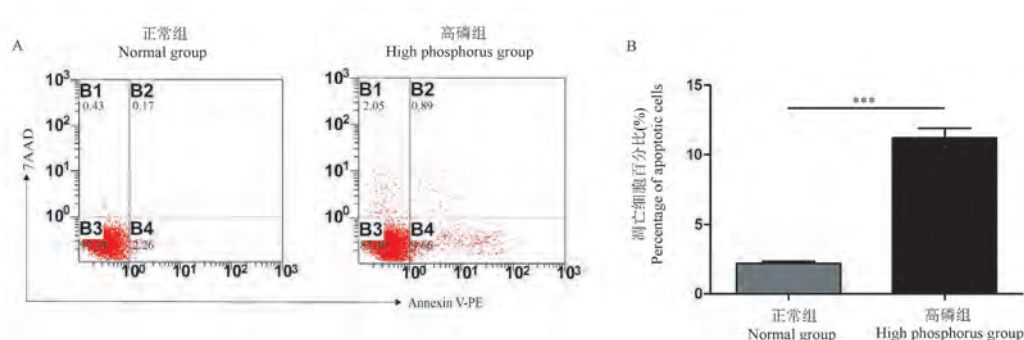
MTT 结果显示:与正常组比较,高磷组细胞增殖能力于 12、24、36、48 h 均显著降低($P<0.05$)。高磷组与正常组比较,0、12、24、36、48 h 分别为($t=0.105, P=0.921, t=13.03, P<0.001, t=16.892, P<0.001, t=12.659, P<0.001, t=18.049, P<0.001$),有统计学差异($P<0.05$),见图 3。

2.1.4 高磷对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 结果显示,高磷组 VSMCs 促凋亡基因 BAX 上调($t=-4.727, P=0.009$)、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显下降($t=-14.872, P<0.001$),有统计学差异($P<0.05$),见图 4。

2.2 高磷对大鼠 VSMCs miR-30b 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常组比较,高磷组 VSMCs miR-30b 的表达明显下降(1.00 ± 0.00 vs $0.387 \pm 0.05, t=19.497, P<0.05$),有统计学差异($P<0.05$),提示高磷能够抑制 miR-30b 的表达,见图 5。

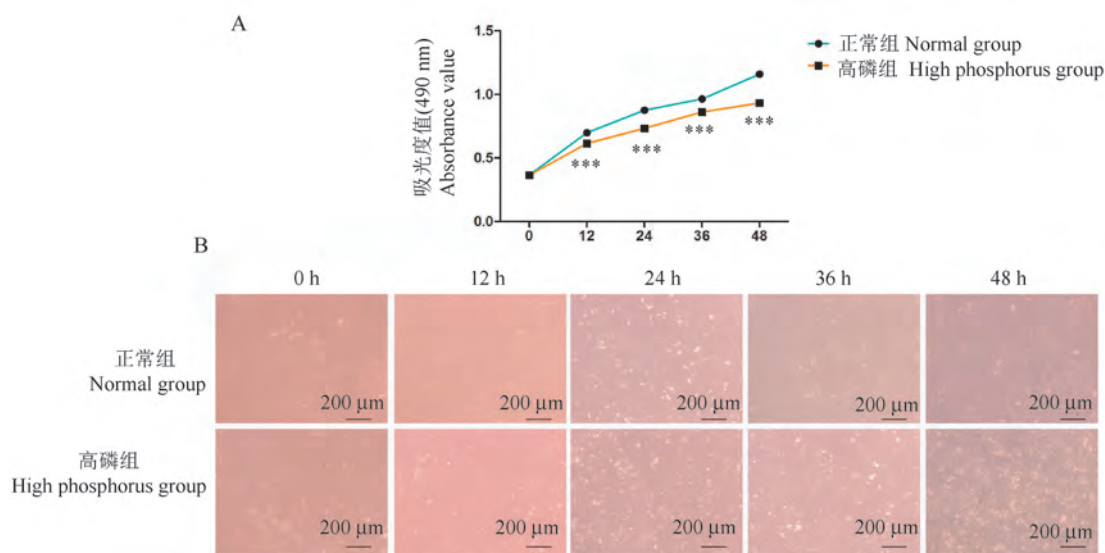


注:A:正常组与高磷组的流式结果;B:正常组与高磷组凋亡细胞百分比。与正常组相比, $*** P<0.001$ 。

图2 两组血管平滑肌细胞的凋亡情况($n=3$)

Note. A, Flow results of normal group and high phosphorus group. B, Percentage of apoptotic cells in normal group and high phosphorus group. Compared with normal group, $*** P<0.001$.

Figure 2 Apoptosis of vascular smooth muscle cells in two groups



注:A:各组细胞的 MTT 结果;B:各组细胞不同时间段的显微镜下照片。与正常组相比, $*** P<0.001$ 。

图3 两组血管平滑肌细胞的增殖情况($n=3$)

Note. A, MTT results of cells in each group. B, Microscopic photos of cells in each group at different time periods. Compared with normal group, $*** P<0.001$.

Figure 3 Proliferation of vascular smooth muscle cells in two groups

2.3 miR-30b 对 VSMCs 增殖凋亡的影响

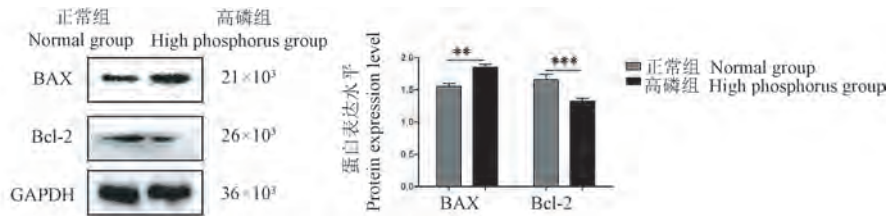
2.3.1 miR-30b 低表达对 VSMCs 凋亡的影响

流式结果显示,与正常组比较,inhibitor-30b 组 VSMCs 凋亡增多($P<0.001$),与 inhibitor-NC 组比较,inhibitor-30b 组 VSMCs 凋亡增多($P<0.001$)有统计学差异($P<0.05$),提示 miR-30b 低表达能够促

进 VSMCs 凋亡,见图 6。

2.3.2 miR-30b 低表达对 VSMCs 增殖的影响

MTT 结果显示:与正常组和 inhibitor-NC 组比较,inhibitor-30b 组细胞增殖能力于 12、24、36、48 h 均显著降低($P<0.05$)。正常组和 inhibitor-NC 组比较,无统计学差异($P>0.05$)。见图 7。

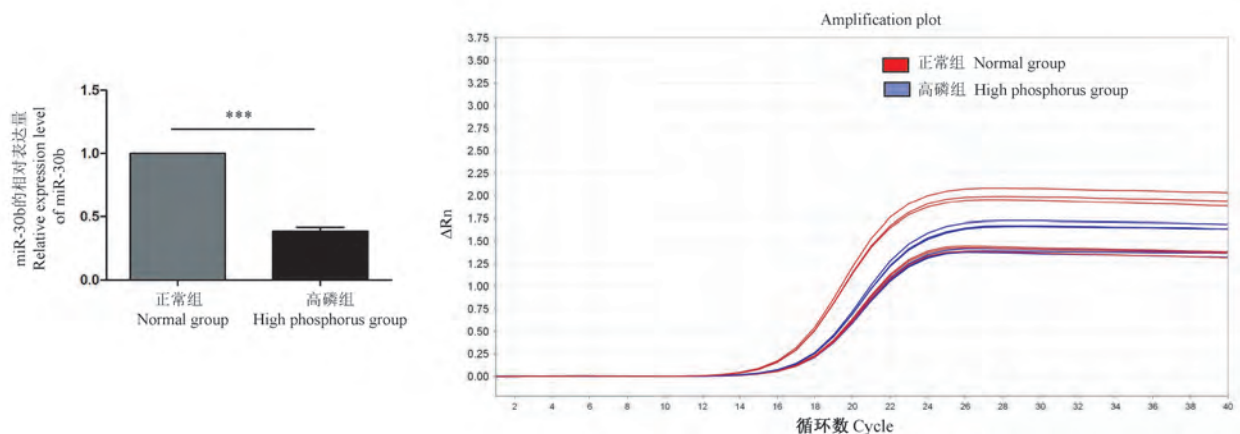


注:与正常组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 两组血管平滑肌细胞相关蛋白表达情况($n=3$)

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

Figure 4 Expression of vascular smooth muscle cells related proteins in two groups

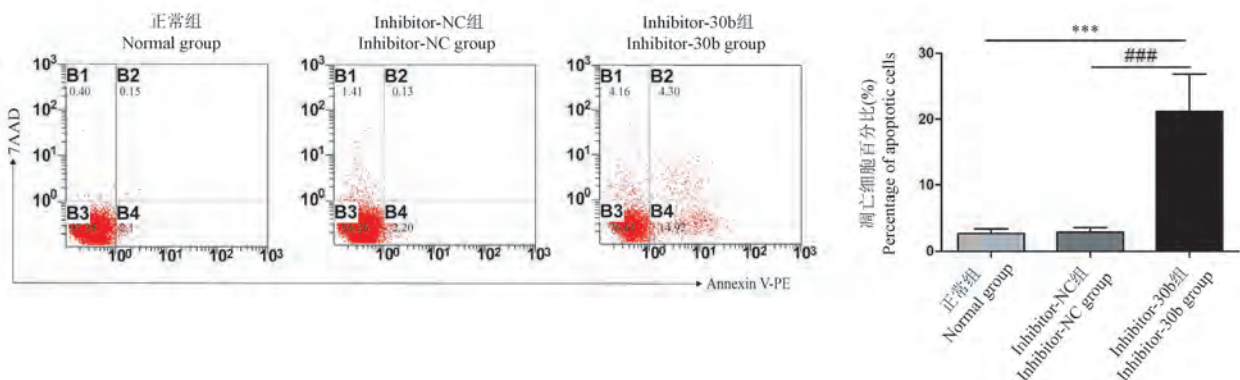


注:与正常组相比, *** $P<0.001$ 。

图 5 两组血管平滑肌细胞的 miR-30b 的表达($n=3$)

Note. Compared with normal group, *** $P<0.001$.

Figure 5 Expression of miR-30b in vascular smooth muscle cells of the two groups



注:与正常组相比, *** $P<0.001$;与 inhibitor-NC 组相比, ### $P<0.001$ 。

图 6 各组血管平滑肌细胞的凋亡情况($n=3$)

Note. Compared with normal group, *** $P<0.001$. Compared with inhibitor-NC group, ### $P<0.001$.

Figure 6 Apoptosis of vascular smooth muscle cells in each groups

2.3.3 miR-30b 低表达对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 印迹结果结果显示, inhibitor-30b 组 VSMCs 促凋亡基因 BAX 上调($P < 0.01$)、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显下降($P < 0.01$), 有统计学差异($P < 0.05$), 见图 8。

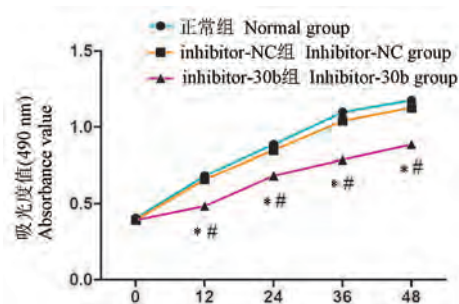
2.3.4 miR-30b 高表达对 VSMCs 凋亡的影响

流式结果显示, 与高磷组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 凋亡减少($P < 0.01$), 与高磷-mimic-NC 组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 凋亡减少($P < 0.01$), 有统计学差异($P < 0.05$), 提示 miR-30b 高表达能够抑制 VSMCs 凋亡, 见图 9。

2.3.5 miR-30b 高表达对 BAX、Bcl-2 表达的影响

Western blot 印迹结果结果显示, 与高磷组和高磷-mimic-NC 组比较, 高磷-mimic-30b 组 VSMCs 促凋亡

基因 BAX 下调、抑凋亡基因 Bcl-2 的表达明显上调, 有统计学差异($P < 0.05$), 见图 10。

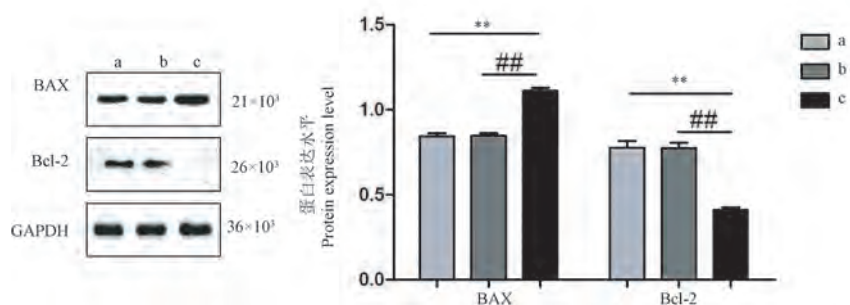


注: 与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 inhibitor-NC 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 各组血管平滑肌细胞的增殖情况

Note. Compared with normal group, * $P < 0.05$. Compared with inhibitor-NC group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Proliferation of vascular smooth muscle cells in each groups

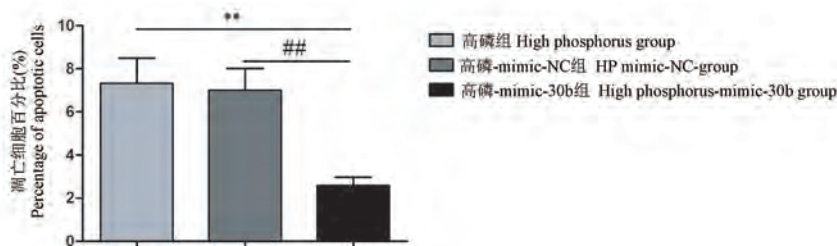
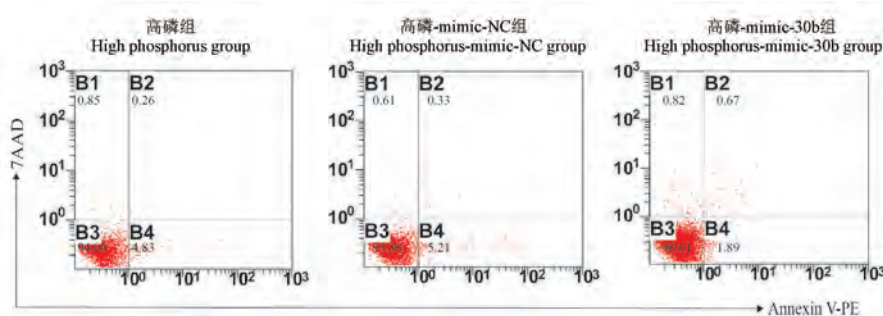


注: a: 正常组; b: inhibitor-NC 组; c: inhibitor-30b 组。与正常组相比, ** $P < 0.01$; 与 inhibitor-NC 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 8 各组血管平滑肌细胞相关蛋白表达情况 ($n = 3$)

Note. a, Normal group. b, Inhibitor-NC group. c, Inhibitor-30b group. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with inhibitor-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 8 Expression of vascular smooth muscle cell related proteins in each groups

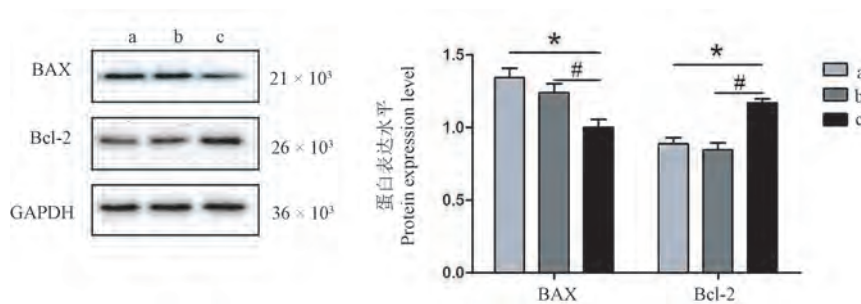


注: 与高磷组相比, ** $P < 0.01$; 与高磷-mimic-NC 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 9 miR-30b 高表达对血管平滑肌细胞凋亡的影响 ($n = 3$)

Note. Compared with High phosphorus group group, ** $P < 0.01$. Compared with High phosphorus-mimic-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 9 Effect of miR-30b overexpression on apoptosis of vascular smooth muscle cells



注: a: 高磷组; b: 高磷-mimic-NC 组; c: 高磷-mimic-30b 组。与高磷组相比, * $P < 0.05$; 与高磷-mimic-NC 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 10 miR-30b 高表达对相关蛋白表达的影响 ($n = 3$)

Note. a, High phosphorus group. b, High phosphorus-mimic-NC group. c, High phosphorus-mimic-30b group. Compared with High phosphorus group, * $P < 0.05$. Compared with High phosphorus-mimic-NC group, # $P < 0.05$.

Figure 10 Effect of miR-30b overexpression on expression of related proteins

3 讨论

心血管疾病死亡率增高的独立危险因素是血管钙化^[7]。而细胞凋亡是调控血管钙化的重要机制之一^[8]。而参与细胞凋亡的机制有多种,高磷血症是导致血管中膜钙化的重要危险因素之一^[9],而 VSMCs 是血管中膜的重要组成成分。因此本研究采用大鼠 VSMCs,给予高磷刺激,探究血管平滑肌细胞凋亡和血管钙化的发生机制。本研究结果显示,高磷可导致血管平滑肌细胞发生凋亡,其机制可能是通过下调 miR-30b 表达,促进凋亡蛋白 BAX 表达,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,进而引起血管平滑肌细胞发生了凋亡。

本研究给予高磷刺激,观察细胞增殖凋亡情况。MTT 结果提示高磷刺激的血管平滑肌细胞增殖显著减弱,流式检测结果提示高磷刺激的血管平滑肌细胞发生了凋亡。有研究表明,高磷可诱导血管平滑肌细胞发生凋亡,与本研究结果一致^[10]。高磷诱导发生凋亡的血管平滑肌细胞中 miR-30b 表达显著降低,促进凋亡蛋白 BAX 表达显著升高,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低。表明 miR-30b 参与了高磷诱导的 VSMCs 的凋亡过程。

miRNAs 是一类小的内源性非编码 RNA,长约 18~24 个核苷酸,具有调控功能,通过调节细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学过程调控血管钙化^[11]。研究发现 miRNA30 家族参与调控血管钙化^[12-13]。有关人结直肠癌的研究发现 miR-30b 可诱导细胞周期 G1 的停止和细胞凋亡^[14]。有关人主动脉瓣的研究发现 miR-30b 是主动脉瓣间质细胞的多功能调节

器^[6]。Xu 等^[15]在人肺成纤维细胞 WI-38 细胞实验中,下调 miR-30b 后人肺成纤维细胞 WI-38 细胞的 BAX 表达升高,凋亡增加。有研究证实,BAX 被激活并转移到线粒体,引起线粒体外膜通透化,导致细胞破坏,诱导凋亡^[16]。BAX 和 Bcl-2 是一对正负凋亡调节因子,BAX 起促进凋亡作用,Bcl-2 起抗凋亡作用^[17]。本研究为探究 miR-30b 与 VSMCs 凋亡的关系,给予转染 miR-30b 的抑制物,结果显示,转染 miR-30b 的抑制物后,流式检测结果及 MTT 显示,VSMCs 凋亡细胞增多、增殖显著降低;促凋亡蛋白 BAX 上调、抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显下降,表明 miR-30b 抑制物能够上调 BAX,下调 Bcl-2,促进了 VSMCs 发生凋亡。

综上,本研究在体外实验中发现高磷可促进血管平滑肌细胞发生凋亡,可能机制是通过抑制 miR-30b 表达,促进 BAX 表达,抑制 Bcl-2 表达,进而导致 VSMCs 发生凋亡。

参考文献:

- [1] Modi ZJ, Lu Y, Ji N, et al. Risk of cardiovascular disease and mortality in young adults with end-stage renal disease: an analysis of the US renal data system [J]. JAMA Cardiol, 2019, 4(4): 353-362.
- [2] Wang P, Zhou P, Chen WS, et al. Combined effects of hyperphosphatemia and hyperglycemia on the calcification of cultured human aortic smooth muscle cells [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 863-868.
- [3] 张东雪, 高少辉, 张胜雷. SET8 介导 AKT 信号通路在调控高磷诱导的血管平滑肌细胞钙化中的作用 [J]. 中华肾脏病杂志, 2020, 36(3): 214-220.
- [4] Croset M, Pantano F, Kan CWS, et al. miRNA-30 family

- members inhibit breast cancer invasion, osteomimicry, and bone destruction by directly targeting multiple bone metastasis-associated genes [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5259–5273.
- [5] Xu J, Lv H, Zhang B, et al. miR-30b-5p acts as a tumor suppressor microRNA in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(7): 3015–3029.
- [6] Zhang M, Liu X, Zhang X, et al. microRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 147(3): 1073–1080.
- [7] Budoff MJ, Young R, Burke G, et al. Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39: 2401–2408.
- [8] 吴奇敏, 张新霞. 非编码 RNA 在血管钙化中的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(11): 955–959, 971.
- [9] Tani T, Fujiwara M, Orimo H, et al. Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model [J]. *J Pathol*, 2020, 250(1): 30–41.
- [10] Cui L, Bai Y, Zhang J, et al. Effects of extracellular acid stimulation on rat vascular smooth muscle cell in Gas6/Axl or PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(5): 451–456.
- [11] Gong Y, He Y, Wang H, et al. Silencing of osterix expression by siRNA inhibits aldosterone-induced calcification of vascular smooth muscle cells in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2111–2118.
- [12] Balderman J, Lee H, Mahoney C, et al. Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(6): e003905.
- [13] Bridge G, Monteiro R, Henderson S, et al. The microRNA-30 family targets DLL4 to modulate endothelial cell behavior during angiogenesis [J]. *Blood*, 2012, 120(25): 5063–72.
- [14] Liao W, Ye Y, Zhang N, et al. microRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and Bcl-2 [J]. *J Pathol*, 2014, 232(4): 415–27.
- [15] Xu J, Li H, Lv Y, et al. Silencing XIST mitigated lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammatory injury in human lung fibroblast WI-38 cells through modulating miR-30b-5p/CL16 axis and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Open Life Sci*, 2021, 16(1): 108–127.
- [16] Zhou D, Lai JR. Isolation of synthetic antibodies against BCL-2-associated X protein (BAX) [J]. *Methods Mol Bio*, 2019, 1877: 351–357.
- [17] Zhang Y, Yang X, Ge X, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/BAX/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726–733.

[收稿日期]2021-09-27

罗敏,章帆,王利民,等. miR-219a-5p 在胃癌中的甲基化调控及生物学功能研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 66-73.

Luo M, Zhang F, Wang LM, et al. Methylated regulation and biological function of miR-219a-5p in gastric cancer [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 66-73.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.009

miR-219a-5p 在胃癌中的甲基化调控及生物学功能研究

罗 敏*, 章 帆, 王利民, 李红霞, 卿克勤

(成都市第一人民医院检验科, 成都 610000)

【摘要】 目的 检测 miR-219a-5p 在胃癌及其癌旁组织中的表达并分析其启动子区域甲基化水平, 探讨其对胃癌细胞系生物学功能的影响。**方法** 利用实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 方法检测胃癌及其癌旁组织中 miR-219a-5p 的表达及甲基化水平, 通过细胞增殖实验和流式细胞仪检测过表达 miR-219a-5p 后对胃癌细胞增殖和凋亡的影响; 体外细胞迁移和侵袭实验检测肿瘤细胞迁移和侵袭能力。**结果** miR-219a-5p 的表达水平在胃癌患者的癌组织中呈现普遍下调, miR-219a-5p 在癌组织中的相对表达量 (0.769 ± 0.95) 明显低于癌旁组织表达 (2.114 ± 5.10), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 且 miR-219a-5p 表达下调组的 DNA 甲基化水平比表达上调组明显升高; 过表达 miR-219a-5p 的胃癌细胞系 MGC-803 细胞增殖能力和迁移侵袭能力明显受到抑制 ($P < 0.05$), 过表达组凋亡比例明显增高 ($P < 0.05$), 凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** miR-219a-5p 在胃癌组织中受甲基化调控普遍低表达, 且其具有抑制细胞增殖和迁移的能力, 促进细胞凋亡等类似抑癌基因的作用, 有望成为胃癌新的诊疗靶点。

【关键词】 胃癌; miR-219a-5p; 甲基化; 细胞凋亡; 迁移; 侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0066-08

Methylated regulation and biological function of miR-219a-5p in gastric cancer

LUO Min*, ZHANG Fan, WANG Limin, LI Hongxia, QING Keqin

(Department of Laboratory Medicine, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610000, China)

【Abstract】 Objective To assess miR-219a-5p expression and its promoter methylation level in gastric cancer and adjacent tissues, and to explore its effect on the biological functions of gastric cancer cell lines. **Methods** The expression and methylation level of miR-219a-5p in gastric cancer and adjacent tissues were detected by qPCR and MSP. Proliferation and apoptosis of gastric cancer cells were detected by Cell Counting Kit-8 assays and flow cytometry after overexpression of miR-219a-5p. **Results** MiR-219a-5p expression was generally downregulated in gastric cancer tissues. The relative expression of miR-219a-5p in cancer tissues (0.769 ± 0.95) was significantly lower than that in adjacent tissues (2.114 ± 5.10) ($P < 0.05$). The DNA methylation level in the miR-219a-5p-downregulated group was significantly higher than that in the miR-219a-5p-upregulated group. Proliferation and invasion of MGC-803 cells overexpressing miR-219a-5p were inhibited significantly ($P < 0.05$), apoptosis in the overexpression group was increased significantly ($P < 0.05$), and expression of apoptosis-related protein caspase-3 was significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions** MiR-219a-5p is

[基金项目] 2020 年四川省卫生健康委员会科研课题 (20PJ188)。

[作者简介] 罗敏 (1985—), 女, 博士, 副主任技师, 研究方向: 微小 RNA 与胃癌相关基础和临床研究。E-mail: 326500084@qq.com

generally underexpressed by methylation in gastric cancer tissue, and inhibits cell proliferation and migration, promotes apoptosis, and play a role similar to tumor suppressor genes. It is expected to become a new target for diagnosis and treatment of gastric cancer.

【Keywords】 gastric cancer; miR-219a-5p; methylation; apoptosis; migration; invasion

胃癌是起源于胃黏膜上皮组织的恶性肿瘤,严重威胁人类健康。根据国际癌症研究机构 2020 年全球最新癌症数据显示:中国胃癌的发病人数约为 47.8 万(占全球 43.9%),死亡人数约为 37.3 万(占全球 48.6%),发病率和死亡率均位列第三位^[1]。

胃癌患者的高死亡率主要是由于肿瘤的复发和转移,DNA 甲基化调控在胃癌的发生过程中具有重要意义^[2],而肿瘤相关的 microRNA 研究揭示出许多在肿瘤发生发展、耐药以及预后等方面起重要作用^[3]。miR-219a-5p 已被报道在多种类型的肿瘤细胞中发挥重要调控作用;miR-219a-5p 抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭^[4];miR-219a-5p 上调抑制了黑色素瘤的生长和转移并增强了黑色素瘤细胞的化学敏感性^[5];miR-219a-5p 抑制上皮性卵巢癌细胞增殖,迁移和侵袭^[6];miR-219a-5p 增强胆囊癌进展^[7]。但 miR-219a-5p 及其甲基化调控在胃癌的发生发展中的机制尚不清楚。本研究发现 miR-219a-5p 在胃癌患者组织中受甲基化调控而出现表达水平明显下调,通过体外实验进一步验证过表达 miR-219a-5p 后能明显抑制细胞增殖和迁移侵袭的能力,提示在胃癌发生发展过程中发挥抑癌基因的作用,为胃癌的诊治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人胃癌细胞株 MGC-803(中国医学科学院基础研究所细胞中心)。

1.1.2 组织

胃癌组织及其相应癌旁组织共 110 例(均来自北京市肿瘤医院 2013~2016 年手术切除后冻存组织标本)。已通过成都市第一人民医院(成都市中西医结合医院)伦理审查(2020 年 KT 第 006 号)。

1.2 主要试剂与仪器

1640 培养基和胎牛血清(Hyclone 公司);荧光定量 PCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);Lipofectamine 2000 细胞转染试剂(Invitrogen 公司);miR-219a-5p-mimic(上海吉玛生物技术有限公司);亚硫酸氢盐转化试剂盒 EpiTect® Bisulfite kit

(Qiagen 公司,货号 58694I);兔抗人 P-caspase-3 抗体(Cell Signaling 公司,货号 8664L);CCK-8(Cell Counting Kit-8)(日本株式会社同仁化学研究所 Dojindo,货号 CK04);凋亡试剂盒 PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD Biosciences 公司,货号 579563)。Transwell 小室(Minipore 公司,货号 PIMP12R48);荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad IQ5);流式细胞仪(美国 Coulter Flow c6)。

1.3 实验方法

1.3.1 实时荧光定量 RT-PCR

文中所有引物的设计均根据 Primer Premier 5 软件设计。miR-219a-5p 逆转录引物:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTG GATACGACAGAATT-3';U6 逆转录引物:5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3';miR-219a-5p 定量 PCR 上游引物:5'-CAGCTGATTG TCCAAACGC-3';miR-219a-5p 定量 PCR 下游引物:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 定量 PCR 上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3';U6 定量 PCR 下游引物:5'-ACGCTTCACGAATTT GCGTGTG-3'。定量 PCR 反应条件为:95℃ 5 min, 95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环,72℃ 10 min。均设复孔 3 个。IQ5 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 检测。利用 IQ5 自带分析软件导出相对表达值进行统计学分析。

1.3.2 甲基化特异性 PCR 及甲基转移酶抑制剂 5' aza-2'-脱氧胞苷(5' AZa-CDR)处理细胞

提取肿瘤组织及癌旁组织 DNA,通过亚硫酸氢盐转化试剂盒处理后进行甲基化特异性 PCR。CPG 岛预测及甲基化引物设计利用在线软件 Methprimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 及 Primer Premier 5 软件;甲基化上游引物:5'-TTGATTGTTTAAACGTAATTTTCGA-3';甲基化下游引物:5'-CTAAAAACACACCTAAATCCCCGAT-3';非甲基化上游引物:5'-TTGATTGTTTAAATGTAATT TTTGA-3';非甲基化下游引物:5'-CCTAAAAAC ACACCTAAATCCCCA-3'。甲基化特异性 PCR 采用 Touchdown PCR 的方法,反应条件如下:95℃ 5 min, 95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 40 s,每个循环降 0.6℃,

10 个循环后, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环, 72℃ 10 min。用 5、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 的不同浓度梯度的 5' AZa-CDR 和组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A (TSA) 处理胃癌细胞 MGC-803 后, 分析处理前后 miR-219a-p 的表达变化情况。

1.3.3 细胞转染和分组处理

MGC-803 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 1640 完全培养基, 37℃、5% CO_2 。将 MGC-803 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度达到 70%~80% 时(贴壁 24 h 内), 脂质体转染方法: 每孔 100 μL 的无血清培养基中稀释 20 μL mimic, 另外 100 μL 的无血清培养基中稀释 Lipofectamine 2000 转染试剂 3 μL , 各静置 5 min 后混合再静置 20 min; 将上述混合液加入含细胞的 6 孔板中, 终体积为 1 mL 无血清无抗 1640 培养基, 6 h 后更换新鲜完全培养基 2 mL。转染后继续培养 48 h, 收获细胞提取 RNA 和蛋白质。把转染 control-mimic 和 miR-219a-5p-mimic 的胃癌细胞 MGC-803 命名为 control-mimic (对照组) 和 miR-219a-5p-mimic (miR-219a-5p 过表达组)。把没有转染的细胞命名为 un-treated (未处理组)。

1.3.4 组织标本与细胞总 RNA 提取

按 TRIzol 说明书操作提取组织或者细胞总 RNA。总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳法检测其完整性。

1.3.5 检测细胞增殖

取转染后 24 h 的 MGC-803 细胞, 重新铺于 96 孔板中, 相同实验组各设 4 个复孔。每孔铺 5000 个细胞, 分别设 0、24、36、48、72 h 5 个时间点, 检测 450 nm 与 630 nm 双波长下的光密度值 (optical density, OD), 制作时间增殖曲线, 所有操作均按 CCK-8 试剂盒说明书操作。

1.3.6 检测细胞凋亡

取转染后 48 h 的胃癌细胞系 MGC-803 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 用 Bind buffer 重悬, 经 PE Annexin V 和 7-Amino-actinomycin (7-AAD) 双染后 1 h 内送流式细胞仪检测。

1.3.7 Western blot 检测 p-caspase-3 蛋白的表达

提取细胞 (约 1×10^6 个) 总蛋白, 并将 20 μg 总蛋白于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 中电泳并转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 2 h, 将膜封闭于含有相应一抗的抗体稀释液中 (1 : 1000), 4℃ 过夜。次日用 TBST (tris

buffered saline with 0.05% Tween-20) 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入相应的二抗 (1 : 1000), 室温温育 1 h, TBST 洗膜 3 次后显影。内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶重组蛋白 (recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (1 : 2000), 二抗 (1 : 5000)。用增强化学发光法显色, X 光片曝光显影。

1.3.8 迁移和侵袭实验

接种细胞前 1 d 在 Transwell 小室上准备基质胶, 基质胶与预冷的无血清 1640 按 1 : 7 的比例以总量 32 μL 铺室面 (做肿瘤迁移实验则不需要此步); 取不含血清的培养液制备单细胞悬液 (每毫升 2.5×10^5 个) 400 μL 加入上室中; 在下室即 24 孔板内加入 600 μL 含 20% FBS 的 1640 培养液。将 24 孔板置于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱内, 培养 24 h 后用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞, 无水乙醇固定 20 min 后结晶紫染色, 染色完毕后将小室自然风干, 用手术刀片沿压痕将小室膜轻轻切下, 置于载玻片上在显微镜下观察、计数。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数通过方差齐性检验后, 两组间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-219a-5p 在胃癌组织及其癌旁组织中的差异表达

通过实时荧光定量 PCR 我们分析了 110 例胃癌患者癌组织 (C) 及癌旁组织 (N) 标本中的表达情况, 数据用 $\text{Log}1.5$ (C/N) 表示, 有 72 例患者 miR-219a-5p 的表达水平在癌组织中低于癌旁组织, 另外 38 例患者表达上调 (见图 1A)。miR-219a-5p 在癌组织中的表达值为 (0.769 ± 0.95), 癌旁组织表达值为 (2.114 ± 5.10), 差异具有统计学意义 ($P = 0.0063$) (见图 1B)。

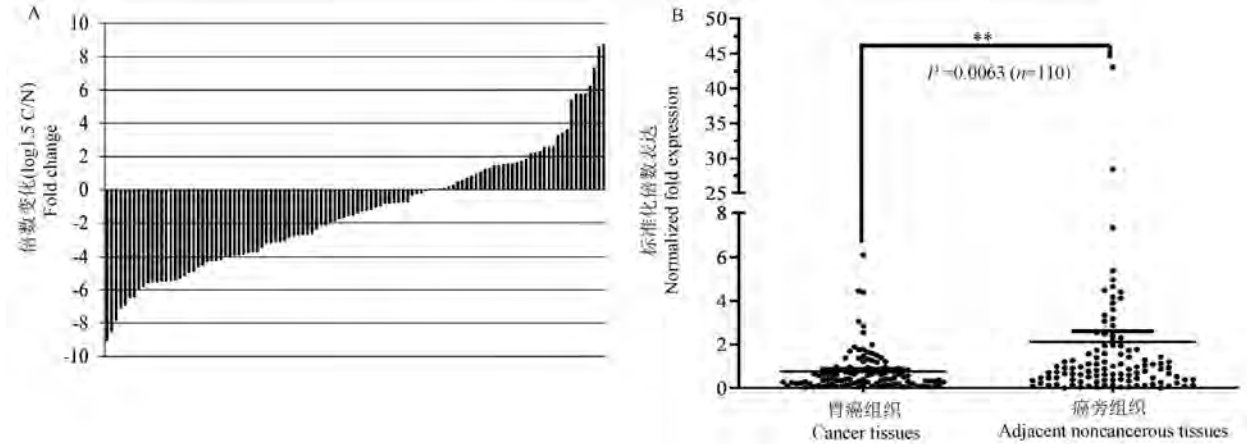
2.2 miR-219a-5p 在胃癌组织中的表达与临床病理分期分型的相关性

本研究分析了 110 例胃癌患者中 miR-219a-5p 的表达与临床病理因素之间的相关性, 其表达与年龄性别等无统计学差异, 与临床病理分型及分期有一定的相关性, miR-219a-5p 的表达随着肿瘤分期的增加而进一步降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 miR-219a-5p 的表达受表观遗传学调控

为了明确 miR-219a-5p 在胃癌细胞中表达下调

的原因,本研究首先进行生物信息学分析,利用 MethPrimer 软件预测 miR-219a-5p 上游区域的 CpG



注:A: 患者 miR-219a-5p 在癌组织中的相对下调表达比例;B: miR-219a-5p 在癌组织及癌旁组织中的表达值分布情况。与癌旁组织相比, ** $P<0.01$ 。

图 1 miR-219a-5p 在胃癌组织及其癌旁组织中的表达情况

Note. A, Relative down-regulated expression ratio of miR-219a-5p in cancer tissues of patients. B, Distribution of expression values of miR-219a-5p in cancer tissues and adjacent tissues. Compared with adjacent noncancerous tissues group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Expression of miR-219a-5p in gastric cancer tissues and adjacent tissues

表 1 miR-219a-5p 表达和胃癌患者临床病理特征的关系 ($n=110$)

Table 1 Relationship between miR-219a-5p expression and clinicopathological characteristics of gastric cancer patients

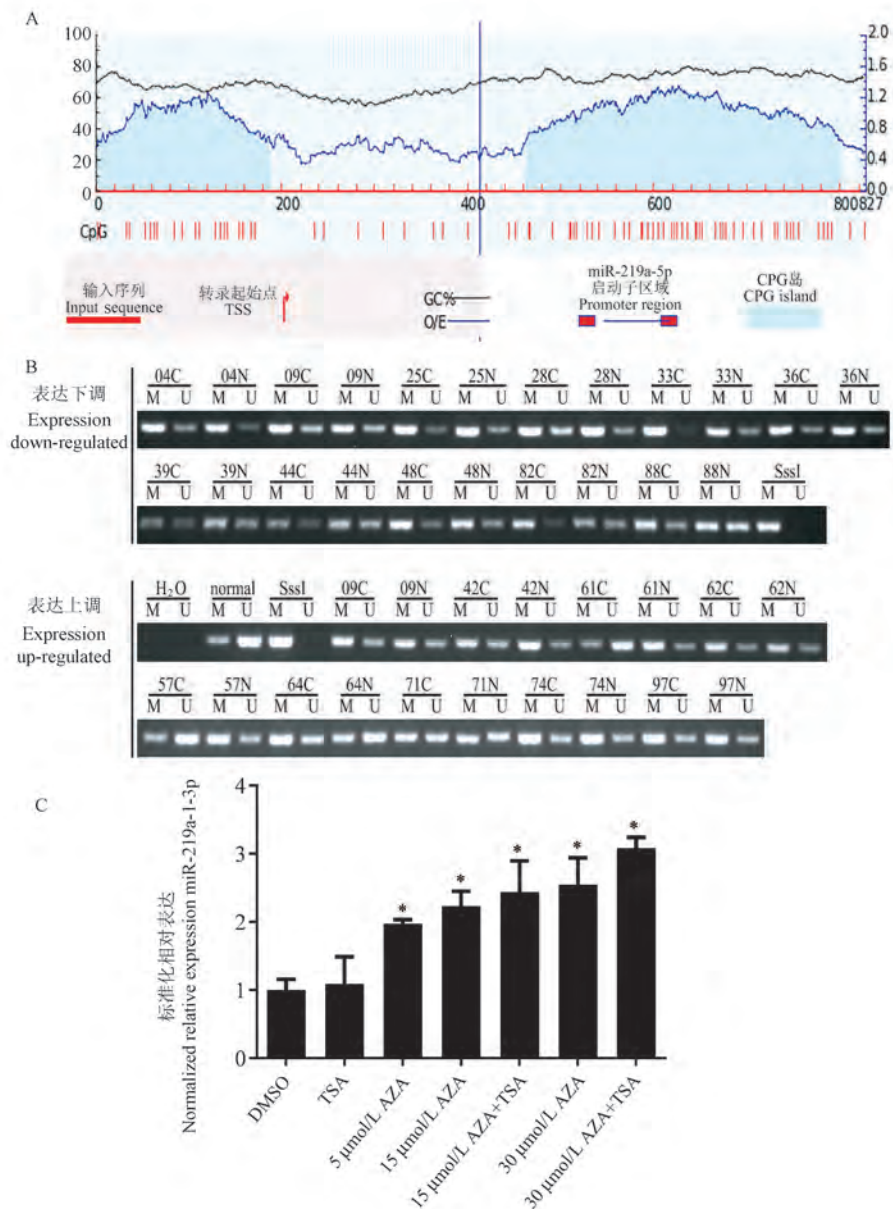
因素 Factors	分组 Groups	<i>n</i>	均值 Mean ¹	标准差 SD ²	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
性别 Gender	男 Male	89	-1.3559	3.6584	0.9065
	女 Female	21	-1.2511	3.7186	
年龄 Age	≥60	56	-1.7334	3.5676	0.2470
	<60	54	-0.9237	3.7277	
静脉侵犯 Venous invasion	无 Negative	64	-1.2228	3.5708	0.7036
	有 Positive	46	-1.4932	3.7985	
位置 Position	贲门 Cardia	49	-1.4717	3.1356	0.8966
	胃体 Gastric body	26	-1.0553	4.7255	
	胃窦 Gastric antrum	35	-1.3541	3.5204	
博尔曼分型 Borrmann typing	隆起 I	11	1.4512	4.9640	0.0240 *
	溃疡 II	82	-1.7246	3.2519	
	浸润 III+IV	17	-1.2645	3.9816	
T 分期 pT stage	T1+T2	11	1.5235	3.8569	0.0057 *
	T3+T4	99	-1.6536	3.5078	
N 分期 pN stage	N0+N1	76	-1.6741	3.2433	0.1474
	N2+N3	34	-0.5799	4.3951	
M 分期 pM stage	M0	98	-1.4956	3.4445	0.1915
	M1	12	-0.0318	5.0522	
TNM 分期 pTNM stage	I + II	29	-1.1776	3.5948	0.7871
	III + IV	81	-1.3925	3.6941	

注: ¹: $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$ 的均数; ²: $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$ 的标准差。博尔曼分型和 T 分期组间比较, * $P<0.05$ 。

Note. ¹, Mean of $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$. ², Standard Definition of $\text{Log}_{1.5}(\text{C}/\text{N})$. Compared between groups of Borman classification and T staging, * $P<0.05$.

岛(图 2A)。采用 MSP 检测 11 对 miR-219a-5p 表达下调组和 9 对表达上调组的胃癌组织和癌旁组织中 miR-219a-5p 的甲基化状态。本研究发现 miR-219a-5p 基因启动子区域的高甲基化比例在 miR-219a-5p 表达下调组(72.7%, 8/11)比表达上调组的甲基化

比例(55.6%, 5/9)更高(图 2B)。此外, MGC-803 经 5' AZa-CDR 处理后, miR-219a-5p 的表达上调(图 2C), TSA 的联合处理排除无其他表观遗传调控的影响。综上所述, 这些数据表明, miR-219a-5p 在胃癌中由于上游区域甲基化而表达下调。



注: A: MiR-219a-5p 上游区域的 CpG 岛; B: MiR-219a-5p 基因启动子区域的甲基化情况; C: MGC-803 细胞经 5' AZa-CDR 处理后 miR-219a-5p 的表达情况。DMSO: 二甲基亚砜; AZA: 5-氮杂-2-脱氧胞嘧啶(5' AZa-CDR); TSA: 组蛋白脱乙酰酶抑制剂 TSA; C: 癌组织; N: 癌旁组织; M: 甲基化引物 PCR 产物; U: 未甲基化引物 PCR 产物。与 DMSO 处理组相比, *P<0.05。

图 2 miR-219a-5p 的表达受甲基化表观遗传学调控

Note. A, CpG island in the upstream region of miR-219a-5p. B, Methylation in the promoter region of miR-219a-5p gene. C, Expression of miR-219a-5p in MGC-803 cells treated with 5' AZa-CDR. DMSO, Dimethyl sulfoxide. AZA, 5-aza-2-deoxycytidine (5' AZa-CDR). TSA, Histone deacetylase Trichostatin A. C, Cancer tissues. N, Adjacent noncancerous tissues. M, Methylated primer PCR product. U, Unmethylated primer PCR product. Compared with DMSO treatment group, *P<0.05.

Figure 2 Expression of miR-219a-5p is regulated by methylation epigenetics

2.4 过表达 miR-219a-5p 抑制胃癌细胞 MGC-803 的增殖能力

通过脂质体转染模拟体 mimic 使 MGC-803 细胞过表达成功,过表达组 miR-219a-5p 表达水平升高近 9583 倍,见图 3A。CCK-8 结果显示,与未处理组(un-treated)和对照组(control-mimic)相比,过表达组(miR-219a-5p-mimic)的细胞增殖能力明显受到抑制,72 h 时间点的 CCK-8 检测值(OD_{450} 和 OD_{630})分别是(1.83 ± 0.02)、(1.78 ± 0.02)、(1.18 ± 0.06),差异具有统计学意义($P < 0.001$) (见图 3B)。

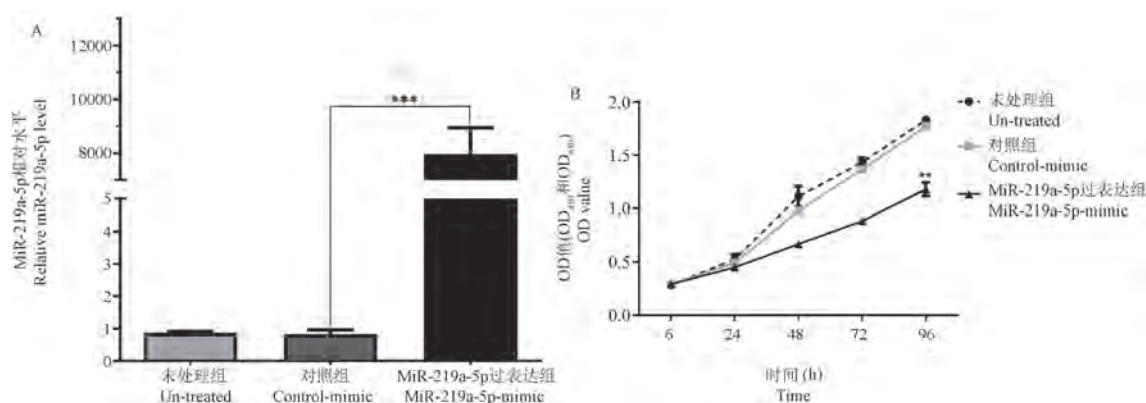
2.5 过表达 miR-219a-5p 促进胃癌细胞 MGC-803 的凋亡

流式细胞仪结果显示,与 un-treated 组和 control-mimic 组相比,miR-219a-5p 过表达组 MGC-803 细胞

的凋亡比例明显增加,见图 4A 所示,control-mimic 组与 miR-219a-5p 过表达组的早期凋亡比例分别是(26.6 ± 0.94)%和(51.6 ± 1.74)%,晚期凋亡比例分别是(11.3 ± 1.21)%和(9.6 ± 0.95)%,早期凋亡率明显增高($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,MGC-803 细胞转染 miR-219a-5p-mimic 48 h 后,凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达水平明显比对照组的表达水平高,GAPDH 为内参,见图 4B。

2.6 过表达 miR-219a-5p 抑制胃癌细胞 MGC-803 迁移和侵袭能力

图 5A、5B 所示,Transwell 小室迁移实验结果显示,过表达 miR-219a-5p 组高倍镜每视野平均穿膜细胞数明显少于 un-treated 组和 control-mimic 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。图 5A、5C 所示,在



注:A: MGC-803 细胞转染 mimic 后 miR-219a-5p 过表达成功;B: miR-219a-5p 过表达后抑制 MGC-803 细胞的增殖。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 miR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞增殖的影响

Note. A, Overexpression of miR-219a-5p successfully transfected mimic into MGC-803 cells. B, Overexpression of miR-219a-5p inhibited the proliferation of MGC-803 cells. Compared with control-mimic group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Effect of miR-219a-5p overexpression on the proliferation of MGC-803 cells

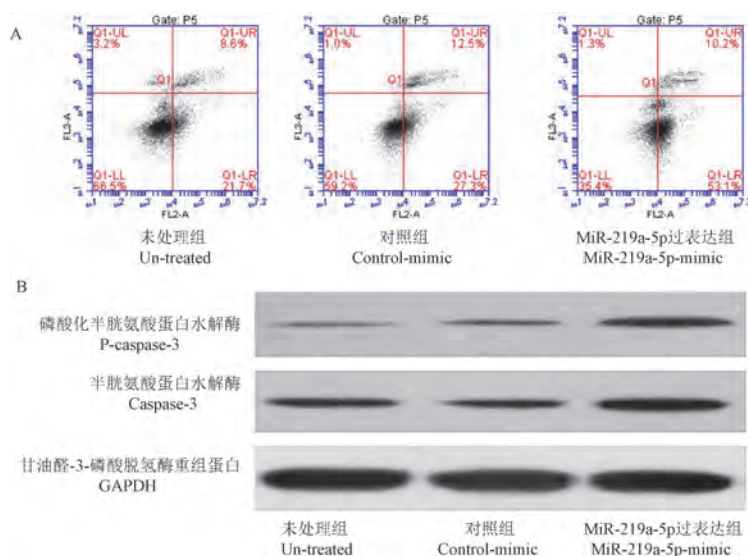
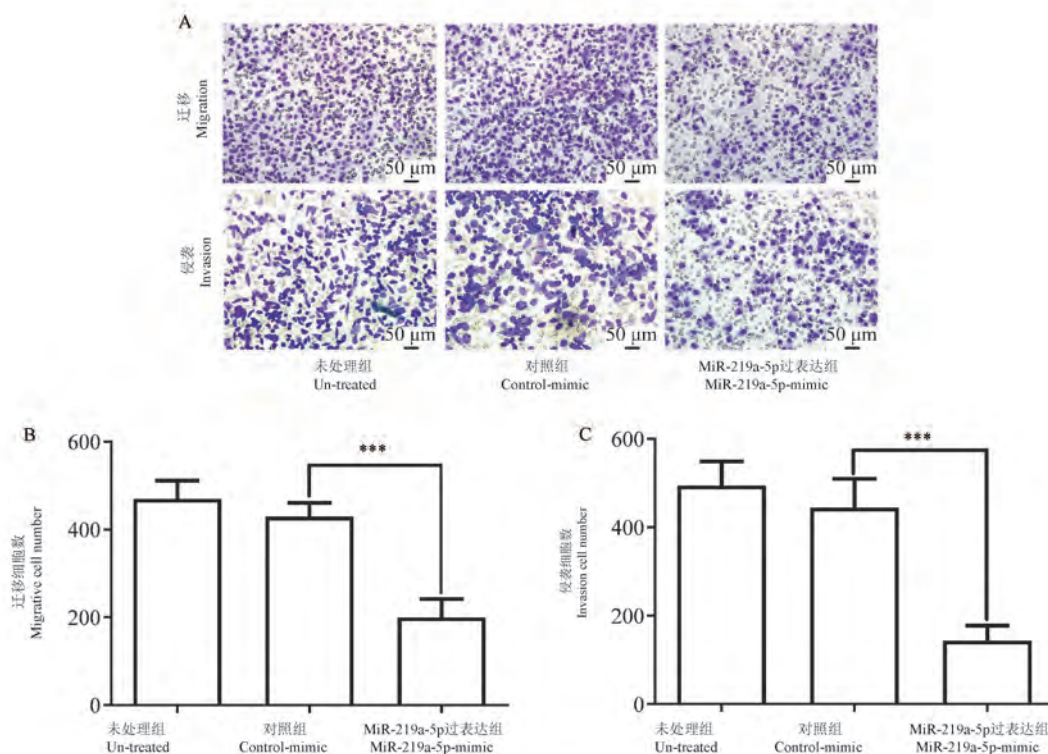


图 4 MiR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of miR-219a-5p overexpression on MGC-803 cell apoptosis



注:A: MiR-219a-5p 过表达后抑制 MGC-803 细胞的迁移和侵袭;B: 3 组高倍镜每视野平均穿膜细胞数。与对照组相比, $^*P<0.05$ 。

图 5 MiR-219a-5p 过表达后对 MGC-803 细胞迁移和侵袭能力的影响

Note. A, Overexpression of miR-219a-5p inhibited the migration and invasion ability of MGC-803 cells. B, The average number of transmembrane cells per field of view of the three groups of high magnification. Compared with control-mimic group, $^*P<0.05$.

Figure 5 Effect of miR-219a-5p overexpression on the migration and invasion ability of MGC-803 cells

有基质胶的 transwell 小室侵袭实验发现,miR-219a-5p 过表达组高倍镜每视野平均穿膜细胞数同样明显少于 un-treated 组和 control-mimic 组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。以上实验表明,miR-219a-5p 能减弱胃癌细胞的迁移和侵袭能力。

3 讨论

胃癌患者发病一般无明显症状,常与胃炎、胃溃疡等胃慢性疾病症状相似,由于缺乏有效的早期诊断的肿瘤分子标志物,大多数胃癌患者确诊时已是进展期,而患者预后高度依赖肿瘤临床分期,早期胃癌患者术后 5 年生存率可达 90%,而进展期胃癌的 5 年生存率却低于 30%^[8],可见胃癌的及时诊断和预后评估对于优化治疗策略至关重要,传统的各种血清抗原标志物如癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 19-9(CA19-9)、胃蛋白酶原(PG)等的检测仅通常被用作表明癌症风险的特征^[9-10]。因此,寻找胃癌新的肿瘤分子标志物是临床对胃癌精准诊疗的迫切需求。miRNA 通过对靶 mRNA 的降解或翻译抑制,从而发挥其对靶基因表达的转录后调控作用,

在肿瘤进展和转移过程中发挥重要的调节作用^[11-12]。Li 等^[13]研究发现血清 miR-17-92 能很好的区分早期胃癌患者和健康对照组,具有致癌潜力,其中 miR-20a-5p 在诊断胃癌时受试者工作特征曲线下面积(AUC)较高,大于 0.95,敏感性和特异性均大于 90%,可见 miRNA 可以很好的作为胃癌诊断的潜在分子标志物。

在本研究中,通过实时荧光定量 PCR 方法手段发现 miR-219a-5p 在胃癌患者癌组织中呈现普遍低表达情况,本课题组下一步研究计划就是收集胃癌患者血清标本,检测血清标本中 miR-219a-5p 的含量,分析是否能为筛选胃癌早期诊断标志物提供参考价值。为了探索 miR-219a-5p 为什么会出现癌组织表达下调,我们分析了 miR-219a-5p 所跨越的基因组启动子区域序列,利用 MethPrimer 在线软件(<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>)我们发现存在 CpG 岛,miRNA 表达的失调是癌症的发生、发展的重要特征,miRNA 的表达具有组织和时空特异性,并受到表观遗传机制调控,CpG 岛的高甲基化具有沉默基因表达的作用^[14]。miR-320a

在胃癌组织中受 DNA 甲基化调控,在癌组织中表达普遍下调,并可抑制肿瘤进展^[15]。我们的实验结果也提示在胃癌组织中显著低表达的 miR-219a-5p 很可能受甲基化的表观遗传调控。同时我们发现 miR-219a-5p 的表达随着肿瘤恶性程度的增加而降低,研究结果表明其表达的改变可能在胃癌的进展中扮演一定角色。

miRNA 在胃癌治疗、监测复发和判断预后方面也有着广阔的应用前景,多项研究表明 miRNA 与胃癌的转移、复发和耐药等紧密相关^[16-18]。本研究利用模拟体 miR-219a-5p-mimic,在胃癌细胞系 MGC-803 中成功过表达 miR-219a-5p 后,可明显抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进凋亡,这说明了 miR-219a-5p 可能是胃癌发生发展过程中一种重要的抑癌 miRNA,调控胃癌细胞增殖、凋亡、转移等生物特性过程,虽然具体机制还有待进一步研究,但为临床治疗胃癌提供了新的靶点。Wang 等^[17]报道 miR-454 在胃癌组织和细胞系中显著下调,miR-454 的低表达与淋巴结转移、浸润深度和 TNM 分期呈正相关,并提出 miR-454 可能负调控结合丝裂原活化蛋白激酶 1 而在胃癌中发挥抑癌基因作用,抑制胃癌细胞的增殖和侵袭,诱导了细胞的凋亡。由此可见,miRNA 作为基因的重要调控因子,可望成为胃癌精准治疗的最有前景的新靶点。

Ji 等^[18]研究发现 miR-374a-5p 在胃癌患者血清中明显高表达且与患者进展及预后不良相关,且装载了 miR-374a-5p 抑制剂的外泌体能够逆转奥沙利铂体内抗药性,显著抑制肿瘤的生长,这些发现提示,体外抗 miR-374a-5p 可能是一种潜在的胃癌耐药治疗方法,也说明利用外泌体的转运功能以及较好生物相容性的特性在治疗肿瘤中显示出优势,这将为 miRNA 靶向治疗开拓一片广阔领域。如果将目的 miRNA 装载至外泌体过表达抑癌基因,其抑制肿瘤活性的效果可能将更明显^[19]。

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] Cao XY, Ma HX, Shang YH, et al. DNA methyltransferase3a expression is an independent poor prognostic indicator in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(25): 8201-8208.
- [3] 阮庆芬, 杨德祥, 杨理伟. miR-572 对胃癌细胞增殖和凋亡影响及其作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 82-88.
- [4] Ye Q, Wang X, Yuan M, et al. MiR-219-5p targets TBXT and inhibits breast cancer cell EMT and cell migration and invasion [J]. Biosci Rep, 2021, 41(8): 1-11.
- [5] Long J, Menggen Q, Wuren Q, et al. MiR-219-5p inhibits the growth and metastasis of malignant melanoma by targeting bcl-2 [J]. Biomed Res Int, 2017, 813(2017): 9032502-9032509.
- [6] Wei C, Zhang X, He S, et al. Microrna-219-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of epithelial ovarian cancer cells by targeting the Twist/Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Gene, 2017, 12(637): 25-32.
- [7] Wang P, Zhou C, Li D, et al. CircMTO1 sponges microRNA-219a-5p to enhance gallbladder cancer progression via the TGF- β /Smad and EGFR pathways [J]. Oncol Lett, 2021, 22(1): 563.
- [8] Strong VE, Wu AW, Selby LV, et al. Differences in gastric cancer survival between the U. S. and China [J]. J Surg Oncol, 2015, 112(1): 31-37.
- [9] Huang RJ, Hwang JH. Improving the early diagnosis of gastric cancer [J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2021, 31(3): 503-517.
- [10] Xia Y, Hu X, Di K, et al. Combined detection of exosome concentration and tumor markers in gastric cancer [J]. J Biomed Nanotechnol, 2020, 16(2): 252-258.
- [11] Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2019, 58(4): 244-253.
- [12] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [13] Li H, Wu Q, Li T, et al. The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review [J]. Oncotarget, 2017, 8(28): 45060-45071.
- [14] Davalos V, Esteller M. MicroRNAs and cancer epigenetics: a macroevolution [J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22(1): 35-45.
- [15] Li YS, Zou Y, Dai DQ. MicroRNA-320a suppresses tumor progression by targeting PBX3 in gastric cancer and is downregulated by DNA methylation [J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(10): 842-856.
- [16] Zhang J, Ren J, Hao S, et al. MiRNA-491-5p inhibits cell proliferation, invasion and migration via targeting JMJD2B and serves as a potential biomarker in gastric cancer [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(2): 525-534.
- [17] Wang X, Liu B, Wen F, et al. MicroRNA-454 inhibits the malignant biological behaviours of gastric cancer cells by directly targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1494-1504.
- [18] Ji R, Zhang X, Gu H, et al. MiR-374a-5p: A new target for diagnosis and drug resistance therapy in gastric cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 12(18): 320-331.
- [19] Elewally MI, Elsergany AR. Emerging role of exosomes and exosomal microRNA in cancer: pathophysiology and clinical potential [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2021, 147(3): 637-648.

[收稿日期] 2021-11-12

高倩,王建宇,孟伟建,等. 大豆皂苷 Bb 预处理对脑缺血再灌模型大鼠的神经保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32 (7): 74-80.

Gao Q, Wang JY, Meng WJ, et al. Neuroprotective effect of soyasaponin Bb pretreatment in cerebral ischemia/reperfusion model rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 74-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.010

大豆皂苷 Bb 预处理对脑缺血再灌模型大鼠的神经保护作用

高倩,王建宇,孟伟建,李静,崔永健,魏琰*

(衡水市人民医院(哈励逊国际和平医院)神经内二科,河北衡水 053000)

【摘要】 目的 探讨大豆皂苷 Bb (soyasaponin Bb, SSBb) 预处理对脑缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 大鼠的神经保护作用。**方法** 将 SD 大鼠分为假手术组、模型组和低、高剂量 SSBb 预处理组, 每组 15 只大鼠。通过线栓法建立大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型, 并于闭塞后 2 h 实现再灌注, 用来模拟脑 I/R。低、高剂量 SSBb 预处理组在 MCAO 术前 1 h 分别灌胃 20 和 50 mg/kg SSBb。再灌注 24 h 后, 用改良神经损伤严重缺损评分表 (modified neurological severity score, mNSS) 评估神经功能缺陷, 用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 检测脑梗死体积, 用微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein-2, MAP-2) 染色法评估神经元损伤, 用干/湿称重法检测脑含水量, 用免疫荧光法检测缺血半暗带中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达水平, 用 Western blot 检测突触后致密蛋白-95 (postsynaptic density-95, PSD-95)、突触素 I (synapsin I) 和突触结合蛋白 (synaptotagmin) 的表达水平。**结果** 与模型组比较, 低和高剂量 SSBb 预处理均能显著改善 MCAO 模型大鼠的神经功能缺陷, 减轻脑水肿和脑梗死, 并降低缺血半暗带中 TNF- α 的表达水平和 PSD-95、synapsin I 和 synaptotagmin 的表达水平 (均 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$); 其中高剂量组作用最为显著 ($P < 0.001$)。**结论** SSBb 预处理在脑 I/R 损伤大鼠中发挥的神经保护作用。

【关键词】 大豆皂苷 Bb; 脑缺血/再灌注; TNF- α ; 突触相关蛋白; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0074-07

Neuroprotective effect of soyasaponin Bb pretreatment in cerebral ischemia/reperfusion model rats

GAO Qian, WANG Jianyu, MENG Weijian, LI Jing, CUI Yongjian, WEI Yan*

(No. 2 Department of Neurology, Hengshui People's Hospital (Harraison International Peace Hospital), Hengshui 053000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of soyasaponin Bb (SSBb) pretreatment in cerebral ischemia/reperfusion (I/R) rats. **Methods** SD rats were divided into sham, model, and low- and high-dose SSBb pretreatment groups with 15 rats each. A rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by suture occlusion, and reperfusion was performed 2 h after occlusion to simulate brain I/R. Low- and high-dose SSBb pretreatment groups were administered 20 and 50 mg/kg SSBb by gavage, respectively, at 1 h before MCAO. At 24 h after reperfusion, neurological deficits were assessed by the modified neurological severity score, and cerebral infarct volume was

【基金项目】 2018 年度河北省医学科学研究重点课题计划 (20181592)。

【作者简介】 高倩 (1986—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑血管病相关的临床与基础方面的研究。E-mail: gaoqian9622@tom.com

【通信作者】 魏琰 (1966—), 女, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向: 脑血管病相关的临床与基础方面的研究。E-mail: weiyan8366@126.com

measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. Microtubule-associated protein-2 staining was used to assess neuronal damage. Brain water content was measured by the dry/wet weight. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression in ischemic penumbra was measured by immunofluorescence. Postsynaptic density-95 (PSD-95), synapsin I and synaptotagmin expression was detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, low- and high-dose SSBb pretreatment significantly improved neurological dysfunction, alleviated cerebral edema and cerebral infarction in MCAO model rats, and decreased expression of TNF- α , PSD-95, synapsin I and synaptotagmin in ischemic penumbra ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). The effects in the high-dose group were most significant ($P < 0.001$). **Conclusions** SSBb pretreatment has a neuroprotective effect in rats with cerebral I/R injury.

【Keywords】 soyasaponin Bb; cerebral ischemia/reperfusion; TNF- α ; synaptic associated proteins; rat

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是一种因脑血管病变引起的脑供血不足而导致的具有严重并发症和高死亡率的亚急性或急性脑血管类疾病,目前其已经成为全球性首位残疾和第三致死的疾病^[1-2]。持续的脑缺血会造成脑神经的持续伤害,造成不良预后甚至死亡,因此,及早的恢复脑血灌注是治疗 IS 的主要治疗策略^[3]。而再灌注也会加重最初由缺血引起的脑损伤,其还能引起缺血区神经元继发性损伤,这种由再灌注引起的脑神经二次伤害严重影响患者的病后神经功能恢复^[4-5]。目前没有特异性抑制脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的方法。如何改善脑 I/R 所致的神经损伤已成为目前急需解决的问题。

脑 I/R 损伤可导致神经元凋亡、氧化应激和炎症级联反应等一系列复杂的病理变化^[6-7]。大豆皂苷是一类主要从大豆中提取的三萜类齐墩果烷型皂苷,目前已确认了 18 种大豆皂苷,根据化学结构分成 A 类、B 类、E 类和 DDMP 类^[8-9]。其中,大豆皂苷 Bb(soyasaponin Bb, SSBb)是大豆皂苷中主要的活性化合物之一,已发现其在不同的疾病模型中具有抗氧化、抗凋亡、抗炎、神经保护和防治心血管等多种药理作用^[10-11]。根据 SSBb 的药理作用,推测其可能也会在脑 I/R 中发挥神经保护作用,而具体作用并不清楚。本研究以大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型观察 SSBb(灌胃给药)预处理对 MCAO 大鼠脑 I/R 所致的脑损伤是否具有神经保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60 只 SD 大鼠(6 周龄, SPF 级, 雄性, 体重: 220~240 g)由北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]提供,将大鼠饲养在河北医科大学新药安全评价研究中心维持 12 h/12 h 循环

光照、湿度(60±5)%和温度(22±3)℃的屏障环境动物房[SYXK(冀)2018-0005],大鼠可自由获取食物和水。本实验使用动物的程序经衡水市人民医院伦理委员会审查批准(2020-107),并符合实验动物护理和使用指南的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

大豆皂苷 Bb(SSBb, 纯度: 99%; #51330-27-9), 购自上海一基实业有限公司, 使用时用生理盐水配置成混悬液; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色液(#G3005) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 兔源微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2) 抗体(#AF4081) 购自美国 Affinity Biosciences 公司; 小鼠源肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抗体(#sc-12744) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; Cy3 标记的羊抗兔 IgG(#BS10007) 和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG(#BS50950) 购自南京巴傲得生物科技有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG(#CLGRHRP) 购自北京达科为生物技术有限公司; 兔源 β -actin 抗体(#WL01372)、RIPA 裂解液(#WLA017) 和高敏 ECL 化学发光试剂盒(#WLA003) 购自万类生物科技有限公司; 兔源突触后致密蛋白-95(postsynaptic density-95, PSD-95)(#ab18258)、兔源突触素 I(synapsin I)(#ab64581) 和兔源突触结合蛋白(synaptotagmin)(#ab131548) 购自英国 Abcam 公司; OCT 冰冻切片包埋剂(#4583) 购自美国 Tissue-Tek 公司。真空干燥箱(型号: LVO-0B6020; 上海龙跃仪器设备有限公司); 电子天平(型号: BA2204; 澳大利亚 KEWLAB 公司); 激光共焦荧光显微镜(型号: LSM 980 with Airyscan; 德国 Carl Zeiss 公司); 数码显微成像系统(型号: Moticam Pro 285C)(麦克奥迪实业集团有限公司); 酶标仪(型号: EnVision; 美国 PerkinElmer 公司); 蛋白质免疫转印系统(型号: Tanon V8; 上海天能科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验方案设计

大鼠经 1 周的适应性喂养后,将其随机分为假手术组、MCAO 组和低、高剂量 SSBb 预处理组,每组 15 只大鼠。参照 Zhang 等^[12] 方法,用线栓法对 MCAO 组和低、高剂量 SSBb 预处理组的大鼠行左侧 MCAO 术处理。具体操作方式:大鼠麻醉后,仰卧位固定,颈部正中切口,结扎颈外动脉和颈总动脉近心端;用微血管夹夹闭颈总动脉远心端,将线栓沿颈总动脉、颈内动脉,送入大脑中动脉约 2 cm 处;并于缺血后 2 h 抽出线栓,实现再灌注。假手术组大鼠除不进行线栓结扎外,其余步骤程序同 MCAO 术。为研究 SSBb 预处理对脑 I/R 的影响,低、高剂量 SSBb 预处理组的大鼠在行 MCAO 术前 1 h,分别用灌胃针胃内注射 20 和 50 mg/kg SSBb (SSBb 的剂量参考大鼠实验的报道^[11]);假手术组和 MCAO 组的大鼠行 MCAO 术前 1 h 给予等体积生理盐水。

1.3.2 神经功能评估

在再灌注 24 h 后,由 1 名对分组不知情的实验人员按照 Zhang 等^[12] 的改良神经功能缺损评分量表(modified neurological severity score, mNSS)评估大鼠的神经功能缺陷。NSS 评分在 0~18 分之间,0 分表示无神经功能缺陷,评分较高表示神经功能缺陷越严重,18 分表示持续性昏迷或死亡。

1.3.3 脑含水量检测

用脑含水量法评估脑水肿^[13]。在神经功能缺损评分结束后,每组任选 5 只大鼠,麻醉后,用颈椎脱位法处死。然后迅速摘除大脑并称重以获得湿重。在烘箱中 60℃ 干燥 24 h 后,直到重量不变,再次称重以获得干重。脑含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.4 TTC 染色

每组任选 5 只大鼠,麻醉后,用颈椎脱位法处死。取全脑并快速在-20℃ 下保存 30 min。用大鼠脑切片器切出连续 11 个 2 mm 厚的冠状切片,然后浸入 2% TTC 染液中在 37℃ 下避光染色 15 min。取出切片,用 PBS 清洗 3 次,滤纸吸掉液体进行拍照。苍白的未染色区表示梗死区域,红色染色区表示正常组织。用 Image Pro Plus 测量每个切片的梗死面积;每切片梗死体积=各切片梗死面积×层厚(2 mm);总梗死体积为各切片的梗死体积之和。

1.3.5 免疫荧光

剩余大鼠经麻醉处死后,迅速切下大脑,在多

聚甲醛中固定 24 h,然后转移到 30% 蔗糖溶液在 4℃ 条件下放置 48 h,然后嵌入 OCT 冰冻切片包埋剂。然后用冰冻切片机将大脑组织切割成 6 μm 厚度的切片。用 PBS 冲洗 3 次,在室温下用 5% 山羊血清封闭 30 min,在 4℃ 下分别用兔抗 MAP-2(1:2000)和小鼠抗 TNF-α(1:500)在加湿室孵育过夜,用 PBS 冲洗 3 次,在室温下分别用 1:1000 稀释的 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 的荧光二抗避光孵育 2 h,用 PBS 冲洗 3 次,用 DAPI 染细胞核 5 min。在激光共焦荧光显微镜下观察,并随机采集梗死和非梗死区域交界处的图像并进行定量研究。用 Image Pro Plus 测量荧光强度,阳性表达水平=积分光密度值(IOD)/视野面积×100%。

1.3.6 苏木素-伊红染色

将脑组织用石蜡包埋,并用石蜡切片机切为 6 μm 厚度的切片。脑切片经脱蜡至水后,按常规程序分别用苏木素和伊红染色液进行染色。脱水封片后,显微镜下观察脑组织形态表现。

1.3.7 蛋白质免疫印迹

收集缺血半暗带脑组织,用 RIPA 裂解法提取蛋白,用 BCA 法量化每样本蛋白浓度。将 80 μg 蛋白的样本行 SDS/PAGE 电泳分离并转移到 PVDF 膜上。然后,在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h,并在 4℃ 下与适当稀释比例的初级抗体孵育过夜。抗体稀释浓度为:PSD95(1:3000)、synaptotagmin(1:2000)、synapsin I(1:1000)和 β-actin(1:10000)。TBST 洗膜 3 次,室温下与 1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次,使用 ECL 增强化学发光系统观察蛋白带,并用 Image Pro Plus 进行定量光密度值 IOD。阳性表达水平=目的蛋白(IOD)/β-actin(10000)×100%。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 分析软件对所有数据进行统计学分析。所有数据表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。多组数据比较采用单因素方差分析法,组间均数两两比较采用事后 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 大豆皂苷 Bb 预处理降低脑 I/R 所致的神经功能障碍和脑水肿

通过 mNSS 评分表和脑含水量来分别评估大豆

皂苷 Bb 预处理对脑 I/R 诱导的神经功能障碍和脑水肿的影响。如图 1A 所示,与假手术组相比, MCAO 组 NSS 评分显著升高 ($P < 0.001$),提示神经功能障碍;而低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理均显著降低 MCAO 大鼠的 NSS 评分 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),提示大豆皂苷 Bb 预处理降低 MCAO 大鼠神经功能障碍,其中高剂量效果更为显著 ($P < 0.001$)。脑含水量检测结果(图 1B)显示, MCAO 组脑含水量显著高于假手术组 ($P < 0.001$),而低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理的 MCAO 大鼠脑含水量均较 MCAO 组显著降低 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),提示大豆皂苷 Bb 预处理降低 MCAO 大鼠的脑水肿,其中高剂量效果更为显著 ($P < 0.001$)。

2.2 大豆皂苷 Bb 预处理减轻脑 I/R 后的脑梗死

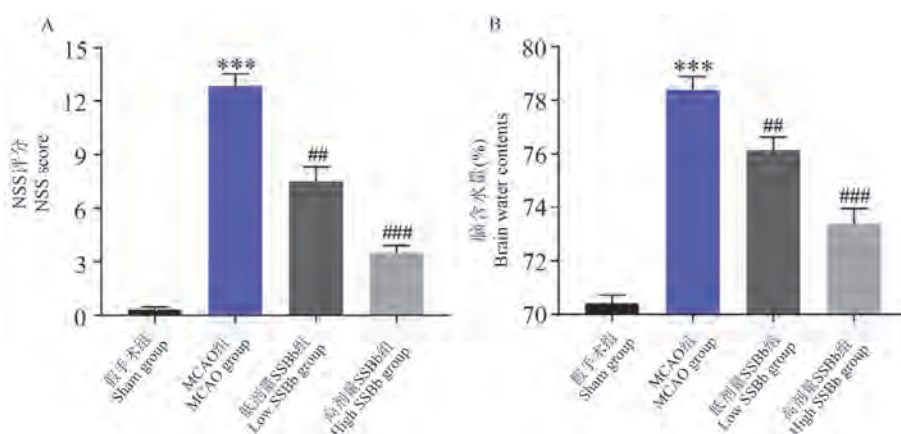
用 TTC 染色和 MAP-2 免疫荧光染色评估大豆皂苷 Bb 预处理对脑 I/R 诱导脑梗死的影响。TTC 染色(图 2A、2C)结果显示,与假手术组相比, MCAO 组梗死体积显著增加 ($P < 0.001$);与 MCAO 组相比,低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理组梗死体积均显著降低 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),且高剂量组效果更显著 ($P < 0.001$)。MAP-2 免疫荧光染色(图 2B、2D)结果显示,与假手术组相比, MCAO 组 MAP-2 荧光强度显著降低 ($P < 0.001$);与 MCAO 组相比,低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理组 MAP-2 荧光强度均显著增加 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),且高剂量组效果更显著 ($P < 0.001$)。这些结果提示,大豆皂苷 Bb 预处理可减轻脑 I/R 后的脑梗死。

2.3 大豆皂苷 Bb 预处理抑制脑 I/R 诱导的炎症反应

为明确大豆皂苷 Bb 预处理对脑 I/R 诱导的炎症的影响,采用 HE 染色法观察脑 I/R 后 24 h 脑组织形态,免疫荧光法检测脑组织中 TNF- α 的表达水平,并用 MAP-2 显示缺血半暗带。HE 染色结果(图 3A)表明,假手术组脑组织形态和细胞结构基本正常;MCAO 组脑组织显示水肿和炎性细胞浸润现象,组织中的部分细胞可见细胞核碎片、核固缩和凋亡小体;低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理组显示脑组织水肿和炎性细胞浸润现象减轻,组织中细胞形态也趋向正常。免疫荧光染色结果(图 3B~3D)表明,与假手术组比较, MCAO 组 TNF- α 荧光强度显著增高 ($P < 0.001$);与 MCAO 组比较,低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理组 TNF- α 荧光强度均显著降低 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),且高剂量组效果更显著 ($P < 0.001$)。这些结果表明大豆皂苷 Bb 可以减轻脑 I/R 导致的炎症反应。

2.4 大豆皂苷 Bb 预处理抑制脑 I/R 诱导的突触相关蛋白的表达

Western blot 结果(图 4)显示,与假手术组相比, MCAO 组 PSD95、synaptotagmin 和 synapsin I 的表达水平均显著降低 ($P < 0.001$);与 MCAO 组相比,低、高剂量大豆皂苷 Bb 预处理组上述蛋白表达水平均显著增加 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$),且高剂量组效果更显著 ($P < 0.001$),这表明大豆皂苷 Bb 抑制脑 I/R 诱导的神经细胞的轴突损伤。

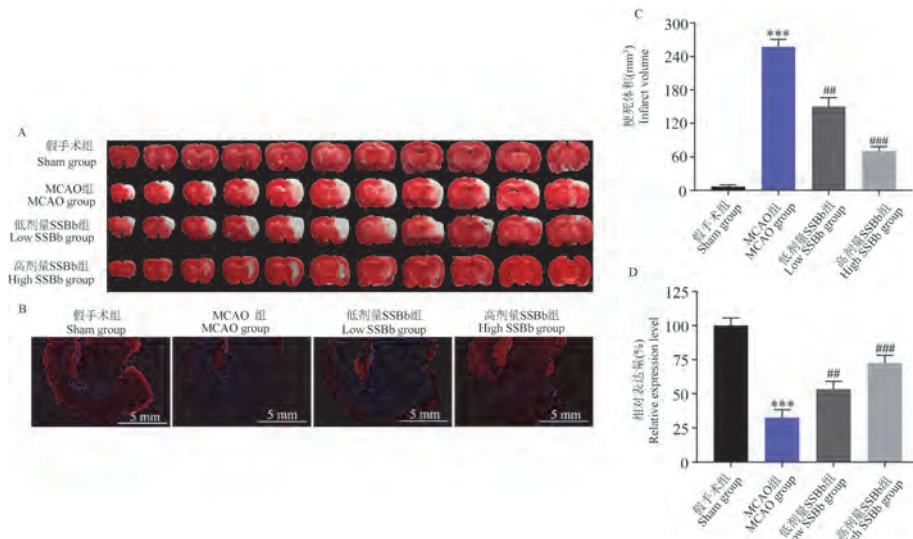


注:A:各组大鼠的NSS评分;B:各组大鼠的脑含水量。与假手术组相比,*** $P < 0.001$;与MCAO组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图1 大豆皂苷 Bb 预处理可以降低脑 I/R 所致的神经功能障碍和脑水肿 ($n = 5$)

Note. A, NSS scores of rats in various groups. B, Brain water contents of rats in various groups. Compared with sham group, *** $P < 0.001$. Compared with MCAO group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

Figure 1 SSBb pretreatment reduces neurological dysfunction and brain edema caused by brain I/R

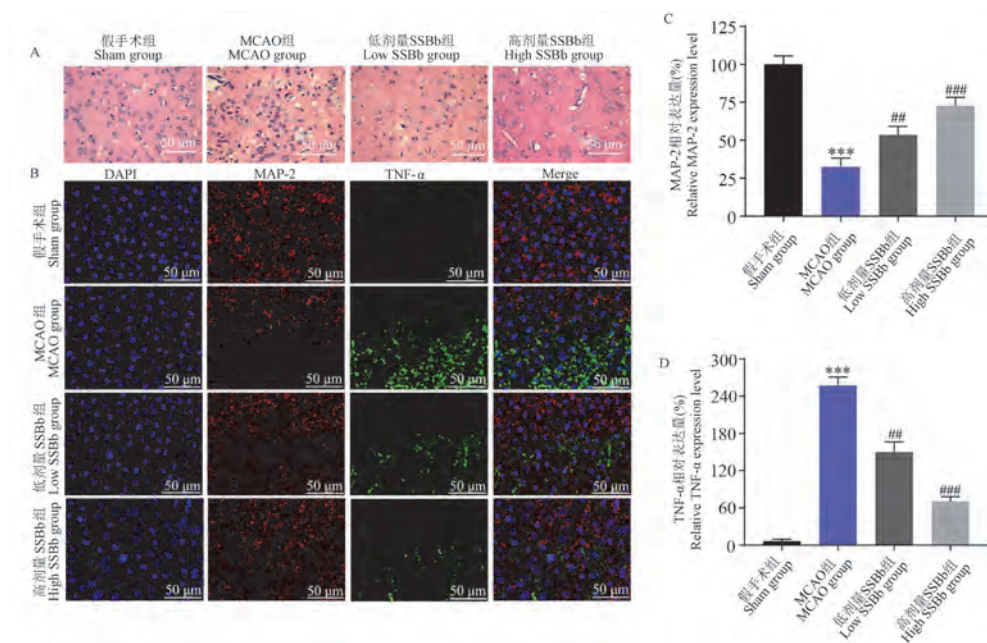


注:A:代表性的 TTC 染色图像;B:代表性 MAP-2 染色切片的荧光显微图像显示的脑梗死区域 (MAP-2 为亮红色点,细胞核为亮蓝色点);C:各组梗死体积;D:各组 MAP-2 的相对荧光强度。与假手术组相比,*** $P<0.001$;与 MCAO 组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 2 大豆皂苷 Bb 预处理减轻大鼠脑 I/R 后的脑梗死 ($n=5$)

Note. A, Representative images of TTC staining. B, Representative fluorescence microscopy images of MAP-2 stained sections showing the infarction areas in the brain (MAP-2 appears as bright red dots, while the nucleus is represented as bright blue spots). C, Infarct volume in various groups. D, Relative fluorescence intensity of MAP-2 in various groups. Compared with sham group, *** $P<0.001$. Compared with MCAO group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 2 SSBb pretreatment alleviates cerebral infarction after cerebral I/R in rats

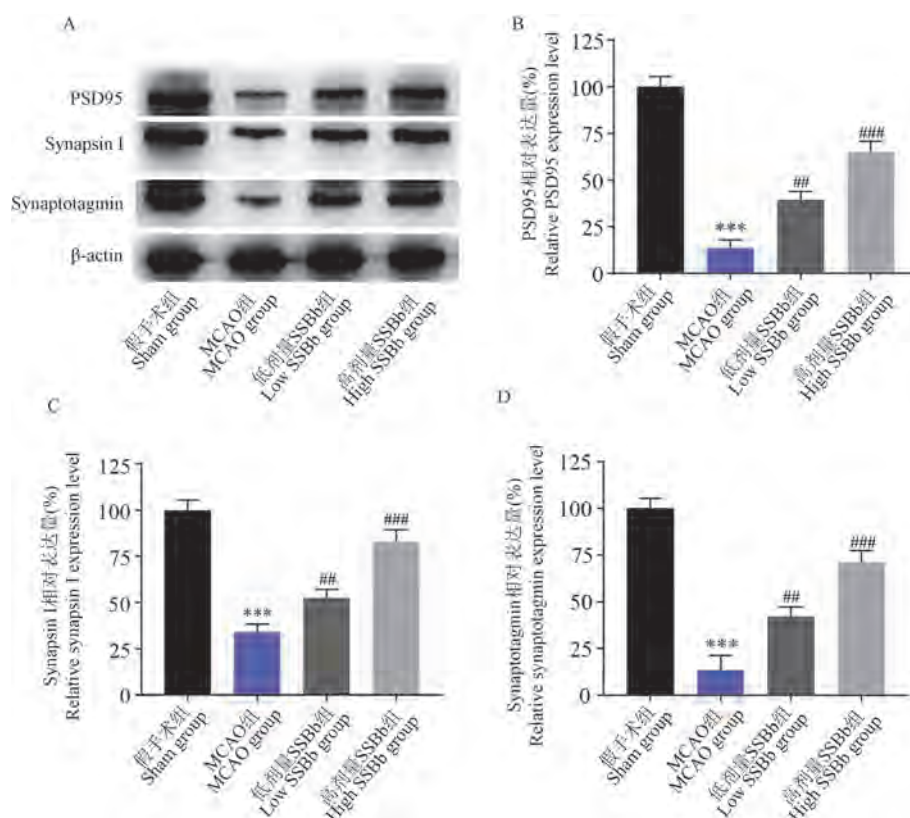


注:A:各组脑组织代表性 HE 染色图像;B:缺血半暗带中 MAP-2 和 TNF-α 免疫荧光定位图像;C、D:半暗带中 MAP-2 和 TNF-α 的相对荧光强度。与假手术组相比,*** $P<0.001$;与 MCAO 组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 3 大豆皂苷 Bb 预处理抑制脑 I/R 诱导的炎症反应 ($n=5$)

Note. A, Representative HE staining images of brain tissues in each group. B, Immunofluorescence localization of MAP-2 and TNF-α in ischemic penumbra area. C, D, Relative fluorescence intensity of MAP-2 and TNF-α in the penumbra region. Compared with sham group, *** $P<0.001$. Compared with MCAO group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 3 SSBb pretreatment inhibits inflammatory response induced by cerebral I/R



注:A:各组代表性 PSD95、synapsin I 和 synaptotagmin 的 Western blot;B~D:各组 PSD95、synapsin I 和 synaptotagmin 的蛋白表达的定量分析。与假手术组相比,*** $P<0.001$;与 MCAO 组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 4 大豆皂苷 Bb 预处理对脑 I/R 后突触相关蛋白表达的影响($n=5$)

Note. A, Representative Western blot electrophoregrams of PSD95, synapsin I and synaptotagmin in each group. B~D, Quantification analysis of the expression levels of PSD95, synapsin I and synaptotagmin proteins in various groups. Compared with sham group, *** $P<0.001$. Compared with MCAO group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 4 Effect of SSBb pretreatment on the expression of synaptic-associated proteins after cerebral I/R

3 讨论

脑卒中是导致死亡和神经功能障碍的主要原因^[1-2],而 IS 在所有类型的脑卒中病例中约占 80%~85%^[14]。先前的研究已经证实,脑 I/R 会导致脑血管损伤和血脑屏障的破坏,以及神经元损伤的级联效应^[6-7,15]。目前还没有阻断脑 I/R 的有效策略,因此,关于如何减少脑 I/R 损伤的不良影响,仍需要做大量的工作。本研究显示 SSBb 预处理能减轻脑 I/R 后神经功能损伤、脑水肿和脑梗死,提示其可能是潜在的用于 IS 的神经保护剂。

脑 I/R 损伤会加重脑缺血引发促炎介质的释放、细胞死亡、轴突损伤和再生抑制^[4-5]。抗炎、抗凋亡和维持损伤神经元的存活是神经系统保护和再生的重要过程。各种促炎细胞因子的释放引起的炎症级联反应是脑 I/R 炎症损伤的主要机制^[16]。TNF- α 是一种强促炎细胞因子,在缺血性脑损伤中

发挥多效性功能^[17]。在先前不同疾病类型的研究中显示 SSBb 具有抑制炎症作用^[10-11]。在本研究中,也证明了 SSBb 预处理能减少缺血半暗带中 TNF- α 的表达,提示其在脑 I/R 模型大鼠中也具有抗炎作用。

突触是中枢神经系统神经元之间的接触位点,有助于信息的处理、传递和存储。树突棘是一种分散在许多类型神经元的树突上的微小突起,是兴奋性突触的主要靶点^[18]。大脑中血流减少 90%,10~20 min 内就会导致树突棘丢失和不可逆的树突损伤^[19]。在急性 MCAO 模型中,缺血性卒中不仅会导致梗死缺血区的神经元死亡,还会损害缺血半暗带区域的神经元结构^[20]。中枢神经元的棘和树突是突触信号传导的重要位点,其也是缺血后最易损伤的结构,其结构破坏会中断神经元回路和损害大脑突触发生的功能。为增加突触发生,神经元会增加树突分枝的形态学改变,使大脑能够重组神经元回

路,增加与突触调节相关的神经递质释放。synaptotagmin 是突触囊泡的对接和与神经元膜的融合的关键蛋白^[21]。Synapsin I 是一种促进突触囊泡形成、突触发生和调节神经递质释放的蛋白^[22]。PSD-95 是树突棘突触后密度中的一种主要支架蛋白^[23]。本研究结果表明,SSBb 预处理可以明显增加脑 I/R 损伤后 synaptotagmin、synapsin I 和 PSD-95 的表达,表明 SSBb 预处理在突触发生中的潜在作用。

本研究结果表明,SSBb 预处理能够减轻大鼠脑 I/R 损伤引起的神经功能缺陷、脑水肿及脑梗死,并且能够促进突触相关蛋白的表达,具有神经保护作用。

参考文献:

- [1] Katan M, Luft A. Global burden of stroke [J]. *Semin Neurol*, 2018, 38(2): 208–211.
- [2] Krishnamurthi RV, Ikeda T, Feigin VL. Global, regional and country-specific burden of ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage: a systematic analysis of the global burden of disease study 2017 [J]. *Neuroepidemiology*, 2020, 54(2): 171–179.
- [3] Herpich F, Rincon F. Management of acute ischemic stroke [J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(11): 1654–1663.
- [4] Hervella P, Rodríguez-Castro E, Rodríguez-Yáñez M, et al. Intra- and extra-hospital improvement in ischemic stroke patients: influence of reperfusion therapy and molecular mechanisms [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3513.
- [5] Jiao L, Zhang J, Li Z, et al. Edaravone alleviates delayed neuronal death and long-dated cognitive dysfunction of hippocampus after transient focal ischemia in wistar rat brains [J]. *Neuroscience*, 2011, 182: 177–183.
- [6] Orellana-Urzuá S, Rojas I, Lábano L, et al. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(34): 4246–4260.
- [7] Lv J, Guan W, You Q, et al. RIPC provides neuroprotection against ischemic stroke by suppressing apoptosis via the mitochondrial pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5361.
- [8] Nagano T, Katase M, Tsumura K. Dietary soyasaponin attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity via gut microbiota in mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2019, 195(1): 86–95.
- [9] Fujimatsu T, Endo K, Yazaki K, et al. Secretion dynamics of soyasaponins in soybean roots and effects to modify the bacterial composition [J]. *Plant Direct*, 2020, 4(9): e00259.
- [10] Zhu LJ, Fu RR, Liu XY, et al. Soyasaponin Bb protects rat hepatocytes from alcohol-induced oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(48): 302–306.
- [11] Hong SW, Heo H, Yang JH, et al. Soyasaponin I improved neuroprotection and regeneration in memory deficient model rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81556.
- [12] Zhang B, Deng F, Zhou C, et al. CLC-3 induction protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through promoting beclin1/vps34-mediated autophagy [J]. *Hum Cell*, 2020, 33(4): 1046–1055.
- [13] Zhao Y, Xue Y, Liu Z, et al. Role of the Janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway in the protective effect of remote ischemia preconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(9): 664–670.
- [14] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke [J]. *Int J Stroke*, 2009, 4(6): 461–470.
- [15] Pan J, Konstas AA, Bateman B, et al. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies [J]. *Neuroradiology*, 2007, 49(2): 93–102.
- [16] Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(5): 779–789.
- [17] Ye XC, Hao Q, Ma WJ, et al. Dectin-1/Syk signaling triggers neuroinflammation after ischemic stroke in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 17.
- [18] Gipson CD, Olive MF. Structural and functional plasticity of dendritic spines-root or result of behavior? [J]. *Genes Brain Behav*, 2017, 16(1): 101–117.
- [19] McLeod DD, Parsons MW, Hood R, et al. Perfusion computed tomography thresholds defining ischemic penumbra and infarct core: studies in a rat stroke model [J]. *Int J Stroke*, 2015, 10(4): 553–559.
- [20] Brown CE, Murphy TH. Livin' on the edge: imaging dendritic spine turnover in the peri-infarct zone during ischemic stroke and recovery [J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(2): 139–146.
- [21] Stein A, Radhakrishnan A, Riedel D, et al. Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca^{2+} -dependent trans interaction with phospholipids [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, 14(10): 904–911.
- [22] Brenes O, Giachello CN, Corradi AM, et al. Synapsin knockdown is associated with decreased neurite outgrowth, functional synaptogenesis impairment, and fast high-frequency neurotransmitter release [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(10): 1492–506.
- [23] Vickers CA, Stephens B, Bowen J, et al. Neurone specific regulation of dendritic spines *in vivo* by post synaptic density 95 protein (PSD-95) [J]. *Brain Res*, 2006, 1090(1): 89–98.

[收稿日期] 2021-09-28

修银玲, 孙凯旋, 于月新. 白藜芦醇对小鼠卵巢早衰的干预作用及可能机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 81-86, 93.
Xiu YL, Sun KX, Yu YX. Effect of resveratrol on premature ovarian failure in mice and its possible mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 81-86, 93.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.011

白藜芦醇对小鼠卵巢早衰的干预作用及可能机制

修银玲, 孙凯旋, 于月新 *

(中国人民解放军北部战区总医院 生殖医学科, 沈阳 110000)

【摘要】 目的 观察白藜芦醇对卵巢早衰小鼠的干预作用,并阐述其可能机制。**方法** 40 只两月龄雌性小鼠随机分为 4 组,分别为对照组(Control)、模型组(Model group)、20 mg/kg RES 组(20 mg/kg RES group)和 40 mg/kg RES 组(40 mg/kg RES group),每组 10 只。测量小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠相对重量比;采用 HE 染色观察小鼠卵巢组织中卵泡数量变化;RT-qPCR 法检测卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达;免疫组化染色观察卵巢组织中 β -catenin 蛋白表达;Western blot 法检测卵巢组织中 Mvh、Oct4、SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。**结果** 20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比均高于模型组;与模型组比较,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠原始卵泡数量增加、闭锁卵泡数量下降($P<0.05$),而卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达增加($P<0.05$);与模型组比较,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 β -catenin 阳性蛋白表达升高,且呈浓度依赖性;与模型组比较,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 Mvh、Oct4、SOD2、Nrf2 和 Bcl-2 蛋白表达升高,Bax 表达下降($P<0.01$)。**结论** 白藜芦醇对卵巢早衰小鼠具有保护作用,其机制可能与抑制卵巢细胞凋亡,激活 Wnt/ β -catenin 通路促进卵巢功能恢复有关。

【关键词】 白藜芦醇;卵巢早衰;小鼠;卵巢;卵泡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0081-06

Effect of resveratrol on premature ovarian failure in mice and its possible mechanism

XIU Yinling, SUN Kaixuan, YU Yuexin *

(Department of Reproductive Medicine, General Hospital of the Northern Theater, Shenyang 110000, China)

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of resveratrol in mice with premature ovarian failure and to explore its possible mechanism. **Methods** Forty two-month-old female mice were randomly divided into four groups: control group (Control), model group, 20 mg/kg RES group, and 40 mg/kg RES group with 10 mice in each group. Changes in body weight and the ovarian weight coefficient were assessed. Follicle number changes in mouse ovarian tissue were observed by HE staining. Relative mRNA expression of cyclin D1, Wnt1 and β -catenin in ovarian tissues was measured by RT-qPCR. β -catenin protein expression in ovarian tissue was detected by immunohistochemical staining. Mvh, Oct4, SOD2, Nrf2, Bax and Bcl-2 protein expression in ovarian tissues was detected by Western blot. **Results** Body weight, ovary weight, and ovary/mouse weight ratio in 20 and 40 mg/kg RES groups were higher than those in the model group. Compared with the model group, the number of primordial follicles was increased and the number of atresia follicles was decreased in 20 and 40 mg/kg RES groups ($P<0.05$), while mRNA expression of cyclin D1, Wnt1 and β -catenin was increased in ovarian tissues ($P<0.05$). Compared with the model group, β -catenin protein expression was increased in ovarian tissues in 20 and 40 mg/kg RES groups in a concentration-dependent manner. Compared with the model group, Mvh, Oct4, SOD2, Nrf2 and Bcl-2 protein expression was increased and Bax expression was decreased in

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2020JH2/10300118)。

[作者简介] 修银玲(1990—),女,硕士,主治医师,研究方向:生殖医学研究。E-mail:xiuyinling@126.com

[通信作者] 于月新(1973—),女,博士,主任医师,研究方向:卵巢早衰。E-mail:yuyuexinpingan@163.com

ovarian tissues of 20 and 40 mg/kg RES groups ($P < 0.01$). **Conclusions** The protective effect of resveratrol in mice with premature ovarian failure may be related to inhibition of ovarian cell apoptosis and activation of the Wnt/ β -catenin pathway to promote recovery of ovarian functions.

【Keywords】 resveratrol; premature ovarian failure; mice; ovary; follicle

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 是指女性在 40 岁前由于卵巢内卵泡提前衰竭或卵泡发育停滞, 导致的卵巢功能丧失^[1]。POF 的特点是雌激素水平低下, 促性腺激素 (Gn) 水平升高, 与绝经后妇女相同^[2]。近几年, 卵巢早衰的发病率有上升趋势, 研究认为 POF 与染色体缺陷、毒素暴露和自身免疫性疾病有关, 但多数患者病因尚不明确。经典的化疗药物如环磷酰胺 (CTX) 和白消安 (BU) 具有严重的生殖毒性, 常用于构建 POF 动物模型^[3]。

白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种多酚类天然植物抗毒素, 广泛存在于葡萄、果桑和其他植物中, 它具有多种药理作用, 如抗肿瘤、免疫调节、抗炎、抗氧化、细胞保护、抗凋亡等^[4]。文献报道, RES 可以通过降低 LH/LH/FSH 比值和 TNF- α 水平来改善卵泡发育^[5]。本研究观察 RES 对卵巢早衰小鼠的干预作用, 并通过检测 Wnt/ β -catenin 信号通路和抗氧化等指标, 探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 40 只, 体重 (20 ± 0.5) g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供 [SCXK(辽)2017-0001], 小鼠饲养于北部战区总医院动物实验科 [SYXK(辽)2018-0021], 本研究经北部战区总医院动物伦理委员会批准 (202005068), 所有动物实验符合 3R 指导原则。

1.2 主要试剂与仪器

白藜芦醇 (美国 Sigma 公司, 货号 L1645); 环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CTX, 美国 Sigma 公司, 货号 C0768) 和白消安 (Busulfan, BUS, 美国 Sigma 公司, 货号 B2635); 兔抗鼠 β -catenin 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 SAB4501254); 兔抗鼠 Mvh 抗体 (美国

Sigma 公司, 批号 SAB540697); 兔抗鼠 Oct4 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 ZRB100); 兔抗鼠 SOD2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 T4929); 兔抗鼠 Nrf2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 SAB4501926); 兔抗鼠 Bax 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 A5367); 兔抗鼠 Bcl-2 抗体 (美国 Sigma 公司, 批号 A8924); 荧光定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司, 批号 SR1110-200T); PCR 引物 (Invitrogen 公司); 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司, 批号 14E25L13D124)。蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 显微镜购自日本 OLYMPUS 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

C57BL/6 小鼠经腹腔注射 CTX (120 mg/kg) 和 BU (30 mg/kg) 制成 POF 模型, 观察 4 周。将 RES 溶解于生理盐水中, 造模同时灌胃给药 28 d。将小鼠分为 4 组: 对照组 (Control)、模型组 (Model group)、20 mg/kg RES 组 (20 mg/kg RES group) 和 40 mg/kg RES 组 (40 mg/kg RES group), 每组 10 只。在治疗最后 1 d 测量并记录小鼠和卵巢的重量。

1.3.2 苏木精-伊红 (HE) 染色观察卵巢组织与卵泡计数

取小鼠卵巢组织, 4% 多聚甲醛固定过夜, 石蜡包埋。HE 染色后观察卵巢形态特征, 计算闭锁率 (闭锁卵泡占卵泡总数的比例) 和原始卵泡率 (原始卵泡占卵泡总数的比例)。

1.3.3 RT-qPCR 检测 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达

采用 TRIzol 试剂提取卵巢总 RNA, 按照 PrimeScript RT-kit 方法, 通过逆转录获得 cDNA, 并按照 TB-Green-Mix-kit 说明书进行 RT-qPCR。表 1 列出了 RT-qPCR 引物序列, 内参采用 GAPDH。

表 1 引物序列 (5'-3')

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
CyclinD1	GATGAGGAAGTTGCTAGAA	TCGTCAGCCAATCGGTACTAG
Wnt1	GGTTTCTACTACGTTGCTACTGG	GGAATCCGTCAACAGGTTTCGT
β -catenin	AACGGCTTTCCGGTTGAGCTG	TGGCGATATCCAAGGGCTTC
GAPDH	GTCCCTAGACAAAACGAGCGT	TGTCTCCACTCATAGTTCTTG

1.3.4 免疫组化染色观察卵巢组织 β -catenin 蛋白表达

卵巢组织石蜡切片经脱蜡、水化,3%过氧化氢中孵育 10 min,阻断非特异性反应,切片加 β -catenin 一抗孵育 4 h,然后加辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗处理 15 min,DAB 显色试剂盒显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片,以 PBS 溶液作为一抗的阴性对照。

1.3.5 Western blot 法检测 Mvh、Oct4、 β -catenin、SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

取各组小鼠卵巢组织 50 μ g,RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳后转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入一抗,4℃孵育过夜,将膜清洗 3 次,然后二抗室温孵育 2 h,用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析,结果以目的蛋白相对表达量表示,目的蛋白相对表达量=目的蛋白 IOD 值/内参 β -actin IOD 值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行数据分析,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间的统计学差异采用 t 检验,多组数据采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠相对重量比

与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢体积明显变大;20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠体重、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比均高于模型组,见图 1、表 2。

2.2 HE 染色观察小鼠卵巢组织的病理变化

与对照组相比,模型组小鼠原始卵泡数量下降($P<0.01$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠原始卵泡数量增加($P<0.05$)。

与对照组相比,模型组小鼠闭锁卵泡数量增加($P<0.01$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠闭锁卵泡数量下降($P<0.05$),见图 2、图 3。

2.3 小鼠卵巢中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达

与对照组比,模型组小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达下降($P<0.01$),而与模型组比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达增加($P<0.05$),见图 4。

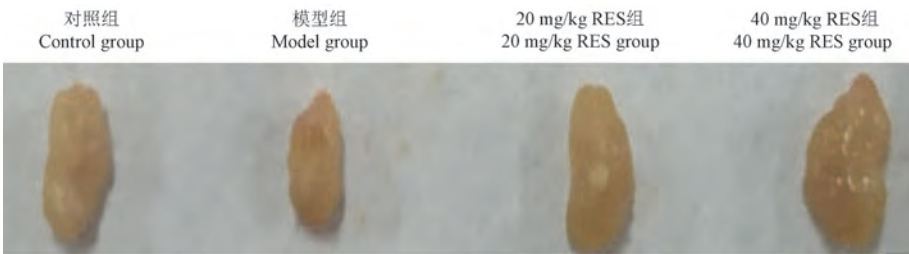


图 1 各组小鼠卵巢形态比较

Figure 1 Comparison of ovarian morphology between groups of mice

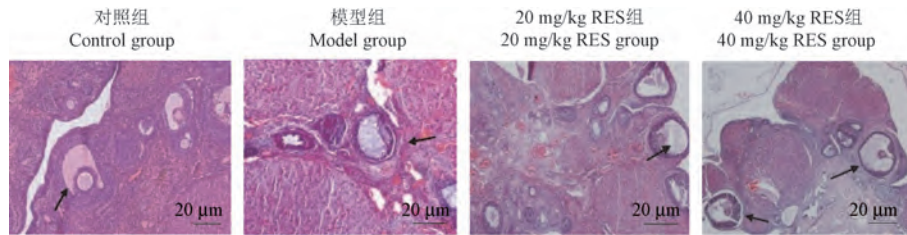
表 2 小鼠重量、卵巢重量和卵巢/小鼠重量比($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Mice weight, ovary weight and ovary/mice weight ratio

组别 Groups	小鼠重量(g) Mice weight	卵巢重量(g) Ovarian weight	卵巢/小鼠重量比 Ovary/mice weight ratio
对照组 Control group	39.42 $\pm$ 1.14	0.0310 $\pm$ 0.0027	0.000786 $\pm$ 0.000049
模型组 Model group	25.60 $\pm$ 0.66 ^{**}	0.0067 $\pm$ 0.0014 ^{**}	0.000265 $\pm$ 0.000054 ^{**}
20 mg/kg RES 组 20 mg/kg RES group	30.24 $\pm$ 1.57 ^{##}	0.0157 $\pm$ 0.0025 ^{##}	0.000519 $\pm$ 0.000077 ^{##}
40 mg/kg RES 组 40 mg/kg RES group	33.50 $\pm$ 0.87 ^{##}	0.0204 $\pm$ 0.0028 ^{##}	0.000608 $\pm$ 0.000085 ^{##}

注:与对照组相比,^{**} $P<0.01$;与模型组相比,^{##} $P<0.01$ 。

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

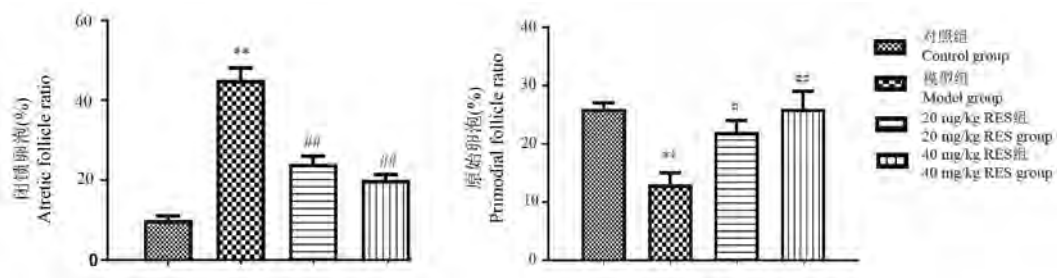


注:箭头所指示均为成熟卵泡。

图 2 白藜芦醇对小鼠卵巢组织的影响(HE)

Note. Arrows indicate mature follicles.

Figure 2 Effect of resveratrol on ovarian tissue of mice

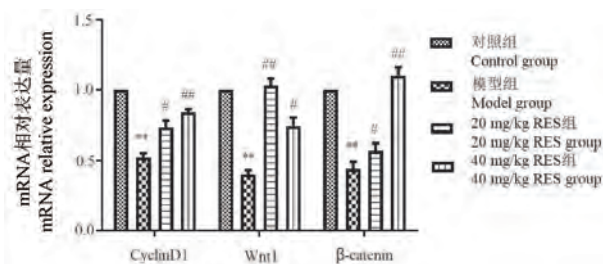


注:与对照组相比,*** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.05$,### $P<0.01$ 。

图 3 小鼠卵巢中原始卵泡和闭锁卵泡比例($\bar{x}\pm s, n=10$)

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

Figure 3 Ratio of the primordial and atresia follicles in the ovaries



注:与对照组比, ** $P<0.01$;与模型组比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 4 小鼠卵巢组织中 CyclinD1、Wnt1 和 β-catenin mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s, n=10$)

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

Figure 4 Relative expression level of CyclinD1, Wnt1 and β-catenin mRNA in mouse ovarian tissue

2.4 卵巢组织中 β-caterin 蛋白表达情况

与对照组比,模型组小鼠卵巢组织中 β-caterin 阳性蛋白表达下降,而与模型组比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 β-caterin 阳性蛋白表达升高,见图 5。

2.5 卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达情况

与对照组相比,模型组小鼠卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达下降($P<0.001$),而与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织

中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达升高($P<0.05$),且呈浓度依赖性,见图 6。

2.6 卵巢组织中 SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况

与对照组相比,模型组小鼠卵巢组织中 SOD2、Nrf2 和 Bcl-2 表达下降, Bax 表达升高($P<0.001$);与模型组相比,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠卵巢组织中 SOD2、Nrf2 和 Bcl-2 表达升高, Bax 表达下降($P<0.001$),且呈浓度依赖性,见图 7。

3 讨论

40 岁前自然绝经这一临床现象称之为卵巢功能早衰,是危害女性健康的重要因素之一,目前各种中西医结合治疗方法效果均不理想^[6]。因此,为恢复卵巢功能寻找替代治疗药物至关重要。白藜芦醇是一种存在于多种植物中的非黄酮类多酚化合物,它具有抗菌、抗癌、抗炎、抗氧化等多方面的药理活性^[7]。在癌细胞中,RES 具有强大的抗炎作用和抗氧化作用,并发现可诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞^[8-9]。

本实验中,模型组小鼠体重、卵巢重量低于对

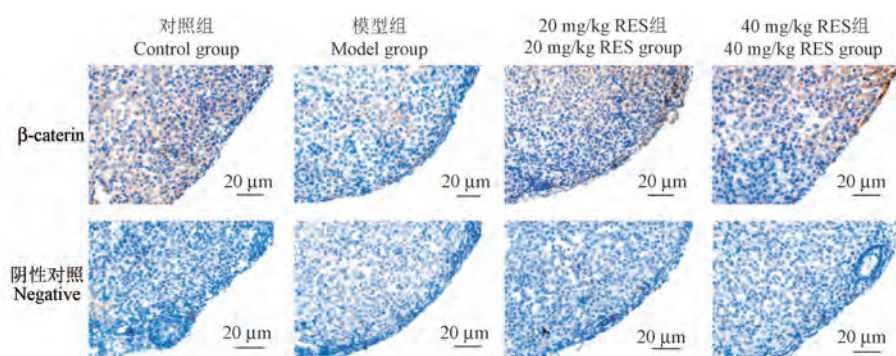
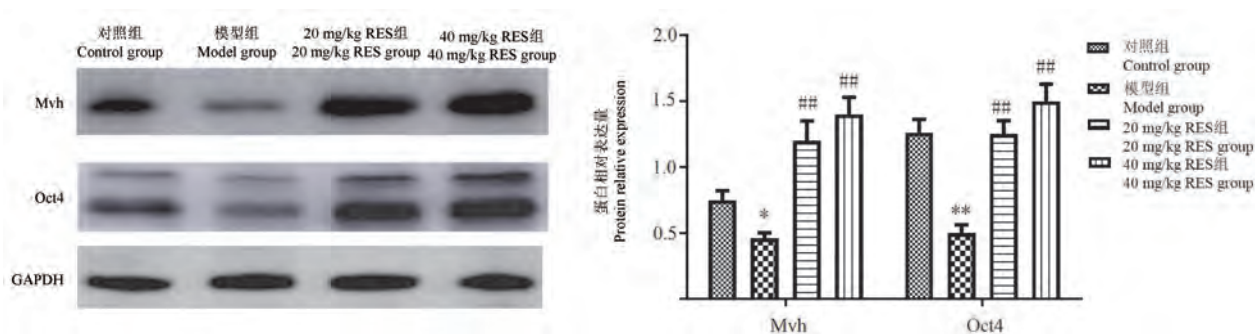


图 5 小鼠卵巢组织中 β -catenin 蛋白表达(免疫组化)

Figure 5 Protein expression of β -catenin in mice ovarian tissue (immunohistochemistry)

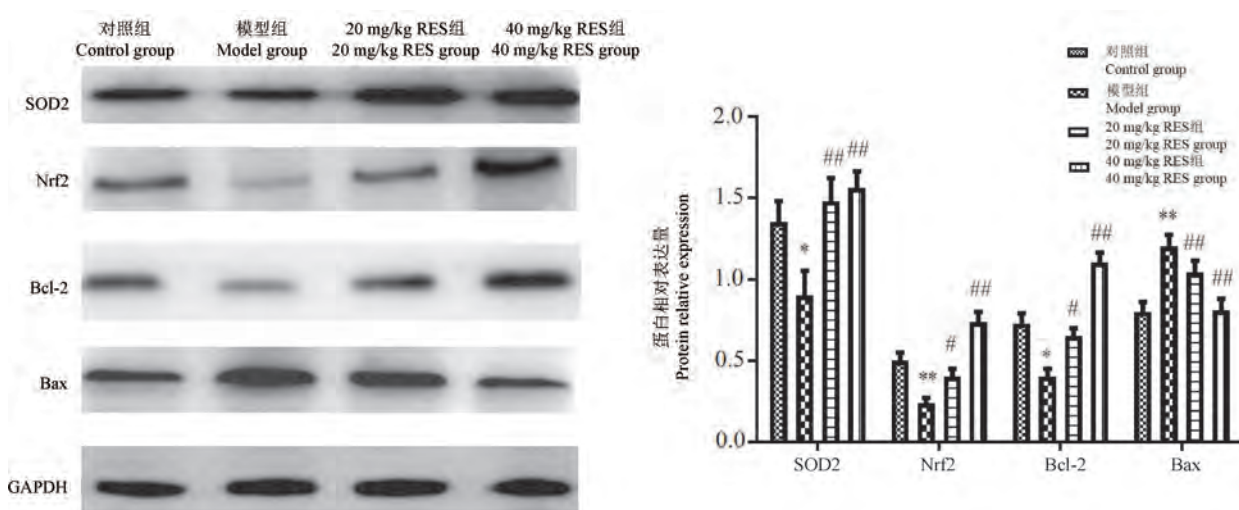


注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 6 白藜芦醇对卵巢组织中 Mvh 和 Oct4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 6 Effect of resveratrol on the expression of Mvh and Oct4 proteins in ovarian tissues



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 7 白藜芦醇对卵巢组织中 SOD2、Nrf2、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

Figure 7 Effect of resveratrol on the expression of SOD2, Nrf2, Bax and Bcl-2 proteins in ovarian tissues

对照组;HE 染色观察发现,与对照组比较,模型组小鼠卵巢体积和成熟卵泡数量减少,而闭锁卵泡数量增加;Western blot 检测发现,POF 小鼠卵巢 Mvh 和 Oct4 蛋白表达低于对照组,这些结果说明 POF 小鼠建模成功^[10]。

白藜芦醇能消除 POF 的免疫损伤,恢复卵巢功能,但其具体机制尚不明确^[11]。Mvh 是生殖细胞标志基因,Oct4 是胚胎干细胞标志物,通常以 Mvh 和 Oct4 作为指标评价雌性生殖干细胞(FGSCs)在小鼠体内的存活情况^[12]。HE 染色观察发现,20 mg/kg RES 组和 40 mg/kg RES 组小鼠原始卵泡数量低于对照组,但高于模型组;Western blot 法检测发现,RES 组 Mvh 和 Oct4 蛋白表达高于模型组,提示 RES 可能通过维持 FGSCs 的存活来保护卵巢功能,这与 HE 染色观察结果基本一致。

Wnt/ β -catenin 通路是经典的 Wnt 通路,参与机体许多重要生理活动,包括胚胎早期发育、生殖系统发育等^[13]。 β -catenin 蛋白是 Wnt 通路激活的重要标志,已被证明能持续增强 FSH 分泌,促进卵泡发育^[14];CyclinD1 位于 β -catenin 下游,是重要的细胞周期调控蛋白^[15-16]。免疫组化观察发现,模型组卵巢组织中 β -catenin 蛋白表达低于对照组,说明在 POF 小鼠卵巢组织中, β -catenin 表达下调,会抑制卵泡发育,可能对卵巢功能有一定影响,而 RES 组 β -catenin 阳性蛋白表达升高,且呈浓度依赖性,提示 RES 可能上调 β -catenin 表达,增强 FSH 分泌,促进卵泡发育;RT-qPCR 法检测发现,RES 组 CyclinD1、Wnt1 和 β -catenin mRNA 表达均高于模型组,且 40 mg/kg RES 组 β -catenin mRNA 表达高于 20 mg/kg RES 组。这些结果进一步说明 RES 可能通过上调 Wnt1 mRNA 表达,使细胞质中的 β -catenin mRNA 表达增加,进入细胞核,从而激活 Wnt/ β -catenin 通路的下游靶基因 CyclinD1 mRNA,促进卵泡发育,有助于卵巢功能恢复,这与免疫组化观察结果基本一致。

Nrf2、HO-1 和 SOD 是体内抗氧化应激和维持氧化还原平衡的几个重要因子。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗氧化酶,可分为 SOD1、SOD2 等,具有清除自由基,保护机体免受氧自由基损伤^[17-18]。Nrf2 为调控机体抗氧化应激反应的核转录因子,能够显著诱导机体的内源性抗氧化应答^[19]。Western blot 检测发现,模型组 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达低于对照组($P<0.05$),提示 POF 可抑制

SOD2 和 Nrf2 蛋白表达,导致 ROS 积累,使卵巢功能受损。而 RES 组 SOD2 和 Nrf2 蛋白表达高于模型组($P<0.05$),且呈浓度依赖性,提示当 POF 诱发卵巢氧化应激时,RES 可促进 Nrf2 激活并进入细胞核,启动下游抗氧化基因 SOD2 表达,起到清除自由基作用,延缓卵巢衰老。

Bax 和 Bcl-2 均是 Bcl-2 家族的重要分子,Bcl-2 为抗凋亡蛋白,而 Bax 为促凋亡蛋白。Western blot 检测发现,与对照组比较,模型组小鼠卵巢组织中 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高,说明 POF 可促进卵巢细胞凋亡,损害卵巢功能;与模型组比较,RES 组 Bcl-2 表达增加,Bax 表达减少,说明 RES 可抑制卵巢细胞凋亡,提高细胞存活率。

综上所述,白藜芦醇对卵巢早衰小鼠具有保护作用,其机制可能与抑制卵巢细胞凋亡,以及激活 Wnt/ β -catenin 通路促进卵巢功能恢复有关。

参考文献:

- [1] Sukur YE, Kivancil IB, Ozmen B, et al. Ovarian aging and premature ovarian failure [J]. J Turk Ger Gynecol Assoc, 2014, 15(3): 190-196.
- [2] 胥风华,侯亚宁,葛鹏玲,等. 卵巢早衰中医治疗特色 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 25-28.
- [3] 朱玲,章雅琼,彭艳丽,等. 左归丸对免疫性卵巢早衰模型小鼠卵巢 GDF-9/Smad 2 信号转导的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1367-1371.
- [4] Li T, Chen LL, Yu YY, et al. Resveratrol alleviates hypoxia/reoxygenation injury-induced mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2774-2780.
- [5] Rencber SF, Ozbek SK, Eraldemir C, et al. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study [J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1): 55.
- [6] Menezes C, Pravata GR, Yela DA, et al. Women with premature ovarian failure using hormone therapy do not experience increased levels of depression, anxiety and stress compared to controls [J]. J Affect Disord, 2020, 273(1): 562-566.
- [7] El-Readi MZ, Eid SY, Abdelghany AA, et al. Resveratrol mediated cancer cell apoptosis, and modulation of multidrug resistance proteins and metabolic enzymes [J]. Phytomedicine, 2019, 55(46): 269-281.
- [8] Ozturk Y, Gunaydin C, Yalcin F, et al. Resveratrol enhances apoptotic and oxidant effects of paclitaxel through TRPM2 channel activation in DBTRG glioblastoma cells [J]. Oxidative Med Cell Longev, 2019, 46(5): 19865-19878.

(下转第 93 页)

杨欣悦,李佳佳,董翔,等. 高原寒冷环境大鼠急性肺水肿模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 87-93.
Yang XY, Li JJ, Dong X, et al. Establishment of a rat model of acute pulmonary edema in cold environment at high altitude [J].
Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 87-93.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.012

高原寒冷环境大鼠急性肺水肿模型的建立

杨欣悦^{1,2}, 李佳佳³, 董翔³, 是文辉³, 李建瑛³, 魏雪梅^{4*}, 刘江伟^{2,3*}

(1.石河子大学医学院,新疆 石河子 832000;2.新疆军区总医院肛肠诊疗中心,乌鲁木齐 830000;3.新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室,乌鲁木齐 830000;4.新疆维吾尔自治区人民医院呼吸危重症医学中心,乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 建立高原低压缺氧、寒冷环境大鼠急性肺水肿模型,同时探讨寒冷因素对高原急性肺水肿形成的影响。**方法** 雄性健康 SD 大鼠 100 只,随机分为 2 组 ($n=50$):高原常温组(HN 组)和高原寒冷组(HC 组)。每组再按 5 个时间点分成 5 个亚组 ($n=10$):0、24、48、72、120 h。将这两组大鼠放置人工实验舱内模拟海拔 7000 m 的低压缺氧环境,并设置常温和寒冷两种环境温度,在相应时间点麻醉大鼠,取肺泡灌洗液(BALF)以及肺组织。检测 BALF 蛋白质浓度及肺组织 W/D 值;将肺组织制片,HE 染色,观察病理变化。**结果** HN 组及 HC 组大鼠肺组织 W/D 值随暴露时间呈升高趋势,HN 组的大鼠肺组织 W/D 值在 72 h 时达到最高,HC 组的大鼠肺组织 W/D 值在 48 h 时达到最高,在 48、72 和 120 h,HC 组的肺组织 W/D 值均高于 HN 组,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。BALF 蛋白质浓度和肺组织病理的变化趋势与肺组织 W/D 值的变化相同,HN 组的 BALF 蛋白质浓度和肺损伤评分均在 72 h 时达到最高,其值依次为 (0.2802 ± 0.0243) 、 (1.7778 ± 0.4410) mg/mL,HC 组的 BALF 蛋白质浓度和肺损伤评分在 48 h 时达到最高,其值分别为 (0.3352 ± 0.0204) 、 (2.8889 ± 1.0541) mg/mL,在 48、72 和 120 h,HC 组的 BALF 蛋白质浓度和肺损伤评分均高于 HN 组,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 在人工实验舱模拟海拔 7000 m 高原低压缺氧环境中,在寒冷条件(白天温度 15℃,夜间温度 5℃)下暴露 48 h 可成功构建 SD 大鼠急性高原肺水肿模型,而常温环境需要 72 h 才可成模,研究提示寒冷因素能促进急性高原肺水肿的发生发展。

【关键词】 高原;低压缺氧;寒冷;急性肺水肿;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0087-07

Establishment of a rat model of acute pulmonary edema in cold environment at high altitude

YANG Xinyue^{1,2}, LI Jiajia³, DONG Xiang³, SHI Wenhui³, LI Jianying³, WEI Xuemei^{4*}, LIU Jiangwei^{2,3*}

(1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China. 2. Anorectal Diagnosis and Treatment Center, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000. 3. Key Laboratory of Special Environmental Medicine, Xinjiang Military Region General Hospital, Urumqi 830000. 4. Respiratory and Critical Care Medical Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of acute pulmonary edema under high-altitude hypobaric hypoxia and a cold environment, and to explore the effect of cold factors on the formation of acute high-altitude pulmonary edema.

Methods One-hundred healthy male SD rats were randomly divided into two groups ($n=50$): HN and HC groups. Each

[基金项目] 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2019D04022)。

[作者简介] 杨欣悦(1994—),女,硕士研究生,研究方向:普外基础与临床。E-mail: 1577202501@qq.com

[通信作者] 刘江伟(1970—),男,博士后,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:特殊环境战创伤研究。E-mail: ljw273273@163.com

魏雪梅(1972—),女,硕士,主任医师,研究方向:肺肿瘤的临床与基础研究。E-mail: weixuemei@163.com

* 共同通信作者

group was divided into five subgroups ($n=10$) with five time points: 0, 24, 48, 72 and 120 h. The two groups of rats were placed in an artificial experimental cabin to simulate hypobaric hypoxia at an altitude of 7000 m, different ambient temperatures were set, the rats were anesthetized at the corresponding time points, and alveolar lavage fluid and lung tissue were collected. The BALF protein concentration and W/D ratio of lung tissue were measured. The lung tissue was sectioned and stained with HE to observe pathological changes. **Results** The W/D ratio of lung tissue was increased in HN and HC groups. The W/D ratio of lung tissue in the HN group reached the highest at 72 h, and that in the HC group reached the highest at 48 h. At 48, 72 and 120 h, the W/D ratio of lung tissue in the high-altitude cold group was significantly higher than that in the HN group ($P<0.05$). The trend in the changes of the BALF protein concentration and lung pathology was the same as that of the lung W/D ratio. The BALF protein concentration and lung injury score in the HN group reached the highest at 72 h, which were (0.2802 ± 0.0243) and (1.7778 ± 0.4410) mg/mL respectively, and the BALF protein concentration and lung injury score in HC group reached the highest at 48 h, and their values were (0.3352 ± 0.0204) and (2.8889 ± 1.0541) mg/mL respectively. At 48, 72 and 120 h, the BALF protein concentration and lung injury score in the HC were higher than those in the HN group ($P<0.05$). **Conclusions** In the simulated hypobaric hypoxia environment at high altitude of 7000 m, the SD rat model of acute high-altitude pulmonary edema was successfully established after exposure to cold conditions (daytime temperature: 15°C ; nighttime temperature: 5°C) for 48 h, but it required 72 h at normal temperature. This study suggests that cold factors promote the occurrence and development of acute high-altitude pulmonary edema.

【Keywords】 high altitude; hypobaric hypoxia; cold; acute lung edema; animal model

高原急性肺水肿是急性高原疾病的肺部表现^[1]。高原肺水肿起病急、进展快、死亡率高,是一种潜在的威胁生命的疾病^[2]。当快速上升到海拔 2500 m 以上的人不适应高原环境时,就会发生高原肺水肿^[3]。临床上明显的高原肺水肿以严重发绀、呼吸困难和咳嗽为特征^[4]。目前对于急性高原肺水肿,我们仍然缺乏满意的预防和治疗手段。高原寒冷环境具有气压低、缺氧、寒冷、紫外线辐射强、植被稀疏、人口稀少等一系列特点。目前,世界高原面积约为四千八百万平方千米,约占世界总面积的 10%,中国是世界上高原面积最大的国家,海拔最高,人口最多^[5]。暴露在高原寒冷环境中的人,如工人、士兵、旅行者和高原常驻人群,都有发生高原肺水肿的可能^[6]。

因此,开展急性高原肺水肿有效防治药物的研究非常必要。而这些研究的基础就是建立重复性好、评价体系健全的急性高原肺水肿动物模型。目前高原肺水肿的发病机制还未十分明确^[7],可能与海拔高度^[8]、运动强度^[9]及机体的适应与重塑有关,但至今仍无一种制作高原肺水肿模型的标准方法。更重要的是,高原低压缺氧常伴随寒冷环境,即使在夏天,高原地区白天温度常常在 15°C 以下,但目前出现的高原肺水肿模型大部分在常温环境中建立,未考虑寒冷环境对肺水肿形成的影响,目前尚未见高原寒冷环境的肺水肿模型的文献报道,因此建立一个符合高原实际环境的肺水肿模型是

一个亟待解决的问题。在本研究中,我们使用模拟气候舱来建立高原寒冷环境大鼠肺水肿模型,并评估肺湿/干重比、肺泡灌洗液中的总蛋白质含量、肺泡组织的病理学的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验采用 SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只(6~8 周龄、体重 220~260 g),购自新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2018-0002]。实验大鼠饲养在新疆军区总医院实验动物科 SPF 级动物实验室中[SYXK(军)2017-0050],环境条件:12 h/12 h 光暗循环,温度(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(45 ± 5)%,充足供应水与饲料。所有实验方案获新疆军区总医院动物伦理委员会批准(DWLL20190320),遵从 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院研制);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);戊巴比妥钠(Sigma-Aldrich (Shanghai) Trading Co. Ltd.)。电子秤(上海仪器厂);光学显微镜 CKX41(日本 Olympus);TS-12U 生物组织脱水机(中国亚鹏);LEICA RM213 型组织切片机(德国);BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技公司);YB-6D 型生物组织石蜡包埋机(湖北孝感亚光电子技术公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 高原寒冷环境肺水肿模型建立

将 100 只健康标准大鼠随机分为 2 组(每组 50 只):高原常温组(HN 组)和高原寒冷组(HC 组)。每组按不同时间点分为 5 个亚组:0 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组、120 h 组。0 h 组置于常温环境中[温度(21 ± 1)℃,相对湿度(45 ± 5)%],其余组放置在西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院研制)的高原环境中。HN 组实验舱条件设置 12 h/12 h 的光暗循环,温度(21 ± 1)℃、相对湿度(45 ± 5)%。HC 组实验舱条件设置:12 h/12 h 光暗循环,白天 12 h 15℃,夜间 12 h 5℃,湿度(45 ± 5)%。

实验过程中,打开舱门,将高原 24、48、72、120 h 组的动物暴露在高原低压低氧舱内。设置高原环境参数,海拔设置为 7000 m,高度以 10 m/s 的速度上升,设备达到预定高度后,保持湿度(45 ± 5)%,实验舱压力 47.3 KPa,氧含量约 9.9%^[10]。

1.3.2 样本解剖与采集

当到达相应时间后,高度降低至海平面,打开舱门,在舱内快速麻醉动物,每组大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)。沿胸部正中逐层剪开胸壁,充分暴露胸腔后,先结扎右侧主支气管,将导管插入左主支气管,经气管插管向左肺缓慢注入 0.9% 生理盐水 4 mL,缓慢回抽;反复冲洗 2~3 次。收集肺泡灌洗液 3 mL,用于肺泡灌洗液蛋白质浓度测定。分离右肺,取右肺上叶测量湿/干重比值。右肺中叶用 4% 多聚甲醛固定,用于病理 HE 染色。

1.3.3 肺泡灌洗液蛋白质浓度测定

取肺泡灌洗液,以 3000 r/min 离心 15 min,收集上清液,使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,采用 Bicinchoninic acid 法(BCA 法)检测肺泡灌洗液中总蛋白浓度。

1.3.4 肺组织湿/干重比测定

肺组织湿/干重比可评估肺含水量。处死大鼠并彻底放血,取右肺上叶,用滤纸轻轻吸去肺组织表面的血污。然后将其放在锡箔纸上,用电子天平测量湿重,精确度为 0.1 mg。然后将肺组织与锡箔纸一起放入电烤箱,80℃ 加热 72 h,达到恒定重量(重复 2 次称量干重误差<0.002 g 为恒定重量),随后记录其重量为干重。按 Elliot 公式计算含水量:组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.3.5 肺组织 HE 染色

右肺中叶在 4% 多聚甲醛中固定 1 周后,不同

浓度乙醇梯度脱水,包埋,切片,用 HE 染色试剂盒染色。染色后在光学显微镜下观察肺部病理变化,肺损伤程度通过用肺损伤评分的方法评估。光学显微镜下肺组织损伤程度基于以下指标:(1)肺泡和间质有无水肿;(2)中性粒细胞浸润程度;(3)出血程度。肺的损伤严重程度分为以下几类:无损伤得分为 0;25% 的肺野损伤得分为 1;50% 的肺野损伤得分为 2;75% 的肺野损伤得分为 3;全肺野改变得分为 4^[11]。

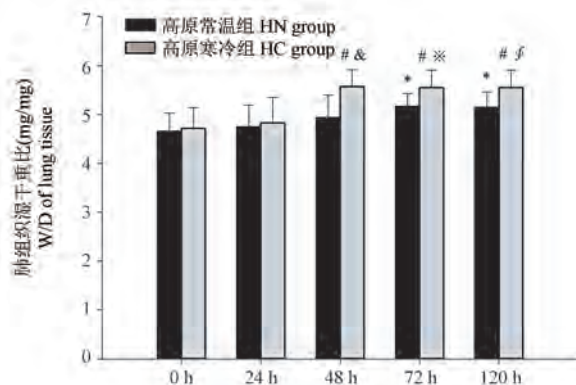
1.4 统计学方法

统计学方法:采用 SPSS 23.0 进行统计学分析。所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析。组内比较采用独立样本 *t* 检验。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织湿/干重比分析

如图 1 所示,48、72 和 120 h 的 HC 组肺湿/干重比均高于 0 h 的 HC 组($P<0.05$),72 和 120 h 的 HN 组肺湿/干重比均高于 0 h 的 HN 组($P<0.05$);48、72 和 120 h 的 HC 组的肺湿/干重比均高于 HN 组($P<0.05$)。高原寒冷环境下暴露 48 h 时 HC 组肺湿/干重比达到最高值(5.4218 ± 0.3983),与 72 和 120 h 的 HC 组比较无显著性差异($P>0.05$)。



注:与高原常温组 0 h 相比,* $P<0.05$;与高原寒冷组 0 h 相比,# $P<0.05$;与高原常温组 48 h 相比,& $P<0.05$;与高原常温组 72 h 相比,* $P<0.05$;与高原常温组 120 h 相比,† $P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠肺组织 W/D 比的比较($\bar{x}\pm s$)

Note. Compared with the HN group for 0 h, * $P<0.05$. Compared with the HC group for 0 h, # $P<0.05$. Compared with the HN group for 48 h, & $P<0.05$. Compared with the HN group for 72 h, * $P<0.05$. Compared with the HN group for 120 h, † $P<0.05$.

Figure 1 Change of the lung water content in lung tissues in the rats of different groups

2.2 肺泡灌洗液蛋白质含量分析

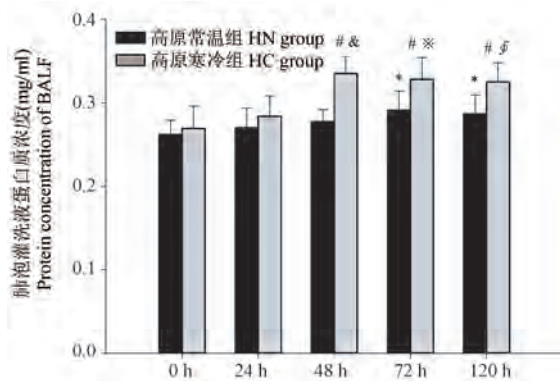
如图 2 所示, 48、72 和 120 h 的 HC 组灌洗液蛋白含量均高于 0 h 的 HC 组 ($P < 0.05$), 72 和 120 h 的 HN 组灌洗液蛋白含量均高于 0 h 的 HN 组 ($P < 0.05$); 48、72 和 120 h 的 HC 组的灌洗液蛋白含量均高于 HN 组 ($P < 0.05$)。高原寒冷环境下暴露 48 h 时 HC 组灌洗液蛋白含量达到最高值 (5.4218 ± 0.3983), 与 72 和 120 h 的 HC 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 肺组织病理学改变

大鼠肺组织 HE 染色显示, 正常对照组肺泡结构完整, 肺间隔无增厚, 肺泡腔或肺间质未见明显水肿, 肺泡和肺间质未见白细胞及红细胞渗出 (图 3A)。与正常对照组相比, HN 组及 HC 组表现出不

同程度的肺组织结构损伤, 表现为肺泡结构完整性受损, 肺泡腔相互融合扩张, 形成巨大气肿状肺泡 (图 3B), 局部肺组织实变、部分肺泡塌陷 (图 3C), 部分静脉血管水肿, 肺间质中有水肿液渗出 (图 3D), 部分肺泡管、肺泡囊及肺泡中有红细胞浸润 (图 3E)。

如图 4 所示, 48、72 和 120 h 的 HC 组病理组织学评分均高于 0 h 的 HC 组 ($P < 0.05$), 72 和 120 h 的 HN 组病理组织学评分均高于 0 h 的 HN 组 ($P < 0.05$); 48、72 和 120 h 的 HC 组的病理组织学评分均高于 HN 组 ($P < 0.05$)。高原寒冷环境下暴露 48 h 时 HC 组病理组织学评分达到最高值 (5.4218 ± 0.3983), 与 72 和 120 h 的 HC 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

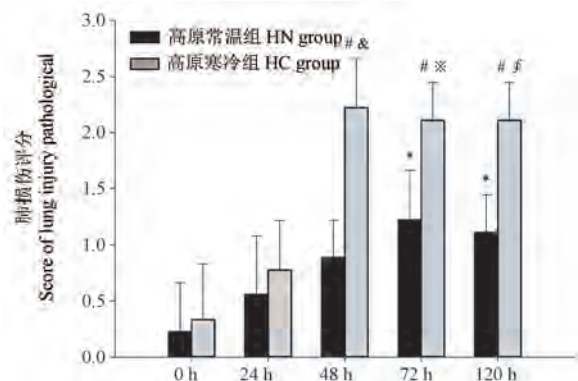


注: 与高原常温组 0 h 相比, * $P < 0.05$; 与高原寒冷组 0 h 相比, # $P < 0.05$; 与高原常温组 48 h 相比, & $P < 0.05$; 与高原常温组 72 h 相比, &# $P < 0.05$; 与高原常温组 120 h 相比, &# $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠 BALF 蛋白质含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared with the HN group for 0 h, * $P < 0.05$. Compared with the HC group for 0 h, # $P < 0.05$. Compared with the HN group for 48 h, & $P < 0.05$. Compared with the HN group for 72 h, &# $P < 0.05$. Compared with the HN group for 120 h, &# $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of bronchoalveolar lavage fluid protein content in the rats of different groups



注: 与高原常温组 0 h 相比, * $P < 0.05$; 与高原寒冷组 0 h 相比, # $P < 0.05$; 与高原常温组 48 h 相比, & $P < 0.05$; 与高原常温组 72 h 相比, &# $P < 0.05$; 与高原常温组 120 h 相比, &# $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠肺损伤评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Note. Compared with the HN group for 0 h, * $P < 0.05$. Compared with the HC group for 0 h, # $P < 0.05$. Compared with the HN group for 48 h, & $P < 0.05$. Compared with the HN group for 72 h, &# $P < 0.05$. Compared with the HN group for 120 h, &# $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of score of lung injury in the rats of different groups

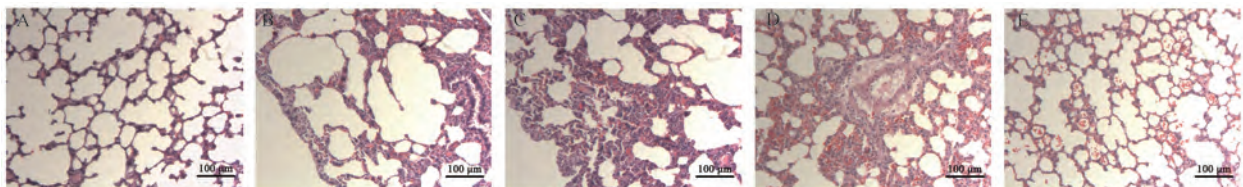


图 3 肺病理组织学变化

Figure 3 Lung histopathological changes

3 讨论

长期以来,由于低压缺氧、寒冷、复杂地形等极端环境因素,生活在高海拔地区一直是对人类的挑战^[12]。高海拔地区降低的氧分压创造了一个独特的环境条件称为高原低压缺氧环境^[13]。在快速攀登海拔 3000 m 以上地区的人群中,由急性高原病发展而来的急性高原肺水肿仍是一个未解决的问题。在高海拔地区出现呼吸困难、咳嗽、粉红色泡沫痰^[1],可能严重影响活动或紧急军事任务。

急性高原肺水肿是急进高海拔地区时发生的一种非心源性肺水肿,通常发生在到达高海拔地区后 2~5 d^[6]。高原环境大鼠肺水肿模型的成功建立受到海拔高度、减压速度、持续时间、舱内环境及机体情况等多种因素影响^[14-16]。现有的高原肺水肿动物模型的研究都使用了大鼠模型。大鼠在低氧条件下可诱导低氧性肺血管收缩反应,严重的低氧性肺血管收缩反应会导致高原肺水肿的发生^[17]。以往的高原肺水肿模型建立方法,着重于海拔高度、缺氧和劳累等因素,国内目前还未见报道有研究关注温度对于肺水肿模型建立的影响,为了更加符合高原环境寒冷、低压、缺氧的极端环境,本次实验在肺水肿模型建立的条件中加入了温度这一影响因素,通过降低环境温度结合低压缺氧等条件更快、更全面的建立重复性好、最贴近高原真实环境的肺水肿模型,为急性高原肺水肿后续的治疗创造基础条件。

本实验通过特殊的低压缺氧结合寒冷模拟高海拔暴露大鼠高原肺水肿的发生,即 24、48、72 和 120 h 的寒冷低压缺氧状态。比较在不同环境温度影响下不同暴露时间大鼠肺组织的变化及特异性指标,建立稳定的急性高原肺水肿实验模型。本实验通过肺组织的 HE 染色发现,相较于 0 h 时,高原常温及高原寒冷组其他时间点的大鼠均表现出不同程度的肺组织损伤表现,尤其是高原寒冷 48 h 组和高原常温 72 h 组,肺组织肺泡间隔明显增宽,大量红细胞和炎性细胞溢出,且出现肺泡间隔的明显水肿,这一结果说明在缺氧刺激下,肺部血管收缩,使血液更多的分布在阻力较小的毛细血管,使水肿液从毛细血管漏出、转移并滞留,引起肺间质和肺泡水肿。肺组织湿/干重比值是评估动物模型肺水肿整体严重程度的指标,肺泡灌洗液蛋白质含量是

评估肺泡毛细血管通透性的指标^[18]。有相关研究表明,高原肺水肿大鼠具有肺含水量增加,肺泡毛细血管通透性增高的特征^[18-20]。同样的,在我们的研究中高原寒冷 48 h 组和高原常温 72 h 组大鼠肺组织中的湿/干重比值和肺泡灌洗液蛋白质含量明显高于其他组,说明高原环境会使大鼠肺泡毛细血管通透性增强。由此,结合上述 3 项检测指标的变化,在高原寒冷环境 48 h 组和高原常温 72 h 组大鼠的肺水肿模型建立成功,并且我们可以推定寒冷因素加速了肺水肿的发展进程,可更快的建立急性高原大鼠肺水肿模型。

这种现象在肺组织病理变化中也同样得到体现。这说明了寒冷可以加剧高原肺水肿的形成。寒冷应激是一种严重的急性应激类型,可能导致局部及全身的免疫系统损伤^[21],降低其防御功能,使其易受致病因素的影响^[22],诱导气道炎症反应,导致肺功能下降^[23]。寒冷诱导的靶器官损害首先发生在血流丰富的组织中。肺作为肺循环中的主要器官,为全身提供氧气,是对血流变化最敏感的器官^[24]。寒冷应激是一种已知的诱发和加重呼吸系统疾病的环境因素^[25]。相关研究表明,暴露于冷应激可直接引起血流动力学改变,导致血栓形成、组织缺血再灌注和炎症损伤^[26]。在寒冷应激期间,细胞外液的结晶会直接损伤细胞膜,使细胞膨胀^[27],影响渗透压,导致毛细血管通透性在快速血管收缩下发生变化^[28]。此外,肺直接暴露在冷空气中,导致肺动脉平滑肌收缩甚至痉挛^[29]。在高原环境中,缺氧会导致肺血管平滑肌收缩^[13],加上寒冷因素的影响,会加剧肺血管的收缩,进而形成肺动脉高压。在本实验中,由于设备和操作的复杂性,没有测定肺动脉压这项指标。但在林雪等^[30]研究中,与平原对照组相比,高原低压低氧组大鼠的肺动脉压力明显增高。高原寒冷组大鼠的肺组织湿/干重比值和肺泡灌洗液蛋白质含量显著高于高原常温组,并且肺组织病理学显示肺泡上皮完整性被破坏,肺泡-毛细血管屏障功能持续受损。由此,我们可以推测,缺氧及寒冷联合作用会显著收缩肺部动脉,使肺动脉压力升高,大量肺部血液积聚于压力相对较小的毛细血管,导致毛细血管压力升高,血液中蛋白质等大分子物质通过肺泡-毛细血管屏障进入肺泡腔,使毛细血管中的胶体渗透压降低并且破坏了肺泡上皮的完整性,使更多的富含蛋白质的水肿液

流入肺泡。

最后,从肺组织病理、肺组织湿/干重比值及肺泡灌洗液蛋白质含量的结果来看,在高原常温环境暴露 72 h 组可建立急性高原肺水肿模型,但高原寒冷组的大鼠只需 48 h 就可形成急性高原肺水肿。所以,暴露在模拟海拔 7000 m 高原寒冷低压缺氧环境至 48 h 可成功建立急性高原肺水肿模型,且造模方法简便有效,用时更短,适合大批量快速的动物造模,可重复性好,为我们后续对急性高原肺水肿的发病机制与预防治疗打下良好的基础。

参考文献:

- [1] Li Y, Zhang Y, Zhang Y. Research advances in pathogenesis and prophylactic measures of acute high altitude illness [J]. *Respir Med*, 2018, 145: 145-152.
- [2] Li X, Jin T, Zhang M, et al. Genome-wide association study of high-altitude pulmonary edema in a Han Chinese population [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31568-31580.
- [3] Sheppard RL, Swift JM, Hall A, et al. The influence of CO₂ and exercise on hypobaric hypoxia induced pulmonary edema in rats [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 130.
- [4] Swenson ER. Early hours in the development of high-altitude pulmonary edema: time course and mechanisms [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2020, 128(6): 1539-1546.
- [5] Shi J, Wang J, Zhang J, et al. Polysaccharide extracted from *Potentilla anserina* L ameliorate acute hypobaric hypoxia-induced brain impairment in rats [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(9): 2397-2407.
- [6] Jensen JD, Vincent AL. High altitude pulmonary edema [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing; 2021.
- [7] 骆亚莉, 刘永琦, 安方玉, 等. 敦煌方大青龙汤对高原低氧大鼠肺损伤的影响 [J]. *中成药*, 2016, 38(12): 2529-2535.
- [8] 罗晓红, 郭文静, 许瑞元, 等. 模拟不同海拔低氧对大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴及肺组织 VEGF 和 HIF-1 表达的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2016, 37(8): 864-868.
- [9] Zhou Q, Wang D, Liu Y, et al. Solnatide demonstrates profound therapeutic activity in a rat model of pulmonary edema induced by acute hypobaric hypoxia and exercise [J]. *Chest*, 2017, 151(3): 658-667.
- [10] 罗琴. 腺苷 2B 受体激动剂 BAY60-6583 对高原肺水肿的作用研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2021.
- [11] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(5): 725-738.
- [12] Wang C, Yan M, Jiang H, et al. Protective effects of puerarin on acute lung and cerebrum injury induced by hypobaric hypoxia via the regulation of aquaporin (AQP) via NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 300-309.
- [13] Wu G, Xu G, Chen DW, et al. Hypoxia exacerbates inflammatory acute lung injury via the toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1667.
- [14] 吴万民, 张金红, 杨义, 等. 高原舱模拟大鼠急性高原肺水肿及脑水肿的研究概况 [J]. *解放军药学报*, 2018, 34(3): 258-260.
- [15] Paul S, Gangwar A, Patir H, et al. Reverse translating SUL1A1, a potential biomarker in roentgenographically tested rat model of rapid HAPE induction [J]. *Life Sci*, 2019, 229: 132-138.
- [16] 郁硕. 辅酶 Q10 对高原肺水肿大鼠的保护作用及机制探索 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2017.
- [17] Li S, Ran Y, Zhang D, et al. MicroRNA-138 plays a role in hypoxic pulmonary vascular remodelling by targeting Mst1 [J]. *Biochem J*, 2013, 452(2): 281-291.
- [18] Zhao Q, Eichten A, Parveen A, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal endothelial cell heterogeneity in tumors and changes following antiangiogenic treatment [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(9): 2370-2382.
- [19] Shi J, Liu Z, Li M, et al. Polysaccharide from *Potentilla anserina* L ameliorate pulmonary edema induced by hypobaric hypoxia in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111669.
- [20] Tetzlaff F, Adam MG, Feldner A, et al. MPDZ promotes DLL4-induced Notch signaling during angiogenesis [J]. *Elife*, 2018, 7: e32860.
- [21] Boonarkart C, Suptawiat O, Sakorn K, et al. Exposure to cold impairs interferon-induced antiviral defense [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(8): 2231-2237.
- [22] Luo B, Liu J, Fei G, et al. Impact of probable interaction of low temperature and ambient fine particulate matter on the function of rats alveolar macrophages [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 49: 172-178.
- [23] Juan Y, Haiqiao W, Xie W, et al. Cold-inducible RNA-binding protein mediates airway inflammation and mucus hypersecretion through a post-transcriptional regulatory mechanism under cold stress [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 78: 335-348.
- [24] Joo SY, Park MJ, Kim KH, et al. Cold stress aggravates inflammatory responses in an LPS-induced mouse model of acute lung injury [J]. *Int J Biometeorol*, 2016, 60(8): 1217-1225.
- [25] Hansel NN, McCormack MC, Kim V. The effects of air pollution and temperature on COPD [J]. *COPD*, 2016, 13(3): 372-379.
- [26] Yu ZX, Qi S, Lasaro MA, et al. Targeting complement pathways

- during cold ischemia and reperfusion prevents delayed graft function [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(9): 2589-2597.
- [27] Chaudhuri J, Basu U, Zarrin A, et al. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism [J]. *Adv Immunol*, 2007, 94: 157-214.
- [28] Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses [J]. *Cell Res*, 2010, 20(1): 34-50.
- [29] Xiao MM, Pan CS, Liu YY, et al. Post-treatment with Ma-Huang-Tang ameliorates cold-warm-cycles induced rat lung injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 312.
- [30] 林雪, 雷有芳, 蒲小燕. 不同低氧胁迫方式构建 SD 大鼠高原肺水肿模型的比较研究 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(5): 367-373.
- 〔收稿日期〕2021-12-21

(上接第 86 页)

- [9] Yu XD, Yang JL, Zhang WL, et al. Resveratrol inhibits oral squamous cell carcinoma through induction of apoptosis and G2/M phase cell cycle arrest [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(3): 2871-2877.
- [10] 李虹璇, 李思慧, 冯嘉欣, 等. 卵巢早衰动物模型构建方法及比较研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2021, 41(6): 505-514.
- [11] Luo Q, Yin N, Zhang L, et al. Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in chemotherapy drug induced premature ovarian failure mice [J]. *Life Sci*, 2017, 179(15): 103-109.
- [12] 梁夏, 潘泽政, 叶海峰, 等. Notch 信号通路参与卵巢生殖干细胞的调控及卵巢的衰老进程 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(4): 428-435.
- [13] Zhao LD, Jin YH, Donahue K, et al. Tissue repair in the mouse liver following acute carbon tetrachloride depends on injury-induced Wnt/ β -Catenin signaling [J]. *Hepatology*, 2019, 69(6): 2623-2635.
- [14] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: control of totipotency and germline determination [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(4): 452-457.
- [15] Liao YM, Song Y, Li YK, et al. SOX17, β -catenin and CyclinD1 expression in the endometrioid adenocarcinoma and influence of 5-AZA on expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(4): 256-263.
- [16] Zhang GC, Yu XN, Sun JL, et al. UBE2M promotes cell proliferation via the β -catenin/cyclin D1 signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Aging*, 2020, 12(3): 2373-2392.
- [17] Chen JJ, Deng JS, Huang CC, et al. p-Coumaric-acid-containing adenostemma lavenia ameliorates acute lung injury by activating AMPK/Nrf2/HO-1 signaling and improving the anti-oxidant response [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(7): 1483-1506.
- [18] Yu Y, Yang YY, Yang M, et al. Hydrogen gas reduces HMGB1 release in lung tissues of septic mice in an Nrf2/HO-1-dependent pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69(22): 11-18.
- [19] 刘磊, 张静文, 张新玥. 牡荆苷调控 Nrf2/ARE 通路减轻急性脑缺血再灌注大鼠氧化应激反应研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(5): 1287-1293.
- 〔收稿日期〕2021-10-13

薛兰,毛春迎,王慧,等. 槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 94-100, 117.

Xue L, Mao CY, Wang H, et al. Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 94-100, 117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.013

槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究

薛 兰¹, 毛春迎², 王 慧¹, 王守福¹, 张争辉¹, 郭新庆^{1*}

(1. 菏泽医学专科学校基础医学部, 山东 菏泽 274000; 2. 菏泽医学专科学校医学技术系, 山东 菏泽 274000)

【摘要】 目的 探讨槲皮素对肺纤维化大鼠肺组织细胞间质转化、炎症及对 NOX4-P62 信号途径的影响, 为进一步阐明槲皮素对肺纤维化的作用机制提供实验依据。**方法** 将实验大鼠分为对照组、博来霉素组 (BLM 组) 和博来霉素+槲皮素组 (BLM+QUE 组), 分别于造模后第 7、14、28 天观察各组肺组织外观, 利用苏木素-伊红染色法 (HE 染色) 评价肺纤维化情况, 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测各组肺组织还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NOX4)、自噬蛋白 P62、核因子 κ B (NF- κ B) 的蛋白表达情况, 反转录-聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测人肺腺癌细胞株 A549 细胞血管平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 和钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 的 mRNA 表达水平, 酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 检测转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的水平。**结果** BLM 组随时间增加大鼠肺纤维化呈进行性加重, BLM+QUE 组在第 7 天时症状较 BLM 组轻, 在第 28 天时症状明显减轻。BLM 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达, 较对照组明显上升, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), BLM+QUE 组在第 7 天时较 BLM 组低, 但无显著差异 ($P > 0.05$), 但在第 14、28 天时较 BLM 组明显下降, 差异显著 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 加入 TGF- β 1 的 A549 细胞 E-cadherin、 α -SMA mRNA 的表达分别明显降低和升高 ($P < 0.05$); 给予槲皮素后, E-cadherin、 α -SMA mRNA 的表达较 TGF- β 1 组分别明显升高和降低 ($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素能够抑制 TGF- β 1 对人肺腺癌细胞株 A549 细胞诱导的间质转化的转变, 减轻肺纤维化大鼠的炎症反应, 缓解博来霉素所致的大鼠肺纤维化, 自噬活性在博来霉素诱导大鼠发生肺纤维化的过程中受到抑制; 槲皮素可能通过抑制 NOX4-P62 信号途径, 激活自噬, 减轻大鼠肺纤维化。

【关键词】 肺纤维化; 槲皮素; 炎症细胞因子; 间质转化; NOX4; P62

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0094-07

Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism

XUE Lan¹, MAO Chunying², WANG Hui¹, WANG Shoufu¹, ZHANG Zhenghui¹, GUO Xinqing^{1*}

(1. Department of basic Medicine, Heze Medical College, Heze 274000, China.

2. Department of Medical Technology, Heze Medical College, Heze 274000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of quercetin on interstitial transformation, inflammation, and the NOX4-P62 signaling pathway in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis to provide an experimental basis for further elucidating the mechanism of quercetin in pulmonary fibrosis. **Methods** Rats were divided into control, BLM and BLM+QUE groups. The appearance of lung tissue in each group was observed on days 10, 20 and 30 after modeling. Pulmonary fibrosis was evaluated by HE staining. NOX4 and P62 in lung tissue, and α -SMA and E-cadherin in A549 cells were detected by western blotting. TGF- β 1, IL-1 β and TNF- α were measured by ELISA. **Results** Symptoms in the BLM+QUE group were milder than those in the BLM group on day 7, and significantly relieved on day 28. TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α ,

[作者简介] 薛兰 (1989—), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 应用解剖学。E-mail: dengzh71@126.com

[通信作者] 郭新庆 (1976—), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 解剖学。E-mail: 852532823@qq.com

NOX4 and P62 expression in the BLM+QUE group was lower than that in the BLM group on day 10 ($P>0.05$), but it was much expression lower than that in the BLM group on days 14 and 28 ($P<0.05$). Compared with the control group, E-cadherin and α -SMA expression in the TGF- β 1 group was significantly decreased and increased, respectively ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, E-cadherin and α -SMA expression in the TGF- β 1+QUE group were significantly increased and decreased, respectively ($P<0.05$). **Conclusions** Quercetin inhibits TGF- β 1. EMT of A549 cells alleviates the inflammatory reaction and pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats. Autophagy is inhibited by bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Quercetin inhibits the NOX4-P62 signaling pathway, activates autophagy, and reduces pulmonary fibrosis in rats.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; quercetin; inflammatory cytokines; mesenchymal transition; NOX4; P62

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是临床上棘手的疾病,无有效治疗方法,致死率高,患者一般最终因呼吸衰竭而死亡。该病是多因素引起的严重的呼吸系统疾病,在西医上认为是细胞外基质在肺组织间质过度沉积,降解减少而引起的病理改变。在中医学上属于“肺痿”、“肺痹”范畴,认为可能与肺肾亏虚、气血凝滞、痰瘀痹阻肺络有关。目前中药对于肺纤维化的治疗具有一定的作用,能够有效缓解病情,减轻肺纤维化的程度,减少患者痛苦^[1]。槲皮素(quercetin, QUE)是一种广泛存在于自然界中的多羟基黄酮醇类化合物,不仅富含在柴胡、桑寄生、银杏叶等中药中,就连日常生活中的苹果、西兰花、卷心菜等也有。药理研究证明槲皮素具有抗氧化、清除自由基、抗肿瘤、抗炎症、抗菌等作用^[2],相关实验也说明了槲皮素抗肺纤维化的分子机制,有可能是通过调控 Smad7 信号,缓解 TGF- β 诱导的小鼠肺泡 II 型上皮细胞 NIH3T3 纤维化^[3],但槲皮素抗肺纤维化的分子机制尚未得到透彻研究,为了进一步阐明槲皮素对肺纤维化的作用机制,本研究在前期研究的基础上,进一步探讨槲皮素抗肺纤维化的分子机制,现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康成年 3~5 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,重量 190~210 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0009],质量合格证号:11400700045968,饲养于本院屏障级动物室[SYXK(鲁)2020-0013]。所有实验操作遵守实验室相关管理规定,经菏泽医学专科学校进行伦理审批 HZYZ2019-0381),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

人肺腺癌细胞株 A549 细胞由中南大学遗传实验室赠送。

1.2 主要试剂与仪器

Click-iT[®] Plus TUNEL assay 试剂盒(货号:C10618)购自 Invitrogen 公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105)购自碧云天;Masson Stain Kit Masson 染色试剂盒(货号:60532ES58)购自上海翊圣生物科技有限公司;IL-1 β (货号:ab13847)、TNF- α (货号:ab202068)、TGF- β 1(货号:ab64715)、 α -SMA(货号:ab5694)、GAPDH(货号:1056)一抗购自美国 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司;NOX4(货号:E-EL-R0015c)、NF- κ B(EEL-R0019)、P62(E-EL-R0016)和 ELISA 试剂盒购自 Elabscience;注射用盐酸博来霉素(每瓶 15 mg),日本化药株式会社生产(注册证号 H20090885);槲皮素购自上海西格玛(Sigma)公司。AniRes2005 动物肺功能分析系统购自北京贝兰博科技有限公司;PCR 仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司;Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司;Multiskan GO 酶标仪购自 Thermo。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及槲皮素给药

实验动物采用随机数字表法分为 3 组,分别是对照组 10 只、博来霉素组(bleomycin, BLM)20 只、博来霉素+槲皮素组(BLM+QUE)20 只。大鼠腹腔注射 25%乌拉坦(4 mL/kg)麻醉后,BLM 组采取一次性给予大鼠气管内注射 BLM(5 mg/kg)以造成大鼠急性肺损伤,对照组采取一次性气管内注射同体积无菌生理盐水,BLM+QUE 组采取向气管内一次性注入 BLM(5 mg/kg)的当日给予腹腔注射槲皮素(3 mg/kg),其后每日一次腹腔注射槲皮素(3 mg/kg),直至大鼠被处死,期间所有大鼠均给予日常饮食。分别在建模后第 7、14、28 天,BLM 组和 BLM+QUE 组随机处死 6 只(剪断腹主动脉处死各组大鼠),并在第 28 天处死对照组 6 只,处死前所有动物

均禁食 10 h, 称重后注射 25% 乌拉坦 (4 mL/kg) 麻醉, 严格进行无菌消毒后留取同一位置适度大小的肺组织, 放入冻存管中, 置于 -80℃ 冰箱中, 用于制备肺组织匀浆和石蜡切片。

1.3.2 HE 染色

将取出的肺组织固定在 4% 多聚甲醛中 24 h, 除去多余多聚甲醛, 加入 PBS, 每隔 8 h 更换 1 次, 连续 3 d, 4℃ 冰箱保存, 然后切成 0.2 cm 厚的小块并标记好, 然后用乙醇进行梯度洗脱, 加入 50% 乙醇和 50% 二甲苯静置 30 min, 然后放入 100% 二甲苯, 观察组织块至透明。此时放入已经融好的 50% 石蜡和 50% 二甲苯溶液 30 min, 然后放入预融的 100% 石蜡两遍, 每次 2 h, 再放入 100% 石蜡纸盒内凝固, 置于 4℃ 冰箱存放, 取出, 使用切片机切成约 7 μm 厚的切片, 将其置于水面上伸展, 贴在已经处理好的载玻片上。将制备好的石蜡切片使用二甲苯进行脱蜡, 酒精梯度水化后用苏木精染液浸泡 8 min 后, 再用自来水冲洗, 加入 1% 盐酸乙醇 10 s 后自来水冲洗, 再加入 0.5% 伊红浸染 3 min 后自来水冲洗, 然后再用梯度乙醇脱水, 依次使用二甲苯 I 和 II 透明, 中性树胶封片待分析。

1.3.3 ELISA 法检测分析各细胞因子

使用双抗体夹心法检测转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)、白介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)。以 TNF-α 为例: 标准品按照说明书进行梯度稀释, 样本用样本稀释液进行稀释, 分别于标准品孔、样本孔、空白孔加入标准品、样本、标准品稀释液各 100 μL, 各孔分别加生物素标记的细胞因子抗体 50 μL, 经 37℃ 孵育后各孔加 350 μL 洗涤液, 静置 1 min 后弃去, 重复 4 次, 各孔加入标记的链霉亲和素工作液 100 μL, 经 37℃ 孵育 30 min 后弃去, 重复 4 次。各孔加入 100 μL 底物避光孵育, 30 min 取出酶标板, 各孔加入 100 μL 终止液, 450 nm 波长处检测 OD 值, 绘制标准曲线,

计算各细胞因子的浓度。

1.3.4 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测分析

利用 Western blot 技术检测在第 7、14、28 天时肺组织的 NOX4、P62、NF-κB 水平。Western blot 技术主要分以下步骤: 提前制备好聚丙烯酰胺凝胶, 上样后进行电泳, 当目的蛋白电泳至分离胶 2/3 处时停止电泳, 采用半干式转膜至出现清晰条带并冲洗至染色液褪去, 然后封闭、洗膜、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜, 进行显色反应后去除一抗和二抗, 然后再洗膜, 再次重复一抗孵育和二抗孵育的过程, 最后进行图像分析。

1.3.5 人肺腺癌细胞株 A549 细胞的培养与处理

采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养人肺腺癌细胞株 A549 细胞。将液氮中冻存的 A549 细胞迅速取出后, 立即置于 37℃ 的水浴锅中快速复苏, 待冻存管内液体完全溶解后, 转移至离心管中, 加入 10% 胎牛血清的完全培养基, 轻轻吹打混匀后置于离心机中离心后倒去上清液, 再加入完全培养基将细胞重悬, 转移至培养瓶中并置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 当细胞生长至 80% 汇合或即将汇合时进行细胞传代, 全部操作步骤在超净工作台内完成。将培养瓶中 A549 细胞用胰酶消化以制备单细胞悬液, 种于培养皿中, 置于 37℃ 细胞培养箱中, 培养 24 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 2% 胎牛血清继续培养 24 h 后换液。对照组加入 PBS, TGF-β1 组加入终浓度为 5 ng/mL 的 TGF-β1, TGF-β1+QUE 组加入终浓度为 5 ng/mL 的 TGF-β1 和 100 μmol/L 的 QUE, 继续培养 48 h。

1.3.6 Real-time PCR 检测 A549 细胞中 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 表达情况

采用 TRIzol 提取试剂盒提取各组 A549 细胞总 RNA, 经逆转录合成 cDNA 模板, 根据 SYBR Green 试剂盒中的有关说明对 E-cadherin 和 α-SMA mRNA 表达水平进行检测, 以 GAPDH 作为内参物。根据

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

基因名称 Gene name	基因编码方向 Gene coding direction	引物序列 Primer sequence
GAPDH	F	5'-GATCGCGACTTACGGACT-3'
	R	5'-AGCTAGGCTAGCCACGCACATTA-3'
α-SMA	F	5'-GTCGTAGCTAGTAGGGTACACGG-3'
	R	5'-ACTGCTACTAGCTTATCGTAGGA-3'
E-cadherin	F	5'-GCTGTACCTAGACTGGACCACTAC-3'
	R	5'-GCTGACCAACGTAGTTACACAG-3'

Primer Premier 5.0 软件对引物进行设计,引物合成由上海生工生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系总体积为 20 μ L(其中逆转录产物 2 μ L、SYBR Green Mix 10 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、7 μ L 的 ddH₂O),PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因表达情况。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 分析软件包以及 Excel 2010 进行统计分析,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组之间比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内数据之间的比较采用 LSD-*t* 检验,所有数据经统计分析后以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织纤维化的形态学观察

建模后第 7、14、28 天观察,对照组肺表面光滑无结节无出血点,外观呈粉红色,轮廓清晰。BLM 组肺泡在第 7 天时明显肿胀并有点状红斑;第 14 天时呈灰白,有点状出血;第 28 天时质地较硬,体积明显缩小。BLM+QUE 组与 BLM 组比较,整体情况偏好,没有明显结节,偶见少许点状出血及斑块,具体见图 1。

2.2 HE 染色检测结果

HE 染色显示,建模后对照组各时间点内肺泡结构完整,肺泡壁较薄,肺泡内无明显炎症细胞浸润。BLM 组肺泡在第 7 天时有大量炎症细胞聚集,并有少量胶原纤维;第 14 天肺泡间隔显著增厚,胶原纤维增多;第 28 天时部分肺泡结构遭到破坏,大量肺泡塌陷,出现纤维化区域。BLM+QUE 组在第 7 天可见肺泡有炎症细胞浸润但较 BLM 组症状轻;第 14 天时炎症细胞浸润减轻,有少量胶原纤维沉积;第 28 天时肺组织炎症病变明显减轻,轻度肺纤维化得到明显改变,具体见图 2。

2.3 各组实验动物细胞因子检测结果

在第 7、14、28 天的样本检测中发现,BLM 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8,与对照组比较明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$),给药第 14、28 天的样本中,BLM+QUE 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8,与 BLM 组比较显著下降,具有统计学差异($P<0.05$),提示槲皮素在一定程度上具有减轻肺组织纤维化大鼠的炎

症反应,见表 2。

2.4 槲皮素对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞间质转化的影响

对照组中 A549 细胞的 E-cadherin 呈高表达, α -SMA 呈低表达,加入 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞间质转化中,在第 7、14、28 天时,A549 细胞 E-cadherin 的表达明显降低,在第 28 天时达最低,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时对应各时间点, α -SMA 的表达水平明显增高($P<0.05$)。给予槲皮素后,各时间点与 TGF- β 1 组比较,A549 细胞的 E-cadherin 的表达明显升高($P<0.05$),但低于正常对照组, α -SMA 的表达明显降低($P<0.05$)。该结果说明槲皮素能够抑制 TGF- β 1 对 A549 细胞诱导的 EMT 的转变,具体见图 3、表 3。

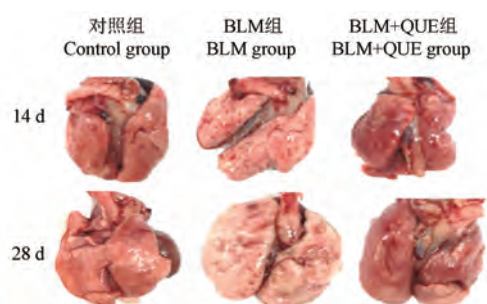


图 1 形态学观察不同组别大鼠第 14、28 天肺组织纤维化情况

Figure 1 Morphological observation of pulmonary fibrosis in different groups on the 14th and 28th days

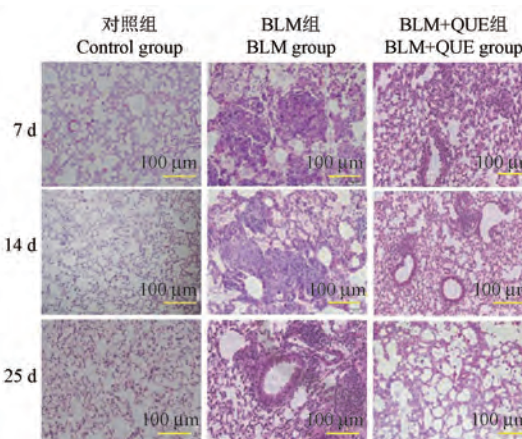


图 2 各组大鼠肺组织第 7、14、28 天的 HE 染色情况

Figure 2 HE staining of lung tissue of rats in each group on day 7, 14 and 28

表 2 各组细胞因子的检测结果
Table 2 Test results of cytokines in each group

组别 Group	时间点 Time	TGF-β1 (ng/L)	IL-1β (ng/L)	TNF-α (ng/L)	IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组 Control group	第 7 天 D7	310.3±68.9	58.4±11.7	63.6±12.7	543.26±69.41	664.33±59.24
	第 14 天 D14	307.5±70.3	60.2±9.6	59.8±10.3	548.57±72.06	659.24±67.03
	第 28 天 D28	312.7±66.4	59.8±10.4	60.2±11.5	541.08±80.53	663.52±63.48
BLM 组 BLM group	第 7 天 D7	822.6±87.8 [*]	99.6±20.6 [*]	100.3±19.4 [*]	642.54±55.67 [*]	786.35±89.20 [*]
	第 14 天 D14	1540.3±112.5 ^{*▲}	200.4±29.3 ^{*▲}	182.4±22.6 ^{*▲}	705.28±59.28 ^{*▲}	812.33±83.64 ^{*▲}
	第 28 天 D28	1800.7±106.4 ^{*▲}	240.7±18.6 ^{*▲}	286.3±27.2 ^{*▲}	731.93±67.08 ^{*▲}	800.26±80.14 ^{*▲}
BLM+QUE 组 BLM+QUE group	第 7 天 D7	813.3±79.6	97.9±18.8	95.5±15.6	653.57±59.41	776.61±80.06
	第 14 天 D14	1105.2±89.8 ^{#▲}	128.6±20.7 ^{#▲}	149.4±18.9 ^{#▲}	659.24±68.34 ^{#▲}	743.21±76.83 ^{#▲}
	第 28 天 D28	1211.3±82.6 ^{#▲}	122.5±14.9 ^{#▲}	142.1±14.7 ^{#▲}	604.23±72.97 ^{#▲}	702.31±71.29 ^{#▲}

注:同一时间内,与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与 BLM 组相比, [#] $P<0.05$;同一组别,与第 7 天相比, [▲] $P<0.05$ 。
Note. At the same time, compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the BLM group, [#] $P<0.05$. In the same group, compared with the 7th day, [▲] $P<0.05$.

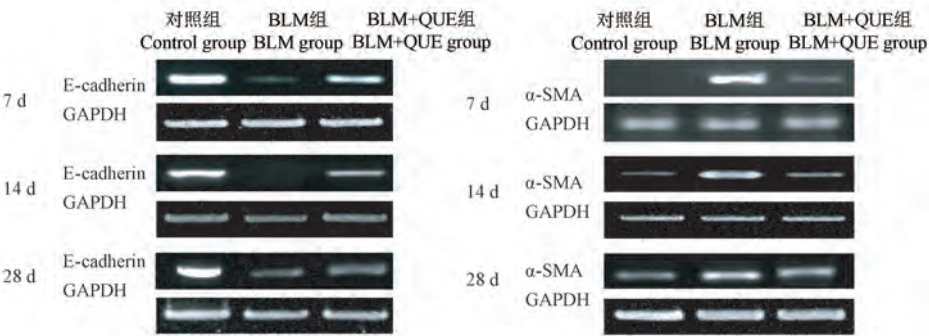


图 3 qRT-PCR 检测各组不同时间点 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 的电泳图

Figure 3 Electrophoresis of E-cadherin mRNA and α-SMA mRNA detected by qRT-PCR at different time points in each group

表 3 不同组别不同时间点 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 的表达

Table 3 Expression of E-cadherin mRNA and α-SMA mRNA in different groups at different time points

组别 Group	基因名称 Gene name	第 7 天 D7	第 14 天 D14	第 28 天 D28
对照组 Control group	E-cadherin mRNA	0.953±0.074	0.887±0.083	0.902±0.075
TGF-β1 组 TGF-β1 group		0.271±0.064 [*]	0.232±0.055 [*]	0.384±0.072 [*]
TGF-β1+QUE 组 TGF-β1+QUE group		0.732±0.045 [#]	0.574±0.072 [#]	0.593±0.054 [#]
对照组 Control group	α-SMA mRNA	0.139±0.022	0.173±0.026	0.211±0.013
TGF-β1 组 TGF-β1 group		0.992±0.089 [*]	0.947±0.081 [*]	0.732±0.055 [*]
TGF-β1+QUE 组 TGF-β1+QUE group		0.336±0.043 [#]	0.343±0.029 [#]	0.409±0.057 [#]

注:同一时间内,与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与 TGF-β1 组相比, [#] $P<0.05$ 。
Note. At the same time, compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the TGF-β1 group, [#] $P<0.05$.

2.5 NOX4 和 P62 蛋白的表达

在第 7、14、28 天的样本检测中发现, BLM 组 NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量显著高于正常对照组。在第 7 天检测的样本, BLM+QUE 组与 BLM 组比较, NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量有所降低, 但差异不显著 ($P>0.05$), 但在第 14、28 天的检测结果中, BLM+QUE 组与 BLM 组比较, NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$), 见图 4、表 4。

3 讨论

肺纤维化的致病因素至今没有明确阐释清楚, 可能与不断恶化的空气质量、环境粉尘污染以及不明原因的物理化学污染等有关。目前临床上没有根治的办法, 患者常会出现渐进性加重, 最终出现

呼吸衰竭而死亡。研究证明中药能够通过调节 TGF- β 信号通路发挥抑制肺纤维化的作用^[4-5]。槲皮素在柴胡等中药中含量较高, 具有多种生物学活性, 既往的研究发现槲皮素对肺部疾病具有一定效果^[6-7]。明确槲皮素在抗肺纤维化过程中的机制有助于开发有针对性的治疗药物。博来霉素在 Fe^{2+} 和 O_2^- 存在下诱导产生氧自由基, 诱发细胞膜发生 DNA 解链和脂质过氧化, 导致细胞受损, 启动纤维化前炎症反应^[8]。本次研究采用博来霉素诱导大鼠发生肺纤维化, 在造模后第 7、14、28 天观察各组肺组织外观情况并经 HE 染色结果分析, 证明博来霉素可以导致大鼠肺组织发生纤维化。本次研究进一步探讨槲皮素对大鼠肺纤维化炎症反应的影响。

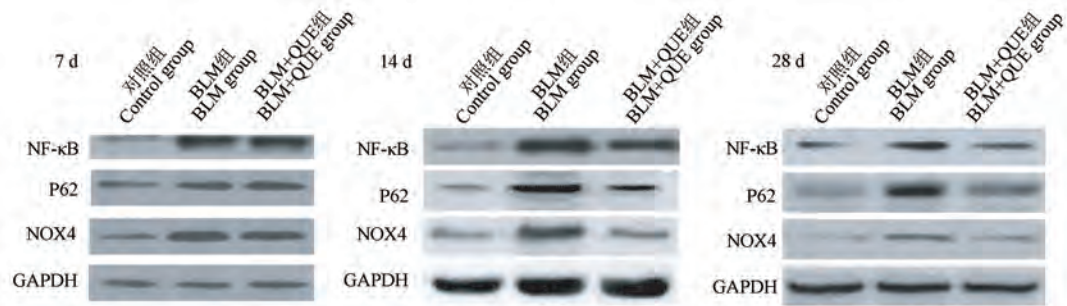


图 4 Western blot 检测各组大鼠肺组织不同时间点 NOX4、P62 及 NF- κ B 蛋白表达电泳图

Figure 4 Western blot detection of NOX4, P62 and NF- κ B in lung tissue of rats in each group at different time points

表 4 不同组别不同时间点 NOX4、P62 及 NF- κ B 的蛋白表达

Table 4 Protein expression of NOX4, P62 and NF- κ B at different time points in different groups

组别 Group	基因名称 Gene name	第 7 天 D7	第 14 天 D14	第 28 天 D28
对照组 Control group	NF- κ B	0.233 $\pm$ 0.024	0.269 $\pm$ 0.033	0.302 $\pm$ 0.037
BLM 组 BLM group		0.876 $\pm$ 0.072	1.282 $\pm$ 0.061 *	0.882 $\pm$ 0.064 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.852 $\pm$ 0.065	0.674 $\pm$ 0.092 [#]	0.597 $\pm$ 0.054 [#]
对照组 Control group	P62	0.139 $\pm$ 0.022	0.173 $\pm$ 0.026	0.211 $\pm$ 0.013
BLM 组 BLM group		0.495 $\pm$ 0.056	0.869 $\pm$ 0.061 *	0.875 $\pm$ 0.069 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.506 $\pm$ 0.049	0.402 $\pm$ 0.038 [#]	0.423 $\pm$ 0.059 [#]
对照组 Control group	NOX4	0.139 $\pm$ 0.022	0.173 $\pm$ 0.026	0.131 $\pm$ 0.018
BLM 组 BLM group		0.764 $\pm$ 0.089	0.901 $\pm$ 0.093 *	0.420 $\pm$ 0.039 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.768 $\pm$ 0.043	0.435 $\pm$ 0.042 [#]	0.289 $\pm$ 0.034 [#]

注:同一时间内,与对照组相比, * $P<0.05$;与 BLM 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. At the same time, compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the BLM group, [#] $P<0.05$.

炎症反应在肺的纤维化过程中发挥重要作用,由于炎症细胞的聚集导致肺泡壁和气道的受损,继而出现的纤维化使肺发生不可逆重建^[9-10]。TGF- β 1 是肺纤维化形成的关键因子,它能够促进肺泡上皮细胞发生上皮细胞间质转化,促进成纤维细胞的形成。TNF- α 可促进炎症反应和间质细胞增殖分化。IL-1 β 是一种前炎性因子,能够诱导其它炎性因子的合成。肺纤维化的发生与多种细胞因子如 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、NF- κ B 等的异常表达有一定关系,已有研究证明 TGF- β 1、IL-1 β 和 TNF- α 对于促进成纤维细胞的增生和肺纤维化发挥重要作用^[11]。本次研究结果与既往的研究结果一致^[12],发现在肺纤维化形成过程中,TGF- β 1、IL-1 β 和 TNF- α 的表达明显上升,给予槲皮素后,3 者水平又明显下降,说明槲皮素能够减轻肺纤维化的炎症反应。

成纤维细胞大量聚集是肺纤维化的重要病理特征,而成纤维细胞的产生主要有 3 个途径,除了肺固有的成纤维细胞发生增殖和外周血游离的成纤维细胞迁移至肺以外,最主要的就是肺上皮细胞的间质转化^[13]。因此,以间质转化为研究靶点可能会抑制肺纤维化的进程。E-cadherin 是上皮细胞的主要标志物之一,在维持细胞间的正常链接中起到重要作用,它的表达减少会释放 β -cadherin 转移至细胞核进而诱导间质转化基因的表达。 α -SMA 是平滑肌肌动蛋白的一种异构形式,主要控制细胞的收缩,它的表达是纤维化的标志,当上皮细胞发生间质转化时, α -SMA 的表达明显增加,TGF- β 1 能够促进 α -SMA 的表达^[14]。本次研究结果提示:槲皮素能够逆转 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞对 E-cadherin 表达的抑制,同时能够下调发生间质转化后 α -SMA 的表达,说明槲皮素能够抑制 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞发生间质转化。

氧化抗氧化平衡失调可能是肺组织纤维化的机制之一。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)在生理状态下呈低表达、低活性状态,当机体发生疾病时,NOX 被激活后通过产生活性氧簇介导的氧化应激反应参与疾病的发生发展。在肝纤维化初始阶段,NOX 参与调控 TGF- β 等促纤维化因子作用下细胞的活化^[15]。NOX4 是 NOX 的一个重要亚基,NOX4 诱导老年小鼠 NrF2 应答的能力损伤,导致肺组织更容易发生纤

维化^[16]。自噬是真核生物中长周期蛋白降解的重要途径,在细胞的整个生命周期中扮演重要角色。自噬蛋白 P62(也称为 SQSTM1 蛋白)是检测自噬水平的标志物,当细胞自噬活性受到抑制时,P62 蛋白在细胞内大量聚集,引发一系列生理病理结果。本研究结果发现 NOX4 的蛋白表达随着肺纤维化的严重程度增加而呈进行性升高,证明 NOX4 的促纤维化效应,同时说明 NOX4 不仅参与早期肺细胞损伤,而且在肺纤维化的形成阶段可能发挥非常重要的作用。研究结果中,BLM 组 P62 蛋白表达明显高于正常对照组,BLM+QUE 组 P62 蛋白表达较 BLM 组明显降低,说明自噬不足参与了肺纤维化的过程,同时也证明槲皮素能够下调自噬抑制肺纤维化大鼠的 P62 蛋白表达,通过抑制 NOX4-P62 信号途径,激活自噬,干预肺纤维化,减轻肺纤维化的症状。

综上所述,博来霉素能够诱导大鼠发生肺纤维化,槲皮素能够减轻肺纤维化的炎症反应,能够抑制 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞发生间质转化,同时也能通过抑制 NOX4-P62 信号途径,激活自噬,干预肺纤维化,减轻肺纤维化的症状。但是我们的研究对象是实验大鼠,对于人体肺纤维化的实际疗效到底如何,槲皮素的适宜剂量等方面的情况还需要做进一步的研究才能确定。

参考文献:

- [1] 刘杨,朱星,徐昌君,等.补肺汤对肺纤维化小鼠肺组织中自噬相关蛋白的影响[J].中药材,2017,40(1):192-197.
- [2] David AVA, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid [J]. Pharmacognosy Rev, 2016, 10(20): 84-89.
- [3] 陈将,章小敏,叶爱菊,等.槲皮素抗肺纤维化的分子机制研究[J].中国中医药科技,2018,25(5):666-669.
- [4] 雷敏芬,张恂,赵奇慧,等.中药在 TGF- β 信号通路抑制肺纤维化中的作用研究进展[J].中国药物评价,2018,35(3):190-194.
- [5] Ji Y, Dou YN, Zhao QW, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37: 794-804.
- [6] Chuang CH, Yeh CL, Yeh SL, et al. Quercetin metabolites inhibit MMP-2 expression in A549 lung cancer cells by PPAR- γ associated mechanisms [J]. J Nutr Biochem, 2016, 33: 45-53.
- [7] Lim EJ, Heo J, Kim YH. Quercetin induces cell death by caspase-dependent and p38 MAPK pathway in EGFR mutant lung cancer cells [J]. Kosin Med J, 2016, 31(1): 30-40.

(下转第 117 页)

曹彬彬,蔡瑶,王宝珠,等. 基于 CRISPR/Cas9 技术构建 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 101-108.

Cao BB, Cai Y, Wang BZ, et al. Generation of a *Plcz1* gene knockout mouse by using the CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 101-108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.014

基于 CRISPR/Cas9 技术构建 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型

曹彬彬^{1,2}, 蔡瑶^{1,2}, 王宝珠^{1,2}, 饶喻^{1,2}, 王超^{1,2}, 苟克勉^{1,2}, 王涛^{1,2*}

(1.扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;2.江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏扬州 225009)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 系统构建精子特异性磷脂酶 C zeta-1 (phospholipase C zeta-1, *Plcz1*) 基因敲除 (*Plcz1*^{-/-}) 小鼠模型,探讨 *Plcz1* 基因在雄性小鼠生育过程中的作用。方法 选择小鼠 *Plcz1* 基因第 6、7 外显子作为靶位点,前后两个位点设计 2 对 sgRNA 序列,再将 2 对 sgRNA 以 Golden Gate 方法插入 pX330A 质粒中,构建 pX330-sgRNA 重组质粒。经扩增、纯化后,将重组质粒显微注射进小鼠受精卵原核中,进行胚胎移植至代孕母鼠, F0 代小鼠出生后,提取其尾 DNA 进行 PCR 鉴定和 DNA 测序分析。通过 F0 代与野生型小鼠交配得到 F1 代小鼠, F1 代交配繁殖至 F2 代获得 *Plcz1* 基因缺失的小鼠纯合品系, *Plcz1*^{-/-} 与野生型小鼠交配,分析 *Plcz1*^{-/-} 雄鼠的生育能力。结果 成功构建 pX330-sgRNA 重组质粒,通过繁育和测序筛选获得 3 只 *Plcz1*^{-/-} 雄鼠 (*Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4}、*Plcz1*^{m5}),对 3 只小鼠进行目的基因测序发现:(1) *Plcz1*^{m3}: *Plcz1* 基因第 6、7 外显子区域缺失 3078 bp;(2) *Plcz1*^{m4}: 第 7 外显子区域缺失 7 bp,该小鼠在饲养过程中死亡;(3) *Plcz1*^{m5}: *Plcz1* 基因第 6 外显子区域缺失 1 bp。结论 利用 CRISPR/Cas9,成功获得 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠, *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠可育,但与野生型小鼠相比,其生育能力明显下降。

【关键词】 *Plcz1*; CRISPR/Cas9; 序列测定; 基因敲除; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0101-08

Generation of a *Plcz1* gene knockout mouse by using the CRISPR/Cas9 system

CAO Binbin^{1,2}, CAI Yao^{1,2}, WANG Baozhu^{1,2}, RAO Yu^{1,2}, WANG Chao^{1,2}, GOU Kemian^{1,2}, WANG Tao^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou 225009, China. 2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009)

【Abstract】 Objective A sperm-specific phospholipase C zeta-1 (*Plcz1*^{-/-}) gene knockout mouse was generated by the CRISPR/Cas9 system to explore the role of the *Plcz1* gene in male mouse fertility. **Methods** Exons 6 and 7 of the mouse *Plcz1* gene were selected as target sites to design two pairs of sgRNAs. The two pairs of sgRNAs were inserted into the pX330A plasmid by the Golden Gate method to construct the pX330-sgRNA recombinant plasmid. After amplification and purification, the recombinant plasmid was microinjected into pronuclear of mouse zygote. The embryos were transferred to surrogate mother mice. After the birth of F0 generation mice, tail DNA was analyzed by PCR and sequencing. The F0 generation was mated with wild-type mice to obtain F1 generation mice. The F1 generation was bred to the F2 generation to obtain a homozygous strain of *Plcz1* gene knockout mice. To analyze *Plcz1*^{-/-} male mouse fertility, *Plcz1*^{-/-} mice were mated with wild-type mice. **Results** The recombinant plasmid pX330-sgRNA was constructed successfully, and three *Plcz1*^{-/-}

【基金项目】江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD);国家自然科学基金青年项目(31802260);江苏省自然科学基金青年项目(BK20180917);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(18KJB230009)。

【作者简介】曹彬彬(1996—),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail:1727295040@qq.com

【通信作者】王涛(1989—),男,硕士生导师,研究方向:实验动物学。E-mail:wtao6550@yzu.edu.cn

male mice ($Plcz1^{m3}$, $Plcz1^{m4}$ and $Plcz1^{m5}$) were obtained by breeding. Target gene sequencing of the three mice showed that $Plcz1^{m3}$ had a 3078 nucleotide deletion between exons 6 and 7 of $Plcz1$, $Plcz1^{m4}$ had a seven nucleotide deletion in exon 7 of $Plcz1$, which died during feeding, and $Plcz1^{m5}$ had a one nucleotide deletion in exon 6 of $Plcz1$. **Conclusions** $Plcz1^{-/-}$ male mice were successfully generated using the CRISPR/Cas9 system. $Plcz1^{-/-}$ male mice were fertile, but their fertility was significantly decreased compared with wild-type mice.

【Keywords】 $Plcz1$; CRISPR/Cas9; sequencing; gene knockout; mice

生殖能力下降是人和动物共同面临的健康问题,不仅对畜牧业造成经济损失,而且对人类健康构成严重威胁。因此,寻找动物生殖过程中关键的调控基因,探讨其生殖发生过程中的调控机制成为该领域内关注的焦点之一。在过去的半个多世纪里,许多在动物生殖过程中发挥重要作用的精子因子相继被发现,在动物发生受精时,精子中的某些因子会通过融合孔进入卵母细胞胞质中,启动卵母细胞内钙离子释放系统,从而激活卵母细胞^[1]。研究发现,哺乳动物受精的特征是在精子-卵子融合后,卵子内持续 2~4 h 不同程度的 Ca^{2+} 振荡^[2],该过程是恢复第一次减数分裂和胚胎发育的前提,同时还阻止多精入卵的发生^[3]。

磷脂酶 C zeta (PLC ζ) 是 Saunders 等^[4] 在研究小鼠睾丸中 PLC 时发现的新亚型,随后证实 PLC ζ 不仅存在于睾丸中,并且拥有其他亚型中的基本结构域。该蛋白结构域由 4 个位于 N 端的 EF 手型结构域、位于中心的特征性 X 和 Y 催化域以及碳基端的 C2 结构域构成^[5]。其中 EF 手型区域对低浓度 Ca^{2+} 敏感,使 PLC ζ 在静息状态的 Ca^{2+} 水平具有活性。通过 C2 结构域与 PI(3)P、PI(5)P 或一种未知的膜蛋白相互作用可能实现 PLC ζ 与特定囊泡膜的结合^[6],带正电的 XY 连接区与第一个 EF 手型结构域相互作用,催化 XY 结构域进行 PIP_2 的酶促水解,生成三磷酸肌醇 (IP_3)^[7],促进内质网中 Ca^{2+} 的释放,进而诱导细胞内 Ca^{2+} 振荡的发生^[8]。Saunders 等^[4] 将 PLC ζ 功能受到抑制的精子注入卵母细胞中,发现 Ca^{2+} 的振荡不明显,而将完整的 PLC ζ cRNA 注入小鼠卵母细胞后产生了与正常体外受精相类似的 Ca^{2+} 振荡现象,表明 PLC ζ 介导的 Ca^{2+} 振荡在体外受精过程中发挥重要作用。研究显示,在牛^[9]、鸡^[10] 和猪^[11] 等家畜中已经发现 PLC ζ 基因。

体外授精实验结果表明, $Plcz1$ 基因缺陷的精子会导致小鼠受精失败,进而导致不育,最近研究发现,在缺失 PLC ζ 蛋白的情况下,自然交配的小鼠也会导致体内受精产生后代,但产仔数明显下降^[12]。

因此,自然受精的情况下 $Plcz1$ 基因缺陷雄鼠是否具有生育能力尚未完全阐明。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 $Plcz1^{-/-}$ 小鼠模型,并对 $Plcz1^{-/-}$ 小鼠进行扩繁和基因型鉴定,探讨 $Plcz1$ 基因在雄性小鼠生育过程中的作用,为解决 $Plcz1$ 基因突变带来的生殖能力障碍提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 雄鼠 6 只,8~12 周龄,体重 23~28 g;SPF 级 C57BL/6 雌鼠 12 只,4~8 周龄,体重 14~22 g;SPF 级 ICR 雄鼠 3 只,10 周龄,体重 32~37 g;SPF 级 ICR 雌鼠 3 只,10 周龄,体重 30~35 g,均购自扬州大学比较医学中心 [SCXK(苏)2017-0007],实验操作在扬州大学兽医学院兽医大楼的实验室进行 [SYXK(苏)2017-0044]。实验小鼠均饲养于扬州大学比较医学中心的 SPF 级动物房,光照周期采用 5:00 am~7:00 pm,环境温度控制在 20℃~25℃,自由饮水、进食,每周更换 1 次垫料。

动物实验伦理审核由扬州大学审批 (NSFC2020-SYXY-20),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

pX330A-1x2、pX330S-2 载体购自 Addgene;限制性内切酶 BpiI (批号:10020723)、T4 DNA 连接酶 (批号:10037474) 及限制性内切酶 Eco31I (批号:0431712) 购自 New England Biolabs 公司;2×Es Taq MasterMix (Dye) (批号:01031/50351)、DH5 α 感受态细胞 (批号:50525) 及高纯度质粒小提试剂盒 (批号:50433) 购自康为世纪生物科技股份有限公司;EndoFree Plasmid Maxi Kit (批号:163013537) 购自 QIAGEN;普通琼脂糖 (批号:EZ6688C178) 购自赛国生物科技有限公司;纯化试剂盒 (批号:123722) 购自 MP Biomedicals;DL2000 marker (批号:AKF0781A) 购自 TaKaRa Bio;Spe 抗生素 (批号:EB15BA0006) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

T100 Thermal Cycler PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;ABI PCR 仪 miniAmp 及 ABI 经典型 PCR 仪 2720 购自美国 Thermo Fisher 公司;天能 1600 型凝胶成像+电脑、HE-90 电泳槽购自上海天能生物科技有限公司;恒温水浴锅购自宁波新芝生物科技有限公司;台式冷冻离心机 5424R、台式离心机 5424、微型离心机 MiniSpin 购自德国 Eppendorf 公司;ZHTY-50 N 恒温振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 设计 sgRNA 及 sgRNA 双链合成

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上查询到 C57BL/6 小鼠的 *Plcz1* 基因的序列 (NM_054066.4), 由于第一个外显子不存在氨基酸, 因此本试验从第二个外显子开始统计外显子数量并标记的。通过张峰 sgRNA 设计的网站 (<http://crispr.mit.edu/>) 在第 6、7 外显子上选择 sgRNA 靶点序列, 选择出得分较高的 2 条 sgRNA, 并在其两端添加限制性内切酶 Bpi I 酶切位点, 由擎科有限公司合成 (如表 1 所示)。其中, 如图 1 所示的基因敲除示意图, *Plcz1*-sgRNA6 位于 *Plcz1* 基因第 6 外显子, *Plcz1*-sgRNA7 位于 *Plcz1* 基因第 7 外显子。

将合成的上游引物和下游引物各 8 μ L、Taq DNA Polymerase Buffer 4 μ L 在 PCR 管中混合, 进行 PCR 退火反应: 99 $^{\circ}$ C 10 min, 16 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3.2 pX330-sgRNA 重组载体的构建

将退火的寡核苷酸分别插入 pX330A 和 pX330S 载体, 反应体系共 2 μ L: 25 ng/ μ L pX330A/S 载体 0.3 μ L, 10 μ mol/L 退火的寡核苷酸 0.5 μ L, 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 0.2 μ L, BpiI 0.1 μ L, T4 DNA 连接酶 0.1 μ L, 无菌蒸馏水 0.8 μ L。进行 PCR 扩增反应: 37 $^{\circ}$ C 5 min, 16 $^{\circ}$ C 10 min 进行 3 个循环, 循环反应后, 在 37 $^{\circ}$ C 下进行额外的 BpiI 酶消化 1 h, 即得到连接产物 pX330A-1x2-sgRNA6 与

pX330S-2-sgRNA7, 用于后续步骤。

1.3.3 连接产物转化感受态细胞

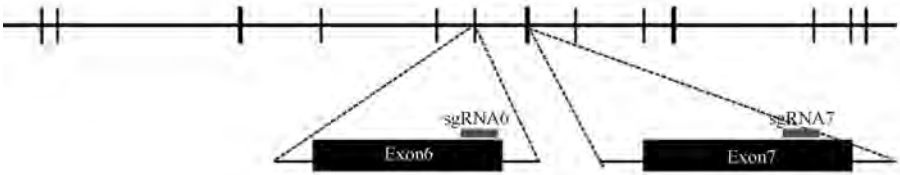
取冷冻的感受态细胞置于冰浴中, 待感受态细胞在冰上融化后, 在超净台中向感受态细胞悬液中加入连接产物, 用移液器轻轻吹打混匀, 置于冰上 30 min。42 $^{\circ}$ C 热击 90 s, 迅速将离心管转移到冰浴中, 冰上静置 2 min。在超净台里向每个离心管中加入 700 μ L 无菌的 LB 培养基, 不含抗生素, 混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 摇床, 220 r/min 振荡培养 1 h 使菌体复苏。在超净台中取 50 μ L 已转化的感受态细胞, 加到含 Amp 或者 Spe 抗生素的 LB 固体琼脂培养基上, 用无菌的涂布棒将菌液均匀涂开, 直至干燥, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 12~16 h 培养。

1.3.4 质粒的提取与鉴定

用灭菌过后的枪头挑取上述培养出的单菌落, 接种于 5 mL Amp 或 Spe 抗生素的 LB 液体琼脂培养基置于 37 $^{\circ}$ C 摇床, 220 r/min 振荡培养 10~12 h。在超净台中保菌, 余下菌液用质粒小提试剂盒提取质粒, 取过夜培养的菌液加入离心管 (自备) 中, 13000 r/min 离心 30 s 收集菌体沉淀, 尽量吸弃上清。向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ L 含 RNase A 的 Buffer P1, 使用涡旋振荡器充分混匀, 悬浮菌体沉淀。加入 250 μ L Buffer P2, 轻轻地上下颠倒混匀 6 次, 充分混匀使菌体裂解, 此时溶液应变得清亮粘稠。加入 350 μ L Buffer N3, 立即轻柔地上下颠倒混匀 10 次, 充分混匀, 此时应出现白色絮状沉淀。13000 r/min 离心 5 min。将所得的上清液转移

表 1 *Plcz1* 基因 sgRNA 寡核苷酸链

Table 1 SgRNA oligonucleotide chain of <i>Plcz1</i> gene	
目的片段 Target fragment	sgRNA 序列 (5'-3') sgRNA sequence (5'-3')
<i>Plcz1</i> -sgRNA6	F: CACCGAGATACACTACCGTCTCCAG
	R: AAACCTGGAGACGGTAGTGTATCTC
<i>Plcz1</i> -sgRNA7	F: CACCGCTTCCTATCAGGATCAAGG
	R: AAACCTTGATCCGTGATAGGAAGC



注: *Plcz1* 基因的外显子由竖线表示。

图 1 *Plcz1* 基因的基因结构 (NM_054066.4) 和 CRISPR/CAS9 的靶序列

Note. Exons are represented by vertical bars.

Figure 1 Gene structure of the mouse *Plcz1* gene (NM_054066.4) and target sequences for CRISPR/Cas9

到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DM) 中, 13000 r/min 离心 30 s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。向吸附柱中加入 150 μ L Buffer PB, 13000 r/min 离心 30 s。向吸附柱中加入 400 μ L Buffer PW, 13000 r/min 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于 1 个新的离心管中, 向吸附膜的中间部位加入 60 μ L Buffer EB, 室温放置 2 min, 13000 r/min 离心 1 min, 将质粒溶液收集到离心管中, -20°C 保存质粒。质粒送至南京擎科生物科技有限公司进行测序, 测序引物为通用引物 U6-F。

1.3.5 Golden Gate assembly

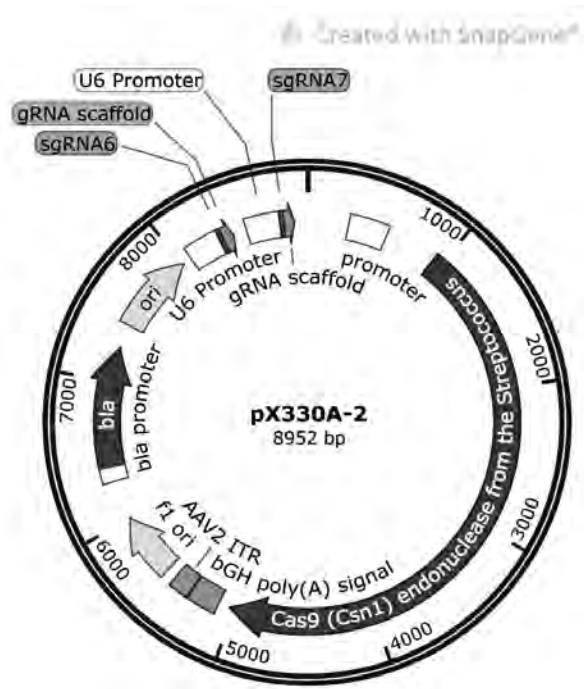
为构建靶向 2 个 *Plcz1* 基因组位点的 CRISPR/Cas9-核酸酶载体, 将测序正确的 pX330A-1x2-sgRNA6 与 pX330S-2-sgRNA7 统一到单个载体中。将 pX330A/S 载体、Eco31I、T4 DNA 连接酶与 $10\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液在 PCR 管中混合, 并进行如下热循环反应: 37°C 5 min, 16°C 10 min 进行 25 个循环, 循环反应后, 在 37°C 下进行额外的 Eco31I 消化 1 h, 即得到连接产物 pX330A-2 (如图 2 所示), 用于后续步骤。

1.3.6 显微注射

测序正确的质粒经纯化后, 用注射用水稀释至 3 ng/ μ L, 存于 -20°C 备用。将注射过 PMSG 和 hCG 的 C57BL/6 雌鼠 (供体) 与 C57BL/6 雄鼠合笼, 同时将未注射过激素的 ICR 雌鼠与结扎的雄鼠合笼, 从而获得假孕雌鼠 (受体)。处死超数排卵的供体雌鼠, 取出受精卵, 使用显微注射仪将质粒注射到受精卵原核中。麻醉假孕雌鼠, 将受精卵移植至受体卵巢内。3 周后移植成功的受体雌鼠可生出 F0 代小鼠。

1.3.7 基因敲除小鼠的筛选

提取鼠尾基因组 DNA, 通过 PCR 检测目的片段。由南京擎科生物科技有限公司合成检测 sgRNA 的引物 (如表 2 所示)。PCR 反应体系: $2\times$ Es Taq MasterMix (Dye) 10 μ L, F (10 μ mol/L) 1 μ L, R (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA (<0.2 μ g) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应程序: 预变性 94°C 2 min, 变性 94°C 30 s, 退火 60°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 循环 33 次, 终延伸 72°C 2 min。PCR 扩增产物送至南京擎科生物科技有限公司进行测序, 用 SnapGene 软件分析。



注: 图片由 SnapGene 提供。
图 2 pX330A-2 质粒图谱
Note. The picture was support by SnapGene software.
Figure 2 Plasmid map of pX330A-2

表 2 检测目的片段的引物序列

Table 2 Primer sequences for detection of target fragment	
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
检测 <i>Plcz1</i> -sgRNA6 引物 Detection of <i>Plcz1</i> -sgRNA6 primer	F: TTAGAAAATCACTGCTCCCTG R: GCGTAGCAAAACCATCTTCTCT
检测 <i>Plcz1</i> -sgRNA7 引物 Detection of <i>Plcz1</i> -sgRNA7 primer	F: TATCTGAAACCCACGAGAGGAT R: GAAGAGGAAGCTGACCCCTTAT

1.3.8 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠的饲养和繁育

繁育出 F0 代小鼠后, 与野生型 C57BL/6 小鼠合笼, 得到 F1 代杂合小鼠。然后将纯合和纯合小鼠、纯合和杂合小鼠、纯合和野生型、杂合和杂合小鼠以及野生型和野生型小鼠等不同基因型间进行合笼, 从繁殖情况分析 *Plcz1* 基因敲除雄性小鼠的生育能力。

1.4 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 22 统计软件进行统计学分析, 组间两两比较采用配对双尾 *t* 检验, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 显示。当 $P<0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pX330A-sgRNA 重组载体构建

目的序列 *Plcz1*-sgRNA6 和 sgRNA7 与载体

pX330A 载体连接,通过序列测定验证目的基因,并用 SnapGene 软件进行序列比对,结果表明正确插入两对 sgRNA 序列(图 3)。

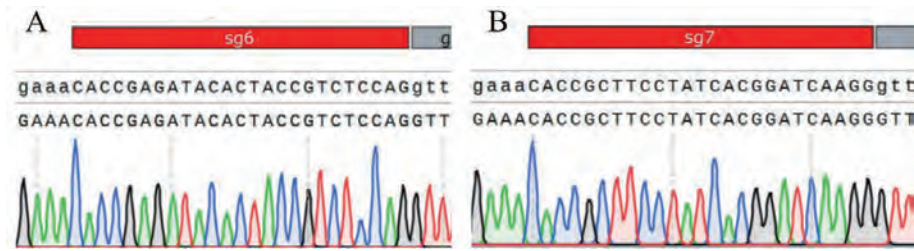
2.2 *Plcz1* 基因敲除小鼠的测序筛选

获得受精卵 82 枚,显微注射活胚 54 枚,胚胎移植两只 ICR 受体(C102、C103),其中 C102 受体产仔 6 只,编号 1~6, C103 受体生的 8 只后代均被吃。PCR 扩增包含 sgRNA 的片段后进行琼脂糖凝胶电泳(如图 4 所示),电泳结果显示:用检测 sgRNA6 或 sgRNA7 引物进行 PCR 扩增,3 号小鼠没有电泳条带,其余小鼠电泳条带大小为 289 bp;而用检测 sgRNA6 上游引物和 sgRNA7 下游引物进行 PCR 扩增,3 号小鼠在 268 bp 处显示电泳条带。经测序 3~4 次鉴定出 3、4、5 号小鼠为 *Plcz1* 基因敲除小鼠,分别为:(1) *Plcz1*^{m3}: *Plcz1* 基因第 6、7 外显子区域缺失 3078 bp,在第 295 个氨基酸处开始突变;(2) *Plcz1*^{m4}: *Plcz1* 基因第 7 外显子区域缺失 7 bp,在第 356 个氨基酸处开始突变,该小鼠在饲养过程中死亡。(3) *Plcz1*^{m5}: *Plcz1* 基因第 6 外显子区域缺失 1 bp,在第 295 个氨基酸处开始突变。同时预测 *Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4} 与 *Plcz1*^{m5}

的等位基因表达产生的截短蛋白结构域(如图 5 所示);*Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 小鼠的 PLC ζ 蛋白在 X 结构域处产生缺失;*Plcz1*^{m4} 小鼠的 PLC ζ 蛋白在 X-Y 连接区产生缺失。

2.3 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠的生育能力分析

表 3 和表 4 显示了小鼠 *Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 后代的生育能力。结果发现, *Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 雄鼠与野生型雌鼠交配虽然可以产生后代,但与野生型雄鼠(8.5 $\pm$ 1.4)相比,后代数量极显著性降低(*Plcz1*^{m3}: 2.5 $\pm$ 0.5; *Plcz1*^{m5}: 2.3 $\pm$ 1.1)。同时与野生型雄鼠相比(受精率 100%; 后代死亡率 4.7%), *Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率 13.3%; *Plcz1*^{m5} 雄鼠受精率 50%, 后代死亡率 24%。 *Plcz1*^{m3} 雄鼠和 *Plcz1*^{m3} 雌鼠交配,后代数量极显著性降低(3.0 $\pm$ 2.2), *Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率 30%, 后代死亡率高达 100%, 而 *Plcz1*^{m5} 雄鼠与 *Plcz1*^{m5} 雌鼠交配不产生后代。由此可见, *Plcz1*^{m3} 和 *Plcz1*^{m5} 雄鼠可以和不同基因型雌鼠进行交配,但其受精率、出生率以及死亡率均显著性下降。结果表明, *Plcz1*^{-/-} 雄鼠自然交配可以产生后代,但是生育能力显著性下降,同时 *Plcz1*^{m5} 雄鼠较 *Plcz1*^{m3} 雄鼠受精率高,但后代死亡率也高。



注:A:sgRNA6 的测序结果与预测构建的载体的序列比对;B:sgRNA7 的测序结果与预测构建的载体的序列比对。

图 3 载体测序对比图

Note. A, Sequencing results of sgRNA6 were compared with the predicted vector. B, Sequencing results of sgRNA7 were compared with the predicted vector.

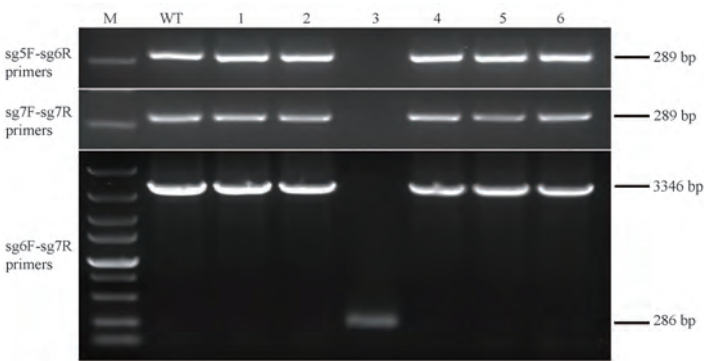
Figure 3 Comparison of vector sequencing

表 3 小鼠 *Plcz1*^{m3} 后代生育能力参数($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Fertility parameters of mouse *Plcz1*^{m3} offspring

交配 Crosses 雄性×雌性 Male × Female	受精率(%) Fertilization rate	产仔窝数 Number of litters	每窝产仔数 Litter size	出生小仔死亡率(%) Infant mortality rate
WT(<i>n</i> =6)×WT(<i>n</i> =7)	100.0	10	8.5 $\pm$ 1.4	4.7
Het ^(m3) (<i>n</i> =16)×Het ^(m3) (<i>n</i> =15)	75.0	25	6.3 $\pm$ 1.5***	21.0
Het ^(m3) (<i>n</i> =6)×Mut ^(m3) (<i>n</i> =7)	55.6	9	6.9 $\pm$ 1.5*	16.1
Mut ^(m3) (<i>n</i> =15)×WT(<i>n</i> =15)	13.3	2	2.5 $\pm$ 0.5***	0
Mut ^(m3) (<i>n</i> =17)×Het ^(m3) (<i>n</i> =17)	17.7	3	3.0 $\pm$ 0.8***	0
Mut ^(m3) (<i>n</i> =10)×Mut ^(m3) (<i>n</i> =6)	30.0	3	3.0 $\pm$ 2.2***	100.0

注:与野生型小鼠每窝产仔数相比, * *P*<0.05, *** *P*<0.001。

Note. Compared with the litter size of wild-type mouse, * *P*<0.05, *** *P*<0.001.

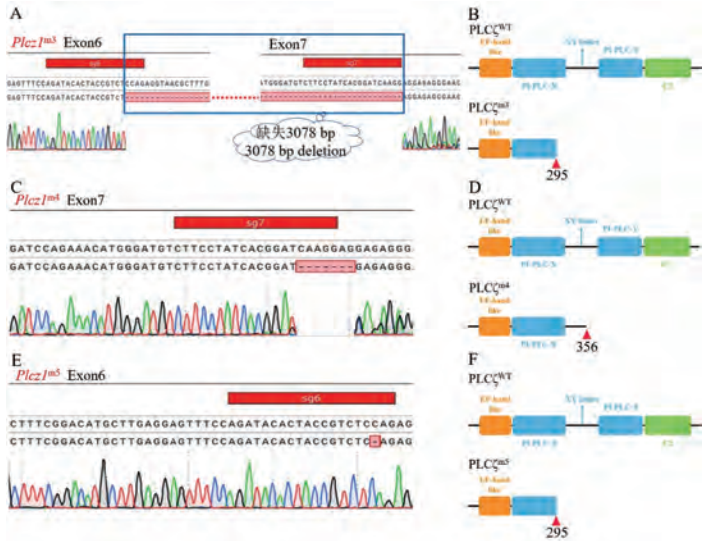


注: M; DL5000 Marker; WT; 野生型; 1~6; 原代小鼠的鼠尾 DNA。

图 4 PCR 法鉴定小鼠 *Plcz1* 基因突变位点

Note. M, DL5000 Marker. WT, Wild type. 1~6, Tail DNA of primary mice.

Figure 4 Identification of mouse *Plcz1* gene mutation site by PCR



注: A、C、E; 野生型 *Plcz1* (*Plcz1*^{WT}) 等位基因和 3 个核苷酸缺失突变 *Plcz1* 等位基因的基因组序列比较, 虚线标红为缺失序列; B、D、F; 预测了野生型小鼠 PLC ζ 蛋白 (PLC ζ ^{WT}) 和突变的 PLC ζ ^{m3} (B)、PLC ζ ^{m4} (D) 以及 PLC ζ ^{m5} (F) 等位基因表达的截短蛋白的结构域。

图 5 小鼠 *Plcz1*^{m3}、*Plcz1*^{m4} 以及 *Plcz1*^{m5} 突变等位基因的表达分析

Note. A, C, E, Comparison of genomic sequences from wild-type *Plcz1* (*Plcz1*^{WT}) allele and three mutant *Plcz1* alleles harbouring nucleotide deletions, the missing sequence is marked red by a dotted line. B, D, F, Predicted protein-domain structures for wild-type mouse PLC ζ protein (PLC ζ ^{WT}) and truncated proteins resulting from expression of mutant PLC ζ ^{m3} (B), PLC ζ ^{m4} (D) and PLC ζ ^{m5} (F) alleles.

Figure 5 Expression analysis of mouse *Plcz1*^{m3}, *Plcz1*^{m4} and *Plcz1*^{m5} mutant alleles

表 4 小鼠 *Plcz1*^{m5} 后代生育能力参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Fertility parameters of mouse *Plcz1*^{m5} offspring

交配 Crosses 雄性×雌性 Male×Female	受精率 (%) Fertilization rate	产仔窝数 Number of litters	每窝产仔数 Litter size	出生小仔死亡率 (%) Infant mortality rate
WT ($n=6$) × WT ($n=7$)	100.0	10	8.5 ± 1.4	4.7
Het ^(m5) ($n=10$) × Het ^(m5) ($n=11$)	80.0	13	8.0 ± 2.3	14.4
Het ^(m5) ($n=6$) × Mut ^(m5) ($n=4$)	75.0	3	6.7 ± 1.3	10.0
Mut ^(m5) ($n=13$) × WT ($n=22$)	50.0	11	2.3 ± 1.1 ***	24.0
Mut ^(m5) ($n=9$) × Het ^(m5) ($n=10$)	18.2	2	2.5 ± 0.5 ***	0
Mut ^(m5) ($n=5$) × Mut ^(m5) ($n=5$)	0	0	0	0

注: 杂合: *Plcz1*^{+/m3} 或 *Plcz1*^{+/m5}; 纯合: 纯合子 *Plcz1*^{m3} 或 *Plcz1*^{m5}; WT; 野生型; 雄性和雌性小鼠之间根据指定的基因型建立交配对。与野生型小鼠每窝产仔数相比, *** $P < 0.001$ 。

Note. Het, *Plcz1*^{+/m3} or *Plcz1*^{+/m5}. Mut, homozygote *Plcz1*^{m3} or *Plcz1*^{m5}. WT, Wild-type. Mating pairs were set up between males and females with genotypes as indicated. Compared with the litter size of wild-type mouse, *** $P < 0.001$.

3 讨论

不孕症是一种影响男性和女性的复杂和多因素的疾病,全球临床数据显示,每 7 对夫妇中就有 1 对经历不孕不育^[13]。即使采用胞浆内单精子注射(ICSI),高达 5%的 ICSI 治疗周期仍然失败,仅在英国每年就有至少 1000 对夫妇受到影响^[14]。目前,卵子激活过程中的缺陷被认为是这一失败的主要来源^[15]。许多临床报告已将人类 PLC ζ 缺陷与卵母细胞激活失败联系在一起,同时某些类型的男性不育与人类精子中 PLC ζ 的异常表达、功能、结构以及定位密切相关^[16]。因此,本研究构建的 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型对研究 PLC ζ 在精子和卵母细胞中的表达和功能活性的调控机制,以及找出不孕症的潜在治疗方案具有临床意义。

利用基因组靶向编辑技术制备动物模型是当今研究的热点领域之一。CRISPR/Cas9 系统使用 RNA 引导的核酸酶切割外源基因^[17],相较于其他基因编辑技术,具有易于定制、更高的靶向效率以及促进多重基因组编辑的能力^[18-19],操作更加简单,成本较低^[20]。Sakuma 等^[21]用 CRISPR/Cas9 构建的系统为多重基因组/表观基因组编辑、同时激活/抑制多个基因等提供了有效的靶向策略。Golden Gate 载体构建方法,使构建质粒更加便利^[22]。为保证 CRISPR/Cas9 的切割效率,本研究选择脱靶位点较少、sgRNA 与其互补序列错配率也较少的靶点,且得分较高的靶点,同时也控制 CRISPR/Cas9 的剂量,因为剂量也是影响脱靶突变的另一个因素,最大限度地减少脱靶突变。此外,通过利用 Cas9 与多个 sgRNA 一起使用的优势,可成功地实现 sgRNA 靶点之间的大片段缺失或倒置^[23]。

利用显微注射方法将质粒注射到胚胎原核中^[24],21 d 后,6 只 F0 代小鼠出生,鼠尾 DNA 经过 PCR 后琼脂糖凝胶电泳和测序分析,证明 3 只小鼠有 *Plcz1* 基因缺失,成功构建出 *Plcz1* 基因敲除小鼠模型。野生型或 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠分别与野生型雌性小鼠交配,结果表明 *Plcz1*^{-/-} 雄性小鼠可以繁育后代,但是与野生型雄性小鼠相比其产仔数量显著性下降,此结果与 Hachem 等^[12]的研究结果相符,为阐明 *Plcz1* 基因突变带来的生殖能力障碍提供理论依据。

目前,研究者越来越重视卵母细胞激活途径的选择与优化,在体外激活卵母细胞的过程中,研究

者往往通过选取不同的激活方式获得动物的胚胎,而卵母细胞的人工激活效率会直接影响胚胎的发育质量。受精时,PLC ζ 作为精子中一种重要的因子在激活卵母细胞第二次减数分裂过程中发挥重要作用。精卵融合后,PLC ζ 通过精子进入卵质,并催化 PIP₂ 水解生成 IP₃。IP₃ 触发的细胞内 Ca²⁺ 释放,产生特有的胞质 Ca²⁺ 振荡,导致卵子激活,从而启动胚胎发育过程。Nomikos 等^[25]证明在表达功能障碍的 PLC ζ 不能激活的卵母细胞中显微注射重组人 PLC ζ ,可以有效地挽救失败的激活,并正常发育至囊胚阶段。在人类生殖过程中,PLC ζ 蛋白缺陷的男性会不育^[26-27]。Hachem 等^[12]首次在哺乳动物上证明,在没有卵母细胞激活的情况下,自然交配和受精可以产生后代,与本文研究结果相符,相较于野生型雄鼠,*Plcz1*^{-/-} 雄鼠在受精率和繁殖率上均有显著性下降,是否存在别的途径激活小鼠体内的卵母细胞还有待商榷,需要对 *Plcz1* 基因敲除小鼠进行深入的机制研究。同时,Dai 等^[28]证明催化结构域变异的精子会受到损害,失去水解 PIP₂ 的功能,导致异常的 Ca²⁺ 振荡,不能激活卵母细胞使受精失败。Unnikrishnan 等^[29]表明 PLC ζ 在精子中的分布在不同物种中存在差异:在人类精子头部的顶体、赤道段和顶体后区域,以及尾部区域;在小鼠精子的顶体和顶体后区域。但是,PLC ζ 的不同结构区域调节 PLC ζ 定位的机制,以及对于精子获能的具体作用尚不清楚。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统构建的 *Plcz1* 基因敲除(*Plcz1*^{-/-})小鼠模型,为进一步揭示 *Plcz1* 基因缺失导致的生殖障碍发病机制提供理论依据,同时为治疗生育能力障碍等问题的研究提供了有效的动物模型。但是关于 PLC ζ 的确切作用机制及其在卵母细胞激活过程中的作用程度仍然存在许多问题,所以需要进一步探索。

参考文献:

- [1] Swann K, Saunders CM, Rogers NT, et al. PLC zeta (ζ): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals [J]. Semin Cell Dev Biol, 2006, 17(2): 264-273.
- [2] Kashir J, Nomikos M, Lai FA, et al. Sperm-induced Ca²⁺ release during egg activation in mammals [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(3): 1204-1211.
- [3] Nozawa K, Satouh Y, Fujimoto T, et al. Sperm-borne phospholipase C ζ -1 ensures monospermic fertilization in mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1315.
- [4] Saunders CM, Larman MG, Parrington J, et al. PLC ζ : a sperm-

- specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development [J]. *Development*, 2002, 129(15): 3533.
- [5] Saunders CM, Swann K, Lai FA. PLC ζ , a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization [J]. *Biochem Soc Symp*, 2007, 74: 23–36.
- [6] Nomikos M, Stamatidis P, Sanders JR, et al. Male infertility-linked point mutation reveals a vital binding role for the C2 domain of sperm PLC ζ [J]. *Biochem J*, 2017, 474(6): 1003–1016.
- [7] 纪丽轩, 高玉平. 精源性卵母细胞激活因子的相关机制研究进展 [J]. *中国男科学杂志*, 2021, 35(3): 82–87.
- [8] Nomikos M, Elgmami K, Theodoridou M, et al. Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 15): 2582–2590.
- [9] Ross PJ, Beyhan Z, Iager AE, et al. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using bovine and murine phospholipase C ζ [J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 16.
- [10] Coward K, Ponting CP, Chang HY, et al. Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species [J]. *Reproduction*, 2005, 130(2): 157–163.
- [11] Yoneda A, Kashima M, Yoshida S, et al. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C ζ [J]. *Reproduction*, 2006, 132(3): 393–401.
- [12] Hachem A, Godwin J, Ruas M, et al. PLCzeta is the physiological trigger of the Ca^{2+} oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence [J]. *Development*, 2017, 144(16): 2914–2924.
- [13] Ramadan WM, Kashir J, Jones C, et al. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology [J]. *Cell Commun Signal*, 2012, 10(1): 12.
- [14] Kashir J, Heindryckx B, Jones C, et al. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(6): 690–703.
- [15] Yeste M, Jones C, Amdani SN, et al. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22(1): 23–47.
- [16] Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C ζ (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility [J]. *Adv Biol Regul*, 2013, 53(3): 292–308.
- [17] 朱佩琪, 蒋伟东, 周诺. CRISPR/Cas9 基因编辑系统的发展及其在医学研究领域的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 116–123.
- [18] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281–2308.
- [19] 杨伟莉, 涂著池, 李晓江. CRISPR/Cas9 系统: 构建非人灵长类动物疾病模型的新技术 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(8): 70–74.
- [20] 董健健. 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 Wilson 病小鼠模型及其基因治疗研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- [21] Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, et al. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5400.
- [22] 梁龙, 杨华, 杨永林, 等. “Golden Gate” 克隆法构建靶向载体 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 111–116.
- [23] 朱浩然, 张鑫, 祁俊侠, 等. 利用双引导 RNA 的 CRISPR/Cas9 技术构建 Nudt3 基因敲除小鼠 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2021, 41(7): 949–955.
- [24] 张茹君, 夏海林, 朱赞, 等. 基于 CRISPR/Cas9 构建小鼠 UOX 基因敲除模型 [J]. *中外医疗*, 2020, 39(7): 32–35.
- [25] Nomikos M, Yu Y, Elgmami K, et al. Phospholipase C ζ rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(1): 76–85.
- [26] Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, et al. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca^{2+} release and are unable to initiate the first step of embryo development [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(11): 3671–3681.
- [27] Yuan P, Zheng L, Liang H, et al. Novel mutations in the PLCZ1 gene associated with human low or failed fertilization [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(10): e1470.
- [28] Dai J, Dai C, Guo J, et al. Novel homozygous variations in PLCZ1 lead to poor or failed fertilization characterized by abnormal localization patterns of PLC ζ in sperm [J]. *Clin Genet*, 2020, 97(2): 347–351.
- [29] Unnikrishnan V, Kastelic JP, Thundathil JC. Ouabain-induced activation of phospholipase C ζ and its contributions to bovine sperm capacitation [J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 385(3): 785–801.

[收稿日期] 2021-09-13

韩懿存,武颖烁,尚艺婉,等. 阳和汤治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 109-117.

Han YC, Wu YS, Shang YW, et al. Research progress of Yanghe decoction for the treatment of malignant tumors [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 109-117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.015

阳和汤治疗恶性肿瘤的研究进展

韩懿存¹, 武颖烁¹, 尚艺婉¹, 陈玉龙^{1,2*}

(1.河南中医药大学研究生院,郑州 450046;2.河南中医药大学中医药科学研究院 河南省中医方证信号传导重点实验室/河南省中医方证信号传导国际联合重点实验室,郑州 450046)

【摘要】 阳和汤出自清代《外科全生集》,功在温阳补血,散寒通滞。中医认为阳虚寒痰凝聚是恶性肿瘤发病的重要机制,阳和汤作为温阳散寒通滞的代表方之一,临床上治疗恶性肿瘤应用广泛,尤其在诸多“阳虚型”癌症患者中疗效显著,基于此,文章对2001~2021年CNKI、万方数据、维普、SinoMed中国生物医学文献系统、PubMed、Medline、Embase数据库以“阳和汤、温阳法、恶性肿瘤(癌症)、网络药理学”为主题进行检索,共检索文献225篇,整理、归纳相关文献94篇,主要从中医的理论渊源、临床观察、药理研究等方面对阳和汤的作用机制进行概述,同时结合网络药理学进一步探析其应用于恶性肿瘤的可行性,以期恶性肿瘤的临床治疗提供科学依据。

【关键词】 阳和汤;恶性肿瘤;寒痰凝聚;机制;网络药理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0109-09

Research progress of Yanghe decoction for the treatment of malignant tumors

HAN Yicun¹, WU Yingshuo¹, SHANG Yiwang¹, CHEN Yulong^{1,2*}

(1. Graduate School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan Key Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Henan International Joint Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Yanghe decoction is derived from the Qing Dynasty “Waike Quan sheng ji”, which has the effect of warming Yang and replenishing blood, dispersing cold and clearing stagnation. In accordance with traditional Chinese medicine, Yang deficiency and cold phlegm condensation are major mechanisms of malignant tumors. As a representative prescription of warming Yang and dispersing cold and stagnation, Yanghe decoction is widely used in the clinical treatment of malignant tumor, especially in Yang-deficient cancer patients. We analyzed CNKI, WanFang, VIP, SinoMed Chinese Biomedical Literature System, PubMed, Medline and Embase database from 2001 to 2021, found 225 articles with the topics of “Yanghe decoction, warming Yang method, malignant tumor (cancer), and network pharmacology”, and sorted out, and summarized 94 relevant articles. This review summarizes the mechanism of Yanghe decoction from the aspects of their theoretical origin, clinical observations, and pharmacological research to provide a scientific basis for the clinical treatment of malignant tumors.

【Keywords】 Yanghe decoction; malignant neoplasm; cold phlegm condensation; mechanism; network pharmacology

近年来,恶性肿瘤的发病率和死亡率逐渐攀升。国际癌症研究机构(international agency for

research on cancer, IARC)最新数据显示:2018年全球约有1810万的新发病例和960万的癌症死亡病

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81873285,82074313)。

【作者简介】 韩懿存(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治肿瘤。E-mail: hcc2492@163.com

【通信作者】 陈玉龙(1972—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治肿瘤。E-mail: cyl72621@163.com

例^[1],其中中国的癌症死亡病例占全球的 1/3,已成为最主要的死亡原因之一^[2]。中医认为,恶性肿瘤为消耗性疾病,极易损耗人体阳气,癌症患者多以阳虚为主,故“温阳通滞”为治疗恶性肿瘤的基本法则^[3-4]。中医经典方剂阳和汤由熟地、鹿角胶、肉桂、姜炭、白芥子、麻黄、甘草 7 味药组成,具有宣化寒凝、温阳通滞的功效,在临床上辅助治疗恶性肿瘤效果显著,且近几年关于其抗肿瘤的药理学研究尤为详尽^[5-6]。本文将从中医理论渊源、临床观察、基础研究等方面对阳和汤的机制进行概述,同时结合网络药理学相关研究进一步探析其治疗恶性肿瘤的机制,以期恶性肿瘤的治疗提供科学依据。

1 中医“温阳通滞”思维治疗恶性肿瘤的理论渊源和现代认识

肿瘤发病是一个慢性的病理过程,属中医“积病、癥瘕”等范畴。《黄帝内经·百病始生篇》对肿瘤的形成、病理等方面的论述颇为详尽:“积之始生,得寒乃生,厥乃成积也…温气不行,凝血蕴裹而不散,津液涩渗,著而不去,而积皆成矣。”可见,寒邪作为“积聚”形成的主要病因^[7],自古籍便有所考究。中医认为,寒为阴邪,其性凝滞收引,而人身气血“喜温而恶寒,寒则泣不能留”,一旦寒邪侵犯,易使气血津液凝结、经脉阻滞。若机体阳气充盛,则“温则消而去之”,不至使寒凝积聚;若人体阳气受损,则无法发挥其温煦推动的作用,痰凝、湿浊、瘀血等阴邪便壅结于脏腑,相互搏结,日久积渐而成肿瘤。现代研究证实,在相对寒冷的环境下机体的代谢增高,这种高代谢方式易增加肿瘤的发生并使其死亡率更高^[8]。Weinberg^[9]指出,低温条件会加速癌细胞的增殖,促使肿瘤的发生发展;且小鼠处于温度过低的环境中可抑制自身的内源性免疫反应,进而增加肿瘤治疗的抵抗性^[10]。

可见寒邪致癌不无道理,而以“温阳”之法温化寒痰、通络散结可达到治疗肿瘤的目的。因而此法在临床治疗恶性肿瘤的过程中被历代医家所推崇^[11-12],老中医李可也明确提出治疗肿瘤“保得一分元阳,便有一线生机,元阳强一分,瘤即消一分”的见解^[13]。随着对恶性肿瘤认识的深入,众多学者发现采用手术切除、放化疗等“攻邪”的手段治疗肿瘤,易使本已阳气偏衰的癌症患者病情加重,进一步助长肿瘤滋生,从而陷入恶性循环。肿瘤热疗(hyperthermia)作为一种新的治疗手段,可通过增加肿瘤的血流量来增强肿瘤对放射疗法或化学疗法

的反应^[14];实验表明,温度适度增高可通过调节机体的免疫反应等方式起到抗肿瘤作用,如增加肿瘤血管灌注、淋巴细胞运输、炎性细胞因子表达、肿瘤代谢^[15-16]以及加强肿瘤细胞的黏附能力抑制其上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进程^[17]等,这与中医“温阳通滞”的思想不谋而合,也为中医“温阳以通滞,扶阳以制阴”之法治疗恶性肿瘤,提供了可靠的研究支撑。

2 阳和汤的临床观察

临床实践证明,对于晚期癌症患者给予“祛除外邪”、“祛瘀化痰”、“益气养阴”等治疗方法往往难以取得满意疗效,但采用辛温助阳药后症状反而明显缓解,揭示其本质仍属阳虚。故临床上准确辨证、加减得当地运用阳和汤中药汤剂治疗恶性肿瘤效果显著,现将其作用概括如下:

2.1 延缓肿瘤进展,改善临床症状

研究发现,蒋世卿认为恶性肿瘤为阴邪凝聚体内日久所致,其性属阴,当扶阳以制阴,治疗上善以温阳法为基本治疗原则,重用阳和汤,同时结合临床证候辨证加减治疗骨肉瘤及原发性恶性骨肿瘤疗效显著^[18-19]。陈丽等^[20]运用阳和汤加减治疗食管癌术后、非霍奇金淋巴瘤化疗后阳虚寒凝患者,可显著延缓病情的进展。此外,以阳和汤为基础联合中医特色疗法督灸或相关化疗方案可明显改善癌症病人的主要临床症状,如发热^[21]、呕吐、食欲不振^[22]、术后疼痛^[23]、癌因性疲乏(cancer-related fatigue, CRF)^[24]等,提高患者的生活质量^[25]。可见阳和汤在整个抗癌过程中发挥着调整机体状态,延缓病情进展的重要作用。

2.2 提高患者免疫功能

黄芊等^[26]观察阳和汤对乳腺癌化疗患者免疫功能的影响,运用多柔比星、环磷酰胺、多西他赛(AC-T)方案联合阳和汤进行 4 个周期的治疗,治疗组 CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁴⁺/CD⁸⁺、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)水平明显高于对照组,证实阳和汤联合化疗可明显改善乳腺癌化疗患者的免疫功能。田同等^[27]研究了阳和汤对免疫微环境的相关因子表达的影响,发现其可调控缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、白介素 10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋

化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 和骨髓来源抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)、调节性 T 细胞 (regulatory cells, Tregs) 等免疫抑制细胞的水平,并通过提高干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的水平,有效逆转肿瘤相关炎症微环境的免疫抑制状态。黄芊等^[25]和田同德等^[28]也证实阳和汤可提高晚期癌症患者体内 NK 细胞、B 淋巴细胞的表达,不仅进一步验证了阳和汤干预肿瘤炎症微环境的确切疗效,同时也证实其可通过改善肿瘤相关炎症状态,重塑肿瘤免疫微环境,对中医药在肿瘤的临床免疫治疗方面具有重要意义。

2.3 抑制肿瘤远处转移

恶性肿瘤的远处转移是长期以来面临的治疗难题,中医药在预防以及治疗肿瘤转移方面有一定优势^[29]。临床观察发现,对于乳腺癌骨转移患者,运用阳和汤联合唑来膦酸可使病灶保持稳定,具有改善骨性疼痛及活动能力等临床疗效,是中西医结合提高乳腺癌骨转移疗效行之有效的方法之一^[30-32];李阳等^[33]深入探讨其抑制骨转移的机制,提示阳和汤可通过降低趋化因子 CXCL12/趋化因子受体 CXCR4 及下游血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达,提高磷酸盐类药物抗骨转移的临床疗效,无疑为阳和汤治疗肿瘤的远处转移提供了可靠依据,可见,基于药理学之上的相关系统研究是阐明中药作用机制的关键。

2.4 与放化疗结合增效减毒

田同德等^[27]对 120 名阳虚型胃癌患者观察阳和汤对化疗的增效作用,结果证实阳和汤显著促进肿瘤细胞凋亡的作用可能是重要机制。程培育等^[34]将阳和汤联合化疗治疗晚期三阴性乳腺癌患者,二者联合能明显缓解患者的消化道不良反应,且对肿瘤标志物 CEA、CA153 有一定的抑制作用。此外阳和汤联合 R-CHOP 方案 (利妥昔单抗 R-环磷酰胺 C、多柔比星 H、长春新碱 O、泼尼松龙 P) 治疗 CD20 阳性的弥漫大 B 细胞淋巴瘤寒痰凝滞证患者^[35]、联合 GP 方案 (吉西他滨+顺铂) 治疗脾肾阳虚型中晚期非小细胞肺癌患者^[36-37]、联合钙镁合剂防治奥沙利铂所致神经毒性^[38]、联合阿片类药物缓解晚期骨转移患者的癌性痛及便秘^[39]等均具有显著的疗效,可减少化疗及阿片类药物的使用量和毒性,安全性可靠,为中西医结合治疗恶性肿瘤提供了可靠的临床依据。

3 阳和汤的基础研究

近年来,阳和汤在临床上的疗效使众多学者对其药理学机制进行了探索,对阳和汤的作用机制研究不断深入,同时结合网络药理学手段明确其起作用的主要成分和作用靶点,以探讨阳和汤干预恶性肿瘤的作用机制。

3.1 网络药理学研究

网络药理学的发展为中医药治疗疾病提供了新的思路和较为严谨的数据支撑,其在揭示中医药的有效成分、明确发挥实际作用的小分子等方面发挥着重要的作用,以直观的方式展示了中药靶点的整体网络。据 Zeng 等^[6]报道,阳和汤治疗 HER2 阳性乳腺癌,麻黄和熟地涉及基因占多数,可能是发挥作用的主要中药。全方含有 383 种有效成分,其中儿茶素、 β -谷甾醇、菜油甾醇、香叶木素、草质素、槲皮素、木犀草素、山奈酚、柚皮素、柳穿鱼黄素、肉桂酸、甘草查尔酮 A、异甘草素、香橙烯、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、鱗叶甘草素 A、1-甲氧基菜豆素、豆甾醇等在治疗乳腺癌中发挥着重要的作用,是治疗 HER2 阳性乳腺癌的主要中药。组方对 HER2 阳性乳腺癌具有显著影响的信号通路有 11 条:癌症、RAS、PI3K-AKT、MAPK、FOXO、P53、mTOR、Toll 样受体、VEGF、雌性激素以及酪氨酸激酶受体。众所周知,EGFR、FOXO 通路和细胞周期和代谢密切相关^[40-41],PI3K-AKT 信号通路参与耐药^[42],HIF-1 促进了肿瘤的免疫逃逸^[43],VEGF、MAPK 参与癌症的转移^[44],而阳和汤组方均与上述通路有密切的关系,且基于网络药理学预测的靶点及通路已有现代药理学的相关研究进行证实:麻黄与甘草当中的有效成分木犀草素可通过介导 PI3K/AKT、MAPK/细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2) 抑制人乳腺癌细胞的 EGFR 信号通路^[45],能通过信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription3, STAT3) 途径显著缩小裸鼠 MDA-MB-231 移植瘤的大小和减轻肿瘤重量^[46];异甘草素可通过下调花生四烯酸代谢网络使 PI3K/AKT 通路失活,从而抑制乳腺癌细胞的生长和诱导凋亡^[47];槲皮素不仅可以调节 AKT/AMPK/mTOR 信号通路,还可抑制肿瘤新生血管形成,降低 VEGFR-2 的表达^[48];肉桂当中的有效成分香橙烯可抑制肿瘤细胞增殖,并通过线粒体途径诱导细胞内活性氧 (reactive oxygen

species, ROS) 的积累引起细胞凋亡^[49]; 熟地当中的有效成分 β -谷甾醇可通过 p53/NF- κ B/乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP) 信号通路逆转多药耐药^[50]; 可见阳和汤方中单药均具有抗肿瘤的作用, 全方合用可从多种途径治疗恶性肿瘤。

3.2 作用机制研究

3.2.1 抑制癌细胞增殖, 阻滞细胞周期, 促进肿瘤细胞凋亡

众多研究证实, 阳和汤含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7、4T1、SK-BR-3 细胞、胃癌 MGC-803 细胞均有抑制作用, 并能影响细胞周期分布、诱导肿瘤细胞凋亡, 体内相关实验也有明显的抑瘤效应^[51]。李康乐等^[52]以早期生长反应因子 1 (early growth response 1, Egr1)/细胞周期蛋白依赖性抑制因子 (p21) 信号通路为基础, 探讨阳和汤对肿瘤细胞凋亡的影响, 并指出阳和汤可以显著抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖, 使其在 G2/M 期阻滞, 并诱导凋亡, 作用机制可能是通过激活 Egr1/p21 信号通路发挥抗癌作用; 阳和汤能降低 Bcl-2/Bax 比值、降低 AKT、mTOR 磷酸化率, 抑制 AKT、mTOR 的活化, 从而抑制 AKT/mTOR 信号通路诱导凋亡^[53]; 彭湃^[54]阐述了阳和汤抑制乳腺癌增殖的另一机制: 降低癌基因 *EZH2* 与核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 的表达, 抑制二者在细胞核内结合, 从而减少下游相关因子的分泌, 影响乳腺癌的增殖。

阳和汤抑制肿瘤增殖的作用机制众多: 抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白的磷酸化水平^[55-56]、抑制有丝分裂原激活蛋白激酶 (p38)/STAT3 信号通路促进癌细胞凋亡^[57]、负调控 JAK/STAT3 通路等^[58], 但更详尽的机制有待补充。

3.2.2 调控肿瘤微环境

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 具有“缺氧^[59]、慢性炎症^[60]、免疫抑制^[61]”3 大特征, TME 与肿瘤的发生发展、远处转移及免疫逃逸有密切的关系^[62]。研究表明, 缺氧状态会激活 HIF 及其下游 VEGF 信号通路, 加速癌细胞生长。阳和汤可显著降低 HIF-1 α 的 mRNA 及蛋白表达^[63], 且能抑制乳腺癌细胞的跨内皮能力和血管生成能力, 降低 VEGF C 的表达, 减少新生血管形成^[64]。刘晓菲等^[65]阐明其抗肿瘤的机制可能与有效抑制 PI3K/AKT 调控通路活化有关。阳和汤能调节多种炎性相关因子的分泌和表达, 如 IL-2/4/6/8/10、TNF- α /

β 、IFN- γ 、环氧化酶 2 (COX-2) 等^[66-71], 有效抑制肿瘤细胞的生长, 多个研究证实此种抗炎作用主要是通过降低 NF- κ B 的表达^[54,70,72]、负性调节 JAK/STAT3 通路实现的^[58]。骨髓来源的抑制性细胞 MDSCs 负向调控机体的免疫应答, 可通过沉默免疫反应促进肿瘤进展和免疫逃逸, 阳和汤可以逆转此种免疫抑制, 增强抗肿瘤免疫反应。Mao 等^[58]证实阳和汤可显著降低肿瘤微环境当中的 MDSCs、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、IL-6、TGF- β 的表达, 同时通过增加 NKT、CD⁴⁺T 细胞、IFN- γ 激活信号传导与转录激活因子 1 (STAT1) 的表达, 逆转免疫抑制; 袁文佳^[73]发现其能提高荷 S180 肉瘤小鼠的脾指数与胸腺指数, 降低肿瘤对小鼠免疫器官的损害, 增强小鼠的免疫功能。

3.2.3 抑制癌细胞侵袭, 干预肺、骨转移

肿瘤成纤维细胞 (CAFs) 是恶性肿瘤转移的重要组成部分, 可直接诱导 EMT, 使肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力, 杨亦奇^[74]和郑川^[75]证实, 阳和汤可通过降低裸鼠肺组织中 TGF- β 1 mRNA 及 CAFs 的表达, 调节间充质蛋白如波形蛋白 (Vimentin)、N-钙粘蛋白 (N-cadherin)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 进而抑制 EMT 过程, 阻止乳腺癌肺转移。此外, 胰岛素样生长因子 (insulin like growth factor II, IGF-II)、L-选择素 (L-Selectin) 与乳腺癌细胞的侵袭转移密不可分, 肖玉洁等^[63]发现阳和汤能通过调节 HIF-1 α /IGF-II 信号通路及 L-Selectin 的表达抑制乳腺癌细胞的增殖转移; 窦建卫等^[76]和张欣萌^[77]阐述了阳和汤抑制乳腺癌 EMT 的另一重要机制, 即下调 EMT 过程所必需的 NF- κ B 的蛋白表达。Liu 等^[78]则认为抑制肿瘤血管形成同样是阻止肿瘤细胞侵袭的重要手段, 并证明阳和汤可通过调节 pAKT 信号显著抑制肿瘤血管生成, 从而降低肿瘤细胞的侵袭性。

癌症的进一步扩散面临着骨转移的风险, 在此过程中, 骨保护素 (Osteoprotegerin, OPG) 的表达量降低, 甲状旁腺激素相关蛋白 (parathyroid hormone related protein, PTHrP) 和 RANK-配体 (RANKL) 的表达量增加, 进一步加剧骨转移的进展^[79], 对上述因子进行调节就能够在一定程度上抑制骨转移^[80]。田莎等^[81]和冯磊等^[82]先后探讨了阳和汤对裸鼠移植性人乳腺癌骨转移模型的作用及其相关调节因子的影响; 阳和汤对骨转移相关调节因子具有调控作用, 可促进 OPG, 抑制 PTHrP、RANKL 的表达, 从

表 1 阳和汤治疗恶性肿瘤的作用机制
Table 1 Mechanism of Yanghe decoction in the treatment of malignant tumors

作用机制 Mechanism of action	癌种 Cancer types	涉及信号通路及信号因子 Signal pathways and factors	参考文献 Reference
抑制癌细胞增殖, 阻滞细胞周期, 促进肿瘤细胞凋亡 Proliferation inhibition, cell cycle arrest and induce cell apoptosis	乳腺癌 Breast cancer	早期生长反应因子 1/细胞周期蛋白依赖性抑制因子(Egr1/p21) (↑) Early growth response factor-1/cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Egr1/p21) (↑)	[52]
	乳腺癌 Breast cancer	EZH2/NF-κB (↓)	[54]
	乳腺癌 Breast cancer	PI3K/AKT/mTOR (↓)	[53,55]
	乳腺癌 Breast cancer	p38/STAT3 (↓)	[57]
改善肿瘤缺氧、炎症反应、免疫抑制的微环境 Ameliorate the tumor microenvironment of hypoxia, inflammatory response and immunosuppression	乳腺癌、肺癌、胃癌、肝癌 Breast cancer, lung cancer, gastric cancer, liver cancer	炎性因子 IL-4/6/8、TNF-α、COX-2、iNOS (↓) Anti-inflammatory factors IL-4/6/8, TNF-α, COX-2, iNOS (↓)	[66-70]
	乳腺癌 Breast cancer	单核/巨噬细胞近分泌通路 (↓) Monocytes/macrophages autocrine pathway (↓)	[89]
	乳腺癌 Breast cancer	IFN-γ/STAT1 (↑)	[58]
	乳腺癌 Breast cancer	JAK/STAT3 (↓)	[58]
	乳腺癌 Breast cancer	PHD2(↑)/TGF-β/CAF(↓)	[75]
	肺癌 Lung cancer	调节 Th1(↑)/Th2(↓) 比例 Regulate the Th1(↑)/Th2(↓) balance	[71]
	乳腺癌 Breast cancer	HIF-1α (↓)	[27]
	乳腺癌 Breast cancer	MAPK/ERK1/2 (↓)	[45]
	肉瘤 Sarcoma	VEGF, HIF-1α(↓)	[73]
	乳腺癌 Breast cancer	基质金属蛋白酶 9(MMP-9) (↓) Matrix metalloproteinase-9(MMP-9) (↓)	[66]
抑制癌细胞的浸润与转移 Inhibit the invasion and metastasis of cancer cells	乳腺癌 Breast cancer	RANK/RANKL(↓)/OPG(↑)	[67]
	乳腺癌 Breast cancer	Smad3/NF-κB (↓)	[76]
	乳腺癌 Breast cancer	c-Met/NF-κB/CXCL1 (↓)	[77]
	乳腺癌 Breast cancer	Fas(↑)/FasL(↓)	[83]
预防癌前病变 Prevent premalignant lesions	乳腺癌 Breast cancer	FGF-2、Flk-1 (↓)	[84]
	乳腺癌 Breast cancer	Ki67、p53、细胞色素 C (↓) Ki67, p53, cytochrome C (↓)	[85-88]
诱导肿瘤细胞分化 Induce cancer cells differentiation	白血病 Leukemia	机制不明 Unknown mechanism	[94]
逆转肿瘤细胞耐药 Reverse the drug resistance	乳腺癌 Breast cancer	ER/PI3K/AKT/mTOR (↓)	[92]

注: ↓: 阳和汤抑制该信号通路; ↑: 阳和汤激活该信号通路。

Note. ↓, It indicates that Yanghe decoction negatively regulates this signaling pathway. ↑, It indicates that Yanghe decoction promotes this signaling pathway.

而抑制乳腺癌骨转移,可见阳和汤可通过靶向 RANKL 起到治疗或预防骨转移的作用。

3.2.4 预防癌前病变

及早发现并治疗癌前病变是降低癌症死亡风险的重要举措,中医药在此方面具有独特的优势。李静蔚等^[83]指出阳和汤相关加减方能通过激活死亡受体 Fas/FasL 和半胱氨酸蛋白酶(caspase3/8)级联反应抑制细胞增殖及诱导凋亡,阻断乳腺癌癌变的进展。王云龙等^[84]从抑制肿瘤血管生成的角度阐明了阳和汤预防癌前病变的机制,下调血管内皮生长因子 VEGF 受体(Flk-1)及碱性成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor2, FGF-2)的表达,对血管内皮细胞的生存和增殖造成障碍,抑制新生血管的形成,从而逆转乳腺癌癌前病变的发生;激活细胞色素 C^[85]、降低 Ki67^[86-87]、突变型 P53 的表达^[88]、改善细胞超微结构也是其干预癌前病变的重要机制。由此可见,阳和汤抑制恶性肿瘤癌前病变主要是通过加速癌细胞的凋亡及阻断相关通路实现的。

3.2.5 其它

近期,有研究证实阳和汤不仅对异常增殖的肿瘤细胞起作用,且对乳腺癌干细胞 HMLER90hi 同样具有抑制作用,机制可能与抑制单核巨噬细胞近分泌通路分泌的细胞因子有关^[89],如簇分化抗原 90(CD90)^[90]。肿瘤耐药是导致治疗失败的主要原因,中西医结合治疗是克服耐药的关键策略之一,阳和汤可逆转阿霉素^[91]、他莫昔芬^[92]耐药,并能增强曲妥珠单抗的疗效^[65,93]等,可能与干预 ER/PI3K/AKT/mTOR 通路有关。有报道表明阳和汤对白血病 HL-60、K562 细胞有诱导分化的作用,使肿瘤细胞发育为成熟细胞而丧失恶性^[94],是中医“扶正”疗法的实验基础,为阳和汤治疗恶性肿瘤提供了诸多实验依据和科学参考。

4 总结和讨论

综上所述,众多临床观察及基础研究证实,阳和汤具有抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制血管生成、调节免疫功能、诱导肿瘤细胞分化以及预防癌前病变等多种抗肿瘤作用,网络药理学研究进一步揭示阳和汤组方涉及 TNF、MAPK、NF- κ B、JAK-STAT、铂类耐药、细胞凋亡等多个癌症相关通路(归纳总结见表 1)。尽管目前存在的数据库尚不完善,某些中药当中的活性成分也未完全阐明,

但仍为中医药治疗恶性肿瘤提供了众多分子层面的证据。大多数研究已验证阳和汤可通过 MAPK、NF- κ B、JAK-STAT 等诸多信号通路发挥抗癌作用,但多集中在乳腺癌方向的探索,作用于其它癌种的有效性仍欠缺充分的证据,且对药理学机制的研究尚待进一步挖掘补充。阳和汤作为多途径、多成分、多靶点的中药方剂对恶性肿瘤复杂的疾病优势明显,可不只局限于对乳腺癌的治疗,因此完善基础研究、进行基于药理学之上的相关系统研究是阐明中药作用机制的关键;其次,目前针对恶性肿瘤,尽管靶向治疗与免疫治疗近几年进展迅速,但耐药和副反应已然成为提高疗效的主要障碍,阳和汤在克服耐药与减轻不良反应方面优势显著,其逆转耐药的应用前景不容忽视,需要大规模的展开临床观察验证其效果;其三,大多数恶性肿瘤被发现往往处于晚期,治疗困难,因此癌前病变期是扼杀肿瘤发病的关键节点,及早发现并治疗癌前病变可有效减低癌症的死亡率,诸多阳和汤治疗癌前病变的研究已初步阐述其机制,但更令人信服的证据仍待进一步发掘,阳和汤应用于预防癌前病变的价值值得深入探索。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 22.
- [3] 许博文, 李杰, 曹璐畅, 等. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨扶阳消阴法在肿瘤临证中的应用 [J]. 中医杂志, 2020, 61(9): 772-775, 780.
- [4] 王红玲, 康斐, 黄兴. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨温阳法在恶性肿瘤中的应用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(7): 999-1002.
- [5] 张洋, 刘晓菲, 王楠, 等. 基于网络药理学的阳和化岩汤治疗乳腺癌作用机制探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(10): 2135-2138, 2239.
- [6] Zeng L, Yang K. Exploring the pharmacological mechanism of Yanghe decoction on HER2-positive breast cancer by a network pharmacology approach [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 199: 68-85.
- [7] 郑佐桓. 《黄帝内经》积聚类疾病研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.
- [8] Sharma A, Verma HK, Joshi S, et al. A link between cold environment and cancer [J]. Tumour Biol, 2015, 36(8): 5953

- 5964.
- [9] Weinberg RA. The biology of cancer [M]. New York: Garland Science; 2010.
 - [10] Hylander BL, Repasky EA. Thermoneutrality, mice, and cancer: a heated opinion [J]. Trends Cancer, 2016, 2(4): 166-175.
 - [11] 陶颖莉, 王璐萍, 郭洁涛, 等. 祝味菊理法方药中的重阳思想探析 [J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(3): 159.
 - [12] 李福威. 祝味菊对《伤寒论》学术思想的继承与发展 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
 - [13] 孙其新. 李可攻癌 2 号方补遗——李可学术思想探讨之二十五 [J]. 中医药通报, 2013, 12(1): 23-27.
 - [14] Lee SY, Kim JH, Han YH, et al. The effect of modulated electro-hyperthermia on temperature and blood flow in human cervical carcinoma [J]. Int J Hyperthermia, 2018, 34(7): 953-960.
 - [15] Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW. Temperature matters and why it should matter to tumor immunologists [J]. Cancer Immunol Res, 2013, 1(4): 210-216.
 - [16] Appenheimer MM, Evans SS. Temperature and adaptive immunity [J]. Handb Clin Neurol, 2018, 156: 397-415.
 - [17] 张其刚, 刘宏旭. 钙离子及温度对 K-ras 基因转染的鼠肺恶性转化细胞粘附能力的影响 [J]. 中华外科杂志, 2001, 39(9): 58-60.
 - [18] 徐鑫, 王赛, 张孟哲, 等. 蒋士卿教授重用阳和汤治疗软组织肉瘤经验 [J]. 中医学报, 2016, 31(3): 319-321.
 - [19] 徐鑫, 张孟哲, 杜如辛, 等. 蒋士卿教授运用阳和汤加蜈蚣治疗原发性恶性骨肿瘤经验 [J]. 中医学报, 2017, 32(2): 174-177.
 - [20] 陈丽, 郑玉玲. 郑玉玲教授温阳法治疗恶性肿瘤经验 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2019, 1(3): 69-72.
 - [21] 彭仁通. 温阳法联合 TP 方案治疗晚期非小细胞肺癌临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(2): 175-178.
 - [22] 邵轶群, 杨明, 贾默然, 等. 阳和汤对晚期前列腺癌患者疼痛及生活质量的改善作用 [J]. 陕西中医, 2016, 37(3): 319-321.
 - [23] 林涛. 阳和汤加减治疗老年肺癌术后疼痛 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 314-316.
 - [24] 高雪云, 杨亚琴. 杨亚琴运用升提阳和汤联合督灸治疗癌因性疲乏经验介绍 [J]. 中国民间疗法, 2019, 27(17): 11-12.
 - [25] 黄芊, 杨小娟, 叶凯, 等. 阳和汤对三阴性乳腺癌化疗患者生活质量的影响 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(15): 80-81.
 - [26] 黄芊, 杨小娟, 叶凯, 等. 阳和汤对乳腺癌化疗患者免疫功能指标水平的影响 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(6): 88-90.
 - [27] 田同德, 杨峰, 岳立云, 等. 阳和汤对晚期胃癌阳虚证患者的化疗增效及其对肿瘤炎症因子、Treg、MDSCs 水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 160-164.
 - [28] 田同德, 岳立云, 田同良, 等. 肿瘤炎症微环境与免疫的关系及中医药干预策略 [J]. 中医杂志, 2017, 58(3): 209-213.
 - [29] 王萍, 杨海燕. 中医药调控恶性肿瘤转移微环境的研究进展 [J]. 江西中医药, 2020, 51(10): 69-73.
 - [30] 孟祥悦. 加味阳和汤治疗乳腺癌骨转移的临床疗效 [J]. 中外医疗, 2017, 36(26): 159-161.
 - [31] 张理卓. 加味阳和汤治疗乳腺癌骨转移的临床疗效 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(27): 158-159.
 - [32] 李阳, 黄立中, 龚辉, 等. 加味阳和汤治疗乳腺癌骨转移的临床观察 [J]. 中南药学, 2015, 13(10): 1105-1108.
 - [33] 李阳, 黄立中. 阳和汤对肾阳虚乳腺癌骨转移患者 CXCL12/CXCR4 及其下游血管内皮生长因子的影响 [J]. 肿瘤药学, 2020, 10(1): 73-76.
 - [34] 程培育, 王皓, 韩冬, 等. 温阳化痰法联合化疗治疗晚期三阴性乳腺癌临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3128-3131.
 - [35] 卢霞. 阳和汤加味联合 R-CHOP 治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤临床观察 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
 - [36] 何兰, 王橙思. 阳和汤联合化疗治疗脾肾阳虚型中晚期非小细胞肺癌的价值分析 [J]. 医药前沿, 2020, 10(6): 221.
 - [37] 卢亚品. 阳和汤联合化疗治疗脾肾阳虚型中晚期非小细胞肺癌患者的临床研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2018.
 - [38] 彭仁通. 当归四逆汤合阳和汤防治奥沙利铂所致神经毒性疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2015, 7(12): 88-90.
 - [39] 张云芳, 张明, 符英金. 阳和汤加减联合西医止痛药治疗骨转移癌疼痛的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(3): 410-414.
 - [40] Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation [J]. Anticancer Res, 2002, 22(1a): 1-11.
 - [41] Kloet DE, Polderman PE, Eijkelenboom A, et al. FOXO target gene CTDSP2 regulates cell cycle progression through Ras and p21(Cip1/Waf1) [J]. Biochem J, 2015, 469(2): 289-298.
 - [42] He K, Xu T, Xu Y, et al. Cancer cells acquire a drug resistant, highly tumorigenic, cancer stem-like phenotype through modulation of the PI3K/Akt/ β -catenin/CBP pathway [J]. Int J Cancer, 2014, 134(1): 43-54.
 - [43] You L, Wu W, Wang X, et al. The role of hypoxia-inducible factor 1 in tumor immune evasion [J]. Med Res Rev, 2021, 41(3): 1622-1643.
 - [44] del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis [J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 79-84.
 - [45] 隋佳琪, 谢鲲鹏, 谢明杰. 木犀草素对表皮生长因子诱导的人乳腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制 [J]. 生理学报, 2016, 68(1): 27-34.
 - [46] Yang MY, Wang CJ, Chen NF, et al. Luteolin enhances paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells by blocking STAT3 [J]. Chem Biol Interact, 2014, 213: 60-68.
 - [47] Li Y, Zhao H, Wang Y, et al. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272(1): 37

- 48.
- [48] Rivera A, Castillo-Pichardo L, Gerena Y, et al. Anti-breast cancer potential of Quercetin via the Akt/AMPK/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157251.
- [49] Pavithra PS, Mehta A, Verma RS. Aromadendrene oxide 2, induces apoptosis in skin epidermoid cancer cells through ROS mediated mitochondrial pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 197: 19-29.
- [50] Wang Z, Zhan Y, Xu J, et al. β -Sitosterol reverses multidrug resistance via BCRP suppression by inhibiting the p53-MDM2 interaction in colorectal cancer [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(12): 3850-3858.
- [51] 高永翔, 沈欣, 宗桂珍, 等. 阳和汤对裸鼠人癌移植瘤的抗肿瘤作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(7): 57-59.
- [52] 李康乐, 杨小倩, 张愉, 等. 阳和汤对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡 Egr1/p21 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(8): 62-67.
- [53] 黄芊, 张扶莉, 李雪莲, 等. 阳和汤对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡及其 Akt/mTOR 信号通路的影响 [J]. *陕西中医*, 2018, 39(11): 1497-1500.
- [54] 彭湃. 基于 EZH2/NF- κ B 信号通路探讨阳和汤对人三阴性乳腺癌细胞增殖的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [55] 赵天一. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨阳和汤含药血清对人乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2017.
- [56] 孙雪, 徐茜茜, 王星宇, 等. 阳和化岩汤对 mTOR 低表达型乳腺癌内分泌耐药细胞 ER-PI3K/Akt/mTOR 通路的作用机制 [J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(14): 1068-1073, 1082.
- [57] 杨硕, 李康乐, 朱中博, 等. 阳和汤含药血清通过 p38/STAT3 信号通路对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5): 6-10.
- [58] Mao D, Feng L, Gong H. The antitumor and immunomodulatory effect of Yanghe decoction in breast cancer is related to the modulation of the JAK/STAT signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 8460526.
- [59] Patel A, Sant S. Hypoxic tumor microenvironment: opportunities to develop targeted therapies [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 803-812.
- [60] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.
- [61] Yang L, Li A, Lei Q, et al. Tumor-intrinsic signaling pathways: key roles in the regulation of the immunosuppressive tumor microenvironment [J]. *Haematologica*, 2019, 12(1): 125.
- [62] Finger EC, Giaccia AJ. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(2): 285-293.
- [63] 肖玉洁, 王婷, 陈州华, 等. 阳和汤含药血清对缺氧乳腺癌干细胞 MDA-MB-231 增殖的抑制作用及其机制 [J]. *中南药学*, 2019, 17(8): 1219-1223.
- [64] 刘晓菲, 李静蔚, 李湘奇, 等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型肿瘤血管生成的影响及机制研究 [J]. *中药材*, 2018, 41(6): 1467-1470.
- [65] 刘晓菲, 李静蔚, 孙庆颖, 等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型微淋巴管生成及 PI3K/Akt 交互调控通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(1): 51-56.
- [66] 窦建卫, 黄芊, 赵天一, 等. 阳和汤对三阴性乳腺癌裸鼠移植瘤生长及 IL-6、MMP-9 表达的影响 [J]. *中国现代医药杂志*, 2016, 18(12): 1-4.
- [67] 冯磊. 阳和汤对阳虚证乳腺癌的抑制作用及相关机制的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [68] 吴琳, 叶峥嵘. 阳和汤药组配伍对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的抑瘤效应及 IL-2、IL-4 的影响 [J]. *现代中医药*, 2019, 39(4): 125-129.
- [69] 王新新. 阳和汤干预肿瘤相关炎症因子的初步实验研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [70] 刘丽颖, 窦建卫, 李高彪, 等. 阳和汤含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞 iNOS、COX-2 及 NF- κ B 表达的影响 [J]. *国际中医中药杂志*, 2019, 41(2): 173-176.
- [71] 叶峥嵘, 吴琳. 阳和汤药组配伍对不同期 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的抑瘤效应及 Th1/Th2 漂移的影响 [J]. *江西中医药大学学报*, 2020, 32(5): 89-93.
- [72] 窦建卫, 黄芊, 赵天一, 等. 阳和汤对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 NF- κ B、IL-8 表达的影响 [J]. *四川中医*, 2017, 35(2): 44-47.
- [73] 袁文佳. 阳和汤对荷 S₁₈₀ 肉瘤小鼠抑瘤及抗血管生成作用机制研究 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2016.
- [74] 杨亦奇. 基于 CAF 诱导 EMT 探讨阳和汤干预乳腺癌肺转移研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [75] 郑川. 基于 PHD2/TGF- β /CAF 路径的阳和汤干预乳腺癌肺转移研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [76] 窦建卫, 朱中博, 李康乐, 等. 阳和汤含药血清对乳腺癌细胞 Smad3、NF- κ B 表达的影响 [J]. *国际中医中药杂志*, 2019, 41(10): 1087-1090.
- [77] 张欣萌. 基于 c-Met/NF- κ B/CXCL1 信号通路研究阳和汤抑制人乳腺癌细胞迁移与侵袭的机制 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.
- [78] Liu XF, Li JW, Chen HZ, et al. Yanghe huayan decoction inhibits the capability of trans-endothelium and angiogenesis of HER²⁺ breast cancer via pAkt signaling [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(2): BSR20181260.
- [79] Wu MY, Li CJ, Yiang GT, et al. Molecular regulation of bone metastasis pathogenesis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1423-1438.
- [80] Azim HA, Kamal NS, Azim HA Jr. Bone metastasis in breast cancer: the story of RANK-ligand [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2012, 24(3): 107-114.
- [81] 田莎, 王云丹, 黄立中, 等. 阳和汤对裸鼠移植性乳腺癌骨转移模型作用机制的探讨 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2012, 32(7): 27-30.
- [82] 冯磊, 毛丹, 陈州华, 等. 基于 RANK/RANKL/OPG 系统探讨阳和汤对阳虚证乳腺癌骨转移裸鼠模型的影响 [J]. 北京

- 中医药, 2017, 36(1): 27-32.
- [83] 李静蔚, 陈宏志, 陈翰翰, 等. 阳和化岩汤对大鼠乳腺癌的预防作用和 Fas/FasL 的影响 [A]. 2016 第十四次乳腺癌中医、中西医结合学术研讨会论文集 [C]; 2016.
- [84] 王云龙, 陈芬, 王芳. 阳和化岩汤干预乳腺癌前病变的效果及机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(3): 44-47, 260.
- [85] 史文娴, 刘晓菲, 李斐斐, 等. 阳和化岩汤对乳腺癌前病变细胞凋亡关键因子 Bcl-2、细胞色素 C 表达影响的机制研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 711-714, 719.
- [86] 李静蔚, 刘晓菲, 陈宏志, 等. 阳和化岩汤对大鼠乳腺癌前病变的抑制及 ki67 表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(8): 970-975.
- [87] 郑雪连. 阳和化岩汤干预乳腺癌前病变 Ki67, PI3K 的临床及实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.
- [88] 王晓娜, 刘晓菲, 孙颖, 等. 阳和化岩汤对乳腺癌前病变细胞 P53、Ki67 表达的影响研究 [J]. 中医药学报, 2020, 48(6): 9-13.
- [89] 叶凯, 何芬莉, 杨小娟, 等. 阳和汤含药血清对乳腺癌干细胞增殖的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(1): 49-52.
- [90] 沈伟, 李康乐, 尚荣国, 等. 阳和汤对乳腺癌干细胞 CD90、IL-8 mRNA 表达水平的影响 [J]. 四川中医, 2019, 37(3): 44-46.
- [91] 康红钰, 王雁梅, 杜钢军, 等. 阳和汤血清增强阿霉素对 MCF-7 肿瘤细胞抑制作用机制的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 196-199.
- [92] 徐茜茜, 王蕾, 刘志勇, 等. 阳和化岩汤通过 ER/PI3K/Akt/mTOR 通路逆转乳腺癌他莫昔芬耐药 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(7): 34-41.
- [93] 张洋, 刘晓菲, 王楠, 等. 阳和化岩汤联合曲妥珠对 HER-2 高表达型乳腺癌细胞 PTEN-PI3K/Akt 通路及 VEGFC 的影响研究 [J]. 江苏中医药, 2018, 50(6): 79-82.
- [94] 杜钢军, 林海红, 谢松强. 小鼠阳和汤血清对细胞的诱导分化作用 [J]. 中药材, 2008, 31(1): 82-85.

[收稿日期]2021-11-12

(上接第 100 页)

- [8] Flight W, Jones A. The diagnosis and management of respiratory viral infections in cystic fibrosis [J]. Expert Rev Respir Med, 2017, 11(3): 221-227.
- [9] Zhang Q, Ye H, Xiang F, et al. miR-18a-5p inhibits sub-pleural pulmonary fibrosis by targeting TGF- β receptor II [J]. Mol Ther, 2017, 25(3): 728-738.
- [10] 叶文静, 朱小春, 王晓冰, 等. 积雪草苷通过抑制炎症和纤维化减弱平阳霉素诱导的肺间充质纤维化 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(1): 29-37.
- [11] Cleveland ZI, Zhou YM, Akinyi TG, et al. Magnetic resonance imaging of disease progression and resolution in a transgenic mouse model of pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 312(4): L488-L499.
- [12] 郭迎科, 李瑞琴, 丁玉文. 肺纤维化发病机制的细胞因子研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(19): 69-72.
- [13] Ohbayashi M, Kubota S, Kawase A, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis [J]. J Toxicol Sci, 2014, 39(2): 319-330.
- [14] Ma SY, Park WS, Lee DS, et al. Fucoxanthin inhibits profibrotic protein expression *in vitro* and attenuates bleomycin induced lung fibrosis *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 811: 199-207.
- [15] Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The role of NADPH oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts [J]. Front Physiol, 2016, 7: 17.
- [16] Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways [J]. Hepatology, 2015, 61(3): 1066-1079.

[收稿日期]2021-08-23

余琳静,谢逸轩,刘茜茜,等. 基于中西医临床病症特点的慢性咽炎动物模型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 118-123.

She LJ, Xie YX, Liu QQ, et al. Analysis of chronic pharyngitis animal models by clinical symptoms in Chinese and Western medicine [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 118-123.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.016

基于中西医临床病症特点的慢性咽炎动物模型分析

余琳静,谢逸轩,刘茜茜,苗明三*,白明*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 慢性咽炎是一种临床常见的咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的弥漫性炎症,发病率逐年增高,病程逐渐加长,且慢性咽炎的治疗没有特效药,长此以往导致患者产生了精神压力。本研究基于慢性咽炎的中、西医临床病症特点,总结现有的慢性咽炎动物实验模型。本文对慢性咽炎病因病机、诊断标准与其动物实验模型的吻合度进行分析,并对现有的模型建立评价体系,分析不同动物模型的优缺点。尽可能完善现有的动物模型,为建立完善的动物模型提供思路,以期促进慢性咽炎的现代研究。

【关键词】 慢性咽炎;临床病症特点;诊断标准;模型分析

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0118-06

Analysis of chronic pharyngitis animal models by clinical symptoms in Chinese and Western medicine

SHE Linjing, XIE Yixuan, LIU Qianqian, MIAO Mingsan*, BAI Ming*

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Chronic pharyngitis is a clinically common diffuse inflammation of the pharyngeal mucosa, submucosa, and lymphatic tissues. The incidence of chronic pharyngitis is increasing yearly, the disease duration is increasing gradually, and there is no specific treatment for chronic pharyngitis. This study summarizes the existing animal models of chronic pharyngitis on the basis of the Chinese and Western clinical characteristics of chronic pharyngitis. Clinical diagnosis of chronic pharyngitis and the diagnostic criteria were analyzed in terms of their compatibility with animal models and an evaluation system was established for the existing models to analyze the advantages and disadvantages of various animal models. The existing animal models were improved to provide ideas for the establishment of ideal animal models to promote research of chronic pharyngitis.

【Keywords】 chronic pharyngitis; clinical symptoms; diagnostic criteria; model analysis

慢性咽炎为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的弥漫性炎症^[1]。临床常见异物感、发痒、灼热、干燥、微痛、干咳等症状^[2],为上呼吸道疾病的炎症。慢性咽炎发病率逐年增高,文献报道美国每年因咽炎问题门诊就诊人数达 11 万人,同样,我国慢性咽炎

的发病率极高,耳鼻喉科日常就诊患者中约 1/3 为咽炎患者^[3-6]。目前,药物应用于临床治疗慢性咽炎。西医治疗慢性咽炎的方法大多采用口服药,其中头孢、青霉素、罗红霉素、盐酸氨溴索等较为常用,也采用雾化吸入的治疗方法。中医治疗采用穴

【基金项目】 国家自然科学基金(80274038);河南省重大公益专项(201300310100);河南省科学技术厅科技攻关项目(212102310351);河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZYD02)。

【作者简介】 余琳静(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。E-mail: 827102880@qq.com

【通信作者】 苗明三(1965—),男,教授,研究方向:中药药理学。E-mail: miaomingsan@163.com

白明(1968—),女,教授,研究方向:中药药理学。E-mail: baiming666@126.com

* 共同通信作者

位贴敷、针灸、联合药物等多种辨证论治的方法,不良反应少,效果佳^[7-12]。由于慢性咽炎的病程较长,给患者的生活带来了许多不便,导致患者产生精神压力,故人们对于慢性咽炎的关注度越来越高。目前,治疗慢性咽炎没有特效药,多以抗炎药为主^[13-14],研究开发临床治疗慢性咽炎的药物和方法尤为重要,建立与临床患者症状高度相似的实验动物模型是慢性咽炎实验研究的基础与中心环节。现有的动物模型散在应用较多,缺少系统的归纳分析,更缺少对已有模型的评价。因此,文章以慢性咽炎的临床病症特点为诊断依据,对造模方法进行分析讨论,尽可能完善现有的动物模型,以期促进慢性咽炎的现代研究。

1 病因病机

1.1 西医病因及发病机制

西医认为慢性咽炎的病因主要分为 3 种:局部因素、化学物理刺激以及全身因素。局部因素分为急性咽炎反复发作或延误治疗转为慢性咽炎;患有各种鼻病,因鼻阻塞而长期张口呼吸及鼻腔分泌物下流,致长期刺激咽部,或慢性扁桃体炎,龋病等影响所致。物理化学刺激包括粉尘、颈部放疗、长期接触化学气体、烟酒过度等。全身因素包括各种慢性病,如贫血、便秘、下呼吸道慢性炎症,心血管疾病,新陈代谢障碍,肝及肾等疾病的继发。相关研究表明慢性咽炎的发病机制与胃食管反流性疾病、变态反应因素、细菌感染等有关^[15]。

1.2 中医病因病机

中医认为慢性咽炎属于“虚火喉痹”的范围^[16]。中医对慢性咽炎即喉痹的认识较久。喉痹一病始见于《五十二病方》。历代古籍大多认为喉

痹病因分为外感和内伤,其中以肺肾阴虚导致的虚火上升、咽喉失养为主。内伤因素包含五劳过极,起居失调,房劳过度,饮食不节等所耗伤阴血,克伐元气,致肺肾亏损,津液不足,虚火上扰,循经上蒸,熏蒸咽喉^[17]。《黄帝内经》认为喉痹的病机为阴阳气血瘀结,瘀滞闭阻^[18]。

2 慢性咽炎诊断标准及特点

2.1 西医诊断标准

西医诊断标准参照 2016 年田道法主编的《中西医结合耳鼻咽喉科》^[19]和 2018 年田勇泉主编的《耳鼻咽喉头颈外科学》^[20]关于慢性咽炎的分类及诊断标准拟定,详情如表 1。

2.2 中医诊断标准

中医诊断标准参照中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》(ZY/T001.1-94)^[21]和中华中医药学会耳鼻喉科分会第二十五次学术年会(2019)暨世界中联耳鼻喉口腔科专业委员会第十一次学术年会及 2017 年第五次世界中西医结合大会^[22]制定。将其分为主症、次症和舌脉。主症:(1)异物感,(2)发痒,(3)灼热,(4)干燥,(5)微痛;次症主要归为:(1)咽部黏膜肿胀,(2)萎缩,(3)暗红色斑块、树枝状充血,(4)咽侧索肿大,(5)咽后壁淋巴滤泡增生。详情如表 2。

3 慢性咽炎动物模型的应用

慢性咽炎是临床常见病,对生活造成一定影响,对慢性咽炎的研究离不开动物模型的建立,下面就现有的慢性咽炎动物模型进行总结,归类、并分析其与临床的吻合度,评价其优劣,为模型的标准提供理论基础。

表 1 慢性咽炎西医学诊断标准及临床特点

Table 1 Modern medical diagnostic criteria and clinical features of chronic pharyngitis

类型 Type	主要症状 Main symptoms	次要症状 Secondary symptoms
慢性咽炎 Chronic pharyngitis	(1)咽喉不适 Throat discomfort	(1)咽部症状时轻时重 Throat symptoms may be mild or severe
	(2)微痛,痒 Slightly painful, itchy	(2)咽部检查黏膜肿胀 Swelling of the mucous membrane on examination of the pharynx
	(3)异物感 Foreign body sensation	(3)或有萎缩 Possible shrinkage
	(4)咽喉干燥 Dry throat	(4)或有暗红色斑块状、树枝状充血 Or dark red patchy, dendritic congestion
	(5)晨起刺激性咳嗽,恶心 Irritating morning cough, nausea	(5)咽侧索肿大,咽后壁淋巴滤泡增生 Enlargement of the lateral pharyngeal cord and hyperplasia of the lymphatic follicles in the posterior pharyngeal wall
	(6)少量粘稠分泌物附着 A small amount of sticky discharge adheres	

3.1 模型动物的选择

根据中医药实验研究动物模型的选择标准,包括准确性、重复性等原则。用于慢性咽炎实验研究的动物有成年大鼠、家兔等。大鼠体积小,敏感性强;家兔体积大,性格温顺,在日常管理、标本采集及病理形态改变等方面具有一定优势^[23]。

3.2 动物模型与临床吻合度

慢性咽炎的动物模型造模方法颇多,其中氨水直接喷雾法,氨水+松节油复合法,微生物感染法,沙尘诱导法应用较多,根据中西医临床诊断标准,综合评价临床吻合度,具体模型与临床吻合度分析见表 3。

表 2 慢性咽炎中医诊断标准及临床特点

Table 2 Diagnostic criteria and clinical features of chronic pharyngitis in Chinese medicine

辨证分型 Identification and typing	主症 Main symptoms	次症 Secondary symptoms	舌脉 Tongue and pulse
阴虚肺燥 Yin deficiency and lung dryness	异物感,咽部干燥,发痒,灼热,疼痛不适,午后加重,咽部充血呈暗红色 Foreign body sensation, dryness, itching, burning, pain and discomfort in the throat, worse in the afternoon, dark red congestion in the throat	手足心热,频频求饮,饮而不多 Hot hands and feet, frequent requests for drinks, but not much	舌红苔薄,脉细数 Red tongue with thin coating and thin pulse
肺脾气虚 Lung and spleen qi deficiency	异物感,咽喉干燥,发痒,但不欲饮,咳嗽,有痰易咳 Foreign body sensation, dry, itchy throat, but no desire to drink, cough, easy to cough with phlegm	畏寒,易感冒,神倦乏力,语声低微,大便溏薄 Fear of cold, easily catching colds, tiredness and fatigue, whispering, loose stools	舌苔白润,脉细数 White and moist tongue coating, fine pulse
痰热蕴结 Phlegm and heat entrapment	异物感,咽喉不适,发痒,咳嗽,咳痰粘稠,灼热,咽黏膜充血,肥厚,有黄白色分泌物附着 Foreign body sensation, throat discomfort, itching, cough, thick sputum, burning, congestion, thickening of the pharyngeal mucosa, yellowish-white secretions	面色无华,倦怠乏力,动则气短,手足不温,食少便溏,小便清长 Lack of vitality, tiredness, shortness of breath on movement, lack of warmth in the hands and feet, loose bowel movements, long, clear urine	舌红苔黄腻,脉滑数 Red tongue with yellowish coating and slippery pulse

表 3 慢性咽炎动物模型与中西医临床病症吻合情况

Table 3 Agreement between the animal model of chronic pharyngitis and the clinical symptoms of Chinese and Western medicine

模型分类 Model classification	选择动物 Choose an animal	造模方法 Moulding methods	模型特点 Model features	临床吻合度 Clinical match
氨水直接喷雾法 ^[24-25] Ammonia direct spray method	Wistar 大鼠,家兔 Wistar rats, house rabbits	氨水喷雾 氨水体积 2% ~ 5%, 2~3 周 Ammonia spray ammonia 2% ~ 5% by volume, 2 ~ 3 weeks	优点:简单安全,重复性好 Pros: simple and safe, good repeatability	西医:主要症状(4)(6),次要症状(2)(4) 中医:主要症状(4),次要症状(1)(3) 主要与中医阴虚肺燥证相符合 吻合度中 Western medicine: primary symptom (4)(6), secondary symptom(2)(4) Chinese medicine: primary symptom (4), secondary symptom(1)(3) Mainly consistent with Chinese medicine evidence of Yin deficiency and lung dryness Medium coincidence
氨水+松节油复合 ^[26-28] Ammonia + turpentine compound	大鼠,家兔 Rats, house rabbits	氨水喷雾 15 d,第 8 天起咽部注射松节油 Ammonia spray for 15 d, pharyngeal injection of turpentine from 8 d	优点:由氨水喷雾和松节油注射复合,应用多 缺点:模型持续时间较短,易自愈 Pros: a combination of ammonia spray and turpentine injection, with multiple applications Cons: model duration is short, easy to self-heal	西医:主要症状(1)(4)(6),次要症状(2)(4) 中医:次要症状(1)(3)(4) 主要与中医阴虚肺燥证相符合 吻合度高 Western medicine: primary symptom(1)(4)(6), secondary symptom(2)(4) Chinese medicine: secondary symptoms (1)(3)(4) Mainly consistent with Chinese medicine: evidence of yin deficiency and lung dryness Good match

续表 3

模型分类 Model classification	选择动物 Choose an animal	造模方法 Moulding methods	模型特点 Model features	临床吻合度 Clinical match
微生物感染法 ^[29-31] Microbial infection method	SD 大鼠, SD rats, rhesus macaques	咽喉黏膜注射乙型溶血链球菌或金黄色葡萄球菌持续 15 d Throat mucosa injection of Streptococcus b haemolyticus or Staphylococcus aureus for 15 d	优点: 与人类发病机制相似, 表症与临床相似 缺点: 模型成功后, 易反复传染, 研究反复性炎症慢性咽炎具有局限性 Pros: similar pathogenesis to humans, phenotypic and clinical similarities Cons: after the model is successful, it is prone to recurrent transmission, and the study of recurrent inflammatory chronic pharyngitis has limitations	西医: 主要症状(6), 次要症状(2)(5) 中医: 次要症状(1)(4)(5) 吻合度中 Western medicine: primary symptom (6), secondary symptom (2)(5) Chinese medicine: secondary symptoms (1)(4)(5) Medium coincidence
沙尘诱导法 ^[32] Sand and dust induced method	SD 大鼠 SD rats	沙尘实验模拟平台, 每天 2 h, 持续 45 d Sand experiment simulation platform, 2 h per day for 45 d	优点: 临床发病诱因具有较强相关性和一致性 缺点: 普遍性差 Pros: there is a strong correlation and consistency in clinical pathogenesis triggers Cons: poor universality	西医: 主要症状(6)和次要症状(2) 中医: 次要症状(1) 主要与中医阴虚肺燥证相符 吻合度中 Western medicine: primary symptom (6) and secondary symptom(2) Chinese medicine: secondary symptoms(1) Mainly consistent with Chinese medicine evidence of yin deficiency and lung dryness Medium coincidence
去势法 ^[33] (萎缩性咽炎) Deprogramming (Atrophic pharyngitis)	SD 大鼠 SD rats	切除卵巢 Removal of ovaries	与临床围绝经期妇女咽炎症状相似 Similar to clinical symptoms of pharyngitis in perimenopausal women	西医: 主要症状(4), 次要症状(2) 中医: 次要症状(2)(5) 吻合度中 Western medicine: primary symptom (4), secondary symptom (2) Chinese medicine: secondary symptoms (2)(5) Medium coincidence
药物+氨水复合法 ^[34] Drug + ammonia compound method	SD 大鼠 SD rats	甲状腺片 1.25 mg/100 g, 25% 氨水持续 15 d Thyroid tablets 1.25 mg/100 g, 25% ammonia for 15 d	与临床阴虚型慢性喉痹相似 Similar to the clinical yin deficiency type of chronic laryngeal paralysis	西医: 次要症状(2)(4) 中医: 次要症状(1)(3) 主要与中医阴虚肺燥证相符 吻合度中 Western medicine: secondary symptoms (2)(4) Chinese medicine: secondary symptoms (1)(3) Mainly consistent with Chinese medicine evidence of yin deficiency and lung dryness Medium coincidence
慢性束缚+饥饿法+氨水喷雾复合法 ^[35] Chronic restraint + starvation method + ammonia spray complex	Wistar 大鼠 Wistar rats	25% 氨水, 放入束缚筒, 隔日进食, 复合干预 21 d 25% ammonia, placed in restraint tubes, fed every other day, compound intervention 21 d	与临床情志因素造成的慢性咽炎相似 Similar to chronic pharyngitis caused by clinical affective factors	西医: 主要症状(5), 次要症状(2)(4) 中医: 次要症状(1)(3) 吻合度中 Western medicine: primary symptom (5), secondary symptom (2)(4) Chinese medicine: secondary symptoms (1)(3) Medium coincidence

注: 按中西医临床症状吻合度分级, 参考文献及本研究设置的指标, 将吻合度标准制定如下: 高: 符合西医 ≥ 3 项或中医标准 ≥ 3 项; 中: 符合西医 ≥ 2 项或中医标准 ≥ 2 项; 低: 符合西医或中医标准 ≥ 1 项^[36]。

Note. According to the grading of clinical symptom matching between Chinese and Western medicine, with reference to the literature and the indexes set in this study, the criteria of matching were formulated as follows. High, Meeting ≥ 3 items of Western medicine or ≥ 3 items of Chinese medicine criteria. Medium, Meeting ≥ 2 items of Western medicine or ≥ 2 items of Chinese medicine criteria. Low, Meeting ≥ 1 item of Western medicine or Chinese medicine criteria^[36].

3.3 观察指标

慢性咽炎动物实验的造模,从症状、体征、血液学、组织学及超微结构等方面进行了观察^[37]。(1)一般观察:饮水量、饮食量、精神状态和动物咽部状态^[38]。(2)血液检查:白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞^[39]。(3)血液流变学^[40-41]:血液粘稠度、血浆粘稠度,血细胞压积、全血还原粘度^[42]。

4 讨论

慢性咽炎是临床耳鼻喉科常见病,对患者的生活造成了许多不便,危害患者的身心健康。建立与临床吻合度较高的动物模型是研究慢性咽炎的重要一环,吻合度较高的动物模型更加接近临床患者病症特点,为临床慢性咽炎的诊断和治疗提供基础。

目前,慢性咽炎动物模型的建立常采用氨水直接喷雾法、氨水松节油复合法、微生物感染法。氨水直接喷雾法在建立慢性咽炎时最为常用,直接用氨水喷洒动物的咽部,单一因素操作,造模成功后,与临床病理表现相似^[43]。氨水松节油复合法与氨水直接喷雾法较相似。松节油的使用会增强对咽部黏膜的刺激,常用于咽部长久被刺激慢性咽炎研究。微生物感染法与人类发病机制相似,但细菌具有传染性,在操作时对操作者安全防护等级要求较高,常用于研究反复炎症性慢性咽炎。沙尘诱导法是模拟临床因空气污染原因造成的慢性咽炎,常用于研究因空气污染、职业暴露等自然因素造成的慢性咽炎。去势法则具有明显的年龄因素,常用于复制围绝经期妇女慢性咽炎模型。药物和氨水复合法动物模型,与中医阴虚肺燥证相似。慢性束缚+饥饿法+氨水喷雾模型,与临床的情志因素导致慢性咽炎相似,在病因上更加贴合中医肝郁脾虚证,但造模成功后,动物的症状表现与临床表现贴合度不高。

在治疗疾病的过程中,建立高度吻合的动物模型十分重要。中医强调整体观念,从整体把握疾病的主要矛盾,现有造模方法更多采用局部变化,病因单一。临床慢性咽炎为多因素致病,造模时多采用单一因素造模方法。慢性咽炎的表现如咽部不适,吞之不下,吐之不出,痒,微痛均是患者自体感受,动物无法表述自体的感受,实验者只能通过动物的行为学表现与病理改变来判断是否与临床症状一致。故在未来动物模型的构造中,重视观察动物的行为学变化尤为重要。由于动物与人类个体的差异,所以今后在建立动物模型时,可选择重点突出“咽部黏膜肿胀”,“萎缩”,“暗红色斑块”,“树枝状充血”,“咽侧索肿大”,“咽后壁淋巴滤泡增生明

显”等表症。现有的造模方法中,以西医诊断为标准的动物模型吻合度较高。而与中医证型相符较少,中医将慢性咽炎分为阴虚肺燥证、肺脾气虚证、痰热蕴结证,中医认为慢性咽炎的病因是阴阳瘀血气结,亦有情志因素。病症结合模型研究文献较少。在现有的造模方法上可以考虑加入中医致病因素,合并阴虚、气虚、痰热等因素,将动物放置不同环境中给予刺激,以增加动物活动环境中的风、热。可通过灌胃伤阴药和烟熏法塑造阴虚证^[44],可通过香烟熏加冷水浸泡造肺气虚模型^[45]。高脂饲料联合人工气候箱塑造痰热证模型^[46]。对造模后的动物进行评价,判断是否可以更吻合中医证候值得我们探究。未来应该考虑对这几种证候的总结和探索,并且对已有的动物模型进行不断的完善,方便开展药效或机制等相关研究。

近年来中医药的介入为慢性咽炎的治疗提供了新方法。中医强调“辨证”,西医强调“辨病”,未来在建立动物模型的过程中,尽可能做到中西医结合,在现有的基础上做到病证结合,二者的有机结合有利于提高动物模型与临床吻合度,也在临床发展中有重大意义,在治疗疾病时病症合参发挥优势。

随着不断的实验验证与技术创新,复制出与中西医临床病症特点高度吻合的慢性咽炎动物模型,是今后慢性咽炎模型相关研究的发展方向。

参考文献:

- [1] 贾慧,潘永清.快针深刺廉泉穴治疗慢性咽炎验案1则[J].医学理论与实践,2020,33(22):3806-3807,3826.
- [2] 罗金丽,顾成娟.冬凌草、滁菊花、麦冬治疗慢性咽喉炎经验——全小林三味小方撮萃[J].吉林中医药,2020,40(11):1405-1407.
- [3] Murray RC, Chennupati SK. Chronic streptococcal and non-streptococcal pharyngitis [J]. Infect Disord Drug Targets, 2012, 12(4): 281-285.
- [4] Kalra MG, Higgins KE, Perez ED. Common questions about Streptococcal pharyngitis [J]. Am Fam Physician, 2016, 94(1): 24-31.
- [5] Kaplan EL, Gooch WM, Notario GF, et al. Macrolide therapy of group A Streptococcal pharyngitis: 10 days of macrolide therapy (clarithromycin) is more effective in Streptococcal eradication than 5 days (azithromycin) [J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(12): 1798-1802.
- [6] 陈其冰,王燕,李芬,等.慢性咽炎病因和发病机制研究进展[J].听力学及言语疾病杂志,2019,27(2):224-228.
- [7] 蒋金.中药治疗慢性咽炎的进展[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(24):163,166.
- [8] 陈静.中西医结合治疗慢性咽炎的临床疗效观察[J].中国现代药物应用,2020,14(3):200-202.

- [9] 张帆. 中药穴位贴敷联合药物治疗小儿慢性咽炎的疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(6): 45-46.
- [10] 庞瑞康, 商志浩, 芮靖琳, 等. 朱璉“兴奋”Ⅱ型针刺手法治疗慢性咽炎的临床疗效观察[J]. 广西医学, 2020, 42(22): 2894-2897.
- [11] 郑兆芬, 梁万欢. 桔梗元参汤合加味射干汤加减对痰热蕴结型慢性咽炎患者免疫功能的影响及临床疗效观察[J]. 中医临床杂志, 2020, 32(11): 2175-2178.
- [12] 庞瑞康, 商志浩, 芮靖琳, 等. “兴奋”Ⅱ型针刺手法治疗慢性咽炎的临床疗效观察[J]. 广西医学, 2020, 42(22): 2894-2897.
- [13] Rosell Cervilla A, García Purriños FJ, Calvo Moya J. Chronic pharyngitis and macrolides [J]. Acta Otorrinolaringol Esp, 2002, 53(6): 441-443.
- [14] Milinevskii IV, Shabaldina EV, Shamova IP, et al. The use of the antidepressant citalopran for the treatment of chronic pharyngitis and pharyngeal neurosis. [J]. Vestn Otorinolaringol, 2011, 2: 58-61.
- [15] 刘秀影. 慢性咽炎合剂治疗慢性单纯性咽炎的效果研究[J]. 中国医学创新, 2017, 14(24): 112-114.
- [16] 傅小欧, 海霞. 慢性咽炎中医药治疗研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(8): 153-154, 169.
- [17] 舒建中, 夏林, 曾定伦. 曾定伦主任医师应用滋阴润下法治疗慢性咽炎经验浅析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(18): 101-102.
- [18] 乔靖, 林亮. 慢性咽炎中医药治疗现状[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(4): 55-56.
- [19] 田道法. 中西医结合耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 中国中医药出版社; 2016.
- [20] 田勇泉. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社; 2018.
- [21] 慢喉痹的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》(ZY/T001.1-94) [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(12): 213.
- [22] 何强亮. 慢性咽炎动物模型的建立及相关指标观察分析[A]. 中国中西医结合学会. 2017 年第五次世界中西医结合大会论文摘要集(上册)[C]. 中国中西医结合学会: 中国中西医结合学会, 2017.
- [23] 黄文华, 马居里, 韩曼. 中医药实验研究中实验动物的选择与动物模型的应用[J]. 中医学刊, 2004, 22(8): 1459-1460.
- [24] 王艺, 张玲, 周家璇. 咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠咽黏膜修复作用的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(15): 1600-1602.
- [25] 彭顺林, 钟渠, 熊大经, 等. 慢性咽炎动物模型研究[J]. 成都中医药大学学报, 1999, 22(1): 3-5.
- [26] 唐大轩, 葛麟, 王莉, 等. 甘桔冰梅片防治咽炎作用研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 137-139.
- [27] 刘元献, 李许娜, 吴新风, 等. 天竺雾化剂对慢性咽炎动物模型的行为学及病理形态学影响[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2016, 24(3): 164-167.
- [28] 尤献民, 邹桂欣, 赵金明, 等. 射干提取物对慢性咽炎家兔血清中白细胞介素-4 和免疫球蛋白 E 表达的影响[J]. 中国药业, 2016, 25(7): 3-4.
- [29] Virtaneva K, Porcella SF, Graham MR, et al. Longitudinal analysis of the group A *Streptococcus* transcriptome in experimental pharyngitis in *Cynomolgus* macaques [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(25): 9014-9019.
- [30] 梁璐. 复方利咽口服液对实验性急、慢性咽炎的疗效与作用机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [31] 张荣建, 贺争鸣. 猴腺病毒研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6): 71-74, 70.
- [32] 刘雨娟, 王莉, 姚兰, 等. TNF- α 介导的 NF- κ B 通路在沙尘导致大鼠慢性咽炎中的作用及射干对其影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(17): 4254-4256.
- [33] 戚本明, 田兴华, 王正强, 等. 葛根总黄酮治疗去势大鼠萎缩性咽炎的实验研究[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2002, 10(6): 267-270.
- [34] 李凯, 牛乐, 贾利利, 等. 黄连阿胶汤不同煎煮方法对慢性咽炎大鼠的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(3): 879-881.
- [35] 王艺, 周家璇, 黄春江, 等. 基于“情志致病”理论建立慢性咽炎肝郁脾虚大鼠模型的研究[J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(1): 11-15.
- [36] 谢逸轩, 王赛, 刘浩哲, 等. 基于中西医临床病症特点的膀胱炎动物模型分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 246-250.
- [37] 温雯, 张颖, 邹桂欣, 等. 兔慢性咽炎模型实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1313-1315.
- [38] 祁友松, 王芳, 褚伟, 等. 清咽雾化液对实验性慢性咽炎作用与药效研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 250-252.
- [39] 张燕, 赵莉莉, 赵思俊, 等. 清咽润喉功能中药对大鼠慢性咽炎的治疗作用[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(8): 1295-1296.
- [40] 梁璐, 朴晋华, 马建丽. 急性和慢性咽炎的发病机制与动物模型建立的研究现状[J]. 临床医药实践, 2012, 21(7): 540-543.
- [41] 王颖, 王新帅, 李向宇, 等. 陈皮利咽合剂对慢性咽炎模型家兔全血黏度和咽黏膜的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(12): 1051-1053.
- [42] 南淑玲, 谢丹, 章健, 等. 养阴清肺汤对慢性咽炎大鼠病理形态学及血液流变学实验观察[J]. 吉林中医药, 2010, 30(9): 813-815.
- [43] 吴嘉宝, 黄栋芳, 王烨, 等. 喉痹动物模型的研究现状及评价分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 189-195.
- [44] 王赛, 白明, 苗明三. 阴虚证动物模型诊断指标及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 132-137.
- [45] 周衡朴, 苏洁, 颜美秋, 等. 黄精水提物和黄精酿造酒对肺气虚模型大鼠的作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 77-82.
- [46] 张婷婷, 李云英, 郭强中, 等. 痰证裸小鼠模型的建立及评价[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(4): 842-844.

[收稿日期]2021-08-19

褚云峰,于红燕,杨琪,等. *PTEN* 基因在周围神经损伤修复中的作用机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 124-130, 136.

Chu YF, Yu HY, Yang Q, et al. Research progress on the mechanism of *PTEN* in the repair of peripheral nerve injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 124-130, 136.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.017

PTEN 基因在周围神经损伤修复中的作用机制研究进展

褚云峰¹, 于红燕², 杨琪¹, 彭艳斌¹, 陈仲¹, 于斐^{1,3*}

(1. 北京大学深圳医院, 广东 深圳 518036; 2. 滨州市滨城区市立医院, 山东 滨州 256600;
3. 骨科生物材料国家地方联合工程研究中心, 广东 深圳 518036)

【摘要】 周围神经损伤是影响人类健康的重大疾病之一, 由于该病损伤修复机制阐述不明, 使其治疗效果不佳, 也因此成为临床领域骨科医生的治疗难点。近年来, 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, *PTEN*) 在周围神经损伤修复中研究较多, 本文就 *PTEN* 基因通过调控周围神经损伤后的突触再生、炎性及免疫反应、神经元凋亡、神经营养相关因子等过程以及核因子- κ B (NF- κ B)、磷脂酰肌醇激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白 (PI3K/AKT/mTOR)、非受体酪氨酸激酶/信号传导及转录激活蛋白 (Jak/stat)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等信号通路的作用影响周围神经损伤后的修复进程作一综述, 为相关研究提供便利。

【关键词】 周围神经损伤修复; 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因; 作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0124-07

Research progress on the mechanism of *PTEN* in the repair of peripheral nerve injury

CHU Yunfeng¹, YU Hongyan², YANG Qi¹, PENG Yanbin¹, CHEN Zhong¹, YU Fei^{1,3*}

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China. 2. Binchengqu Shili Hospital, Binzhou 256600.
3. National & Local Joint Engineering Research Center of Orthopaedic Biomaterials, Shenzhen 518036)

【Abstract】 Peripheral nerve injury is a major disease. Because the injury and repair mechanisms of the disease are unclear, its treatment is poor. Therefore, peripheral nerve injury has become a difficult point for orthopedics doctors. In recent years, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (*PTEN*) has been widely studied to repair peripheral nerve injury. Here, we review the mechanism of *PTEN* in regulating synaptic regeneration, inflammatory and immune responses, neuronal apoptosis, neurotrophic related factors, and NF- κ B, PI3K/AKT/mTOR and Jak/Stat signaling pathways during the repair of peripheral nerve injury to facilitate research.

【Keywords】 peripheral nerve injury repair; *PTEN*; mechanism research

【基金项目】 国家自然科学基金 (82102568, 82102076, 82172432, 82001319); 广东省基础与应用基础研究基金 (2021A1515012586, 2019A1515110983, 2019A1515011290); 白求恩·石药骨质疏松科研基金项目 (G-X-2020-1107-21); 北京大学深圳医院科研启动金项目 (KYQD2021099)。

【作者简介】 褚云峰 (1981—), 男, 副主任医师, 研究方向: 周围神经损伤修复的基础研究。E-mail: fengerhekuangren@163.com

【通信作者】 于斐 (1989—), 男, 博士, 医师, 研究方向: 骨、软骨、周围神经损伤修复的基础研究。E-mail: oscarfyu@163.com

第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, *PTEN*) 是一种具有蛋白和脂质磷酸酶双重活性的抑癌基因, 与肿瘤发生关系密切, 编码属于酪氨酸磷酸酶家族成员的蛋白质, 通过调控细胞的增殖分裂影响肿瘤的进展^[1]。近年研究证实, *PTEN* 基因在生物体周围神经损伤修复中作用明显^[2], 使其在骨科领域备受关注。

周围神经损伤是一种由于解剖性原因和损伤性原因造成的周围神经完整性变化的疾病, 其致病原因众多, 常见于体力劳动者, 可造成严重的功能障碍, 甚至残疾, 给家庭和社会带来沉重的负担, 是骨科领域的棘手问题, 也是我国健康领域亟待解决的重大公共卫生问题。周围神经损伤后, 近远端神经纤维将发生 Wallerian 变性, 随时间的推移分解成小碎片, 并逐步被吞噬细胞清除, 神经修复后要经过变性、再生、跨越神经缝合口及终末器官生长成熟的过程, 才能逐步恢复其支配功能, 因此造成其临床治疗效果不佳。国内外学者证实, *PTEN* 基因与周围神经损伤修复关系密切, 可通过 NF- κ B^[3]、PI3K/AKT/mTOR^[4]、Jak/stat^[5]、MAPK^[6] 等信号通路中因子的改变影响周围神经损伤修复的进程。本文就 *PTEN* 基因在周围神经损伤修复中的作用机制做一综述, 为相关研究提供便利。

1 *PTEN* 基因分子结构

PTEN 是一个由 9 个外显子和 8 个内含子组成的定位于染色体 10q23.3 的 200 kb 的基因^[7], 又被称为 *MMAC1* (mutated in multiple advanced cancer 1) 或 *TEP1* (TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase), 其可编码酪氨酸磷酸酶家族成员相关的由 403 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白质的分子量为 $58 \times 10^3 \sim 60 \times 10^3$, 由 N 末端、C2 结构域及 C 末端构成。*PTEN* 基因最早发现是作为磷酸酯酶作用行使肿瘤抑制基因的功能而进行研究的, 与细胞生长相关的信号通路关系密切, 可通过调控细胞周期影响到细胞的增殖及分裂^[8]。当肿瘤细胞中 *PTEN* 基因的表达量改变时, 肿瘤细胞的生长、增殖及侵袭能力均受到显著的影响。*PTEN* 基因可通过甲基化、基因突变等方式在膀胱癌^[9]、乳腺癌^[10]、子宫内膜癌^[11] 等肿瘤疾病中起到重要的作用。

2 *PTEN* 基因与周围神经损伤修复

研究显示, *PTEN* 基因也在骨科相关疾病中起

到重要作用, 如周围神经损伤^[12]、骨关节炎^[13]、骨肿瘤^[14] 等。由于其在周围神经损伤后的突触再生^[15]、炎性及免疫反应^[16]、神经元凋亡^[17]、神经营养相关因子调控^[18] 等方面起到重要的作用而备受关注, 成为该领域中的关注焦点。

2.1 *PTEN* 基因对周围神经损伤后修复过程中突触再生的影响

PTEN 基因在周围神经损伤修复中可以通过其翻译后蛋白表达量的降低而促进轴突及髓鞘的再生^[19]。Singh 等^[15] 研究证实, 在糖尿病周围神经病变小鼠模型中, *PTEN* 蛋白上调可以抑制轴突再生, 而体外培养这些小鼠的感觉神经元, 可因 *PTEN* 基因敲除导致神经轴突生长和分支显著增加。Sun 等^[20] 则证实, *PTEN* 和细胞因子信号转导抑制因子 3 (*SOCS3*) 的同时缺失显著地促进了轴突的稳健和持续再生, 而其中激活 mTOR 和 STAT3 通路是维持成人中枢神经系统长距离轴突再生的关键, 是功能恢复的关键步骤, 这在神经损伤修复中起到重要作用。Kar 等^[21] 实验发现, 损伤诱导的 miR-21 和 miR-199a-3p 表达的改变可以通过调节 *PTEN*/mTOR 途径改变整体和轴突内蛋白质合成, 从而改变轴突生长能力。Ohtake 等^[22] 综述他人研究发现, 通过 *PTEN* 条件敲除小鼠模型、短发夹 RNA 敲除 *PTEN* 或通过药理学方法阻断 *PTEN* 基因作用, 能够刺激具有中枢神经系统损伤的幼年或成年啮齿动物的不同程度轴突再生。Liu 等^[23] 发现, 脊髓损伤后, 二十二碳六烯酸 (DHA) 显著上调皮质脊髓神经元中的 miR-21 并下调 *PTEN*, 在损伤后大鼠模型原代皮层神经元中, 可以观察到 DHA 引起 *PTEN* 下调及磷酸化 AKT 的上调, 与此伴随神经轴突的生长。Urban 等^[24] 则通过使用 *PTEN* 拮抗肽 (PAP4) 恢复了颈脊髓损伤后膈肌的功能, PAP4 能够促进损伤呼吸神经元中头端腹侧呼吸组的轴突通过病变处长距离再生, 并与膈肌运动神经元重新连接, 从而影响了膈肌呼吸功能恢复。这些研究也从侧面证实 *PTEN* 基因可以通过调控周围神经损伤修复后的突触再生影响神经功能恢复。

2.2 *PTEN* 基因对周围神经损伤后修复过程中炎性及免疫反应的影响

PTEN 基因在多种疾病中都能够调控炎症反应影响免疫进程。在肝炎症中, *PTEN* 基因介导的蛋白激酶 B/ β -连环蛋白/叉头框转录因子 O 亚族 1 (Akt/ β -catenin/Foxo1) 信号通路在 Toll 样受体 4

(TLR4) 相关先天性免疫调节中起到重要作用^[25]。在免疫相关疾病类风湿性关节炎中, *PTEN* 甲基化能够促进成纤维细胞样滑膜细胞中炎症激活, 造成关节软骨的破坏^[26]。在中医药领域, 补肾活血汤可以通过 PI3K/AKT 途径影响白介素-17A/白介素-17 受体 (IL-17A/IL-17R) 表达, 导致 *PTEN* mRNA 上调, 促进不明原因反复流产患者的蜕膜基质细胞增殖, 这解释了炎症和凋亡关系及母胎界面 Th17/Treg 免疫细胞之间动态平衡失衡机制^[27]。

在周围神经损伤修复过程中, 炎性细胞引起的免疫反应也尤为重要。Smith 等^[28]发现, 早期炎症事件可能会抑制周围神经系统和中枢神经系统损伤后的功能恢复, 免疫相关因子肿瘤坏死因子介导周围神经系统中的神经胶质细胞 (schwann, 又名雪旺细胞) 中损伤诱导的 NF- κ B DNA 结合的快速激活, 并且这些调控与损伤后轴突发芽的抑制有关。Schuld 等^[29]认为, 免疫蛋白酶体可被疾病、氧化应激及炎症因子上调, 在免疫蛋白酶体亚单位缺乏的视神经损伤小鼠模型中, 位于炎症经典通路 NF- κ B 下游及 *PTEN* 基因上游的 AKT 通路受到影响, 参与视神经损伤修复进程。Dodd 等^[16]则认为, *PTEN* 基因缺失能够加快小鼠模型中恶性周围神经鞘瘤这种影响机体免疫炎症的形成, 嵌合多肽阿霉素纳米胶囊药物制剂能够使该模型中阿霉素浓度高于单纯使用阿霉素给药, 这对于纳米包载化疗药物治疗类似肿瘤有重要的意义。Kan 等^[30]发现糖尿病神经病变中微血管病、血栓形成和炎症浸润明显, 伴随缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和 *PTEN* 的上调, 而 CD40 是引起两者上调的关键分子之一。由此可知, 炎性反应和免疫反应在周围神经损伤修复中有重要意义。

2.3 *PTEN* 基因对周围神经损伤后修复过程中神经元凋亡的影响

神经元凋亡是周围神经相关疾病中经常出现的一个进程, 对其机制阐述有临床意义。周围神经损伤通常会伴有缺血缺氧性损伤, 尤其是当合并血管损伤时, 可引起神经元凋亡, Cong 等^[17]发现, 皮肤前体来源的雪旺细胞的细胞外小泡, 对暴露于氧糖剥夺条件下感觉神经元的存活和恢复意义重大, 这一过程可能与 miR-21-5p/*PTEN*/PI3K/Akt 轴有关。Zhang 等^[31]通过观察 Withaferin A 这种从催眠睡茄 (*Withania somnifera*) 中提取的甾体内酯对中风后神经元的作用, 发现该物质可以抑制 *PTEN* 基因

的表达, 并通过激活 PI3K/AKT 信号通路等作用抑制神经元的凋亡。Song 等^[32]通过实验证实, *PTEN* 磷酸酶代表了大鼠神经系统神经元存活和凋亡信号通路之间的一种新的转化, *PTEN* 的抑制可以活化脑源性神经营养因子磷酸化 AKT 的能力, 并使基底前脑神经元免受前神经营养因子介导的凋亡。李丛琴等^[33]认为, 运动训练可以通过抑制 *PTEN* 通路的激活而减少海马齿状回区域凋亡蛋白的表达, 减轻神经元凋亡并且减少大鼠抑郁程度。林平等^[34]则证实, 神经生长因子过表达联合 *PTEN* 基因敲减可以提升大鼠骨髓间充质干细胞的生存能力及分化为神经元样细胞的能力, 有利于神经元的再生从而提升周围神经再生能力。周坤等^[35]则发现, 甲氨蝶呤腹腔注射有利于急性脊髓损伤大鼠脊髓组织中 *PTEN* 及衰老凋亡相关因子 Bax 和 Caspase-3 的表达量降低, 从而保护了神经组织, 这样也证实了 *PTEN* 基因下调对神经元的保护作用。

2.4 *PTEN* 基因对周围神经损伤后修复过程中神经营养相关因子调控的影响

机体内有多种神经相关的营养因子, 如神经生长因子 (NGF)^[36]、脑源性神经营养因子 (BDNF)^[37]、睫状神经生长因子 (CTNF)^[38]、神经营养因子 3 (NT-3)^[39]、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)^[40]等, 这些神经营养相关的因子在周围神经损伤修复中也起到一定的作用。本课题组前期研究证实, 大鼠坐骨神经钳夹伤后的早期阶段, CTNF 大致呈现出逐步上升的趋势^[38]; 当使用小分子多肽 NP1 肌间隙单次注射治疗坐骨神经钳夹伤时, 与损伤后注射生理盐水组相比, β -NGF 的表达量明显上调, 周围神经损伤也得到一定程度的修复^[41]。Sultan 等^[42]将牙髓干细胞 (DPSC) 和三叉神经节神经元细胞 (TGNC) 共培养, 发现 DPSC 可以通过调控 NGF、BDNF、NT-3 和 GDNF 表达影响 TGNC 的存活和再生, 在三叉神经无细胞修复中起重要作用。Liu 等^[43]通过生物信息学分析相关研究证实, *PTEN* 和 BDNF 均可作为大鼠脊髓损伤后 microRNA 的靶点进行疾病的治疗。而且 *PTEN* 抑制剂可以模拟人参皂苷 Rg1 的作用上调海马区 BDNF 和 ProBDNF 的表达, 进而改善小鼠中神经相关的记忆问题^[44]。Cho 等^[45]发现, 脊髓损伤可导致膀胱功能障碍, 此时相关组织中 BDNF 和 NGF 过度表达, 使用 *PTEN* 抑制剂后, 膀胱功能改善, 同时减弱了相关因子的过度表达。陈歆维^[18]发现, 喉返神经损伤修

复过程中 *PTEN* 基因起到负向调控作用,当敲减 *PTEN* 基因后, *BDNF* 和 *GDNF* mRNA 的表达量上调,激活 *PI3K/Akt/GSK-3 β* 通路并实现喉返神经修复。也由此可知,神经相关的营养因子能够参与周围神经损伤修复的进程。

3 *PTEN* 基因通过相关信号通路的作用对周围神经损伤修复的影响

周围神经损伤后的修复机制仍不清楚,只有对其机制了解清楚才能更好的治疗该病。在周围神经损伤修复过程中, *PTEN* 基因可以通过多条信号通路的作用影响损伤后的修复进程,如 *NF- κ B*^[3]、*PI3K/AKT/mTOR*^[4]、*Jak/stat*^[5]、*MAPK*^[6]等(表 1)。

3.1 *PTEN* 基因通过 *NF- κ B* 信号通路对周围神经损伤修复的影响

NF- κ B 信号通路是一条与炎症关系密切的通路,参与机体的应激和损伤反应,其本身是蛋白因子转录家族,主要包括 *p50*、*p52*、*p65*、*RelB*、*c-Rel* 5 个亚单位。由于周围神经损伤修复过程中炎症反应明显,故该信号通路参与其中^[46]。

Wang 等^[3]发现,健康雪旺细胞的外显体(SC-Exos)对糖尿病周围神经病变具有治疗作用,在这一过程中,SC-Exos 尾静脉注射治疗小鼠 2 型糖尿病周围神经病变时,逆转了 *miR-21*、*27a*、*146a*、*PTEN* 及 *NF- κ B* 的表达,进而起到治疗作用。王寻等^[47]证实,星形胶质细胞缺氧模型内 *PTEN* 诱导假定激

酶 1(*PINK1*)沉默后 *NF- κ B* 信号通路的活性明显降低,使缺血神经元的凋亡升高,从而证实 *PINK1* 介导缺氧损伤时星形胶质细胞对神经元具有保护作用。赵敏^[48]也认为,脂多糖处理过的海马神经元细胞,神经元不是神经炎症反应中的被动者,这一过程 *TLR4* 介导的 *PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B* 信号通路激活后, *TNF- α* 和 *IL-1 β* 等因子表达上调,最终参与了神经炎症反应。王泽夏^[49]则发现,天然中药小分子化合物姜黄素对神经胶质瘤的增殖、迁移、侵袭和凋亡具有影响,在细胞中,10 μ mol/L 以上的姜黄素能够抑制胶质母细胞瘤细胞株的增殖,在降低其迁移和侵袭能力的同时促进了细胞凋亡,在裸鼠皮下成瘤模型中也抑制了瘤的生长,这一过程中姜黄素抑制 *NF- κ B* 蛋白表达,但促进 *PTEN* 蛋白的表达。由此可知, *NF- κ B* 信号通路介导的炎症反应在 *PTEN* 基因的影响下参与周围神经损伤修复的进程。

3.2 *PTEN* 基因通过 *PI3K/AKT/mTOR* 信号通路对周围神经损伤修复的影响

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在细胞增殖、分化、凋亡、葡萄糖转运中起到重要的作用,该通路与 *PTEN* 基因关系密切,参与多种神经相关疾病,如缺血性中风^[50]、脊髓损伤^[51]、帕金森病^[52]等。

该通路在周围神经损伤修复中作用明显。Xin 等^[4]发现,在大鼠中风模型尾静脉注射 *miR-17-92*

表 1 *PTEN* 基因在周围神经损伤修复过程中起作用的机制途径

Table 1 Mechanism and pathway of *PTEN* gene in the repair of peripheral nerve injury

信号通路名称 Name of signaling pathways	起作用的因子 Active factors	对周围神经损伤修复的影响 Effect on the repairing of peripheral nerve injury
<i>NF-κB</i>	<i>PTEN</i> 、 <i>p65</i> 、 <i>miR-21</i> 、 <i>miR-27a</i> 、 <i>miR-146a</i> 、 <i>PINK1</i> 、 <i>PI3K</i> 、 <i>AKT</i> , etc	<i>TLR4</i> 、 <i>TNF-α</i> 、 <i>IL-1β</i> 、神经元缺血凋亡,神经炎症反应,神经胶质细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡等 Neuronal ischemia, apoptosis, neuroinflammatory response, glial cell proliferation, migration, invasion and apoptosis, etc
<i>PI3K/AKT/mTOR</i>	<i>PTEN</i> 、 <i>PI3K</i> 、 <i>AKT</i> 、 <i>mTOR</i> 、 <i>miR-17-92</i> 、 <i>Nf1</i> 、 <i>RAS</i> 、 <i>IL-6</i> , etc	轴突髓鞘重塑,神经肌肉接头发育和成熟,神经突起生长,神经胶质细胞自噬,神经纤维鞘瘤细胞增殖等 Axon myelin remodeling, neuromuscular junction development and maturation, neurite growth, glial autophagy, neurofibroma cell proliferation, etc
<i>Jak/Stat</i>	<i>PTEN</i> 、 <i>Jak</i> 、 <i>Stat</i> 、 <i>RhoA</i> 、 <i>Rock</i> 、 <i>GABAAR</i> 、 <i>ICER</i> 、 <i>SOCS3</i> , etc	神经元固有再生及轴突再生,皮质脊髓束突触形成,神经系统内吞和降解内化受体等 Intrinsic regeneration of neurons and axon regeneration, synaptic formation of corticospinal tract, endocytosis and degradation of internalized receptors in nervous system, etc
<i>MAPK</i>	<i>PTEN</i> 、 <i>ERK</i> 、 <i>JNK</i> 、 <i>SAPK</i> 、 <i>p38</i> 、 <i>BMK1</i> 、 <i>NF1</i> 、 <i>Sprouty</i> 、 <i>RAS</i> 、 <i>RAF</i> 、 <i>MEK</i> 、 <i>MAPK</i> 、 <i>PI3K</i> 、 <i>AKT</i> 、 <i>L1</i> 、 <i>CK2α</i> 、 <i>p53</i> 、 <i>MAP</i> 、 <i>miR-370</i> 、 <i>miR-143</i> 、 <i>miR-181a</i> 、 <i>miR-145</i> , etc	神经胶质细胞存活,神经系统保护,神经鞘瘤细胞增殖,神经纤维瘤细胞增殖等 Glial cell survival, nervous system protection, schwannoma cell proliferation, neurofibroma cell proliferation, etc

慢病毒,可增加缺血边界区神经轴突和髓鞘的密度,这种增强轴突髓鞘重塑的作用可能是通过 *PTEN* 下调诱导的 PI3K/Akt/mTOR 通路激活实现的,从而证实 MiR-17-92 簇能够促进中风后功能的恢复。Li 等^[53]则证实,雪旺细胞中神经纤维蛋白 1 (*Nf1*) 和 *PTEN* 的条件性失活导致神经肌肉接头异常成熟,这一过程是由于 RAS/PI3K/AKT/mTOR 信号通路过度活跃造成的,这一通路对神经肌肉接头的发育及随后的肌肉成熟意义重大。Leibinger 等^[54]认为,高表达的 IL-6 联合视网膜神经节细胞特异性敲除 *PTEN* 基因可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活促进神经突起生长,从而发现了治疗视神经损伤的新方法。彭湃等^[55]实验研究说明,右美托咪定联合放疗与单纯放疗相比,可以通过抑制 *PTEN*/Akt/mTOR 增强神经胶质瘤细胞的自噬与放疗敏感性,这一过程中 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平降低,细胞凋亡率及 *PTEN* 蛋白的水平升高。Bradt Möller 等^[56]则认为,*PTEN* 在恶性神经纤维鞘瘤组织中的表达量明显低于神经纤维瘤和正常组织,使用 mTOR 相关制剂与辛伐他汀合用,能够起到协同抗细胞增殖的作用。

3.3 *PTEN* 基因通过 Jak/Stat 信号通路对周围神经损伤修复的影响

Jak/Stat 信号通路是一条由细胞因子刺激的信号转导通路,参与免疫调节、细胞增殖分化及凋亡等生物学过程。该通路同样对神经相关疾病进程起到重要的作用,如慢性青光眼早期的视神经头胶质细胞增殖^[57]、坐骨神经瓦勒变性的损伤修复^[58]等。

Lu 等^[59]发现,*PTEN*/mTOR、Jak/Stat、DLK/JNK 信号轴在哺乳动物成年成熟神经元的固有再生能力及轴突再生中起到重要作用。Zareen 等^[5]认为,皮质脊髓束受损时,慢性刺激将 *PTEN* 转变为非活性磷酸化形式,此时受损神经轴突向生长状态过度,选择性阻断 Jak/stat 信号通路并不消除刺激依赖性轴突发芽,而是阻止了慢性运动皮质刺激产生的皮质脊髓束突触前位点增加,证实了 Jak/Stat 信号通路在活动依赖性皮质脊髓束突触形成中的重要作用。Riffault 等^[60]确认,RhoA-Rock-*PTEN* 途径能够降低神经系统中典型抑制性神经递质 GABA 的 A 型受体(GABAAR)的磷酸化水平,进而影响神经功能并触发内吞和降解内化受体;JAK-STAT-ICER 途径则在这一过程中受到影响,减少

GABAAR 的合成。Gallaher 等^[61]则在小鼠模型中看到,*PTEN* 基因缺失能够增强坐骨神经损伤后轴突的再生,当合并 *SOCS3* 双基因缺失时,再生能力更强,而 Jak/Stat 信号通路在坐骨神经损伤后早期阶段内被激活,但损伤后 7 d 时该通路恢复到基线水平。因而我们可知道,*PTEN* 基因能够通过激活或抑制 Jak/Stat 信号通路调控周围神经损伤修复。

3.4 *PTEN* 基因通过 MAPK 信号通路对周围神经损伤修复的影响

MAPK 是一组进化保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,在哺乳动物中有四种类型的 MAPK 级联通路,研究最广的是 ERK1/ERK2 (p42/p44) 激酶,此外 JNK/SAPK、p38 和 BMK1 均为其级联通路。该通路在细胞增殖、分化、转化及凋亡等过程中至关重要^[62]。

Zhang 等^[6]通过酪氨酸激酶通路的活性程度,发现了成人弥漫性胶质瘤聚集的分子表征亚群,确定了与 *NF1*、*Sprouty* 和 *PTEN* 共表达的胶质瘤基因模块,从而使 WHO II-IV 级成人弥漫性胶质瘤能够从 5 个独立数据集中聚集成两个亚型,分别与 RAS-RAF-MEK-MAPK 级联和 PI3K-AKT 通路相关,这项研究有助于解释该类型胶质瘤患者的存活情况,并从微环境相关层面研究胶质瘤的进展。Wang 等^[63]则发现,右旋美托咪定这种 α_2 肾上腺素能受体激动剂能够通过保护神经,起到治疗衰老大鼠的认知功能障碍的作用,这一过程中右旋美托咪定能够抑制异氟醚所致认知损害大鼠组织中 *PTEN* 和 p38 MAPK 蛋白的表达,并激活 p-AKT 蛋白表达。Farid 等^[64]则认为,恶性周围神经鞘瘤这种罕见病中,*PTEN* 功能丧失,MAPK 通路活性上调,从而为该类疾病患者的治疗护理提供了理论基础。Wang 等^[65]实验证实,细胞粘附分子 L1 通过激活 CK2 α 刺激神经细胞生成,这一过程导致 *PTEN* 和 p53 下调,同源 src/MAP 激酶信号通路参与这一过程。也有研究全面描述了丛状神经纤维瘤中 microRNA 的表达情况,发现丛状神经纤维瘤中 *PTEN* mRNA 表达降低,该病中参与 RAS-MAPK 通路的四种 miRNA (miR-370、miR-143、miR-181a 和 miR-145) 出现异常表达^[66]。

4 结语与展望

当前的研究中,周围神经损伤修复的机制并不明确,临床医生无法针对性的用药促进其损伤后的修复进程,使该病的治疗效果不佳。研究证实,

PTEN 基因在周围神经损伤修复中起到重要作用, 它可以通过调控周围神经损伤后的突触再生、炎性及免疫反应、神经元凋亡、神经营养相关因子等过程以及 NF- κ B、PI3K/AKT/mTOR、Jak/stat、MAPK 等信号通路的作用, 影响周围神经损伤后的修复。由于 *PTEN* 基因功能多样且复杂, 需要更多的研究论述其在周围神经损伤修复中的作用机制, 从而为临床治疗该病提供实验依据。

参考文献:

- [1] Csolle MP, Ooms LM, Papa A, et al. PTEN and other PtdIns (3,4,5)P 3 lipid phosphatases in breast cancer [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9189–9212.
- [2] Ye K, Yu J, Li L, et al. Microvesicles from schwann-Like cells as a new biomaterial promote axonal growth [J]. J Biomed Nanotechnol, 2021, 17(2): 291–302.
- [3] Wang L, Chopp M, Szalad A, et al. Exosomes derived from schwann cells ameliorate peripheral neuropathy in type 2 diabetic mice [J]. Diabetes, 2020, 69(4): 749–759.
- [4] Xin H, Liu Z, Buller B, et al. MiR-17-92 enriched exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells enhance axon-myelin remodeling and motor electrophysiological recovery after stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2021, 41(5): 1131–1144.
- [5] Zareen N, Dodson S, Armada K, et al. Stimulation-dependent remodeling of the corticospinal tract requires reactivation of growth-promoting developmental signaling pathways [J]. Exp Neurol, 2018, 307: 133–144.
- [6] Zhang W, Lv Y, Xue Y, et al. Co-expression modules of NF1, PTEN and sprouty enable distinction of adult diffuse gliomas according to pathway activities of receptor tyrosine kinases [J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 59098–59114.
- [7] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. Nat Genet, 1997, 15(4): 356–362.
- [8] Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology [J]. Med Sci Monit, 2004, 10(10): 235–241.
- [9] Xiong Y, Ju L, Yuan L, et al. KNSTRN promotes tumorigenesis and gemcitabine resistance by activating AKT in bladder cancer [J]. Oncogene, 2021, 40(9): 1595–1608.
- [10] Ertay A, Liu H, Liu D, et al. WDHD1 is essential for the survival of PTEN-inactive triple-negative breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 1001–1016.
- [11] Stavropoulos A, Varras M, Philippou A, et al. Immunohistochemical expression of insulin-like growth factor-1Ec in primary endometrial carcinoma; Association with PTEN, p53 and survivin expression [J]. Oncol Lett, 2020, 20(6): 395–422.
- [12] Li X, Zhang S, Man K, et al. Schwann cell-specific Pten inactivation reveals essential role of the sympathetic nervous system activity in adipose tissue development [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 531(2): 118–124.
- [13] Huang Z, Ma W, Xiao J, et al. CircRNA_0092516 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis in osteoarthritis through the miR-337-3p/PTEN axis [J]. J Biochem, 2021, 69(4): 467–475.
- [14] Zheng C, Tang F, Min L, et al. PTEN in osteosarcoma: Recent advances and the therapeutic potential [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(2): 188405–188414.
- [15] Singh B, Singh V, Krishnan A, et al. Regeneration of diabetic axons is enhanced by selective knockdown of the PTEN gene [J]. Brain, 2014, 137(Pt 4): 1051–1067.
- [16] Dodd RD, Scherer A, Huang W, et al. Tumor subtype determines therapeutic response to chimeric polypeptide nanoparticle-based chemotherapy in PTEN-deleted mouse models of sarcoma [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(18): 5036–5047.
- [17] Cong M, Shen M, Wu X, et al. Improvement of sensory neuron growth and survival via negatively regulating *PTEN* by miR-21-5p-contained small extracellular vesicles from skin precursor-derived Schwann cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 80–95.
- [18] 陈歆维. PTEN 在大鼠喉返神经损伤修复过程中作用机制的初步研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2016.
- [19] Wong KM, Beirowski B. Multiple lines of inhibitory feedback on AKT kinase in Schwann cells lacking TSC1/2 hint at distinct functions of mTORC1 and AKT in nerve development [J]. Commun Integr Biol, 2018, 11(1): e1433441–e1433451.
- [20] Sun F, Park KK, Belin S, et al. Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3 [J]. Nature, 2011, 480(7377): 372–375.
- [21] Kar AN, Lee SJ, Sahoo PK, et al. MicroRNAs 21 and 199a-3p Regulate Axon Growth Potential through Modulation of Pten and mTor mRNAs [J]. eNeuro, 2021, 8(4): 0155–0176.
- [22] Ohtake Y, Hayat U, Li S. PTEN inhibition and axon regeneration and neural repair [J]. Neural Regen Res, 2015, 10(9): 1363–1368.
- [23] Liu Z, Yip PK, Adams L, et al. A single bolus of docosahexaenoic acid promotes neuroplastic changes in the innervation of spinal cord interneurons and motor neurons and improves functional recovery after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2015, 35(37): 12733–12752.
- [24] Urban MW, Ghosh B, Block CG, et al. Long-distance axon regeneration promotes recovery of diaphragmatic respiratory function after spinal cord injury [J]. eNeuro, 2019, 6(5): ENEURO.0096–19.
- [25] Kamo N, Ke B, Busuttill RW, et al. PTEN-mediated Akt/ β -catenin/Foxo1 signaling regulates innate immune responses in mouse liver ischemia/reperfusion injury [J]. Hepatology, 2013, 57(1): 289–298.
- [26] Li X, Wu S, Yan Q, et al. PTEN methylation promotes

- inflammation and activation of fibroblast-Like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 700373–700385.
- [27] Feng X, Jiang S, Leung W, et al. BuShen HuoXue decoction promotes decidual stromal cell proliferation via the PI3K/AKT pathway in unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 6868470–6868481.
- [28] Smith D, Tweed C, Fernyhough P, et al. Nuclear Factor- κ B activation in axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating axon regeneration: studies with etanercept [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(6): 691–700.
- [29] Schuld NJ, Hussong SA, Kapphahn RJ, et al. Immunoproteasome deficiency protects in the retina after optic nerve crush [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126768–e0126792.
- [30] Kan HW, Hsieh JH, Chien HF, et al. CD40-mediated HIF-1 α expression underlying microangiopathy in diabetic nerve pathology [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(4): dmm033647.
- [31] Zhang Q, Guo Y, Li H, et al. Protection against cerebral infarction by Withaferin A involves inhibition of neuronal apoptosis, activation of PI3K/Akt signaling pathway, and reduced intimal hyperplasia via inhibition of VSMC migration and matrix metalloproteinases [J]. *Adv Med Sci*, 2017, 62(1): 186–192.
- [32] Song W, Volosin M, Cragolini AB, et al. ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress TRK-mediated survival signaling in brain neurons [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(46): 15608–15615.
- [33] 李丛琴, 王强, 罗路, 等. 运动训练对卒中后抑郁大鼠 PTEN 诱导的炎症通路及海马神经元凋亡的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2020, 42(7): 577–582.
- [34] 林平, 陈毅, 梁淑霞, 等. NGF 和 PTEN 双基因诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化效果观察 [J]. *浙江医学*, 2020, 42(10): 1000–1005.
- [35] 周坤, 宋雪锋, 高雯雯. 甲氨蝶呤对大鼠急性脊髓损伤后的神经保护作用及对 PTEN/AKT/mTOR 信号通路的影响 [J]. *重庆医学*, 2020, 49(8): 1228–1232.
- [36] Sencar L, Güven M, Şaker D, et al. Ultrastructural effects of nerve growth factor and betamethasone on nerve regeneration after experimental nerve injury [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2020, 44(4–6): 436–449.
- [37] Liu Y, Luo Z, Wang C, et al. Electroacupuncture promoted nerve repair after peripheral nerve injury by regulating miR-1b and its target brain-derived neurotrophic factor [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 525144–525153.
- [38] Yuan Y, Yu F, Zhang Y, et al. Changes in proteins related to early nerve repair in a rat model of sciatic nerve injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(8): 1622–1627.
- [39] Cai M, Shao J, Wang Y, et al. Claudin 14/15 play important roles in early wallerian degeneration after rat sciatic nerve injury [J]. *Chin J Traumatol*, 2021, 24(6): 374–382.
- [40] Eggers R, de Winter F, Tannemaat MR, et al. GDNF gene therapy to repair the injured peripheral nerve [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 583184–583194.
- [41] Yu F, Yuan Y, Xu H, et al. Neutrophil peptide-1 promotes the repair of sciatic nerve injury through the expression of proteins related to nerve regeneration [J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25(3): 631–641.
- [42] Sultan N, Amin LE, Zaher AR, et al. Neurotrophic effects of dental pulp stem cells on trigeminal neuronal cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19694–19707.
- [43] Liu Y, Han N, Li Q, et al. Bioinformatics analysis of microRNA time-course expression in brown rat (*rattus norvegicus*): spinal cord injury self-repair [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2016, 41(2): 97–103.
- [44] Zhu G, Wang Y, Li J, et al. Chronic treatment with ginsenoside Rg1 promotes memory and hippocampal long-term potentiation in middle-aged mice [J]. *Neuroscience*, 2015, 292: 81–99.
- [45] Cho YS, Kim SJ, Kim KH. Evaluation of PTEN inhibitor following spinal cord injury on recovery of voiding efficiency and motor function observed by regeneration in spinal cord [J]. *Int Neurourol J*, 2020, 24(Suppl 2): 104–110.
- [46] Kou Y, Yu F, Yuan Y, et al. Effects of NP-1 on proliferation, migration, and apoptosis of Schwann cell line RSC96 through the NF- κ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4127–4140.
- [47] 王寻, 国敏, 王卫峰, 等. PINK1 介导缺氧损伤时星形胶质细胞对神经元的保护作用 [J]. *中国临床神经科学*, 2016, 24(6): 601–607.
- [48] 赵敏. 海马神经元 TLR4 介导的 PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路在神经炎症中的作用 [D]. 南通: 南通大学, 2014.
- [49] 王泽夏. 姜黄素对神经胶质瘤生长与迁移的影响及机制研究 [D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2019.
- [50] Xian M, Cai J, Zheng K, et al. Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12(17): 8056–8067.
- [51] Xiao X, Li W, Rong D, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles facilitate the repair of spinal cord injury via the miR-29b-3p/PTEN/Akt/mTOR axis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 212–222.
- [52] Huang S, Yuan H, Li W, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharides protect against MPP-Induced neurotoxicity via the Akt/mTOR and Nrf2 pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8843899–8843912.
- [53] Li X, Zhang S, Chiu AP, et al. Conditional inactivation of Nf1 and Pten in Schwann cells results in abnormal neuromuscular junction maturation [J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9(1): 297–303.

郭晨博,毛玉宁,张延英,等. 长链非编码 RNA 在胰腺癌吉西他滨耐药研究中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 131-136.

Guo CB, Mao YN, Zhang YY, et al. Role of long noncoding RNAs in gemcitabine resistance of pancreatic cancer [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 131-136.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.018

长链非编码 RNA 在胰腺癌吉西他滨耐药研究中的作用

郭晨博^{1,2}, 毛玉宁^{2,3}, 张延英¹, 汪永锋^{1*}, 师长宏^{2*}

(1.甘肃中医药大学,兰州 730030;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】 获得性耐药是引起胰腺癌高致死率的主要原因,其中吉西他滨耐药在临床中最为常见。探究胰腺癌吉西他滨耐药的具体分子机制,有助于临床合理使用吉西他滨,提高患者的生活质量和生存率。长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)被报道在胰腺癌吉西他滨耐药中发挥着重要作用,并具有肿瘤耐药后特异性表达的特点,可能成为恢复胰腺癌吉西他滨敏感性的理想靶点。本文通过总结各种 lncRNA 在胰腺癌吉西他滨耐药中的具体作用机制,以期探索基于 lncRNA 筛选胰腺癌吉西他滨耐药可能的治疗靶点。

【关键词】 长链非编码 RNA;胰腺癌;吉西他滨耐药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0131-06

Role of long noncoding RNAs in gemcitabine resistance of pancreatic cancer

GUO Chenbo^{1,2}, MAO Yuning^{2,3}, ZHANG Yanying¹, WANG Yongfeng^{1*}, SHI Changhong^{2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China. 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032. 3. Yanan University School of Medicine, Yanan 716000)

【Abstract】 Acquired drug resistance is a major cause of high lethality in pancreatic cancer. Gemcitabine resistance is the most common in the clinic. Exploring the specific molecular mechanism of gemcitabine resistance in pancreatic cancer will facilitate using gemcitabine rationally in the clinic and improve the quality of life and survival of patients. Long non-coding RNAs (lncRNAs) play an important role in gemcitabine resistance of pancreatic cancer. Because of specific expression after drug resistance in tumors, lncRNAs have become ideal targets to restore gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer. In this review, we summarize the specific mechanisms of various lncRNAs in gemcitabine resistance of pancreatic cancer to explore possible therapeutic targets related to lncRNA to alleviate gemcitabine resistance of pancreatic cancer.

【Keywords】 long non-coding RNA; pancreatic cancer; gemcitabine resistance

【基金项目】 国家自然科学基金(31572340,31772546)。

【作者简介】 郭晨博(1995—),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤的生物学性状及中医药防治基础研究。E-mail: 821962209@qq.com

【通信作者】 师长宏(1973—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

汪永锋(1967—),男,教授,研究方向:医学解剖学研究。E-mail: wyf@gszy.edu.cn

* 共同通信作者

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)是全球危害最严重的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别位于恶性肿瘤的第七位和第六位。手术切除仍是 PC 患者唯一可能治愈的手段,但由于 PC 早期缺乏临床症状和体征,直到晚期才被发现,导致手术效果不佳^[1]。虽然近几年免疫疗法在 PC 治疗方面取得了一定的进展,但化疗仍然是 PC 治疗的主要手段^[2]。吉西他滨(gemcitabine, GEM)是治疗 PC 的一线化疗药物,由于长期使用 GEM 容易产生耐药性,导致其治疗效果不佳^[3]。因此深入研究 GEM 产生耐药的原因和机制对 PC 的治疗具有重要的意义。

文献报道胰腺癌吉西他滨耐药与细胞自噬、肿瘤细胞干性、上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等多种肿瘤表型密切相关^[4]。胰腺癌吉西他滨耐药具体的调控机制并不明确,明确其机制有助于改善吉西他滨的治疗效果。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)具有调控细胞自噬、肿瘤细胞干性、上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、细胞凋亡等多种生物学途径,研究表明 lncRNA 可通过以上途径调控肿瘤细胞耐药^[5]。本文对 lncRNAs 在胰腺癌耐药中的作用进行归纳总结,以期为临床提高 GEM 敏感性提供理论基础,为探索新的干预靶点提供思路。

1 lncRNA

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一种大小超过 200 bp 的非编码 RNA,异常表达的 lncRNA 与肿瘤的发生、发展密切相关, lncRNA 可以通过与 DNA、RNA 以及蛋白质相互作用,调节蛋白质/RNA 稳定性^[6]。lncRNA 调节细胞生物学活动取决于其在细胞中的定位:在细胞核中 lncRNA 通过染色质相互作用和重塑来调节转录程序,并通过支架建立核室的空间组织。例如: lncRNA 作为诱饵调控蛋白与 DNA 或其他蛋白的结合^[7]。lncRNA-生长停滞特异性转录物 5(growth arrest-specific transcript 5, GAS5)充当诱饵,使效应蛋白与受体蛋白结合,从而使肿瘤转移和耐药^[8]; lncRNA 浆细胞瘤多样异位基因(plasmacytomavariant translocation 1, PVT1)中含有几个基因内增强子,能通过调节 MYC 癌基因启动子的转录,抑制 MYC 癌基因的表达,从而调控肿瘤的发展与耐药^[8]。在细胞质中, lncRNA 的功能是介导

信号转导途径、翻译程序和基因表达的转录后调控。例如: lncRNA-HOX 转录反义 RNA(HOX transcription antisense intergenic RNA, HOTAIR)可以海绵化 miRNA,消除 lncRNA HOTAIR 对癌基因的促进作用,使肿瘤耐药^[9]; lncRNA ANRIL 通过染色质修饰复合物调节顺式和反式基因,以及影响 microRNA 信号网络调控肿瘤的发展^[10]; lncRNA 作为竞争性内源 RNA(ceRNAs),可以隔离 miRNA,从而阻止其靶向 mRNA 的抑制, lncRNA SNHG14 被发现作为 miRNA 的竞争性内源 RNA,调节癌症中癌基因的表达从而调控肿瘤的发展^[11];长基因间非蛋白编码 RNA(reprogramming regulator, linc-ROR)首次在诱导多能干细胞(iPSCs)中被发现,受到肿瘤多能因子的影响,从而促进肿瘤的发展^[12]。linc-DYNC2H1-4 主要位于胞浆中,可以海绵化靶向 miRNA,以恢复 EMT 和 CSC 相关基因的表达^[13]。lncRNA 通过多种方式在表观遗传、转录、转录后、翻译和翻译后水平发挥调控作用,影响耐药性的产生,可能成为多种癌症诊断的新标记物和治疗的重要靶点。

2 lncRNA 通过调节细胞自噬调控胰腺癌吉西他滨耐药

自噬是细胞质成分在细胞内降解的一种机制,在应激条件下维持细胞内稳态。在肿瘤中,自噬具有抑制肿瘤和支持肿瘤进展的双重作用,它参与耐药的发展,使肿瘤细胞不受化疗药物的影响,也可杀死不活跃的肿瘤细胞,因此自噬在肿瘤耐药中起到了关键作用^[14]。研究表明,胰腺癌吉西他滨耐药和自噬有着非常密切的关系,而 lncRNA 在自噬调控中至关重要,通过调节自噬相关 lncRNA 可恢复胰腺癌吉西他滨的敏感性^[15]。lncRNA 调节自噬的具体机制可以分为 3 类:(1) lncRNA 充当竞争性内源 RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA)结合 miRNA 以调节 miRNA 表达,从而影响自噬进程;(2) lncRNA 通过影响自噬相关基因的表达;(3) lncRNA 通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制自噬介导的细胞凋亡^[16]。构建胰腺癌吉西他滨耐药细胞株,是研究 lncRNA 在胰腺癌吉西他滨耐药中作用的基础。Wang 等^[17]探究 lncRNA ANRIL 在胰腺癌吉西他滨耐药中的机制发现 lncRNA ANRIL 通过靶向 miR-181a,激活 HMGB1 诱导的细胞自噬,从而增强胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药。Zhang 等^[18]通过体外实验发现 lncRNA SNHG14 通过分泌 miR-101 激活

胰腺癌细胞自噬增强吉西他滨耐药性。Zhou 等^[19]通过体外实验发现 lncRNA PVT1 通过激活 Wnt/ β -catenin 和调节 miR-6195p/Pygo2 以及 miR-619-5p/ATG14 轴的自噬途径,从而促进胰腺癌对吉西他滨的耐药性;在体内 CDX 模型中验证了 lncRNA PVT1 在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用。Li 等^[20]在体外实验中发现 linc-ROR 通过 miR-124/PTBP1/PKM2 轴诱导自噬使胰腺癌细胞对吉西他滨产生耐药;再利用 PDX 模型验证了 linc-ROR 在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用。

肿瘤耐药细胞通过调节自噬增加对化疗的抵抗力,自噬在胰腺癌吉西他滨耐药中发挥着重要的作用,但目前自噬调控的机制并不明确,这给临床通过抑制自噬增加胰腺癌吉西他滨敏感性的研究带来了困扰。已有报道称 lncRNA PVT1 是一种致癌基因,作为 ceRNA 或分子海绵负调控 miRNA 调节自噬促进了肿瘤的发展和化疗药物耐药,lncRNA PVT1 可能通过诱导自噬调节胰腺癌吉西他滨耐药^[21]。在未来研究中 lncRNA PVT1 可能成为治疗胰腺癌吉西他滨耐药的新靶点^[22]。

3 lncRNA 通过调节肿瘤细胞干性调控胰腺癌吉西他滨耐药

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤细胞的一个亚群,可以驱动肿瘤的发生与复发,CSCs 是肿瘤发生的来源,也是肿瘤化疗耐药的原因之一。CSCs 对化疗和放疗均有抵抗作用,放化疗后残留的 CSCs 能够促进肿瘤复发和对放化疗产生抵抗^[23]。研究发现,PC 在经过吉西他滨治疗后,胰腺癌细胞内 CSCs 的含量显著增加。lncRNAs 是 CSCs 的关键调控因子,能够促进肿瘤耐药^[24]。在膀胱癌中 lncRNAs 通过增加 CSCs 在肿瘤中的比例使化疗药物产生耐药^[25]。综上所述 lncRNA、CSCs 和耐药这 3 者可能有着密切的关系。Liu 等^[26]采用胰腺癌细胞株 PANC-1、ASPC-1、CAPAN-2、SW1990,通过实验发现 lncRNA GAS5 能逆转 CSCs 介导的吉西他滨耐药。Wang 等^[27]构建胰腺癌 PANC-1 吉西他滨耐药细胞株,通过实验发现吉西他滨通过诱导 lncRNA HOTAIR 表达进而诱导胰腺癌干细胞耐药。Gao 等^[28]分别建立了人胰腺癌 BxPC-3-Gem 耐药细胞和 PDX 模型,体内外实验发现 linc-DYNC2H1-4 通过分泌 miR-145 促进 CSCs 使胰腺癌吉西他滨耐药。lncRNA 不止是可以通过促进肿瘤细胞干性促进肿瘤细胞产生耐药,部分 lncRNA 也可通过调节

肿瘤细胞干性逆转耐药。Yoshida 等^[29]建立 BxPC3 耐药株 CDX 模型,通过实验发现 lncRNA PVT1 通过调控胰腺癌细胞中 CSCs 的含量逆转胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药性。

综上所述,CSCs 与胰腺癌吉西他滨耐药有着密切的联系,研究 CSCs 与吉西他滨耐药的关系,可为临床上治疗胰腺癌吉西他滨耐药提供新的思路和方法。目前,在乳腺癌耐药中,通过调控 CSCs 信号通路的药物已进入临床试验阶段^[30]。已有研究证明 lncRNA PVT1 可在体外和体内增强肝 CSC 能力,主要通过稳定核仁蛋白 NOP2 介导肝细胞获得干细胞样特性,研究发现 lncRNA PVT1 具有调节肿瘤细胞干性的作用^[31],lncRNA PVT1 通过调节肿瘤细胞干性调控胰腺癌吉西他滨耐药,可能为以后临床上肿瘤干性程度高的胰腺癌治疗提供了潜在的靶点。

4 lncRNA 通过调节 EMT 调控胰腺癌吉西他滨耐药

上皮细胞-间充质细胞转变(EMT)是一种使细胞和细胞粘附复合物松散并增强细胞的转移和侵袭特性的胚胎程序。肿瘤细胞需要经历这个转变过程而实现转移,同时使肿瘤细胞获得更强的侵袭性以及对细胞凋亡的抵抗性^[32]。研究发现吉西他滨耐药细胞表现出更强的侵袭性,这有可能和肿瘤耐药之后发生 EMT 相关^[33]。lncRNA 可通过内源性竞争 miRNA,调控与 EMT 相关的一些转录因子的表达,进而影响 EMT 进程^[34]。如在胆囊癌中,lncRNA 通过调控 EMT,促进胆管肿瘤细胞吉西他滨耐药^[35]。在胰腺癌中,Liu 等^[26]分别使用胰腺癌细胞株 PANC-1、ASPC-1、CAPAN-2、SW1990 进行体外实验,发现 lncRNA GAS5 通过靶向 miR-221/SOCS3 逆转 EMT 介导的胰腺癌吉西他滨耐药。Gao 等^[28]建立人胰腺癌 BxPC-3-Gem 耐药细胞和肿瘤异种移植模型,发现 linc-DYNC2H1-4 通过分泌 miR-145 促进胰腺癌细胞 EMT 使胰腺癌吉西他滨耐药。

对比肿瘤细胞和肿瘤耐药细胞发现肿瘤耐药细胞表现出了更强的侵袭性,这有可能和 EMT 有关。lncRNA 具有调控 EMT 的作用,需要找出调控 EMT 的关键 lncRNA,研究表明 lncRNA GAS5 是调节 EMT 的关键分子,lncRNA GAS5 可作为 miRNA 或剪切因子的诱饵,通过靶向结合 miRNA 而负性调控 miRNA 下游靶基因的表达调控 EMT^[36],这可能为临床上治疗 EMT 程度高的胰腺癌吉西他滨耐药提供新的靶点。

表 1 lncRNA 在胰腺癌吉西他滨耐药中的作用机制
Table 1 The mechanism of lncrna in gemcitabine resistance of pancreatic cancer

相关表型 Associated phenotypes	lncRNA	上调/下调 Up/down regulation	模型 Model	细胞系 Cell lines	作用靶点 Targets of action	文献 Literature
	lncRNA PVT1	↑	CDX	SW1990, PANC-1	Wnt/ β -catenin, miR-6195p/Pygo2, miR-619-5p/ATG14	[19]
自噬 Autophagy	lncRNA ANRIL	↑	耐药株 Resistant strains	PANC-1	miR-181a, HMGB1	[17]
	lncRNA SNHG14	↑	耐药株 Resistant strains	SW1990	miR-101	[18]
	linc-ROR	↑	PDX	PANC-1, MIAPaCa-2	miR-124/PTBP1/PKM2	[20]
	lncRNA HOTAIR	↑	耐药株 Resistant strains	PANC-1	CSCs	[27]
肿瘤干细胞 Cancer stem cells	lncRNA PVT1	↑	CDX	BxPC3	CSCs	[29]
	lncRNA GAS5	↓	耐药株 Resistant strains	PANC-1, ASPC-1, CAPAN-2, SW19990	miR-221/SOCS3, CSCs	[26]
	linc-DYNC2H1-4	↑	PDX	BxPC-3	miR-145, CSCs	[28]
EMT	lncRNA GAS5	↓	耐药株 Resistant strains	PANC-1, ASPC-1, CAPAN-2, SW19990	miR-221/SOCS3	[26]
	linc-DYNC2H1-4	↑	PDX	BxPC-3	miR-145	[28]

5 总结与展望

胰腺癌被称为“癌王”,5 年内生存率极低,化疗预后差,准确评估患者状况是胰腺癌患者治疗最重要的环节,因此找到胰腺癌吉西他滨耐药的生物标志物有着重要的意义。目前 lncRNA 表达对患者预后的研究发现癌组织和血清中的 lncRNA 与癌旁组织有着明显的差异,而癌组织和血清中的 lncRNA 表达呈正相关,再通过生存曲线分析血清中 lncRNA 表达与癌症患者预后的关系。因此,将以上 lncRNA 进行分析对比,以期寻找到胰腺癌吉西他滨耐药的预后标志物。近几年测定患者唾液中 lncRNA 水平并探讨其作为胰腺癌的早期生物学指标的价值取得了令人满意的成果,提示我们可以从患者体液,如唾液、尿液、血液等标本获取 lncRNA,从而提高其临床应用的可行性^[37]。

研究表明胰腺癌吉西他滨耐药与 lncRNA 关系密切,不同的 lncRNA 通过不同的途径发挥各自的作用(见表 1)。大多数 lncRNA 在胰腺癌吉西他滨耐药中上调,通过直接或间接的调节相关基因的表达影响胰腺癌吉西他滨耐药。其中也有单个 lncRNA 通过调节多个表型发挥作用,例如:lncRNA PVT1 可以通过调节自噬和 CSCs 促使胰腺癌吉西

他滨耐药,lncRNA GAS5 也可通过调节 CSCs 和自噬促进胰腺癌吉西他滨耐药。通过揭示不同 lncRNA 在胰腺癌吉西他滨耐药中的具体作用机制,可为临床治疗胰腺癌吉西他滨耐药带来新的靶向药物。比如 lncRNA H19 的靶向药物 BC-819(DTA-H19),目前正在进行包括 PC 在内的人类恶性肿瘤的临床试验^[38]。目前临床上 PC 早期生物标志物的缺乏和获得性耐药是 PC 治疗的难点,因此,迫切需要寻找一种新的肿瘤生物标志物和治疗靶点来进行早期诊断和治疗。未来应大量开展胰腺癌动物模型实验,进一步深入研究 lncRNA 的潜在机制,发现具有肿瘤耐药后特异性表达的 lncRNA,基于特定 lncRNA 的表达情况对化疗药物的效果进行评判,这将是未来临床上治疗 PC 所要突破的重点问题。综上所述,发现 lncRNA PVT1 可以调控多个表型调节胰腺癌吉西他滨耐药,并在不同的胰腺癌吉西他滨耐药细胞株得到了验证。期望在未来,基于 lncRNA PVT1 在胰腺癌吉西他滨耐药中的研究可以在临床上取得重要的突破。

参考文献:

- [1] Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(8): 487-505.

- [2] Springfield C, Jäger D, Büchler MW, et al. Chemotherapy for pancreatic cancer [J]. Presse Med, 2019, 48(3): e159–e174.
- [3] Wei L, Wen JY, Chen J, et al. Oncogenic ADAM28 induces gemcitabine resistance and predicts a poor prognosis in pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(37): 5590–5603.
- [4] Zahan T, Das PK, Akter SF, et al. Therapy resistance in cancers: phenotypic, metabolic, epigenetic and tumour microenvironmental perspectives [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(18): 2190–2206.
- [5] Lin Z, Lu S, Xie X, et al. Noncoding RNAs in drug-resistant pancreatic cancer: A review [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110768.
- [6] Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. Lncation: lncRNA localization and function [J]. J Cell Biol, 2021, 220(2): e202009045.
- [7] Paraskevopoulou MD, Hatzigeorgiou AG. Analyzing miRNA-lncRNA interactions [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1402: 271–286.
- [8] 王利然, 杨丽红, 宁文华, 等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 143–149.
- [9] Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, et al. HOTAIR lncRNA: A novel oncogenic propellant in human cancer [J]. Clin Chim Acta, 2020, 503: 1–18.
- [10] Kong Y, Hsieh CH, Alonso LC. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B locus with roles in cancer and metabolic disease [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9: 405.
- [11] Shen S, Wang Y, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 14, a promising biomarker and therapeutic target in malignancy [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 746714.
- [12] Pan Y, Li C, Chen J, et al. The emerging roles of long noncoding RNA ROR (lncRNA-ROR) and its possible mechanisms in human cancers [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(1–2): 219–229.
- [13] Gao Y, Zhang Z, Li K, et al. Linc-DYNC2H1-4 promotes EMT and CSC phenotypes by acting as a sponge of miR-145 in pancreatic cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2924.
- [14] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer [J]. Chin J Cancer, 2017, 36(1): 52.
- [15] Xu X, Cui L, Zhong W, et al. Autophagy-associated lncRNAs: promising targets for neurological disease diagnosis and therapy [J]. Neural Plast, 2020, 2020: 8881687.
- [16] 白茹梦, 卓帅帅, 孙苗苗, 等. 长链非编码 RNA 在肿瘤细胞自噬中的调控作用 [J]. 中国肿瘤, 2020, 29(5): 373–378.
- [17] Wang L, Bi R, Li L, et al. lncRNA ANRIL aggravates the chemoresistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine by targeting inhibition of miR-181a and targeting HMGB1-induced autophagy [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(15): 19272–19281.
- [18] Zhang X, Zhao P, Wang C, et al. SNHG14 enhances gemcitabine resistance by sponging miR-101 to stimulate cell autophagy in pancreatic cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 510(4): 508–514.
- [19] 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.
- [20] Li C, Zhao Z, Zhou Z, et al. Linc-ROR confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells via inducing autophagy and modulating the miR-124/PTBP1/PKM2 axis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(6): 1199–1207.
- [21] Pan X, Zheng G, Gao C. LncRNA PVT1: a novel therapeutic target for cancers [J]. Clin Lab, 2018, 64(5): 655–662.
- [22] Sun Y, Ren D, Zhou Y, et al. Histone acetyltransferase 1 promotes gemcitabine resistance by regulating the PVT1/EZH2 complex in pancreatic cancer [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(10): 878.
- [23] Makena MR, Ranjan A, Thirumala V, et al. Cancer stem cells: Road to therapeutic resistance and strategies to overcome resistance [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(4): 165339.
- [24] Yang Z, Zhao N, Cui J, et al. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210 [J]. Cell Oncol (Dordr), 2020, 43(1): 123–136.
- [25] Chen X, Xie R, Gu P, et al. Long noncoding RNA LBCS inhibits self-renewal and chemoresistance of bladder cancer stem cells through epigenetic silencing of SOX2 [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(4): 1389–1403.
- [26] Liu B, Wu S, Ma J, et al. lncRNA GAS5 reverses EMT and tumor stem cell-mediated gemcitabine resistance and metastasis by targeting miR-221/SOCS3 in pancreatic cancer [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 13: 472–482.
- [27] Wang L, Dong P, Wang W, et al. Gemcitabine treatment causes resistance and malignancy of pancreatic cancer stem-like cells via induction of lncRNA HOTAIR [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4773–4780.
- [28] Gao Y, Zhang Z, Li K, et al. Linc-DYNC2H1-4 promotes EMT and CSC phenotypes by acting as a sponge of miR-145 in pancreatic cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(7): e2924.
- [29] Yoshida K, Toden S, Ravindranathan P, et al. Curcumin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine by attenuating PRC2 subunit EZH2, and the lncRNA PVT1 expression. Carcinogenesis [J]. 2017, 38(10): 1036–1046.
- [30] Palomerias S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting breast cancer stem cells to overcome treatment resistance [J]. Molecules, 2018, 23(9): 2193.
- [31] Lu D, Luo P, Wang Q, et al. lncRNA PVT1 in cancer: A review and meta-analysis [J]. Clin Chim Acta, 2017, 474: 1

- 7.
- [32] Lambert AW, Weinberg RA. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21: 325-338.
- [33] Bulle A, Dekervel J, Libbrecht L, et al. Gemcitabine induces epithelial-to-mesenchymal transition in patient-derived pancreatic ductal adenocarcinoma xenografts [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 765-779.
- [34] Gugnoni M, Ciarrocchi A. Long noncoding RNA and epithelial mesenchymal transition in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1924.
- [35] Xue Z, Yang B, Xu Q, et al. Long non-coding RNA SSTR5-AS1 facilitates gemcitabine resistance via stabilizing NONO in gallbladder carcinoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 522(4): 952-959.
- [36] Zhu L, Zhou D, Guo T, et al. LncRNA GAS5 inhibits invasion and migration of lung cancer through influencing EMT process [J]. *J Cancer*, 2021, 12(11): 3291-3298.
- [37] Chi Y, Wang D, Wang J, et al. Long non-coding RNA in the pathogenesis of cancers [J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1015.
- [38] Sorin V, Ohana P, Gallula J, et al. H19-promoter-targeted therapy combined with gemcitabine in the treatment of pancreatic cancer [J]. *ISRN Oncol*, 2012, 2012: 351750.

[收稿日期]2022-01-19

(上接第 130 页)

- [54] Leibinger M, Andreadaki A, Gobrecht P, et al. Boosting central nervous system axon regeneration by circumventing limitations of natural cytokine signaling [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(10): 1712-1725.
- [55] 彭湃, 杨军, 罗琴, 等. 右美托咪定对神经胶质瘤细胞 PTEN/Akt/mTOR 介导自噬及放疗敏感性的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2021, 33(8): 14-18.
- [56] Bradtmöller M, Hartmann C, Zietsch J, et al. Impaired Pten expression in human malignant peripheral nerve sheath tumours [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47595-e47604.
- [57] Lozano DC, Choe TE, Cepurna WO, et al. Early optic nerve head glial proliferation and Jak-Stat pathway activation in chronic experimental glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(4): 921-932.
- [58] Yao D, Li M, Shen D, et al. Expression changes and bioinformatic analysis of Wallerian degeneration after sciatic nerve injury in rat [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(3): 321-332.
- [59] Lu Y, Belin S, He Z. Signaling regulations of neuronal regenerative ability [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 27: 135-142.
- [60] Riffault B, Medina I, Dumon C, et al. Pro-brain-derived neurotrophic factor inhibits GABAergic neurotransmission by activating endocytosis and repression of GABAA receptors [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(40): 13516-13534.
- [61] Gallaher ZR, Steward O. Modest enhancement of sensory axon regeneration in the sciatic nerve with conditional co-deletion of PTEN and SOCS3 in the dorsal root ganglia of adult mice [J]. *Exp Neurol*, 2018, 303: 120-133.
- [62] Sun Y, Liu W, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [63] Wang X, Zhao B, Li X. Dexmedetomidine attenuates isoflurane-induced cognitive impairment through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptosis in aging rat [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 17281-17288.
- [64] Farid M, Demicco EG, Garcia R, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors [J]. *Oncologist*, 2014, 19(2): 193-201.
- [65] Wang Y, Schachner M. The intracellular domain of L1CAM binds to casein kinase 2 α and is neuroprotective via inhibition of the tumor suppressors PTEN and p53 [J]. *J Neurochem*, 2015, 133(6): 828-843.
- [66] Masliah-Planchon J, Pasmant E, Luscan A, et al. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 473-484.

[收稿日期]2021-09-30

廉舒博,陈珏蓉,何苇. 初级纤毛相关信号通路在小鼠腭发育中的机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 137-141.

Lian SB, Chen JR, He W. Research progress on the mechanism of primary cilia and related signaling pathways in mouse palatal development [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 137-141.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.019

初级纤毛相关信号通路在小鼠腭发育中的机制研究进展

廉舒博,陈珏蓉,何 苇*

(遵义医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,贵州 遵义 563000)

【摘要】 初级纤毛是以微管为基础的细胞器,可感知细胞外机械和化学信号变化,并通过介导多种分子信号通路将信息传导至细胞内,在发育、细胞迁移和细胞分化过程中,扮演着重要角色。近年来有研究发现,小鼠胚胎腭窝上皮和间充质细胞上存在初级纤毛,并且,初级纤毛自身及其传递的信号因子与腭发育密切相关。因此本文将近年来针对初级纤毛及相关信号通路导致腭发育异常机制的研究进展作一综述,以期为唇腭裂这一领域的研究者提供新的思考。

【关键词】 初级纤毛;腭发育;Wnt 信号通路;Hh 信号通路;Shh 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0137-05

Research progress on the mechanism of primary cilia and related signaling pathways in mouse palatal development

LIAN Shubo, CHEN Juerong, HE Wei*

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

【Abstract】 Primary cilia are microtubule-based organelles that sense extracellular mechanical and chemical signals, and transmit information into cells by mediating various molecular signaling pathways, which play an important role in development, cell migration, and cell differentiation. In recent years, primary cilia have been found on epithelial and mesenchymal cells of the mouse embryonic palatal process, and the primary cilia themselves and their signaling factors are closely related to palate development. Therefore, this article reviews the recent research progress on the mechanism of palatal dysplasia caused by primary cilia and related signaling pathways to provide new ideas for researchers in the fields of cleft lip and palate.

【Keywords】 primary cilia; palatal development; Wnt signaling pathways; hedgehog signaling pathways; Sonic Hedgehog signaling pathways

初级纤毛是以微管为基础的天线状结构细胞器,在进化上十分保守,是细胞外信号(如生长因子、激素、光、机械刺激、气味和发育形态等)的传感器^[1]。有研究报道 Hedgehog (Hh)、Wnt、PDGF α 和 Ca²⁺ 通道等信号受体定位于纤毛膜上^[2-4],并对机

械应力等多种刺激以及来自细胞外环境的各种信号分子作出反应^[5-6]。初级纤毛的功能或结构缺陷可导致相关信号通路发挥异常,而引起一系列的疾病,称为纤毛相关疾病^[7]。有研究表明腭的生长发育和融合受 Sonic Hedgehog (Shh)、Wnt、FGF 及 TGF

【基金项目】 国家自然科学基金(82160176)。

【作者简介】 廉舒博(1996—),男,在读硕士研究生,研究方向:唇腭裂基础与临床。E-mail: 15688981982@163.com

【通信作者】 何苇(1977—),女,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:唇腭裂基础与临床。E-mail: heweichenhui@163.com

等多种信号通路调节^[8-11],其信号传导异常可导致胚胎多种器官发育障碍,其中包括腭的发育。本文对腭发育机制中相关的初级纤毛及相关信号通路作一综述,以期为先天性腭裂发生的防治提供一定的研究基础。

1 初级纤毛的结构与功能

初级纤毛(primary cilia, PC)是根据细胞周期和发育规律进行组装和拆卸的动态细胞器,与细胞的分化状态和微环境密切相关。PC 由 9 对微管组成的中央轴突组成,由基底体成核,并被富含特定信号受体的双层脂膜和离子通道所包围,基底体结构来源于细胞分裂后的中心粒^[12]。在基底和纤毛之间有一个被称为纤毛过渡区(transiton zone, TZ)的区域,它包含特殊的门控结构,如 Y-连接,它与基底体过渡纤维一起,控制纤毛蛋白的进出,从而有助于细胞器的区域化^[13]。除了 TZ 和基底体过渡纤维的门控外,纤毛的组成和功能也受到主动转运机制的调节,包括针对特定受体或信号分子的囊泡运输途径^[14],以及纤毛内运输系统(intraflagellar transport, IFT),它上下拉动轴丝微管,介导特定的纤毛蛋白进入或离开细胞器^[15]。

由于初级纤毛缺乏合成其组装、维持及转运所需的蛋白质的能力,所以需要依赖于 IFT^[16]。IFT 是由多蛋白复合体(称为 IFT 蛋白)沿轴丝介导的双向转运系统。IFT 蛋白根据生化特性及运输方向不同分为 IFT-A 复合体 IFT-B 复合体。IFT-B 复合体介导的纤毛蛋白从纤毛基底部运输到纤毛顶部的运输称为顺向转运^[17]。IFT-B 复合体包含了 16 种蛋白质(IIFT20、IFT22、IFT25、IFT27、IFT38、IFT46、IFT52、IFT54、IFT56、IFT57、IFT70、IFT74、IFT80、IFT81、IFT88 和 IFT172),其中,IFT88 是 IFT-B 复合物的核心组件^[18]。顺向转运还依赖于异源三聚体驱动蛋白-2 蛋白(heterotrimeric kinesin-2 protein, kinesin-2),该蛋白由驱动蛋白-3A(kinesin like protein 3A, KIF3A)和驱动蛋白-3B(kinesin like protein 3B, KIF3B)以及一个附属亚基运动相关蛋白(kinesin-associated protein, KAP)组成。从纤毛顶端到基底部的运输称为逆向转运,是由 Dynein-2 和 IFT 复合体 A 介导的^[16-17]。IFT-A 复合体由 6 种蛋白组成,包括 IFT43、IFT121、IFT122、IFT139、IFT140 和 IFT144,其中,IFT122 是 IFT-A 复合体的中心枢纽^[19-20]。由于 PC 自身需依靠 IFT 蛋白介导相关信

号分子蛋白的转运,IFT 系统的任何蛋白成分的缺失都会导致初级纤毛结构、功能及相关信号通路的异常,从而引起纤毛相关疾病^[7,21]。

2 腭的发育过程

腭的发育过程是颅面部形态发生的重要事件。从宏观角度来看,腭由原发腭和继发腭融合而成,原发腭来自中鼻突,并最终形成前牙区的硬腭。继发腭来自左右两个上颌突,并向中线方向生长,但由于舌发育较快,且几乎充满了原始口腔,因此继发腭在舌两侧垂直向下生长;由于下颌骨的长度和宽度的增加以及头颅因发育而向上抬高等因素,舌的形态变得扁平且位置逐渐下降,继发腭向水平方向转动并向中线生长;继发腭已经达到舌面上方的水平位置,继发腭继续向两个腭突交汇的中线方向快速生长,在两者中线处接触,最终发生融合。在腭发育的过程中,即腭突的生长、上抬、附着、融合中的任何一个过程发生异常,都会引起腭裂发生^[22-23]。

3 相关信号通路

3.1 Hedgehog 信号通路

Hedgehog 家族分泌的信号分子对于许多生物体的正常胚胎发育至关重要。在哺乳动物中,Shh 在胚胎内许多区域的发育过程中起着关键作用,包括腭部发育。哺乳动物有 3 种 Hh 同源蛋白,分别为 Sonic Hedgehog(Shh)、Desert Hedgehog(Dhh)以及 Indian Hedgehog(Ihh)^[2,24]。Shh 和 Ihh 在许多组织中都具有重要功能,有时是重叠的功能,其中 Shh 信号通路与腭发育的关系最为密切。Shh 信号通路可通过调节腭胚突上皮-间充质之间的交互作用,从而对双侧腭突的发育产生重要影响^[25]。

免疫定位实验表明,Shh 信号转导的许多核心成分大多定位在初级纤毛上,并随着配体的不同作用而改变其分布^[24]。Shh 信号通路涉及与跨膜受体(patched 1, Ptch1)的结合,在没有 Shh 信号的情况下,Ptch1 抑制跨膜平滑蛋白(smoothened protein, Smo)进入 PC, Smo 是一种 7 次跨膜蛋白,其结构类似于 G 蛋白偶联受体;当 Shh 配体存在并与 Ptch1 结合时,可将 Ptch1 移出 PC 并解除对 Smo 的抑制,激活的 Smo 进入初级纤毛并通过抑制融合抑制因子(suppressor of fused, Sufu)激活 Gli 家族转录因子(包括 Gli1、Gli2、Gli3)以调控 Hedgehog 下游靶基因

的表达^[26-27]。驱动蛋白家族成员 KIF7 是纤毛中 Gli 蛋白运输的最佳候选物,是 Shh 信号通路的核心成分。在没有 Shh 配体的情况下,KIF7 定位于初级纤毛的基部,并与 Gli2 和 Gli3 相互作用,是 Gli3 在 Hedgehog 反应中定位于纤毛所必需的。

IFT 蛋白对于物质转运进出初级纤毛是必不可少的,这些组分的突变可导致纤毛缺陷和人类疾病^[7]。KIF3A 是 IFT 系统的重要组成部分,Yuan 等^[28]采用组织学方法研究 KIF3A 缺失对腭部的影响,并用不同的转基因报告菌株研究 KIF3A 基因缺失对 Hedgehog 和 Wnt 信号的影响。结果发现 KIF3A 缺失导致了神经嵴细胞(neural crest cells, NCCs)对 Hedgehog 信号无反应,对 Wnt 信号高反应。这种异常的分子信号导致了细胞增殖异常,并出现继发性腭裂。在缺乏 KIF7 的胚胎中,Shh 信号通路异常,且 Gli2 和 Gli3 在纤毛中几乎检测不到^[29-30]。由于正常的 Shh 功能需要初级纤毛和发生在该细胞器内的 Gli 蛋白转录活性的精细调控,而这一过程依赖于正常的 IFT。因此,IFT 中任何蛋白的缺失均可影响初级纤毛结构或功能,导致 Shh 信号传导失败,从而影响胚胎内正常组织器官的发育^[7]。

IFT88 是初级纤毛的组装和功能所必需的核心蛋白,介导关键发育信号通路的活性。Tian 等^[31]发现在 IFT88^{fl/fl} 小鼠 NCCs 中特异性去除 IFT88,可导致腭发育早期神经嵴细胞增殖减少,以及腭突间充质细胞 Shh 信号通路下调,随后在 NCCs 衍生的腭突间充质细胞中失去初级纤毛,从而引起严重的颅面缺陷,包括双侧唇腭裂和舌发育不全。最近,有研究揭示 IFT122 是 IFT-A 的中心枢纽^[20]。国内有学者为阐明 IFT122 对 PC、Shh 信号通路以及小鼠胚胎腭突间充质细胞(mouse embryo palatal mesenchymal cells, mEPMCs)增殖的影响,采用 RNAi 技术敲减了 PC 中 IFT122 的表达观察 PC 的生长情况;并检测 Smo、Gli3、细胞增殖标志物(PCNA)和细胞周期因子(Cyclin D1)的表达变化以及 mEPMCs 的数量变化;结果显示缺乏 IFT122 组中 PC 的发生率降低且长度变短,并且 Gli3、Smo、Cyclin D1 及 PCNA 的表达低于 IFT122 正常组,同时,缺乏 IFT122 组中 mEPMCs 的数量增长速度减缓。该研究表明 IFT122 通过介导 Shh 信号通路参与调控 mEPMCs 增殖,同时也间接反映了 PC 及其介导的 Shh 信号通路在小鼠腭部发育中发挥了至

重要的作用^[32]。

3.2 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路是腭部组织发育的重要通路之一。有研究表明,Wnt 信号通路的几个核心成分均定位于初级纤毛,初级纤毛可参与调控 Wnt 信号通路^[33-34]。根据分子机制的不同,Wnt 信号传导通路主要分为两种:Wnt/ β -catenin 信号通路和 Wnt/PCP 信号通路。在 Wnt/ β -catenin 信号通路中,Wnt 配体与 Frizzled(FZD)受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白(LDL receptor related protein,LRP)辅助受体的结合而被激活,LRP 受体随后被酪蛋白激酶 1 α (casein kinase 1 α , CK1 α)和糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)磷酸化,并激活 Dishevelled(Dsh/Dvl)蛋白质以抑制 GSK3 破坏复合物的活性,促进细胞质 β -catenin 的稳定,从而进入细胞核调节靶基因的表达,影响细胞的增殖、分化和存活^[35]。Wnt-PCP 信号通路主要调节细胞形态、迁移和定向细胞分裂,并依赖于大量受体组合和下游信号事件^[35]。

尽管有研究表明初级纤毛在调节 Wnt 信号传导中发挥作用,但其在 Wnt 信号中的作用仍存在争议。小鼠胚胎缺乏纤毛微管-驱动蛋白 KIF3A,可导致 Wnt/ β -catenin 信号的异常激活,并且,在缺乏关键纤毛发生基因(KIF3A、IFT 88 或 OFD1)的小鼠胚胎成纤维细胞中,初级纤毛的丢失与 Wnt3a 配体的异常有关^[36]。这些发现支持了初级纤毛抑制 Wnt/ β -catenin 信号的观点。另一项研究表明,具有 KIF3A、IFT88、IFT72 突变的小鼠胚胎成纤维细胞表现出正常的 Wnt/ β -catenin 信号活性^[37]。Tian 等^[31]发现,在 Wnt1Cre-IFT88^{fl/fl} 小鼠腭突间充质中,纤毛细胞的比例及纤毛长度减少,Wnt 信号活性升高,这表明初级纤毛对 Wnt 信号通路起着抑制作用。该研究还发现,在 Wnt1Cre-IFT88^{fl/fl} 小鼠中,Axin2 在小鼠腭突间充质口腔侧的表达水平升高,这提示在腭裂发生过程中,IFT88 介导的纤毛缺陷也可能影响典型的 Wnt 信号通路。非典型的 Wnt 信号相关分子在腭皱褶发育过程中表现出动态的时空表达模式。在 IFT88 突变小鼠中,ROR2 的表达下调。这表明初级纤毛参与了腭皱纹发育过程中非典型的 Wnt 信号的调节^[38]。此外,Yuan 等^[28]发现 PC 所调控的 Wnt 信号和 Hedgehog 通路可共同介导小鼠胚胎腭突上皮与间充质之间相互作用。该研究发现 KIF3A 缺失可导致小鼠胚胎腭突间充

质中同一区域的 Wnt 信号异常增高以及 Hedgehog 信号异常降低,这种异常的分子信号导致了异常的细胞增殖,进而影响小鼠腭突上皮/间充质的转换,从而引起腭部畸形。

3.3 Shh 信号通路

有文献报道,Shh 通过 Smo 向腭突间充质传递信号,并通过正反馈环调节成纤维细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor 10, Fgf10) 的表达,以调控腭部上皮和间质的增殖^[39]。Shh 信号在腭间充质中激活或维持几种转录因子,包括 Foxf1、Foxf2、Bmp2 和 OSR2。OSR2 是 mEPMCs 增殖的内在调节因子,其在 mEPMCs 中的表达还依赖于 Pax9 转录因子的功能。在 OSR2 和 Pax9 缺失的胚胎中可出现非综合征性腭裂,并且 Fgf10 在发育中的腭间充质中的表达显著减少,表明这些转录因子通过 Shh 和 Fgf10 信号通路在基因调控腭发育网络中发挥作用^[40]。值得注意的是,最近的遗传研究揭示了一种新的 Shh-Foxf1/2-Fgf18-Shh 分子回路,即 Foxf1 和 Foxf2 是 Shh 和 FGF 之间腭部调控反馈环的一个重要部分,Shh 依赖 Foxf1/2 激活 Fgf18, Fgf18 反馈调节 Shh 的表达,这对腭突的生长发育至关重要。Foxf2^{-/-} 小鼠胚胎可异位激活腭突间充质特定区域 Fgf18 的表达并使腭上皮对应区域的 Shh 表达异常,从而导致腭突生长障碍^[41]。

Msx1 激活腭突间充质中的 Bmp4,并向上皮发出信号,激活 Shh 信号通路,随后,Shh 反过来向腭突间充质发出信号,激活 Bmp2,控制腭突间充质细胞的增殖,并积极调节 Msx1 和 Bmp4^[42]。因此,Msx1 基因敲除的小鼠表现出腭裂表型以及腭部 Bmp2 和 Shh 表达异常,而补充 Bmp4 可以恢复 Bmp2 和 Shh 的表达^[43]。有学者研究利用 Hedgehog 信号功能增强的小鼠模型 K14-Cre-R26SmoM2,揭示 Shh 信号在腭部融合过程中腭部上皮中的作用,详细的组织学分析显示,新生(出生后第 0.5 天) K14-Cre-R26SmoM2 小鼠出生后不久死亡,并表现出严重的腭部融合缺损,其原发腭突未能与继发腭突融合,鼻中隔也未能与腭突融合,中线前后部有一条半透明的条带,而且继发腭前部有持续性的正中嵴上皮细胞(medial edge epithelium, MEE),以及分隔腭骨的薄弱的上皮条索,阻碍了双侧腭突沿中线的融合。这些数据表明,在腭部发生过程中,MEE 特别需要下调 Shh 信号,以确保正常的腭部融合^[44]。

上述研究表明与小鼠腭发育相关的很多信号

因子均与 Shh 信号通路有交互作用,而 Shh 信号的传导依赖于 PC,故可间接反映这些信号因子在小鼠腭突中的传递也与 PC 有密切联系。

4 总结与展望

随着对初级纤毛的 Hedgehog 信号通路和 Wnt 信号通路影响认识的不断加深,初级纤毛及相关信号通路调控腭裂发生的机制已逐渐成为焦点研究领域。目前,虽然部分研究已经明确 Hedgehog 信号通路及非经典 Wnt 信号通路依赖于纤毛参与腭部发育过程中细胞增殖、存活、迁移等的调控,然而,初级纤毛与 Wnt 信号通路的关系仍存在争议,且腭裂发生的每一步的作用和作用机制,我们还远未完全了解。腭发育中的其它重要信号通路如 Notch、TGF- β 与纤毛的关系尚不明确,Hedgehog 信号通路与其他信号通路之间是否存在串扰尚不清楚。我们还需更多的研究来阐明这种初级纤毛及相关信号通路在腭发育中的复杂机制,从而为理解腭裂的发病机制提供重要依据。

参考文献:

- [1] Hua K, Ferland RJ. Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75: 1521-1540.
- [2] Bangs F, Anderson KV. Primary cilia and mammalian hedgehog signaling [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9 (5): a028175.
- [3] Jackson PK. EZH2 inactivates primary cilia to activate wnt and drive melanoma [J]. Cancer cell, 2018, 34(1): 3-5.
- [4] Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary cilium-dependent signaling mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (11): 2272.
- [5] Malicki JJ, Johnson CA. The cilium: cellular antenna and central processing unit [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(2): 126-140.
- [6] Song DK, Choi JH, Kim MS. Primary cilia as a signaling platform for control of energy metabolism [J]. Diabetes Metab J, 2018, 42(2): 117-127.
- [7] Gerth-Kahlert C, Koller S. Ciliopathies [J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2018, 235(3): 264-272.
- [8] Hammond NL, Brookes KJ, Dixon MJ. Ectopic hedgehog signaling causes cleft palate and defective osteogenesis [J]. J Dent Res, 2018, 97(13): 1485-1493.
- [9] Juriloff DM, Harris MJ, Mager DL, et al. Epigenetic mechanism causes Wnt9b deficiency and nonsyndromic cleft lip and palate in the A/WySn mouse strain [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2014, 100(10): 772-88.
- [10] Weng M, Chen Z, Xiao Q, et al. A review of FGF signaling in palate development [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 240

- 247.
- [11] Arisa H, Kyoko O, Michiko KT, et al. Intracellular signaling pathway activation via TGF- β differs in the anterior and posterior axis during palatal development [J]. J Hard Tissue Biol, 2016, 25(2): 195-204.
 - [12] Serwas D, Su TY, Roessler M, et al. Centrioles initiate cilia assembly but are dispensable for maturation and maintenance in *C. elegans* [J]. J Cell Biol, 2017, 216(6): 1659-1671.
 - [13] Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Open Sesame: how transition fibers and the transition zone control ciliary composition [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(2): a028134.
 - [14] Morthorst SK, Christensen ST, Pedersen LB. Regulation of ciliary membrane protein trafficking and signalling by kinesin motor proteins [J]. FEBS J, 2018, 285: 4535-4564.
 - [15] Taschner M, Lorentzen E. The intraflagellar transport machinery [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(10): a028092.
 - [16] Mourão A, Christensen ST, Lorentzen E. The intraflagellar transport machinery in ciliary signaling [J]. Curr Opin Struct Biol, 2016, 41: 98-108.
 - [17] Ishikawa H, Marshall WF. Intraflagellar transport and ciliary dynamics [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(3): a021998.
 - [18] Nakayama K, Katoh Y. Architecture of the IFT ciliary trafficking machinery and interplay between its components [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2020, 55(2): 179-196.
 - [19] Walczak-Sztulpa J, Posmyk R, Bukowska-Olech EM, et al. Compound heterozygous IFT140 variants in two Polish families with Sensenbrenner syndrome and early onset end-stage renal disease [J]. Orphanet J Rare Dis, 2020, 15(1): 36.
 - [20] Hirano T, Katoh Y, Nakayama K. Intraflagellar transport-a complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors [J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(3): 429-439.
 - [21] Gerhardt C. Treatment of ciliopathies; current perspectives [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(17): 3080.
 - [22] Rot I, Kablar B. Role of skeletal muscle in palate development [J]. Histo Histopathol, 2013, 28(1): 1-13.
 - [23] Li C, Lan Y, Jiang R. Molecular and cellular mechanisms of palate development [J]. J Dent Res, 2017, 96(11): 1184-1191.
 - [24] Kong JH, Siebold C, Rohatgi R. Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling [J]. Development, 2019, 146(10): dev166892.
 - [25] Lan Y, Jiang R. Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth [J]. Development, 2009, 136(8): 1387-1396.
 - [26] Abramyan J. Hedgehog signaling and embryonic craniofacial disorders [J]. J Dev Biol, 2019, 7(2): 9.
 - [27] Fleet AJ, Hamel PA. The protein-specific activities of the transmembrane modules of *ptch1* and *ptch2* are determined by their adjacent protein domains [J]. J Biol Chem, 2018, 293(43): 16583-16595.
 - [28] Yuan GJ, Singh G, Chen S, et al. Cleft palate and aglossia result from perturbations in wnt and hedgehog signaling [J]. Cleft Palate Craniofac J, 2017, 54(3): 269-280.
 - [29] Endoh-Yamagami S, Evangelista M, Wilson D, et al. The mammalian *cos2* homolog *Kif7* plays an essential role in modulating hh signal transduction during development [J]. Curr Biol, 2009, 19(15): 1320-1326.
 - [30] Lau CI, Barbarulo A, Solanki A, et al. The kinesin motor protein *Kif7* is required for T-cell development and normal MHC expression on thymic epithelial cells (TEC) in the thymus [J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 24163-24176.
 - [31] Tian H, Feng J, Li J, et al. Intraflagellar transport 88 (IFT88) is crucial for craniofacial development in mice and is a candidate gene for human cleft lip and palate [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(5): 860-872.
 - [32] 郭佳男. IFT122 通过初级纤毛介导的 Shh 信号通路调控 mEPMCs 增殖的机制研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
 - [33] Lee KH. Involvement of wnt signaling in primary cilia assembly and disassembly [J]. FEBS J, 2020, 287(23): 5027-5038.
 - [34] May-Simera HL, Kelley MW. Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton [J]. Cilia, 2012, 1(1): 7.
 - [35] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
 - [36] Jackson PK. EZH2 inactivates primary cilia to activate wnt and drive melanoma [J]. Cancer cell, 2018, 34(1): 3-5.
 - [37] Ocbina PJR, Tuson M, Anderson KV. Primary cilia are not required for normal canonical wnt signaling in the mouse embryo [J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6839.
 - [38] Nakaniwa M, Kawasaki M, Kawasaki K, et al. Primary cilia in murine palatal rugae development [J]. Gene Expr Patterns, 2019, 34: 119062.
 - [39] Wu WJ, Gu SP, Sun C, et al. Altered FGF signaling pathways impair cell proliferation and elevation of palate shelves [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136951.
 - [40] Li R, Chen Z, Yu Q, et al. The function and regulatory network of *pax9* gene in palate development [J]. J Dent Res, 2019, 98(3): 277-287.
 - [41] Xu JY, Liu H, Lan Y, et al. A *shh-foxf18-shh* molecular circuit regulating palate development [J]. PLoS Genet, 2016, 12(1): e1005769.
 - [42] Zhang Z, Song Y, Zhao X, et al. Rescue of cleft palate in *Mx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis [J]. Development, 2002, 129(17): 4135-4146.
 - [43] Chen YX, Wang ZS, Chen YP, et al. Conditional deletion of *bmp2* in cranial neural crest cells recapitulates pierre robin sequence in mice [J]. Cell Tissue Res, 2019, 376(2): 199-210.
 - [44] Li JY, Yuan Y, He JZ, et al. Constitutive activation of hedgehog signaling adversely affects epithelial cell fate during palatal fusion [J]. Dev Biol, 2018, 441(1): 191-203.

[收稿日期]2021-10-11

陈穴,陈耿. ALPPS 动物模型构建及相关研究的新进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 142-148.

Chen X, Chen G. New progress in establishment of an ALPPS animal model and its research [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 142-148.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.020

ALPPS 动物模型构建及相关研究的新进展

陈 穴,陈 耿*

(陆军军医大学 大坪医院肝胆外科,重庆 400042)

【摘要】 联合肝分隔和门静脉结扎的二步肝切除术(associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy, ALPPS)能够促进预留肝快速增生,但其具体机制尚不明确。建立不同肝病背景下的、稳定可复制的 ALPPS 动物模型是对其进行深入研究的必备条件。本文拟对近年来关于 ALPPS 动物模型的研究进展进行简要综述。

【关键词】 联合肝分隔和门静脉结扎的二步肝切除术(ALPPS);动物模型;肝再生

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0142-07

New progress in establishment of an ALPPS animal model and its research

CHEN Xue, CHEN Geng*

(Department of Hepatobiliary Surgery, Daping Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400042, China)

【Abstract】 Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) accelerates liver regeneration remarkably. However, the molecular mechanism of ALPPS remains unclear. It is necessary for in-deep research to establish a stable and reproducible ALPPS animal model under various liver disease backgrounds. This article reviews the research progress of ALPPS animal models in recent years.

【Keywords】 associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS); animal model; liver regeneration

肝切除术是首选的肝癌根治性治疗手段。但我国肝癌患者的手术切除率仅有 15%~25%。相当部分患者因切除肿瘤后剩余的功能性肝组织体积(future liver remnant, FLR)过小而被迫放弃手术切除。对于正常肝,FLR 必须大于 25%;而对于硬化肝,FLR 至少要求高于 40%。故 FLR 不足是目前制约肝外科发展的“阿喀琉斯之踵”^[1]。传统的促进 FLR 增生的手段主要是门静脉栓塞(portal vein embolization, PVE),但其效果非常有限。近年来,有学者先后报道了联合肝分隔和门静脉结扎的二步肝切除术(associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy, ALPPS),促进 FLR 增

生的速度和幅度远优于 PVE^[2]。目前对 ALPPS 促进余肝快速增生的机制并不十分清楚^[3]。鉴于此,在动物模型上复制 ALPPS,有助于深入研究其加速肝再生的分子机制,具有重要的理论和现实意义。

1 ALPPS 动物模型的现状

当前关于 ALPPS 动物模型的构建已经取得了诸多进展(表 1)。一般认为,理想的 ALPPS 动物模型必须具备如下条件:(1)预留肝叶必须有独立的血液流入道(门静脉和肝动脉)和流出道(肝静脉);(2)预留肝叶和待切除肝叶之间必须充分劈离,以防二者之间出现侧支循环^[4]。

【基金项目】 陆军军医大学科技创新能力提升专项(2019XLC1009)。

【作者简介】 陈穴(1996—),男,医学学士,研究方向:肝脏再生。E-mail: chenxue616@outlook.com

【通信作者】 陈耿(1976—),男,博士研究生,研究方向:肝脏移植和肝脏再生。E-mail: dr.chengeng@vip.126.com

表 1 已建立 ALPPS 动物模型一览表
Table 1 List of established ALPPS animal models

序号 Munber	年份 Year	作者 Author	动物种属 Species	预留叶 Reserved lobe	门静脉结扎比(%) Ratio of portal vein ligation	二期手术 Two-stage operation	预留叶增生情况 Hyperplasia of reserved liver lobe
1	2014	Schlegel 等 ^[5]	C57Bl/6 小鼠 C57Bl/6 mouse	左中叶 LML	90	POD2	FLR/BW 增加 220% FLR/BW increase 220%
2	2014	Almau 等 ^[6]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = (120.4 ± 99.5) %
3	2014	Yao 等 ^[7]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = (158.92 ± 9.17) %
4	2015	Dhar 等 ^[8]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	FLR/BW 增加 198.9% FLR/BW increase 198.9%
5	2015	Shi 等 ^[9]	SD 大鼠 SD rats	左中叶 LML	90	POD2	FLR/BW 增加 341% FLR/BW increase 341%
6	2015	顾向前等 ^[10]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = (181.4 ± 14.3) %
7	2015	García-Pérez 等 ^[11]	SD 大鼠 SD rats	左中叶+尾状叶 LML+CL	70	POD8	HRR = 137.5%
8	2015	Croome 等 ^[12]	家猪 Pig	右叶+尾叶 RL+CL	80	POD7	HRR = 75%
9	2016	Wei 等 ^[13]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	POD2	HRR = (153 ± 17) %
10	2017	Andersen 等 ^[14]	Wistar 大鼠 Wistar rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = (130 ± 12) %
11	2017	Kawaguchi 等 ^[15]	Wistar 大鼠 Wistar rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = (95.5 ± 17.9) %
12	2017	Liao 等 ^[16]	新西兰白兔 New Zealand white rabbit	按比例变化 Proportional change	20~70	否 No	HRR = (43.9 ± 13.5) %
13	2017	刘伟伟等 ^[17]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = 174.86%
14	2017	Sheng 等 ^[18]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	HRR = 168%
15	2018	Langiewicz 等 ^[19]	C57Bl/6 小鼠 C57Bl/6 mouse	左中叶 LML	90	否 No	FLR/BW 增加 130% FLR/BW increase 130%
16	2018	Sheng 等 ^[20]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	POD7	HRR = 167.7%
17	2017	Deal 等 ^[21]	约克郡长白猪 Yorkshire landrace pig	右中叶和右叶+尾状叶 RM 和 RL+CL	80	POD7	HRR = 164%
18	2018	Zhao 等 ^[22]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	90	POD3	HRR = (225.5 ± 13.00) %
19	2019	Dili 等 ^[23]	Wistar 大鼠 Wistar rats	左中叶 LML	87	POD2	FLR/BW 增加 150% FLR/BW increase 150%
20	2019	Yang 等 ^[24]	SD 大鼠 SD rats	左外侧叶+左中叶+尾状叶 LLL+LML+CL	50	POD7	HRR = 22.30%~58.76%
21	2019	Tong 等 ^[25]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	POD5	FLR/BW 增加 129% FLR/BW increase 129%
22	2020	Otsuka 等 ^[26]	SD 大鼠 SD rats	右中叶 RML	80	否 No	FLR/BW 增加 120% FLR/BW increase 120%

注:POD:术后时间;BW:体重;FLR:术后预留肝;WA:每个解剖时间点右中叶的实际重量;W1:手术前的初始右中叶重量;HRR:肝再生率, $HRR = (WA - W1) / W1 \times 100\%$ 。

Note. POD, Postoperative day. BW, Body weight. FLR, Future liver remnant. WA, Actual right midpoint weight at each anatomic time point. W1, Initial right midpoint weight before surgery. HRR, Hepatic regeneration rate, $HRR = (WA - W1) / W1 \times 100\%$.

1.1 大动物 ALPPS 模型

既往研究显示猪与人的肝在解剖学和生理学上有许多相似之处,因此长期被用于实验外科研究^[27-30]。猪肝的结构较为简单,血管铸型研究发现,猪肝是高度分叶的,肝实质能做到完全离断,肝静脉和下腔静脉很近,被尾状叶包裹。猪行 ALPPS 后 FLR 增生非常显著^[21]。但由于动物体积大,手术及麻醉操作复杂,成本较高,因而较少使用。羊也可以用于构建 ALPPS 动物模型^[4],但羊是一种反刍动物,它的胃肠道在进食后容易产气,不仅会导致胃膨胀,还会让肝门区域的游离变得困难。羊的血管壁很薄,在离断肝实质的过程中容易出血,因此操作需要非常精细。

1.2 中型动物 ALPPS 模型

兔作为中等大小的动物,也被广泛用于肝再生研究,是肝部分切除、门静脉结扎(portal vein ligation, PVL)或 PVE 动物模型的理想选择。有学者对兔的不同门静脉分支进行结扎并结合肝实质分隔,结果均能促进肝再生,但由于兔肝的解剖结构复杂,使得对其行 ALPPS 极其困难,实验中动物的死亡率较高^[16]。所以兔作为 ALPPS 动物模型的稳定性还有待进一步提高。

1.3 小动物 ALPPS 模型

小动物(大/小鼠)是一个很好的选择,因为这些动物很容易饲养和管理,且价格便宜。从生理上讲,它们生理代谢更快,解剖结构简单,手术操作更容易,并且很容易实现标准化^[31];同时对这些动物进行基因改造、诱发急性/慢性疾病、制作肿瘤模型也比较容易,且人类肝再生及肿瘤发生发展的相关基因在大鼠及小鼠中都可以找到对应的同源基因,因此来自大、小鼠的实验结论可能同样适用于大动物或者人类^[32]。另一个好处是,虽然小鼠和大鼠肝的解剖结构与人类有很大不同,但是中叶具有与人类肝相似的门脉结构,加上其强大的再生能力,完全能够满足 ALPPS 动物模型的要求。

1.4 特殊类型的 ALPPS 动物模型

我国是肝炎大国,每年新发的肝癌病例中,大部分伴有不同程度的肝炎后肝硬化^[33]。考虑到肝硬化对肝再生有明显的影 响,建立肝硬化 ALPPS 动物模型非常有必要。目前大多用四氯化碳、硫代乙酰胺制作肝硬化模型。有研究发现肝硬化时 ALPPS 诱导的肝再生效果明显减弱,且具有较高的死亡率,并且再生启动较晚,且持续的时间比正常

大鼠要长,可能与肝实质离断后肝内门体分流减少有关^[24,34]。

通过高脂饲料喂养 SD 大鼠建立非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠模型,发现与标准实验饲料喂养的大鼠相比,NAFLD 大鼠 FLR 的增长率、Ki-67(+)肝细胞和 CD68(+)肝巨噬细胞(kupffer cell)细胞减少,但术后血清中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平较对照组明显升高。提示炎症性脂肪变性延缓了 ALPPS 手术诱导的肝再生,但其机制尚不明确,有待进一步研究^[22]。

2 大/小鼠 ALPPS 模型建立的要点

从解剖学上看,大/小鼠的肝都有明显的分叶,通常由 4 个主要的肝叶组成,分别称为右侧叶、中叶、左侧叶和尾状叶。每个叶都有自己独立的门静脉、肝动脉和胆管系统。4 个叶都通过单独的肝静脉与下腔静脉相连。其中肝中叶分别由左、右门脉供血,左右两侧的动脉供应和胆管结构各不相同,该叶的流出道由左、右、中 3 条肝静脉组成,人肝的情况也是如此。因此选择切开肝中叶最能模拟人类肝的劈离。在制作大/小鼠 ALPPS 模型时,通往右、左、尾状叶的门静脉分支必须结扎,只留下中叶门静脉灌注(图 1)^[13,35]。由于肝右中叶约占肝总体积的 20%,与临床上行 ALPPS 前的 PVL 相近^[23],因此建立模型时通常将肝右中叶作为预留肝。实验室研究发现在研究门静脉血流和压力变化、肝组织灌注和氧合等生理机制方面,大鼠模型优于小鼠模型,大鼠模型不需要切除左外侧叶和胆囊,从而避免了对相关研究结果的潜在影响。

大/小鼠 ALPPS 一期术中,除了行 PVL 外,还需要沿着肝中叶缺血线劈开(图 2,3),这也是该模型的重点与难点。正确估算肝实质劈离的深度相当困难,下腔静脉一旦损伤就难以止血,靠近下腔静脉的肝后部分劈开可减少并发症的发生。多项研究表明,保持与下腔静脉的最小距离约为 5 mm,可以避免左、中肝静脉的损伤,从而避免大出血^[4,13,17]。在离断肝实质时,可以采用 4-0 丝线结扎断面血管,也可以压迫止血、电凝止血,也可采用生物止血材料。

部分学者在动物模型中进行了二期手术切除的尝试^[5,9,12-13,20-25,36]。与人类不同,大/小鼠

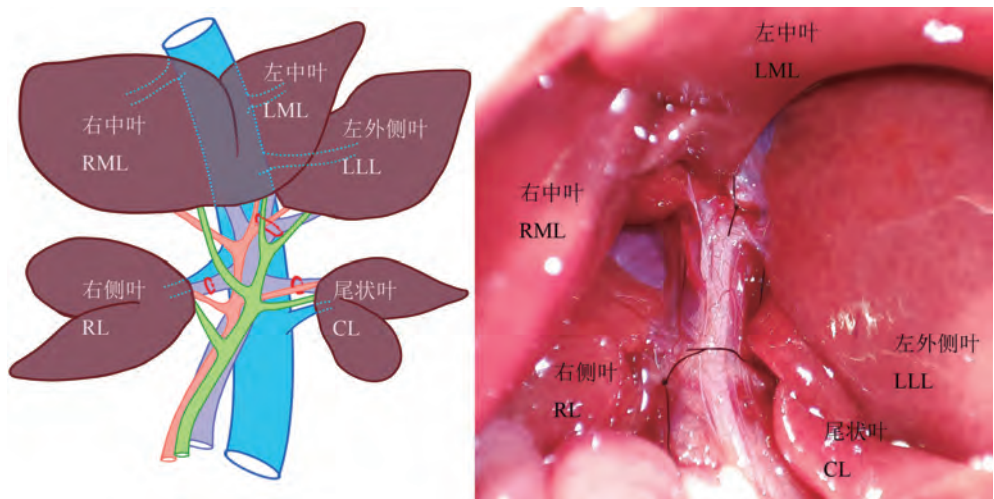


图 1 结扎右侧叶、左中叶、尾状叶及左外侧叶的门静脉分支
Figure 1 Ligation of portal vein branches of RL, LML, CL and LLL

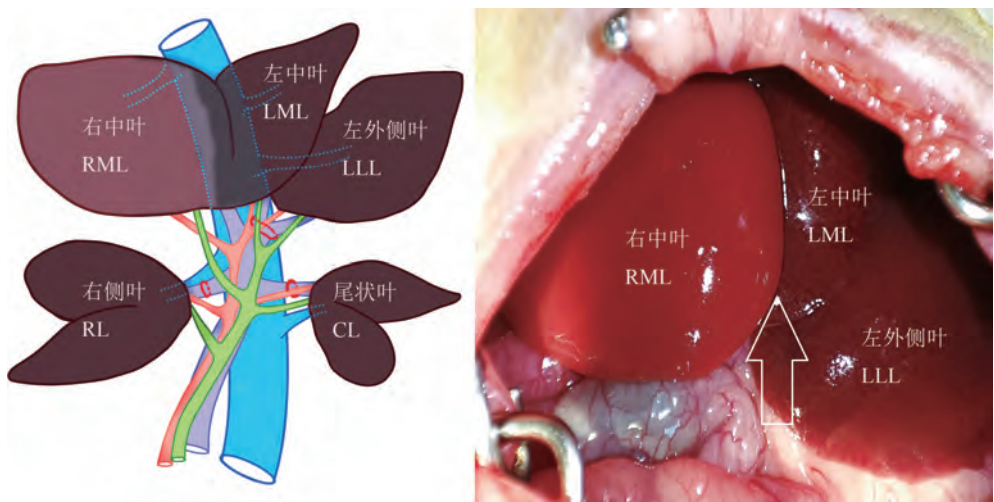


图 2 肝中叶缺血线(白色箭头)
Figure 2 Middle lobe ischemia line(white arrow)

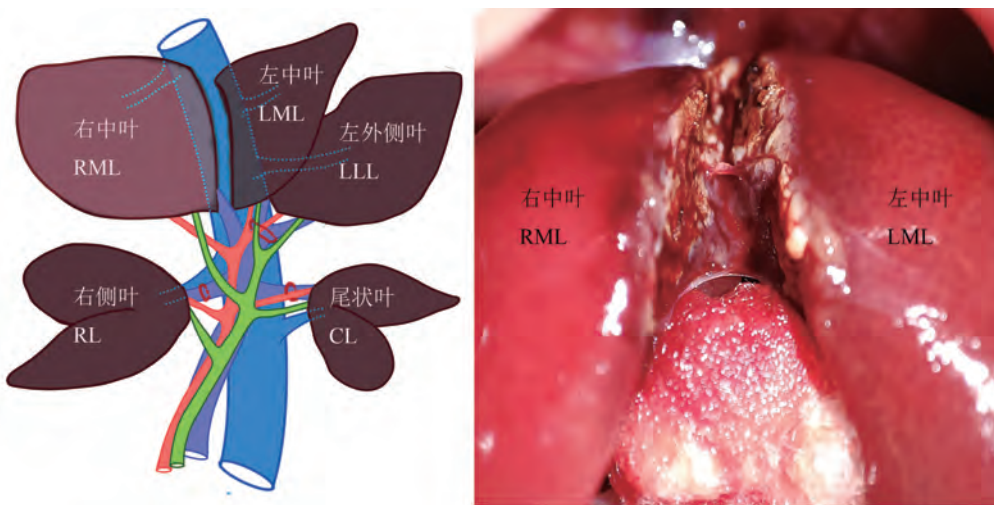


图 3 肝左、右中叶横截面
Figure 3 Cross section of left and right middle lobe

ALPPS 术后肝的增生更为迅速。有研究发现大鼠 ALPPS 一期术后 2 d FLR 即可增加 153%, 术后 4 d 可以增加 260%^[7]。当然, 由于手术方式不同, 不同的研究报道的大/小鼠 ALPPS 术后 FLR 增生幅度差异较大, 例如有研究发现 ALPPS 一期术后 7 d FLR 仅增生了 68%^[15]。不过, 大部分研究选择的一、二期手术间隔时间一般为 2~7 d。需要指出的是, 两次手术间隔时间越长, 腹腔粘连情况越明显, 第二期手术也难度越大。

3 基于 ALPPS 动物模型的相关研究

3.1 肝加速再生触发机制的研究

Kawaguchi 等^[15]建立了大鼠 ALPPS 静脉淤血模型(ALPPS+左肝静脉结扎), 发现淤血组 FLR 的增生较单纯 ALPPS 组更为明显, Ki-67 阳性肝细胞的数量也大于 ALPPS 组, 提示肝劈开后的肝实质淤血对于 ALPPS 术后肝再生有着非常显著的促进作用。Schadde 等^[37]发现由于肝动脉缓冲效应(hepatic arterial buffer response, HABR)的存在, ALPPS 一期术后预留侧肝的肝动脉血流会显著下降并导致明显的肝组织缺氧; Kron 等^[38]发现采用脯氨酰羟化酶抑制剂激活 PVL 大鼠的缺氧信号通路可以显著加速肝组织再生, 而消除 ALPPS 大鼠肝组织缺氧则可以延缓肝再生, 强烈提示组织缺氧可能是肝再生的重要加速因子; Dirscherl 等^[39]也发现缺氧的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)中存在促血管生成因子的激活, 能诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)依赖的血管生成, 在快速肝再生中可能起着关键作用。

3.2 肝再生相关细胞因子的研究

多项研究发现, ALPPS 术后早期血清及肝组织生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、TNF- α 和 IL-6 等的表达水平显著高于 PVL 组, 其中 IL-6 的表达水平大约是 PVL 组的 6 倍, 预留肝组织中 TNF- α 、IL-6 和 HGF 水平比对照组高约 3 倍^[8,10-11]。Schlege 等^[5]将 ALPPS 组小鼠血浆注射到 PVL 组小鼠体内, 使后者的预留肝再生速度可以达到前者水平, 提示由创伤诱导增加的生长因子是 ALPPS 促进 FLR 增生的主要因素。有学者复制该模型, 发现射频消融联合 PVL 促进 FLR 增生的效果与 ALPPS 相当, 且细胞因子浓度无差异, 与细胞增殖相关的基因表达也几乎相同, 认为射频消融可以实现与肝实质离断相同的效果; 通过基因分析, 发现肝实质损

伤之后释放的生长因子激活了参与细胞再生的基因, 并下调了参与细胞动态平衡的基因^[14]。

3.3 肝再生相关信号通路的研究

Langiewicz 等^[19]发现 c-Jun 氨基末端蛋白激酶 1(JNK1)介导的肝星状细胞旁分泌 IHH (Indian hedgehog)对于肝实质的加速再生是必需的, JNK1-IHH 轴是 ALPPS 促进肝再生所特有的机制。Shi 等^[9]发现 ALPPS 后信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)和 YAP 蛋白(yes associated protein)激活, 可能在肝再生中起重要作用。Otsuka 等^[26]在大鼠 ALPPS 模型中发现 ALPPS 加速肝再生与非受体酪氨酸激酶 2(Janus kinase 2, JAK2)/STAT3 通路的激活有密切关系, 而胰岛再生源蛋白(regenerating islet-derived protein, Reg)Reg3 α 和 Reg3 β 的表达可能在 JAK2/STAT3 通路的活化中扮演着重要角色, 作者还认为炎性细胞因子的升高并不是 ALPPS 促进 FLR 快速增生的主要原因; Colak 等^[40]分别在肝切除、ALPPS 和 PVL 术后 24 h 和 96 h 两个时间点通过转录组学的方法对肝基因表达及再生信号通路的激活进行了检测, 发现肝损伤后基因表达的改变是时间依赖性的, 大量的细胞周期相关基因、转录因子、DNA 复制调控基因、细胞和生长因子参与了这一过程。

3.4 肿瘤学相关研究

为了探究 ALPPS 是否对肿瘤的生长和转移有促进作用, Kikuchi 等^[41]分别对小鼠转移性肝癌模型行 ALPPS 和 PVL 术后的肿瘤增殖活性和相关细胞因子的水平进行了检测, 发现预留肝在术后任何时相点都没观察到肿瘤生长加速的迹象, 而门脉结扎侧肝在术后晚期(≥ 9 d)可以观察到肿瘤进展, 并且循环中的细胞因子对肿瘤生长的没有明确影响。Kambakamba 等^[36]通过体外实验和临床观察均发现 ALPPS 没有直接的促肿瘤生长作用。然而也存在争议。García-Pérez 等^[42]在大鼠 ALPPS 模型中发现 ALPPS 可以促进肿瘤在门静脉结扎侧肝叶中的进展和转移, 肝血管生成因子 VEGF 和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达急剧上升, 同时伴有枯否细胞和肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophage, TAM)的显著增加以及肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的下降。因此, ALPPS 是否促进肿瘤生长和转移, 还需要进一步探究。

4 总结

ALPPS 是近十年来肝外科临床最重要的突破之一,其不仅提供了一种新的扩大肝切除方式,更重要的是为进一步研究肝再生机制打开了一扇希望之门。总结既往研究成果,血流动力学改变(门静脉结扎)和生长因子的释放是促进余肝快速增生不可缺少的两大要素,而在对生长因子的探索中,已经发现缺氧相关信号分子、JAK-Ihh 轴和 JAK2/STAT3 等信号通路参与其中。我们相信,随着 ALPPS 动物模型的发展和成熟,有关 ALPPS 促进肝再生机制及其病理生理特性的研究可望取得更大的突破。

参考文献:

- [1] Chapelle T, Op De Beeck B, Driessen A, et al. Estimation of the future remnant liver function is a better tool to predict post-hepatectomy liver failure than platelet-based liver scores [J]. *Eur J Surgical Oncol*, 2017, 43(12): 2277-2284.
- [2] Andreas A, Schnitzbauer M. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings [J]. *Ann Surg*, 2012, 255(3): 405-414.
- [3] Linecker M, Björnsson B, Stavrou GA, et al. Risk adjustment in ALPPS is associated with a dramatic decrease in early mortality and morbidity [J]. *Ann Surg*, 2017, 266(5): 779-786.
- [4] Budai A, Fulop A, Hahn O, et al. Animal models for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): achievements and future perspectives [J]. *Eur Surg Res*, 2017, 58(3-4): 140-157.
- [5] Schlegel A, Lesurtel M, Melloul E, et al. ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration [J]. *Ann Surg*, 2014, 260(5): 839-847.
- [6] Almau Trenard HM, Moulin LE, Padín JM, et al. Development of an experimental model of portal vein ligation associated with parenchymal transection (ALPPS) in rats [J]. *Cir Esp*, 2014, 92(10): 676-681.
- [7] Yao L, Li C, Ge X, et al. Establishment of a rat model of portal vein ligation combined with in situ splitting [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105511.
- [8] Dhar DK, Mohammad GH, Vyas S, et al. A novel rat model of liver regeneration: possible role of cytokine induced neutrophil chemoattractant-1 in augmented liver regeneration [J]. *Ann Surg Innov Res*, 2015, 9(1): 11.
- [9] Shi H, Yang G, Zheng T, et al. A preliminary study of ALPPS procedure in a rat model [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-12.
- [10] 顾向前, 张鲁洲, 曹顺琪, 等. 联合肝脏分割和门静脉结扎的分期肝切除术大鼠模型的建立 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2015, 21(12): 836-839.
- [11] García-Pérez R, Revilla-Nuin B, Martínez CM, et al. Associated liver partition and portal vein ligation (ALPPS) vs selective portal vein ligation (PVL) for staged hepatectomy in a rat model. Similar regenerative response? [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e144096.
- [12] Croome KP, Mao SA, Glorioso JM, et al. Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy [J]. *HPB (Oxford)*, 2015, 17(12): 1130-1136.
- [13] Wei WM, Zhang TM, Zafarnia SM, et al. Establishment of a rat model: Associating liver partition with portal vein ligation for staged hepatectomy [J]. *Surgery*, 2016, 159(5): 1299-1307.
- [14] Andersen KJ, Knudsen AR, Jepsen BN, et al. A new technique for accelerated liver regeneration: An experimental study in rats [J]. *Surgery*, 2017, 162(2): 233-247.
- [15] Kawaguchi D, Hiroshima Y, Kikuchi Y, et al. Associating liver partition and portal vein occlusion, including venous congestion, induction in rats [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(6): 2919-2925.
- [16] Liao M, Zhang T, Wang H, et al. Rabbit model provides new insights in liver regeneration after transection with portal vein ligation [J]. *J Surg Res*, 2017, 209: 242-251.
- [17] 刘伟伟, 刘洪, 余锋, 等. 联合肝脏分割和门静脉结扎二步肝切除术大鼠模型的建立 [J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(1): 50-56.
- [18] Sheng R, Yang L, Jin K, et al. Assessment of liver regeneration after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: a comparative study with portal vein ligation [J]. *HPB (Oxford, England)*, 2018, 20(4): 305-312.
- [19] Langiewicz M, Graf R, Humar B, et al. JNK1 induces hedgehog signaling from stellate cells to accelerate liver regeneration in mice [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(3): 666-675.
- [20] Sheng R, Wang H, Jin K, et al. Histogram analyses of diffusion kurtosis indices and apparent diffusion coefficient in assessing liver regeneration after ALPPS and a comparative study with portal vein ligation [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2018, 47(3): 729-736.
- [21] Deal R, Frederiks C, Williams L, et al. Rapid liver hypertrophy after portal vein occlusion correlates with the degree of collateralization between lobes—a study in pigs [J]. *J Gastrointest Surg*, 2017, 22(2): 203-213.
- [22] Zhao J, Xu H, Li Y, et al. NAFLD induction delays postoperative liver regeneration of ALPPS in rats [J]. *Digest Dis Sci*, 2018, 64(2): 456-468.
- [23] Dili A, Lebrun V, Bertrand C, et al. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: establishment of an animal model with insufficient liver remnant [J]. *Lab Invest*, 2019, 99(5): 698-707.
- [24] Yang X, Yang C, Qiu Y, et al. A preliminary study of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in a rat model of liver cirrhosis [J]. *Exp Ther Med*,

- 2019, 18(2):1203–1211.
- [25] Tong YF, Xu M, Wang YF, et al. Hepatic regeneration by associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) is feasible but attenuated in rat liver with thioacetamide-induced fibrosis [J]. *Surgery*, 2019, 165(2): 345–352.
- [26] Otsuka N, Yoshioka M, Abe Y, et al. Reg3 α and Reg3 β expressions followed by JAK2/STAT3 activation play a pivotal role in the acceleration of liver hypertrophy in a rat ALPPS model [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4077.
- [27] Bruha J, Vycital O, Tonar Z, et al. Monoclonal antibody against transforming growth factor β 1 does not influence liver regeneration after resection in large animal experiments [J]. *In Vivo*, 2015, 29(3): 327–340.
- [28] Darnis B, Mohkam K, Schmitt Z, et al. Subtotal hepatectomy in swine for studying small-for-size syndrome and portal inflow modulation; is it reliable? [J]. *HPB*, 2015, 17(10): 881–888.
- [29] Liska V, Treska V, Mirka H, et al. Tumour necrosis factor- α stimulates liver regeneration in porcine model of partial portal vein ligation [J]. *Hepatogastroenterology*, 2012, 59(114): 496–500.
- [30] 桑剑锋, 马虎成, 施晓雷, 等. 巴马小型猪 85% 肝切除术后急性肝功能衰竭模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(2): 174–180.
- [31] Casellas J. Inbred mouse strains and genetic stability: a review [J]. *Animal*, 2011, 5(1): 1–7.
- [32] Song G, Sharma AD, Roll GR, et al. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2010, 51(5): 1735–1743.
- [33] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [34] Matsuo K, Murakami T, Kawaguchi D, et al. Histologic features after surgery associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy versus those after hepatectomy with portal vein embolization [J]. *Surgery*, 2016, 159(5): 1289–1298.
- [35] Schadde E, Hertl M, Breitenstein S, et al. Rat model of the associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) procedure [J]. *J Vis Exp*, 2017, 126: 1–8.
- [36] Kambakamba P, Linecker M, Schneider M, et al. Impact of associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) on growth of colorectal liver metastases [J]. *Surgery*, 2018, 163(2): 311–317.
- [37] Schadde E, Tsatsaris C, Swiderska-Syn M, et al. Hypoxia of the growing liver accelerates regeneration [J]. *Surgery*, 2017, 161(3): 666–679.
- [38] Kron P, Linecker M, Limani P, et al. Hypoxia-driven Hif2 α coordinates mouse liver regeneration by coupling parenchymal growth to vascular expansion [J]. *Hepatology*, 2016, 64(6): 2198–2209.
- [39] Dirscherl K, Schlöpfer M, Roth Z' Graggen B, et al. Hypoxia sensing by hepatic stellate cells leads to VEGF-dependent angiogenesis and may contribute to accelerated liver regeneration [J]. *Scientific reports*, 2020, 10(1): 4392.
- [40] Colak D, Al-Harazi O, Mustafa OM, et al. RNA-Seq transcriptome profiling in three liver regeneration models in rats: comparative analysis of partial hepatectomy, ALLPS, and PVL [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1–15.
- [41] Kikuchi Y, Hiroshima Y, Matsuo K, et al. Impact of associating liver partition and portal vein occlusion for staged hepatectomy on tumor growth in a mouse model of liver metastasis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(1): 130–138.
- [42] García-Pérez R, Ferrer Fábrega J, Varona-Bosque A, et al. Role of Kupffer cells in the progression of CRC liver metastases after the first stage of ALPPS [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8088–8089.

[收稿日期]2021-09-09

李昕,王芷宁,付璐,等. 缺血-再灌注氧化损伤机制及其对不同器官功能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 149-154.

Li X, Wang ZN, Fu L, et al. Oxidative injury mechanism of ischemia-reperfusion and its effect on various organ functions [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 149-154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.021

缺血-再灌注氧化损伤机制及其对不同器官功能的影响

李 昕¹, 王芷宁¹, 付 璐¹, 张林波^{1,2}, 肖盛元^{3,4*}, 张文慧^{1*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学食药用菌教育部工程研究中心, 长春 130118; 3. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 4. 人参新品种选育与开发国家地方联合工程技术研究中心, 长春 130118)

【摘要】 缺血是由于机体组织器官梗死或者血液供应障碍等原因造成的一种局限性缺血性坏死或软化, 常发生在肝、肾、脑等器官。在恢复血流供应的初期, 往往会引起“缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)”。氧化应激是诱发缺血-再灌注损伤的重要原因之一, 相关研究证实缺血-再灌注氧化损伤会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生, 而 ROS 可相应引起器官损伤及功能障碍。本综述主要从氧化应激角度对近年来有关缺血-再灌注氧化损伤的研究进展进行总结, 分析这种损伤对各组织器官的影响, 旨在进一步揭示缺血-再灌注氧化损伤机制, 为相应疾病的预防和治疗提供思路。

【关键词】 缺血再灌注; 氧化损伤; 活性氧; 器官

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0149-06

Oxidative injury mechanism of ischemia-reperfusion and its effect on various organ functions

LI Xin¹, WANG Zhining¹, FU Lu¹, ZHANG Linbo^{1,2}, XIAO Shengyuan^{3,4*}, ZHANG Wenhui^{1*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China. 2. Engineering Research Center of Edible and Medicinal Fungi, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118. 3. College of Chinese Materia Medica, Jilin Agricultural University, Changchun 130118. 4. National and Local Joint Engineering Research Center of Remote Breeding and Development of Ginseng New Varieties, Changchun 130118)

【Abstract】 Ischemia is a kind of localized ischemic necrosis or softening caused by infarction of tissues and organs or blood supply disturbance, which often occurs in the liver, kidney, brain, and other organs. In the early stage of restoring blood supply, it often causes ischemia-reperfusion injury. Oxidative stress is a major causes of ischemia-reperfusion injury. Studies have confirmed that ischemia-reperfusion leads to the production of reactive oxygen species, which causes organ injury and dysfunction. This review summarizes the research progress of ischemia-reperfusion oxidative injury in recent years from the perspective of oxidative stress and analyzes the effect of this injury on various tissues and organs. It aims to further reveal the mechanism of oxidative injury caused by ischemia-reperfusion and provide ideas for the prevention and treatment of related diseases.

【Keywords】 ischemia reperfusion; oxidative damage; reactive oxygen species; organ

【基金项目】 吉林省科技发展计划重点研发项目(20210202084NC)。

【作者简介】 李昕(1998—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物与医药研究。E-mail: 1109007142@qq.com

【通信作者】 肖盛元(1970—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物与医药研究。E-mail: bmit615@sina.com

张文慧(1977—) 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 生物与医药研究。E-mail: wenhui_changchun@163.com

* 共同通信作者

目前,相关研究已经证实缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)发生的机制主要与活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量产生、细胞内 Ca^{2+} 超载、白细胞损伤、中性粒细胞活化、高能磷酸化合物生成障碍等有关。缺血缺氧阶段组织器官出现损伤性病理变化^[1], ATP 合成减少, 分解代谢产物增多, 刺激 ROS 的产生, 而缺氧时机体 ROS 清除能力不足, 活性氧物质在体内会与有机大分子等成分发生反应, 使氧化损伤增强^[2]; 在某些情况下再灌注会加重血液与缺血组织之间的损伤和病理变化^[3], 再灌注复氧阶段大量产生自由基, 由于细胞 Ca^{2+} 超载、白细胞作用、缺乏高能磷酸化合物、无复流等原因^[4]使损伤进一步加重, 而前期产生的 ROS 可直接造成细胞损伤(坏死、膜破坏)或通过诱导炎症反应相关细胞信号通路激活进而造成间接损伤, 导致损伤双相进展^[5]。在 IRI 部位, 氧化作用会导致组织器官功能出现障碍, 由于不同组织器官结构和能量代谢过程不同, 由缺血-再灌注引起的损伤机制也存在一定程度的差别, 因此本综述主要从氧化应激角度对近些年来有关缺血-再灌注氧化损伤的研究进展进行总结, 并分析这种损伤对各组织器官的影响。

1 缺血-再灌注损伤中活性氧产生的几种途径

1.1 线粒体途径

线粒体是许多组织器官中 ROS 产生的主要场所^[6]。缺血缺氧期间, 由于 ATP 含量减少, Ca^{2+} 浓度变化增多, 对线粒体功能造成损伤^[7], 导致呼吸链复活体活性受损, 呼吸链传递电子的效能下降, 不能产生足够电子, 使自由基生成增加; 再灌注提供氧时会产生大量 ROS, 此时呼吸链复合体 I、II、III 均可产生 ROS。

1.2 黄嘌呤氧化酶途径

正常情况下次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)作用下代谢生成黄嘌呤^[8], 黄嘌呤在 XO 作用下生成尿酸, 尿酸经过肾排出, 同时该过程释放大量电子, 生成大量自由基。组织或者器官在缺氧情况下, ATP 产生不足, ATP 代谢又会生成大量次黄嘌呤, ATP 减少会导致生物膜 ATP 依赖钙泵功能障碍, 从而引起细胞内 Ca^{2+} 增多, 细胞内高浓度的 Ca^{2+} 会促使黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XD)的构象变为 XO; 再灌注后, O_2 恢复供应, 次黄嘌呤在 XO 的作用下代谢产生大量自由基和 O_2 , 二者共同作用形成超氧自由基和过氧化氢, 后者在金属离子参与下生成更活跃的羟基自

由基($\cdot\text{OH}$), 从而使组织内的 $\cdot\text{OH}$ 、过氧化氢(H_2O_2)、超氧自由基($\text{O}_2\cdot^-$)、单态氧(O^-)等 ROS 大量增加。

1.3 中性粒细胞途径

缺血-再灌注时, XO 途径产生的 ROS 对细胞膜造成损伤, 机体会相应产生大量炎症介质等趋化因子, 吸引中性粒细胞在缺血组织局部聚集并激活^[9], 再灌注期间激活的中性粒细胞耗氧量显著增加, 通过 NADPH/NADH 系统形成过多的氧自由基, 从而导致组织细胞膜损伤^[10]。

1.4 细胞内 Ca^{2+} 超载的双重影响途径

ROS 会损害细胞膜结构, 使细胞膜对 Ca^{2+} 通透性增高, 细胞内的 Ca^{2+} 浓度发生变化, Ca^{2+} 过度蓄积成为 Ca^{2+} 超载。 Ca^{2+} 超载会使线粒体功能受损, 线粒体氧化酶系统被抑制, 氧经单电子还原成氧自由基增多。组织缺血时, ATP 产生减少, 膜泵功能失灵, 使细胞内 Ca^{2+} 、 Na^+ 增多^[11]会影响细胞功能, 甚至造成细胞死亡。缺氧导致细胞中抗氧化酶活性降低, 氧自由基清除减少, 是氧自由基增多的原因之一。大量的 Ca^{2+} 会激活磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 使膜磷脂降解为花生四烯酸(arachidonic acid, AA), 后者在环氧酶的作用下生成前列腺素和白三烯的过程中产生大量的 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 、 $\text{O}_2\cdot^-$, 说明 Ca^{2+} 超载反过来又会影响自由基的产生。

1.5 儿茶酚胺自身氧化途径

再灌注是一种应激状态, 儿茶酚胺作为一种神经递质, 正常生理条件下其自动氧化速度很慢, 但在应激条件下如缺氧, 交感-肾上腺髓质系统会大量释放和分泌大量儿茶酚胺并伴有酸中毒现象^[12], 儿茶酚胺加速氧化, 增加了氧自由基的含量, 导致 ROS 含量增多, 从而引起细胞损伤。

2 缺血-再灌注氧化损伤对不同器官功能的影响

2.1 对心脏的影响

及时再灌注是治疗缺血性心脏病最有效的策略, 然而再灌注本身会导致致命的心脏损伤。在心肌 IRI 中观察到氧化应激和抗氧化机制之间存在不平衡性, 缺血缺氧会破坏氧磷、ATP 合成和利用, 腺苷、肌酐及碱基(次黄嘌呤等)明显增加^[13]; 再灌注后恢复氧供应, 由于 ROS 和 Ca^{2+} 超载的增加, 线粒体功能不断改变, 再灌注恢复后一段时间内会出现可逆性收缩, 由于氧化应激导致 ROS 爆发性生成, 最终使心肌缺血现象更加严重, 甚至发生严重的心律失常进而导致猝死。

Li 等^[14]对内质网应激参与糖尿病心肌 IRI 的影响进行研究,结果发现糖尿病心肌 IRI 与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和 ROS 密切相关,并且内质网和活性氧的产生互为因果关系,作为糖尿病患者的病理生理学特征,ROS 生成增加和氧化应激发生可显著降低心肌对 IRI 的耐受性。ERS 破坏内质网中的 Ca^{2+} 稳态,进一步导致线粒体钙超载和 ROS 生成增加,ROS 的积累通过级联放大激活下游 caspase 家族蛋白,从而启动细胞损伤过程。此外,关键 ERS 分子(ATF4 和 CHOP)上调,CHOP 可在 ERS 期间进一步诱导促凋亡蛋白的表达。因此,控制 ERS 和 ROS 对心肌细胞的损伤对于治疗心肌缺血再灌注损伤至关重要。Senthamizhselvan 等^[15]利用大鼠模型探讨氧化应激对心肌损伤的影响机制,结果发现长时间缺血后进行再灌注会加重氧化应激,因此氧化应激可能是心肌损伤的主要原因,而口服地奥司明通过抑制心肌损伤可以为心脏提供保护。与对照组相比,缺血后心室恢复改善,心肌酶渗漏减少,IRI 损伤后 Bcl-2 表达增加,抗氧化防御增强,因此地奥司明可能通过氧化损伤的清除作用从而对再灌注后大鼠心脏功能不全和氧化应激相关的脂质过氧化等方面起到保护作用。

2.2 对肾的影响

肾移植时会立即发生缺血-再灌注损伤导致“早期移植植物功能障碍”,并由此引发慢性移植植物肾病^[16],缺血是急性肾功能衰竭(acute renal failure, ARF)最常见的原因,主要表现为术后血清肌酐升高^[17],其中肾组织中的近曲小管对缺血最为敏感^[18],肾血流降低、肾小管堵塞严重时会发生坏死;再灌注会加重其病变,引起缺血性急性肾衰竭。在肾移植术后,IRI 期间 ROS 生成增加,超过了机体的正常能力,导致细胞氧化损伤。此外,ROS 引发的微血管损伤和功能障碍会造成缺氧环境,从而触发肾小管间质细胞的非纤维化反应,最终导致移植失败。

Legrand 等^[19]利用大鼠模型探讨氧化应激对肾损伤的影响机制时发现,在缺血后的肾中,氧化应激增加导致肾不同区域的内皮和上皮细胞中血管舒张和收缩介质失衡,肾小动脉对乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)等血管扩张剂的反应表现为血管舒张功能受损,对内皮素、白三烯 C4 和内皮衍生前列腺素 H2 等血管收缩剂的反应性增强,缺血损伤后内皮细胞和平滑肌细胞都会迅速受损;再灌注后,由于内皮细胞破裂或充血,管周毛细血管的血流可能受损,间质水肿压迫毛细血管,使血管腔变窄,增加血流量,白细胞的激活和聚集通过维持炎症和细

胞毒性反应增强内皮损伤^[20]。Huang 等^[21]通过建立转基因动物模型探讨锡钙蛋白-1(satellite test center 1, STC1)转基因过度表达是否能保护双侧肾 IRI 氧化损伤机制,结果发现,野生型小鼠的这种损伤导致肌酐清除率减半、有严重的管状空泡化和铸型形成、巨噬细胞和 T 细胞浸润增加、血管通透性高、产生更多的超氧化物和过氧化氢,与假手术对照组相比,激活(活性细胞外调节激酶)ERK/激活(活性细胞间激酶)JNK 和活性 P38(p38 激酶)的比率更高,而敲除锡钙蛋白-1(satellite test center 1 Tg, STC1 Tg)基因小鼠的肾 IRI 不会增加超氧化物和过氧化氢,这说明 STC1 抑制自由基是保护肾 IRI 损伤的主要机制。细胞表面受体 CD47 广泛表达于血管细胞和组织中,应激释放的基质细胞蛋白凝血酶反应蛋白-1(thrombospondin 1, TSP1)是 CD47 的配体激活剂^[22],Rogers 等^[22]研究表明肾 IRI 的发展需要完整的 CD47 信号传导。组织缺血模型中,通过阻断 CD47 信号传导调节一氧化氮活性可减少 IRI 引发的氧化损伤,用 CD47 抗体阻断 CD47 信号通路后,可减少氧化应激,减轻肾 IRI 并为肾移植提供肾保护^[23]。肾小管上皮细胞修复缺陷也可以导致肾 IRI,造成急性肾损伤,并促进慢性肾疾病的发生。Rogers 等^[24]研究表明,TSP1-CD47 阻断剂在降低肾 IRI 方面也具有一定作用,利用 CD47 抗体阻断可减轻促炎细胞因子的产生,上调多种自我更新转录因子,从而改善肾功能。

2.3 对脑的影响

中风在临床上发生率较高,严重危害人们的生命安全^[25],有效的中风治疗需要再通闭塞的脑血管,然而,脑部血管恢复血流供应可能造成脑 IRI,进而导致脑损伤,出现脑水肿及脑细胞坏死。脑的耗氧量和 ROS 生成量高,同时含有大量多不饱和脂肪酸,修复机制较少,神经元细胞不可复制^[26],内源性抗氧化剂水平较低^[27],因此脑对 IRI 非常敏感。氧化应激是诱导神经元凋亡的病理因素,缺血期间抗氧化剂水平降低,再灌注后自由基产生增加,脑组织因参与清除自由基的抗氧化剂少、缺乏过氧化氢酶等酶系统等原因使其更易受到活性氧的影响而发生损伤。此外,氧化应激与脑 IRI 中的炎症反应密切相关,过多的氧自由基可刺激炎症因子的表达,诱导产生更多的氧自由基,而这些自由基反过来会增强炎症级联反应,加剧脑损伤。

Wang 等^[28]研究发现,炎症相关分子如细胞膜 toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)和核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB)也参与缺血再灌注诱

导的脑损伤,转录因子 NF- κ B 可移位到细胞核并调节炎症基因的表达,而炎症因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)可刺激 NF- κ B 通路活化,加重炎症反应,从而诱导产生更多的氧自由基,加剧脑损伤。异黄酮 A 是一种植物雌激素,具有神经保护作用,Guo 等^[29]通过大鼠脑 IRI 模型研究了异黄酮 A 对实验性中风大鼠的神经保护作用,结果表明异黄酮 A 可以显著改善脑 IRI 大鼠的神经功能,减少梗死体积和脑水肿。异黄酮 A 治疗可有效抑制脑氧化应激水平,促进核转录因子(nuclear factor erythroid 2, Nrf2)核易位,增加血红素氧合酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)的表达,并抑制缺血脑组织中 NF- κ B 通路的激活。这说明异黄酮 A 主要通过调节氧化应激进而对脑的神经功能起到保护作用。

2.4 对肝的影响

作为机体内最重要的代谢性和解毒性器官^[30],肝移植时常发生 IRI,损伤特征为凝血功能障碍、转氨酶水平升高、肝功能不全等。肝血管内皮细胞、kupffer 细胞、中性粒细胞均可产生氧自由基,缺血 90 min 之内造成的损伤为可逆损伤,表现为肝窦淤血、干细胞肿胀变性^[31]。再灌注开始的数秒内,组织和血液中的 ROS 可增加数倍,ROS 易和蛋白质、核酸等多种细胞成分发生反应造成细胞损伤。早期阶段主要以 ROS 产生、实质功能障碍和促炎细胞因子分泌为特征,而再灌注后期主要以中性粒细胞浸润为特征,会进一步诱导 ROS 生成,破坏肝细胞结构和功能从而加剧肝损伤^[5]。

Bi 等^[32]研究发现肝 IRI 导致 ROS 过量产生,当 ROS 积累超过了机体自己可以清除的范围,就加剧了氧化应激,ROS 依赖的线粒体信号通路在肝细胞凋亡或坏死途径中发挥着关键作用。Zhang 等^[33]建立大鼠肝 IRI 模型,利用一种具有抗氧化、抗炎作用的化合物-环烯醚萜苷桃叶珊瑚甙(aucubin, AU)对氧化应激与肝 IRI 相关性进行了探究,结果发现 AU 可通过降低肝转氨酶活性和肝组织病理学改变降低肝 IRI 的发生,同时也发现 AU 可显著降低肝中丙二醛(malondialdehyde, MDA)和 ROS 水平、增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平以抑制氧化应激,这说明 AU 可能是通过抗氧化作用降低肝 IRI 的程度进而对肝的代谢、解毒功能起到保护作用。

3 以氧化损伤为靶点的最新缺血再灌注治疗策略

3.1 清除氧自由基

由于氧化应激在 IRI 损伤过程中发挥重要作用,

自由基可能是引起 IRI 的关键因素,因此防止自由基引起的氧化损伤对 IRI 的治疗至关重要。通过抑制对氧化敏感的信号转导途径已成为防治 IRI 的基本策略之一。其中 Nrf2/ARE 途径被认为是降低氧化应激的最重要途径^[34],可以降低 IRI 损伤。

IRI 损伤中的氧化应激可能导致机体出现越来越多的氧化应激指示分子标记物如 MDA 等,同时导致包括(human thioredoxin 1, Trx1)在内的抗氧化剂的耗尽,Trx1 是迄今为止已知的最为重要的一种细胞抗氧化剂,在心肌细胞防御 ROS 损伤中起着关键作用。Wu 等^[35]通过构建离体大鼠心脏 IRI 诱导的心肌损伤和 H9c2 心肌细胞 OGD/R 诱导的损伤模型,结果发现右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)预处理能够通过激活 Trx1/Akt 通路显著降低氧化应激和心肌细胞凋亡,从而证明 Dex 可以通过 Trx1 依赖的 Akt 途径保护心脏免受 IRI 损伤。

丹酚酸 B(salvianolic acid B, Sal B)具有清除自由基活性的作用,其抗氧化能力与其对氧化应激引起的细胞损伤的保护作用一致。Qiao 等^[36]利用 Sal B 预处理建立大鼠模型探讨氧化应激对心脏损伤的影响机制,结果发现 Sal B 可以改善心脏收缩力、减轻过度收缩、降低舒张压,这被认为是氧气增加的主要原因,通过检测氧化指标发现,IRI 治疗后大鼠的抗氧化系统发生了改变,这些酶共同作用以消除 ROS,生理浓度的微小偏差可能会对细胞脂质、蛋白质和 DNA 的抗氧化损伤产生显著影响,Sal B 治疗可消除 IRI 产生的自由基,这可能是由于 Sal B 的抗氧化性能,减少氧化应激发生,从而减少细胞死亡,对心肌 IRI 氧化损伤起到保护作用。

近年来,有部分研究者采用抗氧化剂如维生素 E 等用于 ROS 诱导氧化损伤的预防和治疗。Sun 等^[37]研究发现,长期高脂饮食(high fat feed, HFD)喂养可诱导小鼠肾损伤,而 ROS 清除剂可改善高糖(high sugar, HG)、棕榈酸(palmitic acid, PA)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)对肾小管细胞(renal tubular cells, HK-2)和系膜细胞的作用。也有研究发现,单参、甘露醇、银杏内酯等物质具有很强的抗氧化能力,可以有效清除氧自由基,对组织器官 IRI 损伤均有很好的保护作用。

3.2 缺血预处理和缺血后处理

组织器官经反复短暂缺血后,会明显增强抵抗较长时间 IRI 的现象称为缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC),短暂缺血预处理可保护器官免受长期 IRI,提高器官再生能力^[38]。氧化功能受损和缺血损伤耐受性差有关,局部缺血预适应

(ischemic preconditioning, LIPC)通过调节内源性氧化剂/抗氧化系统的失衡来保护肝窦内皮细胞和肝细胞,可以减少手术中失血,降低氧化反应和过氧化物产生等,IPC 的效果针对脑、小肠、肝等组织的治疗效果明显,但由于缺血事件的不可预知性,使其应用受到一定限制。

全面恢复再灌注前短暂多次预再灌或停灌处理的现象称为缺血后处理(ischemic posttreatment, I-Post),I-Post 能够缩小心肌梗死的范围,降低心率失常的发生率^[39],一般认为 I-Post 可减少 ROS 在再灌注过程中自由基的爆发性生成,促进内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的表达,并可保护多次循环复灌、复停后的线粒体超微结构^[40],减少中性粒细胞与内皮细胞相互作用^[41],此外 I-Post 还可以活化再灌注损伤补救激酶(the reperfusion injury salvage kinase, RISK),这些激酶被激活后可抑制细胞的凋亡,诱导 eNOS 等产生从而起到缺血再灌注氧化损伤保护作用。

4 小结与展望

由于各组织器官的结构、功能、代谢特点不同,ROS 产生的途径和机制也不尽相同。针对 IRI 过程中的各种复杂的病理生理变化,现有通过抑制 IRI 过程中氧化损伤介导的不同组织器官损伤的治疗方法还非常有限。目前针对 IRI,临床主要以对症支持治疗为主,主要是直接应用具有抗炎抗氧化性的药物,但迄今为止临床疗效还不令人十分满意。近年来,中草药已成为研究热点,诸多研究发现中药中含有的青蒿琥酯、灵芝多糖、茶多酚、人参皂苷等成分具有抗氧化、抗炎、抗衰老、抗肿瘤、抗凋亡和护肝等广谱药理活性作用^[42],有效控制和预防缺血-再灌注中氧化应激的发生具有一定的潜力和研究价值。此外,根据缺血-再灌注氧化应激发生的不同机制对药物进行筛选也是一种选择,如有研究发现非诺贝特作为一类降血脂药物具有较强的抗氧化应激作用,可有效减轻大脑、心脏、肾的 IRI 损伤^[43]。因此开展以氧化损伤为靶点的缺血再灌注治疗策略和相应药物研发对于临床 IRI 治疗具有十分重要的意义和广阔的应用前景。

参考文献:

[1] Sherif IO, Alshaalan AA, Al-Shaalan NH. Renoprotective effect of vildagliptin following hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Ren Fail, 2020, 42(1): 208-215.
[2] Lartigue A, Burlat B, Coutard B, et al. The megavirus chilensis

Cu, Zn-superoxide dismutase; the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme [J]. J Virol, 2015, 89(1): 824-832.
[3] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 298(12): 229-317.
[4] Hu SY, Zhu PJ, Zhou H, et al. Melatonin-induced protective effects on cardiomyocytes against reperfusion injury partly through modulation of IP3R and SERCA2a via activation of ERK1 [J]. Arq Bras Cardiol, 2018, 110(1): 44-51.
[5] Zabala V, Boylan JM, Thevenot P, et al. Transcriptional changes during hepatic ischemia-reperfusion in the rat [J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0227038.
[6] 李欢,熊静,杨树龙,等. 线粒体通路、氧化应激在肝脏缺血再灌注损伤细胞凋亡中作用机制的研究进展 [J]. 山东医药杂志, 2018, 58(40): 99-102.
[7] Zhou H, Du W, Li Y, et al. Effects of melatonin on fatty liver disease: The role of NR4A1/DNA-PKcs/p53 pathway, mitochondrial fission, and mitophagy [J]. J Pineal Res, 2018, 64(1): e12450.
[8] Li H, Yan ZY, Zhu J, et al. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats [J]. Neuropharmacology, 2011, 60(2-3): 252-258.
[9] Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, et al. An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. Nat Med, 2018, 24(1): 73-83.
[10] 李勇军,贾菊芳,敖明章,等. 甲基莲心碱对整体大鼠缺血再灌注损伤心肌及单相动作电位的影响 [J]. 同济医科大学学报, 1993, 22(3): 215-215.
[11] 韦武亭. α -硫辛酸通过线粒体途径在大鼠创伤性脑损伤中抑制神经细胞凋亡的作用研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
[12] 王忠. 丙泊酚对离体大鼠工作心脏心肌缺血再灌注损伤后儿茶酚胺释放的抑制作用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2002.
[13] Bagur R, Tanguy S, Foriel S, et al. The impact of cardiac ischemia/reperfusion on the mitochondria-cytoskeleton interactions [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(6): 1159-1171.
[14] Li WY, Li W, Leng Y, et al. Ferroptosis is involved in diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury through endoplasmic reticulum stress [J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(2): 210-225.
[15] Senthamizhselvan O, Manivannan J, Silambarasan T, et al. Diosmin pretreatment improves cardiac function and suppresses oxidative stress in rat heart after ischemia/reperfusion [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 736(4): 131-137.
[16] Chan GC, Chow KM. Should we use kidneys from donors with acute kidney injury for renal transplantation? [J]. Nephrology, 2020, 25(2): 105-115.
[17] Xu J, Ma L, Fu P. Eriocitrin attenuates ischemia reperfusion-induced oxidative stress and inflammation in rats with acute kidney injury by regulating the dual-specificity phosphatase 14 (DUSP14)-mediated Nrf2 and nuclear factor- κ B (NF- κ B)

- pathways [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(4): 337–350.
- [18] Zhang YF, Nakano D, Guan Y, et al. A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor-dependent pathway after renal injury in mice [J]. *Kidney Int*, 2018, 94(3): 524–535.
- [19] Legrand M, Mik EG, Johannes T, et al. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney [J]. *Mol Med*, 2008, 14(7–8): 502–516.
- [20] Zhao HL, Alam A, Soo AP, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond [J]. *Ebiomedicine*, 2018, 28(1): 31–42.
- [21] Huang LP, Belousova T, Chen MY, et al. Overexpression of stanniocalcin-1 inhibits reactive oxygen species and renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(8): 867–877.
- [22] Rogers NM, Yao MY, Novelli EM, et al. Activated CD47 regulates multiple vascular and stress responses: implications for acute kidney injury and its management [J]. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 2012, 303(8): F1117–F1125.
- [23] Wang XC, Xu M, Jia JL, et al. CD47 blockade reduces ischemia/reperfusion injury in donation after cardiac death rat kidney transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(4): 843–854.
- [24] Rogers NM, Zhang ZJ, Wang JJ, et al. CD47 regulates renal tubular epithelial cell self-renewal and proliferation following renal ischemia reperfusion [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(2): e334–347.
- [25] Kang YC, Sun YP, Li TT, et al. Garcinol protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 54(10): 101672.
- [26] 齐磊, 欧阳欣, 于明帅, 等. 丙泊酚对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型神经功能改善及 PKA-CREB 通路的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 30–36.
- [27] Shalavadi MH, Chandrashekhar VM, Muchchandi IS. Neuroprotective effect of convolvulus pluricaulis choisy in oxidative stress model of cerebral ischemia reperfusion injury and assessment of MAP2 in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249(1): e112393.
- [28] Wang X, An F, Wang S, et al. Orientin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rat model through the AQP-4 and TLR4/NF- κ B/TNF- α signaling pathway [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, 26(10): 2199–2214.
- [29] Guo MM, Lu HL, Qin J, et al. Biochanin a provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-Mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 26(25): 8975–8983.
- [30] Inoue Y, Ai S, Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Inflamm Regen*, 2015, 35(2): 061–068.
- [31] Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: what is it, when does it occur, and why does it matter? [J]. *Practical Diabetes Int*, 2011, 24(6): 310–316.
- [32] Bi JB, Zhang J, Ren YF, et al. Irisin alleviates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive mitochondrial fission, promoting mitochondrial biogenesis and decreasing oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2019, 20(10): 296–306.
- [33] Zhang SL, Feng ZJ, Gao WD, et al. Aucubin attenuates liver ischemia-reperfusion injury by inhibiting the HMGB1/TLR-4/NF- κ B signaling pathway, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: e544124.
- [34] Shirley R, Ord EN, Work LM. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke [J]. *Antioxidants*, 2014, 3(3): 472–501.
- [35] Wu ZL, Davis JR J, Zhu Y. Dexmedetomidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by ameliorating oxidative stress and cell apoptosis through the Trx1-dependent akt pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 11(8): 1–12.
- [36] Qiao Z, Xu Y. Myocardium protective function of salvianolic acid B in ischemia reperfusion rats [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13(4): 157–161.
- [37] Sun Y, Ge X, Li X, et al. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(10): 901–914.
- [38] Pantazi E, Zaouali MA, Bejaoui M, et al. Silent information regulator 1 protects the liver against ischemia-reperfusion injury: implications in steatotic liver ischemic preconditioning [J]. *Transpl Int*, 2014, 27(5): 493–503.
- [39] Tejima K, Arai M, Ikeda H, et al. Ischemic preconditioning protects hepatocytes via reactive oxygen species derived from Kupffer cells in rats [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): 1488–1496.
- [40] Sun K, Liu ZS, Sun Q. Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic postconditioning [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(13): 1934–1938.
- [41] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): H579–H588.
- [42] Zhu D, Wu L, Li CR, et al. Ginsenoside rg1 protects rat cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation oxidative injury via antioxidant and intracellular calcium homeostasis [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 117–124.
- [43] Zhang J, Cheng P, Dai WQ, et al. Fenofibrate ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: involvements of apoptosis, autophagy, and PPAR- α activation [J]. *Ppar Res*, 2021, 2021: 1–16.

[收稿日期]2021-11-12