

纪爽,潘慧,李天骢,等. 左向右分流减缓肺动脉高压大鼠心脏重构 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 1-7.
Ji S, Pan H, Li TQ, et al. Left-to-right shunt slows cardiac remodeling in rats with pulmonary hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 1-7.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.001

左向右分流减缓肺动脉高压大鼠心脏重构

纪爽^{1,2}, 潘慧², 李天骢², 叶梦婷⁵, 马铭婕², 张学佳², 王晓建^{2*}, 杨晓敏^{3,4*}

(1.内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014040; 2.中国医学科学院, 北京协和医学院, 阜外医院肺血管医学重点实验室, 心血管疾病国家重点实验室, 国家心血管病中心, 北京 100037; 3.包头医学院第二附属医院心内科, 内蒙古 包头 014030; 4.浙江大学医学院附属邵逸夫医院全科医学科, 杭州 310016; 5.衢州市柯城区人民医院, 浙江 衢州 324000)

【摘要】 目的 左向右分流型先心病相关肺动脉高压患者预后要显著好于特发性肺动脉高压患者,但具体机制不清。本项目旨在制作特发性肺动脉高压与先心病合并肺动脉高压大鼠模型,比较两种模型在肺血管重构和心脏重构方面的异同。**方法** 雄性 SD 大鼠分成 3 组:对照组($n=8$),单纯野百合碱(monocrotaline, MCT)组(50 mg/kg)模拟特发性肺动脉高压($n=8$);颈部动静脉分流手术+MCT 组(50 mg/kg)模拟左向右分流型先心病合并肺动脉高压($n=8$)。造模后 3 周进行超声心动图检测、左右心导管测压和肺组织病理学染色,比较大鼠心肺表型。**结果** 与对照组相比,单纯 MCT 组和手术+MCT 组大鼠在术后 3 周右室肥厚、右室功能障碍、平均肺动脉压、肺血管重构等多项指标上均无明显差异。但在左心相关多项指标上,手术+MCT 组大鼠显著优于单纯 MCT 组。与对照组相比,手术+MCT 组大鼠舒张期左室腔径(left ventricular internal diame, LVID;d)未降低,左心射血分数(ejection fraction, EF)未升高;手术+MCT 组大鼠右心等容收缩期心室内压上升最大速率(maximal ventricular pressure rising rate, dp/dt Max)和等容舒张期心室内压下降最大速率(maximal rate of decrease of ventricular pressure, dp/dt Min)均低于单纯 MCT 组($P<0.05$)。**结论** 左向右分流手术不能改变 MCT 诱导产生的肺动脉高压和右心重构,但能够产生左心代偿作用,可能有利于患者预后。本项目动物模型为研究特发性肺动脉高压及先心病相关肺动脉高压的不同病理机制建立基础。

【关键词】 先天性心脏病相关肺动脉高压;特发性肺动脉高压;肺血管重构;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0001-07

Left-to-right shunt slows cardiac remodeling in rats with pulmonary hypertension

Ji Shuang^{1,2}, Pan Hui², Li Tianqi², Ye Mengting⁵, Ma Mingjie², Zhang Xuejia², Wang Xiaojian^{2*}, Yang Xiaomin^{3,4*}
(1. Baotou Medical College of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China.
2. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Pulmonary Vascular Medicine of Fuwai Hospital, State Key Laboratory of Cardiovascular Diseases, National Center of Cardiovascular Diseases, Beijing 100037. 3. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014030. 4. Department of General Medicine, Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016. 5. Quzhou Kecheng District People's Hospital, Quzhou 324000)

【基金项目】 国家自然科学基金(82170408);北京市自然科学基金(7222142);心血管疾病国家重点实验室重点项目(2022ZD-05);北京市自然科学基金面上项目(7222142)。

【作者简介】 纪爽(1995—),女,硕士研究生,研究方向:肺血管疾病。E-mail:jishuang2020@163.com

【通信作者】 王晓建(1981—),男,副教授,博士生导师,研究方向:肺动脉高压遗传学。E-mail:wang_xiaojian@vip.163.com
杨晓敏(1973—),女,教授,硕士生导师,研究方向:心血管疾病。E-mail:yangxm209@163.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective The prognosis of patients with left-to-right shunt congenital heart disease-associated pulmonary hypertension is significantly better than that of patients with idiopathic pulmonary hypertension, but the specific mechanism is unclear. The purpose of this study was to establish a rat model of idiopathic pulmonary hypertension and congenital heart disease with pulmonary hypertension, and compare the similarities and differences between the two models in terms of pulmonary vascular remodeling and cardiac remodeling. **Methods** Male SD rats were divided into three groups: control group ($n=8$), monocrotaline (MCT) group (50 mg/kg) to simulate idiopathic pulmonary hypertension ($n=8$), and cervical arteriovenous shunt surgery+monocrotaline (MCT) group (50 mg/kg) to simulate left-to-right shunt congenital heart disease with pulmonary hypertension ($n=8$). Three weeks after establishment of the model, echocardiography, left and right cardiac catheter pressure measurements, and lung histopathological staining were performed to compare cardiac and pulmonary phenotypes of the rats. **Results** Compared with the control group, no significant difference was found between the MCT and the operation+MCT groups in terms of the right ventricular hypertrophy, right ventricular dysfunction, mean pulmonary artery pressure, pulmonary vascular remodeling, or other indicators at 3 weeks after the operation. However, many indexes related to left heart in rats of the operation+MCT group were significantly better than those in the simple MCT group. Compared with that in the control group, the left ventricular lumen diameter (and left ventricular ejection fraction) in the operation+MCT group did not decrease in the diastolic period. The maximum rate of increase in right ventricular internal pressure and the maximum rate of decrease in left ventricular internal pressure in the operation+MCT group were lower than that in the simple MCT group. **Conclusions** Left-to-right shunt surgery cannot change MCT-induced pulmonary hypertension or right heart remodeling, but can produce left heart compensation, which may be beneficial to the prognosis of patients. The animal model of this study establishes the basis to examine various pathological mechanisms of idiopathic pulmonary hypertension and pulmonary hypertension associated with congenital heart disease.

【Keywords】 congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension; idiopathic pulmonary hypertension; pulmonary vascular remodeling; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是第一大类肺高血压 (pulmonary hypertension, PH), 根据病因不同可分为先心病相关肺动脉高压 (congenital heart disease-associated pulmonary arterial hypertension, CHD-PAH)、特发性肺动脉高压 (idiopathic pulmonary hypertension, IPAH)、遗传性肺动脉高压、药物和毒素相关肺动脉高压等多种亚型^[1]。CHD-PAH 和 IPAH 是我国排名前两位的肺动脉高压类型, 分别占第一大类肺动脉高压 43.4%~56.1%、30.8%~35.4%^[2-3]。这两种肺动脉高压预后差异很大, CHD-PAH 的 1 年、5 年和 10 年生存率分别是 99%、91% 和 85%, 而 IPAH 只有 90%、63% 和 46%^[4]。为何 CHD-PAH 患者的预后优于 IPAH, 具体机制尚不十分清楚。

本课题组在之前的研究中发现, 单纯左向右分流手术不会诱导大鼠产生肺动脉高压, 但会在术后 1 周诱导大鼠出现快速的左心代偿性重构, 并在术后 8 周持续存在^[5]。有研究表明, 严重的 CHD-PAH 患者尽管会产生右心结构的改变, 但右心收缩功能却可以在数十年内保持正常。这种改变可能是由于分流的存在, 导致左心部分分担了右心的压

力^[6]。在先天性心脏病的早期关闭心脏内左向右的分流, 使肺血流动力学和血管回到正常环境, 这些患者仍有部分会发展成肺动脉高压且预后明显比未进行矫治的 CHD-PAH 患者差^[7-10]。所以, 我们推断左向右分流引起的左心代偿是心脏整体的“预适应”, 可能在先心病合并肺动脉高压患者的预后中起积极的作用。

本项目中, 我们利用大鼠颈部分流手术叠加野百合碱 (monocrotaline, MCT) 来模拟左向右分流型 CHD-PAH, 设置单纯 MCT 组来模拟 IPAH, 比较两组肺动脉高压大鼠在表型差异, 进而探究两种不同类型肺动脉高压患者预后不同的可能原因。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠 (150~200 g, 8 周龄), 购买自北京维通利华动物实验技术有限公司 [SCXK(京) 2021-0006]。动物饲养条件为 12 h/12 h 的明/暗交替、湿度 (50±10)%、温度 (22±1)℃, 自由获取饮食, 饲养在清洁环境, 饲养于心血管疾病国家重点实验室 [SYXK(京) 2022-0052]。所有

动物实验严格遵守 3R 原则,本项目研究方案通过阜外医院动物伦理委员会批准(FW-2022-0028)。

1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(广州硕恒生物科技有限公司,批号:20221001);野百合碱(MCT)(美国 Sigma 公司,批号:mfcd00084656);4%多聚甲醛溶液(北京雷根生物技术有限公司,批号:0111A23);EVG 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:GR3382140-1)。小动物超声仪(加拿大 VisualSonics 公司,序列号:041QPR);小动物气麻醉机(美国 Matrx 公司,序列号:V1643859);多导生理记录仪(Powerlab 8/30)及其配套的压力换能器(北京华睿宝科技有限公司,序列号:DB763);全景玻片扫描系统(厦门精艺兴业科技有限公司,序列号:17490957)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将大鼠随机分为 3 组:对照组(control, $n=8$);单纯野百合碱组(simple MCT, $n=8$),皮下注射 MCT(50 mg/kg);手术+MCT 组(operation+MCT, $n=8$),颈部动静脉吻合术的同时注射 MCT(50 mg/kg)。造模后 3 周为实验终点,各组大鼠进行超声心动图检查、右心导管检测和肺组织病理学分析。

1.3.2 颈部动静脉吻合术

吸入异氟烷麻醉后,大鼠仰卧固定于手术台,颈部剃毛备皮后,做一斜形切口。分离颈部动、静脉,腹腔注射肝素 200 U,夹住动、静脉近端,绑扎远端,剪断动、静脉,吻合动、静脉残端。动静脉吻合后,拔除血管夹,立即可见静脉搏动,吻合口无漏血,手术成功。缝合颈部皮肤,消毒伤口表面。

1.3.3 MCT 皮下注射

在大鼠后颈背部皮下注射 MCT(50 mg/kg)。

1.3.4 超声心动图检查

将大鼠吸入异氟烷麻醉,仰卧于测量台上,暴露胸部皮肤并涂抹耦合剂,使用小动物超声装置(Vevo 2100 成像系统)检测主动脉短轴切面上右心室流出道宽度,在多普勒模式下的主动脉短轴图像上测量肺动脉血流量,在四腔切面上观察三间瓣环收缩期位移,舒张期右心室游离壁厚度和管腔直径是在胸骨旁右心短轴切面上测量的。

1.3.5 左右心导管检查

当大鼠吸入异氟烷麻醉后,在胸骨上方 1 cm 处切开皮肤,暴露颈外静脉。剥离并切断颈外静脉,

结扎远端,近端打松结,拉紧近端结扎线以防止出血。用针刺破颈外静脉,将导管插入血管,将近心端结扎线扎紧以固定导管。导管缓慢推进,导管穿过右心进入肺动脉。用波形验证导管位置,并记录右心室和肺动脉压力。取 3 个稳定波形,每个波形由 10 个心动周期组成,记录平均肺动脉压和右心室收缩压。保存 3 组数据的平均值作为大鼠的压力值,并采用相同的方法测量左心。

1.3.6 病理检查

取出完整的大鼠左叶肺组织,在室温下用 4%多聚甲醛固定 2 周,然后脱水并包埋在石蜡中。HE 和 EVG 染色后计算肺小动脉($<50\text{ }\mu\text{m}$ 和 $50\sim100\text{ }\mu\text{m}$)中膜厚度(肌层厚度/血管外径)的百分比。每组至少计数 5 只大鼠,每只大鼠至少有 15 只血管。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析,连续变量表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。多组间均值比较采用单因素方差分析,两组间均值比较采用独立样本 t 检验两组比较, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术+MCT 组大鼠的左心室重构优于单纯 MCT 组大鼠

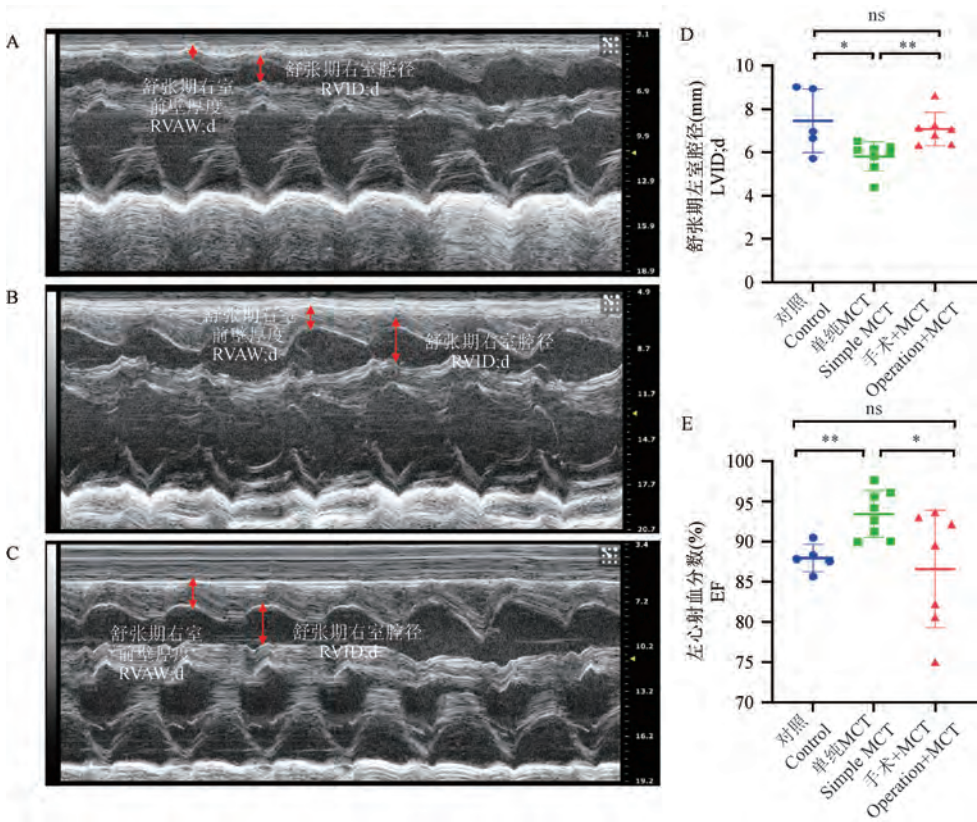
与对照组相比,单纯 MCT 组和手术+MCT 组的舒张期右室前壁厚度(right ventricular wal, RVAW;d)和舒张期右室腔径(right ventricular internal diameter, RVID;d)显著增加(表 1, $P<0.01$);三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE)和肺动脉血流加速时间/肺动脉射血时间(acceleration time of pulmonary blood flow/pulmonary ejection time, PAT/PET)均降低,提示两组大鼠均出现右心重构和右心功能障碍(表 1, $P<0.01$)。单纯 MCT 组与手术+MCT 组两组之间在右心重构指标上无明显差异。单纯 MCT 组大鼠的左心受扩张的右心室压迫,舒张期左室腔径(left ventricular internal diame, LVID;d)减小,左心射血分数(ejection fraction, EF)升高,显著高于对照组(图 1, $P<0.05$)。与单纯 MCT 组相反,手术+MCT 组大鼠虽然右心室也发生重构,但是 LVID;d 未降低,EF 值未升高,总体上更接近正常对照组,提示左向右分流手术部分缓解了 MCT 引起的左心重构。

表 1 实验终点三组大鼠超声结果

Table 1 Ultrasonic results of rats in three groups at the end of the experiment

组别 Groups	舒张期 右室前壁 厚度 (mm) RVAW; d	舒张期 右室腔径 (mm) RVID; d	三尖瓣环 收缩期 位移 (mm) TAPSE	肺动脉血流 加速时间/ 肺动脉 射血时间 PAT/PET	舒张期 左室前壁厚度 (mm) LVAW; d	舒张期 左室腔径 (mm) LVID; d	舒张期左室 后壁厚度 (mm) LVPW; d	左心射 血分数 (%) EF
对照 Control	1.5±0.7	2.4±0.4	3.8±0.1	0.4±0.1	1.94±0.2	7.46±1.2	2.1±0.4	88.0±1.4
单纯 MCT Simple MCT	1.6±0.3 ^a	4.5±1.1 ^a	2.4±0.4 ^a	0.2±0.1 ^a	1.9±0.3	5.8±0.7 ^a	2.1±0.2	93.0±2.7 ^a
手术+MCT Operation+MCT	1.7±0.7 ^a	4.7±1.7 ^a	2.2±0.6 ^a	0.2±0.1 ^a	2.0±0.5	7.0±0.7 ^b	2.0±0.3	86.0±6.7 ^b

注:与对照组相比, ^a $P<0.05$;与单纯 MCT 组相比, ^b $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with simple MCT group, ^b $P<0.05$.



注:A:对照组($n=5$);B:单纯 MCT 组($n=8$);C:手术+MCT 组($n=8$);D:舒张期左室腔径统计图;E:左心射血分数统计图。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 实验终点大鼠胸骨旁右心短轴切面 M 模式检测图及结果统计图

Note. A, Control group($n=5$). B, Simple MCT group ($n=8$). C, Operation+MCT group ($n=8$). D, Statistical diagram of left ventricular cavity diameter in diastole. E, Statistical diagram of left ventricular ejection fraction. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 M-mode detection diagram and result statistics of parasternal right heart short-axis section in rats at the end of the experiment

2.2 手术+MCT 组大鼠的右心室功能处于代偿期

与对照组相比,其余两组的平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure,mPAP)和右室收缩压(right ventricular systolic pressure,RVSP)均升高(表 2, $P<0.01$),提示两组大鼠均发生肺动脉高压。与单纯 MCT 组相比,手术+MCT 组的 mPAP 和

RVSP 稍低,左室收缩压(left ventricular systolic pressure,LVSP)显著升高(71.2 vs 105.1, $P<0.05$)(表 2, $P<0.01$),在右心功能方面,单纯 MCT 大鼠的右心等容收缩期心室内压上升最大速率(maximal ventricular pressure rising rate,dp/dt Max)和等容舒张期心室内压下降最大速率

(maximal rate of decrease of ventricular pressure, dp/dt Min) 均显著高于对照组,提示肺动脉压力升高使该组大鼠右心室处于功能代偿期。如图 2 所示,MCT+分流组大鼠右心代偿虽然高于对照组,但显著低于单纯 MCT 组,提示该组大鼠右心后负荷和代偿反应明显低于单纯 MCT 组 ($P <$

0.05)。这与 MCT+分流组大鼠肺血管压力稍低于单纯 MCT 组相一致。

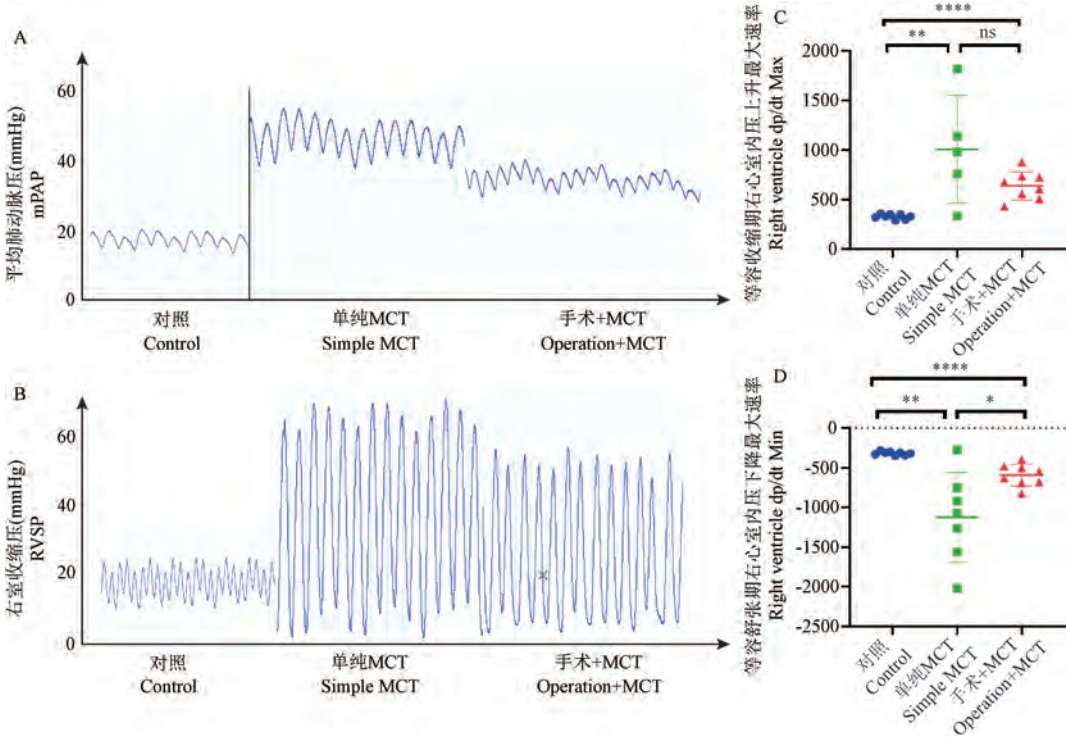
2.3 MCT 注射诱导严重肺血管重构

在明确右室重构和肺动脉压力变化的前提下,对三组大鼠肺组织病理学染色,分析肺血管病变程度 (图 3)。将肺小动脉分为直径 $<50\mu\text{m}$ 和直径 $50\sim$

表 2 实验终点三组大鼠导管结果

Table 2 Results of catheter in three groups of rats at the end of the experiment				
组别 Groups	对照 Control	单纯 MCT Simple MCT	手术+MCT Operation+MCT	
平均肺动脉压 (mmHg) mPAP	17.6±2.3	43.6±11.1 ^a	33.8±8.4 ^a	
右室收缩压 (mmHg) RVSP	19.1±2.4	59.8±20.5 ^a	47.8±13.8 ^a	
右室舒张压 (mmHg) RVDP	10.9±2.7	8.1±9.0	47.8±13.8 ^a	
右心等容收缩期心室内压上升最大速率 Right ventricle dp/dt Max	328.8±23.2	1088.4±453.5 ^a	638.5±133.6 ^a	
右心等容舒张期心室内压上升最大速率 Right ventricle dp/dt Min	-317.5±21.1	-1123.6±524.2 ^a	-592.1±129.0 ^{ab}	
左室收缩压 (mmHg) LVSP	71.2±7.4	92.0±9.6	105.1±6.9 ^a	
左室舒张压 (mmHg) LVDP	-3.0±8.0	2.9±1.7	-3.9±3.0 ^{ab}	
左心等容收缩期心室内压上升最大速率 Left ventricle dp/dt Max	2275.0±292.6	3458.0±596.2 ^a	3464.3±464.3	
左心等容收缩期心室内压上升最大速率 Left ventricle dp/dt Min	-2112.5±455.6	-2184.6±363.6	-2754.8±357.6 ^a	

注:与对照组相比, ^a $P < 0.05$;与单纯 MCT 组相比, ^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with simple MCT group, ^b $P < 0.05$.



注:A:各组大鼠平均肺动脉压力波形图($n=8$);B:各组大鼠右室收缩压波形图($n=8$);C:右心等容收缩期心室内压力上升最大速率(dp/dt Max)统计图;D:右心等容舒张期心室内压下降最大速率(dp/dt Min)统计图。与对照组相比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $**** P < 0.0001$ 。

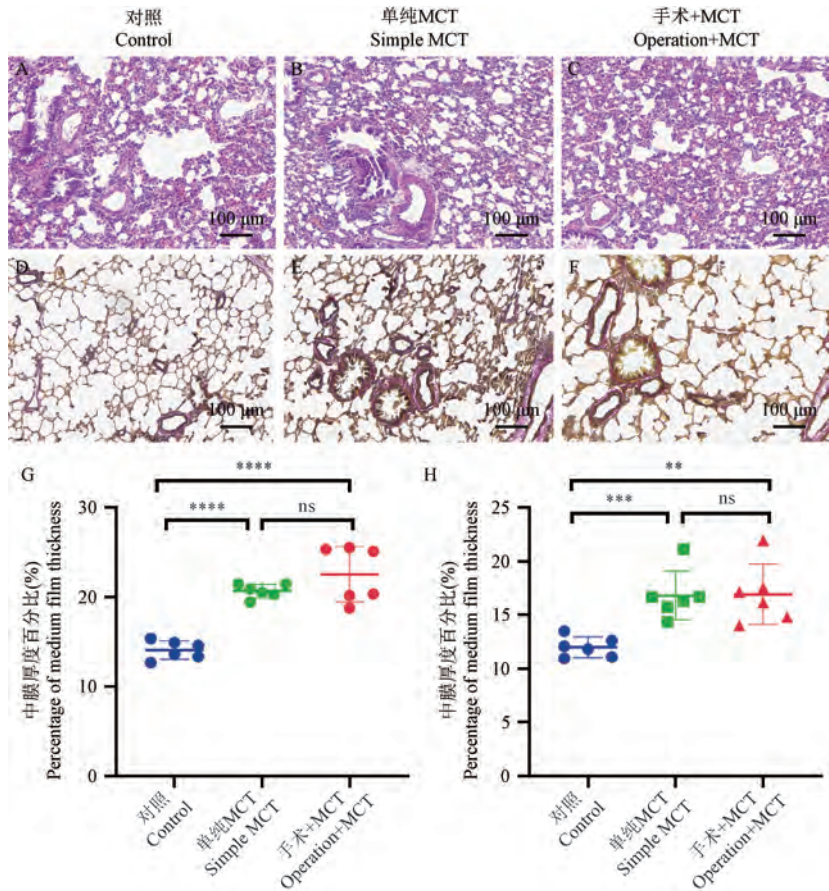
图 2 各组大鼠右心导管测压波形图

Note. A, Waveform of mean pulmonary artery pressure of rats in three groups ($n=8$). B, Right ventricular systolic pressure waveform of rats in three groups ($n=8$). C, Statistical diagram of the maximum rate of ventricular pressure rise (dp/dt Max) during isovolumic contraction of the right heart. D, Maximum rate of decrease of ventricular internal pressure (dp/dt Min) of right heart during isovolumic relaxation. Compared with control group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $**** P < 0.0001$.

Figure 2 Waveform of right ventricular catheter pressure measurement of rats in each group

100 μm 两组,分别统计中膜厚度百分比。与对照组相比,单纯 MCT 组和手术+MCT 组肺小动脉中膜增厚,肺血管明显重构(表 3, $P<0.001$)。单纯 MCT 组

和手术+MCT 组两组之间肺小动脉重构程度没有明显差异(图 3G、3H, $P<0.05$),提示左向右分流不影响肺血管重构,主要影响心脏重构,进而影响预后。



注:A~C:对照组、单纯 MCT 组、手术+MCT 组大鼠肺小动脉 HE 染色图;D~F:对照组、单纯 MCT 组、手术+MCT 组大鼠肺小动脉 EVG 染色图;G:直径 50 μm 以下血管中膜厚度百分比统计图($n=8$);H:直径 50~100 μm 血管中膜厚度百分比统计图($n=8$)。与对照组相比, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

图 3 各组大鼠肺组织病理染色及统计图

Note. A~C, HE staining of pulmonary arterioles of rats in control group, simple MCT group and operation+MCT group. D~F, EVG staining of pulmonary arterioles in rats of control group, simple MCT group and operation + MCT group. G, Statistical chart of percentage of vascular media thickness below 50 μm ($n=8$). H, Statistical chart of the percentage of vascular media thickness 50~100 μm ($n=8$). Compared with control group, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$.

Figure 3 Pathological staining and statistical diagram of lung tissue of rats in each group

表 3 实验终点三组大鼠肺小动脉中膜厚度百分比结果
Table 3 Percentage results of pulmonary arteriolar media thickness of rats in three groups at the end of the experiment

分组 Groups	<50 μm	50~100 μm
对照 Control	14.1±1.0	12.0±0.9
单纯 MCT Simple MCT	20.7±0.7 ^a	16.8±2.1 ^a
手术+MCT Operation+MCT	22.6±2.8 ^a	16.9±2.6 ^a

注:与对照组相比, $^aP<0.05$ 。
Note. Compared with control group, $^aP<0.05$.

3 讨论

本研究中,单纯 MCT 组和手术+MCT 组大鼠术后 3 周均出现肺动脉高压和右心室重构,且两组大鼠之间无明显差异。但对更多表型数据进行分析后,发现手术+MCT 组大鼠的 LVID;d、EF、右心 dp/dt Max 和 dp/dt Min 均明显优于单纯 MCT 组,提示 CHD-PAH 与 IPAH 在心脏重构方面有很大的不同。注射 MCT 是制造肺动脉高压动物模型的经典方法,单次皮下注射剂量范围为 40~80 mg/kg 体

重,最常用的的剂量为 60 mg/kg 体重^[11-12]。本研究中,我们将 MCT 的注射量从常规的 60 mg/kg 体重降低到 50 mg/kg 体重,更好地展示了左向右分流在 CHD-PAH 中所起的作用。与腹主动脉-腔静脉分流术模型相比^[13-14],本研究采用的颈部分流更靠近大鼠心脏,所产生的分流也更加强烈,更加符合患者的临床特征。本研究所模拟的 CHD-PAH 在肺动脉压力、右室重构、肺血管病理重构等多方面与 IPAH 大鼠没有明显差别,但 CHD-PAH 大鼠的左室功能更好,右室因肺动脉压力升高引起的代偿性反应性更低。这些发现与临床研究相一致。2013 年一项针对不同类型肺动脉高压患者临床特征的研究表明,CHD-PAH 患者肺动脉压力和肺血管阻力最高,但患者肺动脉高压功能分级(WHO-FC) 和运动耐量较好,提示 CHD-PAH 患者心功能与肺动脉压力和肺血管阻力并不一致^[15]。关于中国肺动脉高压特征的多中心人群队列研究结果显示,与 IPAH 患者相比 CHD-PAH 组患者更容易延误诊断导致肺动脉压力更高,但心脏的性能更好,生存率明显优于其他病因组^[16-17]。

真实世界中,CHD-PAH 与 IPAH 患者病程很长。本次实验时间较短,仅观察了造模后 3 周的表型变化,并且未设计多个实验终点对各组大鼠进行超声心动图、左右心导管和肺组织病理学检测,观察左心代偿作用产生的时间点。后续我们将做更多研究,明确这两个模型在长期预后和各个时间点心肺功能的改变。

肺动脉高压患者的病灶部位在肺血管,但预后主要取决于心脏整体功能和代偿能力。本研究比较了 IPAH 和 CHD-PAH 两种不同病理情况大鼠模型心脏结构、肺动脉压力和肺小动脉病理变化,发现先心病合并肺动脉高压与特发性肺动脉高压的心脏重构有着很大不同,在肺血管重构相似的情况下,左向右分流的先心病显著改变了心脏整体对肺动脉压力升高的代偿反应。我们的初步实验结果为后续研究这两种不同肺动脉高压亚型的病理机制打下基础。

参考文献:

[1] Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. Eur Respir J, 2023, 61(1): 2200879.

[2] 马丽媛, 王增武, 樊静, 等. 《中国心血管健康与疾病报告 2021》概要 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2022, 30(7): 481-496.

[3] Jiang X, Humbert M, Jing ZC. Idiopathic pulmonary arterial hypertension and its prognosis in the modern management era in developed and developing countries [J]. Prog in Respi Res. 2012, 41: 85-93.

[4] Manes A, Palazzini M, Leci, et al. Current era survival of patients with pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease: a comparison between clinical subgroups [J]. Eur Heart J, 2014, 35(11): 716-724.

[5] 潘慧, 温彬, 李天骥, 等. 先天性心脏病合并肺动脉高压大鼠模型心脏重构趋势 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2022, 22(2): 4582-4588.

[6] Rosenzweig EB, Krishnan U. Congenital heart disease-associated pulmonary hypertension [J]. Clin Chest Med, 2021, 42(1): 9-18.

[7] Stacher E, Graham BB, Hunt JM, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(3): 261-272.

[8] Dickinson MG, Bartelds B, Borgdorff MA, et al. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(1): L1-L14.

[9] Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(25): D4-D12.

[10] Lévy M, Maurey C, Celermajer DS, et al. Impaired apoptosis of pulmonary endothelial cells is associated with intimal proliferation and irreversibility of pulmonary hypertension in congenital heart disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(7): 803-810.

[11] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(6): L1013-L1032.

[12] Sztuka K, Jasińska-Stroschein M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: a systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals [J]. Pharmacol Res, 2017, 125: 201-214.

[13] Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat [J]. Cardiovasc Res, 1990, 24(5): 430-432.

[14] van Albada ME, Schoemaker RG, Kemna MS, et al. The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension [J]. Eur Respir J, 2005, 26(3): 487-493.

[15] 陈果, 何建国, 柳志红, 等. 不同类型肺动脉高压患者临床特征和血流动力学的比较分析 [J]. 中国循环杂志, 2013, 28(4): 300-303.

[16] Quan R, Zhang G, Yu Z, et al. Characteristics, goal-oriented treatments and survival of pulmonary arterial hypertension in China: insights from a national multicentre prospective registry [J]. Respirology, 2022, 27(7): 517-528.

[17] Qian Y, Quan R, Chen X, et al. Characteristics, long-term survival, and risk assessment of pediatric pulmonary arterial hypertension in China: insights from a national multicenter prospective registry [J]. Chest, 2023, 163(6): 1531-1542.

陈丽川,段波,喻昭,等. 穴位埋线通过 PD-1/OX40 信号通路影响类风湿关节炎的炎症水平 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (10): 8-14, 80.

Chen LC, Duan B, Yu Z, et al. Acupoint catgut embedding affects the level of inflammation in rheumatoid arthritis through the PD-1/OX40 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 8-14, 80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.002

穴位埋线通过 PD-1/OX40 信号通路影响类风湿关节炎的炎症水平

陈丽川*, 段波, 喻昭, 马志毅, 孟倩文

(武汉市中医医院 风湿病科针灸科, 武汉 430050)

【摘要】 目的 本实验研究穴位埋线通过调控 PD-1/OX40 信号通路抗类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的作用及其机制。**方法** 取 25 只 SD 雌性大鼠, 用完全弗氏佐剂进行诱导, 建立 RA 模型大鼠, 然后进行穴位埋线和药物治疗, 将大鼠分成 5 组: 对照组、模型组、来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组, 通过评价关节炎指数判断炎症程度; ELISA 检测血清白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) 和白细胞介素-8 (interleukin 8, IL-8) 的含量; HE 染色观察滑膜炎性细胞浸润、滑膜组织、纤维组织、巨噬细胞增生及血管形成等情况; 流式检测 PD-1/OX40 及 CD4⁺CD28⁺ 细胞含量。**结果** 除对照组外, 各组大鼠踝关节至跖骨处或掌关节出现红斑和中度肿胀, 在 14 d 以后模型组评分没有明显的变化, 而来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组炎症因子评分开始下降, 其中穴位埋线+来氟米特组下降最快。模型组血清中 IL-6、IL-8 的含量显著升高 ($P<0.01$), 来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组大鼠血清中 IL-6、IL-8 的含量显著下降 ($P<0.01$)。模型组大鼠滑膜组织遭到破坏, 有大量的炎症细胞浸润, 血管扩张, 纤维细胞增生, 在进行来氟米特和穴位埋线处理后大鼠滑膜组织中炎症细胞浸润明显降低, 血管增生被抑制, 且在来氟米特和穴位埋线共同作用时效果最明显。模型组中大鼠的 PD-1 表达增加, OX40 表达显著降低 ($P<0.01$), CD4 和 CD28 表达显著升高 ($P<0.01$), 来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组大鼠的 OX40 的表达显著增加, CD4、CD28 和 PD-1 表达显著下降 ($P<0.01$)。**结论** 穴位埋线能够改善 RA 症状, 并且与来氟米特具有联合治疗的作用, 其作用机制可能与 PD-1/OX40 信号通路有关。

【关键词】 穴位埋线; 类风湿关节炎; PD-1; OX40

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0008-07

Acupoint catgut embedding affects the level of inflammation in rheumatoid arthritis through the PD-1/OX40 signaling pathway

CHEN Lichuan*, DUAN Bo, YU Zhao, MA Zhiyi, MENG Qianwen
(Department of Acupuncture and Moxibustion, Department of Rheumatology, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, China)

【Abstract】 Objective We studied the effect and mechanism of acupoint catgut embedding on rheumatoid arthritis (RA) by regulating the PD-1/OX40 signaling pathway. **Methods** Twenty-five SD female rats were treated with complete Freund's adjuvant to establish the RA model. Rats were divided into control, model, Leflunomide, acupoint catgut embedding, and acupoint catgut embedding + Leflunomide groups. The degree of inflammation was determined by the arthritis index. Serum interleukin 6 (IL-6) and interleukin 8 (IL-8) levels were measured by ELISA. HE staining was used to observe infiltration of synovial inflammatory cells, synovial tissue, fibrous tissue, macrophage proliferation, and

[基金项目] 湖北省卫生健康委员会项目 (ZY2019M053)。

[作者简介] 陈丽川 (1977—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗风湿免疫学。E-mail: whxiaochozi@163.com

angiogenesis. Proportions of PD-1/OX40 and CD4⁺CD28⁺ cells were determined by flow cytometry. **Results** Except for the control group, rats in each group had erythema and moderate swelling from the ankle joint to the metatarsal bone or palm joint. After 14 days, the scores of the model group did not change significantly. Scores of inflammatory factors in the catgut embedding + Leflunomide group began to decrease, and those in the acupoint catgut embedding + Leflunomide group decreased the fastest. Serum levels of IL-6 and IL-8 in the model group were significantly increased ($P<0.01$), whereas serum levels of IL-6 and IL-8 in Leflunomide, acupoint catgut embedding, and acupoint catgut embedding + Leflunomide groups were significantly decreased ($P<0.01$). The synovial tissue of model group rats was damaged with a large amount of inflammatory cell infiltration, vascular dilation, and fibrous cell proliferation. After treatment with leflunomide and acupoint catgut embedding, inflammatory cell infiltration in synovial tissue was significantly reduced and vascular proliferation was inhibited. The effect was most significant when leflunomide and acupoint catgut embedding were combined. In the model group, PD-1 expression was increased, while OX40 expression was significantly reduced ($P<0.01$). CD4 and CD28 expression was significantly increased ($P<0.01$). OX40 expression was significantly increased in Leflunomide, acupoint catgut embedding, and acupoint catgut embedding + Leflunomide groups, while CD4, CD28, and PD-1 expression was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusions** Acupoint catgut embedding improves RA symptoms and has a combined therapeutic effect with leflunomide. Its mechanism may be related to the PD-1/OX40 signaling pathway.

【Keywords】 acupoint catgut embedding; rheumatoid arthritis; PD-1; OX40

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)作为一种常见的炎症性关节炎,主要表现为关节疼痛和僵硬,伴随终生的发病率在世界范围内高达 1%^[1],其诊断标准包括至少一个关节有明确的肿胀^[2]。RA 的主要特征是炎症途径导致的关节滑膜细胞增殖,形成的血管翳可能导致软骨的破坏和骨质的侵蚀,促炎因子大量产生更加促进了这一过程的发生^[3]。在 RA 患者治疗中,两种或两种以上的抗风湿药物联合治疗比单药治疗更有效,但是两种以上的生物制剂的使用会带来很大的不良反应风险。

穴位埋线(acupoint catgut embedding, ACE)是现代针灸的一种,是指用无菌镊子将肠线(1.0~1.5 cm)放入一次性无菌针的针尖,肠线与针尖内缘平行,针头随针用钝针,将消毒过的针头插入消毒过的穴位,将针刺针推入片刻,取出无菌针,将肠线留在穴位^[4-5]。穴位埋线结合了针灸和穴位的优点,对穴位和机体产生全面持久的作用,此方法价格低廉,疗效持久,临床上被广泛应用。研究证明,在与炎症反应有关的急性呼吸窘迫综合征研究中,通过穴位埋线治疗降低了白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)水平,抑制了促炎细胞因子的产生^[6]。Lu 等^[7]总结发现,在治疗以肠道炎症为主的溃疡性结肠炎疾病中,通过穴位埋线治疗效果更持久,愈合所需时间更短。目前也有很多研究通过穴位埋线能够有效治疗 RA,但是对其机制研究尚不明确。

此外,程序性死亡受体 1(programmed death-1, PD-1)信号缺失或被阻断可以导致一系列自身免疫

性疾病,而肿瘤坏死因子受体超家族成员 4(tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40)信号敲除或被阻断则对自身免疫性疾病有治疗作用。PD-1 和 OX40 共刺激信号失衡可促进 RA 疾病的进展^[8]。因此,本研究通过建立 RA 模型大鼠,对大鼠穴位埋线和给药治疗,从炎症因子、滑膜形态以及流式检测 PD-1/OX40 及分化决定簇抗原 4(CD4)/T 细胞特异性表面糖蛋白(CD28)细胞含量方面,进一步探讨穴位埋线在 RA 中可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,SPF 级,雌性,8 周龄,体重 150~180 g,共 25 只,来源于三峡大学[SCXK(鄂)2022-0012],在武汉华联科生物技术有限公司无特定病原体(specific pathogen free,SPF)条件下饲养[SYXK(鄂)2018-0104]。所有动物实验均由华联科生物技术有限公司伦理委员会审批(HLK-20200110-001)。实验过程严格按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

来氟米特(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, L129518);戊巴比妥钠和完全弗氏佐剂(美国 sigma 公司, P3761/F5881);IL-6 和白细胞介素-8(interleukin 8, IL-8)ELISA 试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司, RA20607);二甲苯(北京沃凯生物科技有限公司, 40091060);苏木素和伊红(北京碧云天生物科技有限公司, C0107 和 C0109);大鼠全血

单个核细胞分离液 KIT(上海微科生物技术有限公司,LDS1080);所有抗体 PD1 (PAB47902)、OX40 (PAB47968)、GAPDH (PAB36269) 和 Goat anti-Rabbit IgG (SAB43714)均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司。可吸收缝合线(上海浦东金环医疗,66V1228A);埋线针(高冠医械,20162271059);酶标仪(芬兰雷勃,MK3);电泳仪(Bio-Rad,mini protean 3 cell);全自动化学发光分析仪(上海天能,Tanon-5200);流式细胞仪(艾森,NovoCyte);倒置荧光显微镜(Leica 公司,MIL LED)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

将动物按照随机数字表(由 SPSS17.0 程序生成)随机分为 5 组,每组 5 只。对照(control)组:造模后第 10 天开始予以等剂量生理盐水灌胃,连续 42 d。模型(model)组:造模后第 10 天开始予以等剂量生理盐水灌胃,连续 42 d。来氟米特(Leflunomide)组:造模后第 10 天开始予以大鼠灌胃来氟米特量为 10 mg/(kg·d),灌胃剂量 1 mL/100 g,连续 42 d。穴位埋线(acupoint catgut embedding, ACE)组:按照上述造模过程,造模后第 10 天进行穴位埋线,处理 42 d,埋线 3 次。穴位埋线+来氟米特(ACE+ Leflunomide)组:造模后第 10 天开始予以大鼠灌胃来氟米特量为 10 mg/(kg·d),灌胃剂量 1 mL/100 g,连续 42 d,并进行上述穴位埋线操作。

1.3.2 模型构建

将各组大鼠右后足趾皮下注射完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant,CFA)0.1 mL 致炎。其中对照组按照造模过程注射等量 PBS。

1.3.3 穴位埋线

实验前动物禁食不禁饮 12 h。以 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠。背部、右后腿剃毛后消毒备用。参照文献进行穴位埋线^[9],定位双侧“足三里”“肾腧”。“肾腧”位于第二腰椎下两旁,左右各一穴,“足三里”位于膝关节后外侧,在腓骨小头下约 5 mm 处。将大鼠俯卧位固定,将 9 号针头(含 0.8 cm 长无菌羊肠线),刺入已消毒的双侧“足三里”和“肾腧”,将肠线完全置入穴内。操作完成后使用碘伏消毒创面。

1.3.4 取材

用 3%戊巴比妥钠麻醉大鼠,取抗凝新鲜全血用于细胞流式检测;血清用于 ELISA 检测;滑膜组织用于病理 HE 染色。

1.3.5 关节炎指数

参照前期方法^[9],每 7 d 对大鼠进行关节炎评分。其标准见表 1。

1.3.6 炎症因子检测

采用 ELISA 试剂盒测定大鼠血清中的 IL-6 和 IL-8 水平,其测定步骤严格按照按照试剂盒说明书进行,通过标准品的稀释,加样,加酶及温育,洗涤,显色,最终加入终止液,在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度,计算 IL-6 和 IL-8 的浓度。

1.3.7 滑膜组织病理检测

将样本经过脱钙、浸蜡及包埋、切片(3 μm)、烤片后进行 HE 染色,并采集样本相关部位。根据炎症滑膜中的三大类细胞群(定居细胞群、迁移细胞群和内膜细胞群)对 HE 染色进行定量评分^[10]。评分范围依次为 0 分(正常)、1 分(轻度)、2 分(中度)、3 分(重度)。将 3 种炎症特征的参数进行汇总,总分 0~1 分表示正常,炎症级别为 0;总分 2~3 分为轻度滑膜炎,炎症级别为 1;总分 4~6 为中度滑膜炎,炎症级别为 2;总分 7~9 分为重度滑膜炎,炎症级别为 3。

1.3.8 流式检测

分离大鼠外周血单个核细胞进行流式检测。取各组样本,1×10⁶ 个细胞,100 μL PBS 重悬后,每管加入 2 μL OX40-APC、CD4-PerCP-eFluor 710 和 CD28-PE 抗体,4℃避光孵育 30 min;加入 2 mL PBS 洗涤 1 次,4℃ 400 r/min,离心 5 min,弃上清液;加入 1 mL 4%多聚甲醛室温固定 30 min;用 1 mL PBS 洗 2 次,每次 3 min,弃去 PBS;加入 200 μL 用 PBS 1:200 稀释后的抗体 PD-1,室温孵育 1 h,用 1 mL

表 1 关节炎评分标准
Table 1 Arthritis scoring standard

状态 Status	分值 Score
正常 Normal	0
踝或腕关节出现轻微红斑、肿胀 Slight erythema and swelling of ankle or wrist	1
后足踝关节及跗骨出现红斑和肿胀 Erythema and swelling of ankle joint and tarsal bone of posterior foot	2
踝关节至跖骨处或掌关节出现红斑和中度肿胀 Erythema and moderate swelling from ankle to metatarsal or metacarpal joints	3
踝关节至跖骨处严重肿胀和红斑,且不能负重 Severe swelling and erythema from ankle to metatarsal and no weight bearing	4

PBS 洗 2 次,每次 5 min,弃去 PBS;加二抗稀释液:加入 200 μ L 用 PBS 1 : 200 稀释后的二抗,37 $^{\circ}$ C,孵育 1 h;用 1 mL PBS 洗 2 次,每次 5 min,弃去 PBS;400 μ L 的 PBS 重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 避光保存,上机检测,使用 NovoCyte 分析软件分析实验结果。

1. 3. 9 Western blot

取各组样本,采用蛋白抽提试剂盒提取不同组别细胞总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 电泳分离总蛋白,每道孔上样 50 μ g 总蛋白质。电泳 2 h 后,采用湿法转膜至 PVDF 膜,将膜用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 PD1 (1 : 1000)、OX40 (1 : 1000) 过夜,次晨采用 TBST 漂洗

膜,加入 HRP 标记的二抗 Goat anti-Rabbit IgG (1 : 20 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,ECL 显影,保存图像,采用 Quantity One 侧光密度值。

1. 4 统计学方法

采用 SPSS 22. 0 软件进行统计学分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验。以 $P < 0. 05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 模型鉴定

对照组大鼠的足均正常 (图 1),跖骨和足骨形

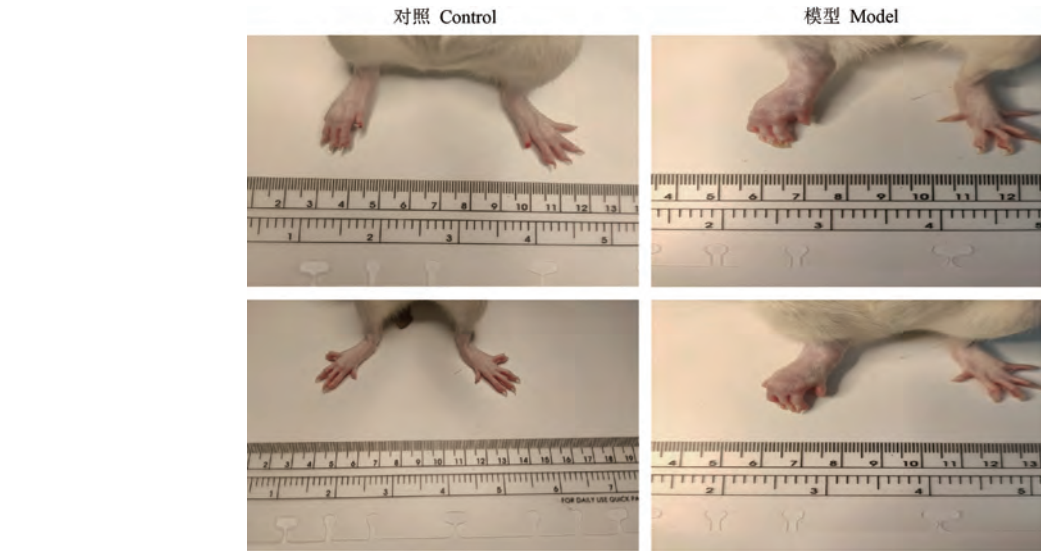
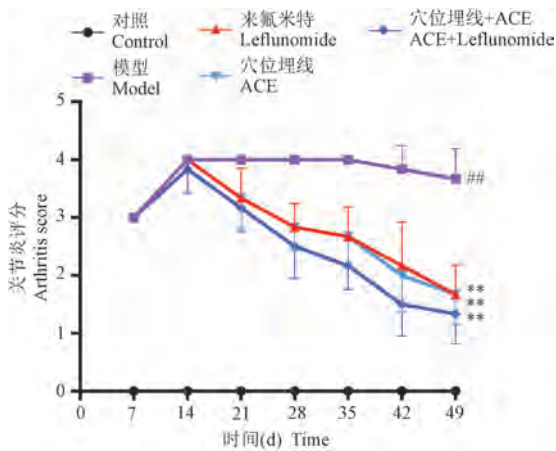


图 1 大鼠模型的鉴定
Figure 1 Identification of rat model

态规则,而模型组大鼠右后足出现明显红肿,炎症严重,跖骨和足骨出现多处红斑,足趾明显肿胀,大鼠行走受限。此模型构建成功。

2. 2 关节炎指数

在大鼠免疫后每 7 d 进行 1 次关节炎评分,结果如图 2 所示,在第 7 天除对照组外,各组大鼠踝关节至跖骨处或掌关节出现红斑和中度肿胀,在第 14 天时除对照组外,各组大鼠炎症加重,炎症因子评分均在 3 分以上,在 14 d 以后模型组评分没有明显的变化,但是来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组炎症因子评分开始下降。在第 49 天时,与对照组比较,模型组炎症因子评分显著升高;与模型组比较,来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组炎症因子评分明显下降,且穴位埋线+来氟米特组最低。



注:与对照组相比,## $P < 0. 01$;与模型组相比,** $P < 0. 01$ 。

图 2 各组关节炎指数

Note. Compared with control group, ## $P < 0. 01$. Compared with model group, ** $P < 0. 01$.

Figure 2 Arthritis index of each group

2.3 血清中炎症因子水平

模型组与对照组比较(图 3),大鼠血清中 IL-6、IL-8 含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组大鼠血清中 IL-6、IL-8 的含量均显著下降($P<0.01$)。

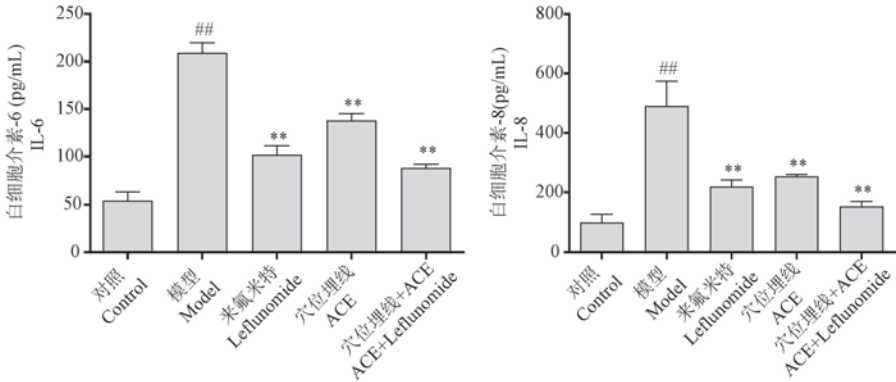
2.4 组织病理形态观察

对大鼠滑膜组织进行 HE 染色(图 4),结果发现,对照组大鼠的关节滑膜组织结构和形态正常,模型组大鼠滑膜组织遭到破坏,有大量的炎症细胞浸润,血管扩张,纤维细胞增生,在进行来氟米特和穴位埋线处理后大鼠滑膜组织中炎症细胞浸润明显降低,血管增生被抑制,且在来氟米特和穴位埋

线共同作用时效果最明显。此外,与对照比较,模型组评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组评分显著降低($P<0.01$)。

2.5 流式检测

流式检测的大鼠血中 PD-1/OX40 及 CD4/CD28 细胞含量(图 5),与对照组比较,模型组中大鼠的 PD-1 和 CD4/CD28 细胞含量显著增加($P<0.01$),OX40 显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组的 PD-1 和 CD4/CD28 细胞含量显著降低($P<0.01$),OX40 显著增加($P<0.05$)。如图 6 所示,通过 Western blot

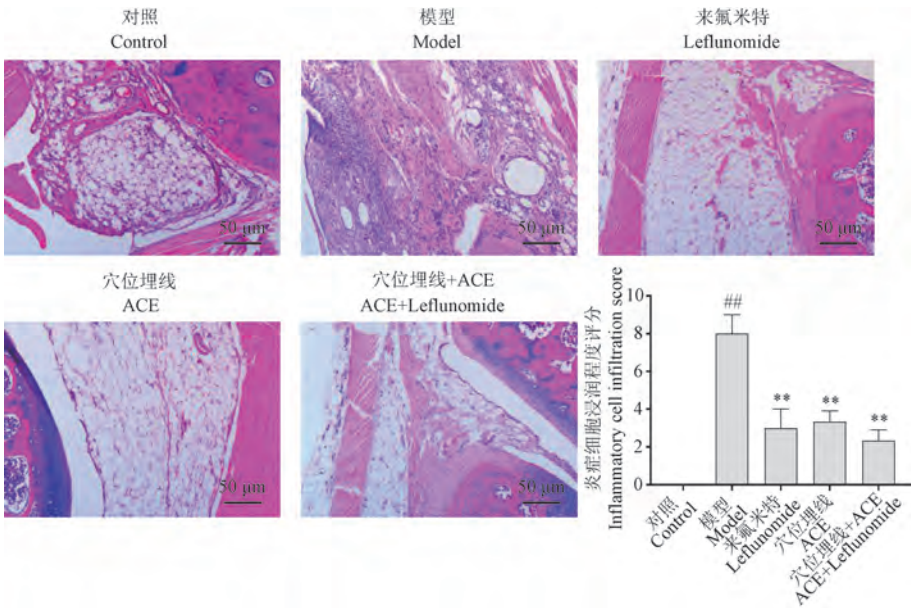


注:与对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图 3 各组大鼠血清中 IL-6、IL-8 的含量

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

Figure 3 Contents of IL-6 and IL-8 in serum of rats in each group

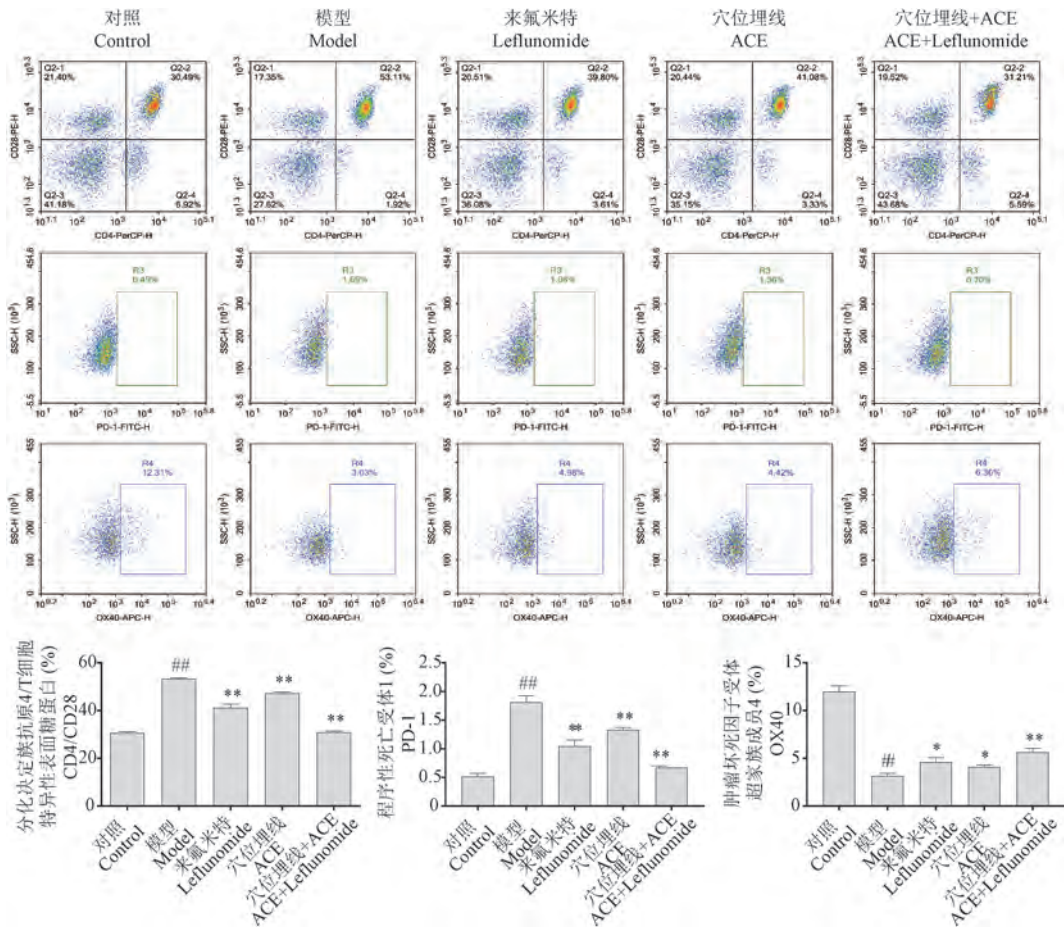


注:与对照组相比,## $P<0.01$;与模型组相比,** $P<0.01$ 。

图 4 大鼠滑膜组织 HE 染色

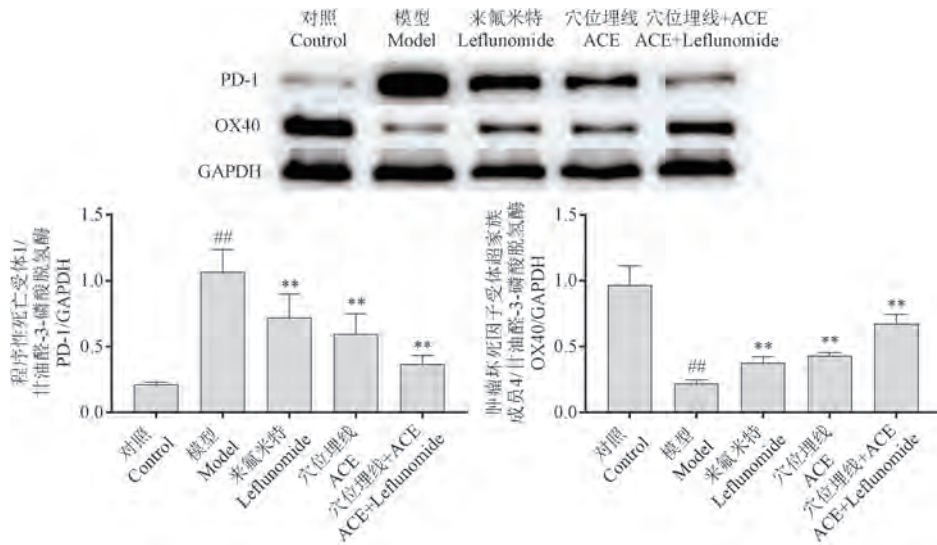
Note. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, ** $P<0.01$.

Figure 4 HE staining of rat synovium



注:与对照组相比, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。
图5 流式检测 PD-1/OX40 及 CD4/CD28 细胞含量
Note. Compared with control group, $^{##}P<0.01$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 5 Flow cytometry detection of PD-1/OX40 and CD4/CD28 cell



注:与对照组相比, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{**}P<0.01$ 。
图6 通过 Western blot 检测 PD-1 和 OX40 的蛋白表达
Note. Compared with control group, $^{##}P<0.01$. Compared with model group, $^{**}P<0.01$.

Figure 6 Detection of protein expression of PD-1 and OX40 by Western blot

检测相关通路的变化,与对照组比较,模型组 PD-1 的蛋白表达显著上调($P<0.01$),OX40 的蛋白表达显著下调($P<0.01$)。与模型组比较,来氟米特组、穴位埋线组和穴位埋线+来氟米特组 PD-1 的蛋白表达显著下调($P<0.01$),OX40 的蛋白表达显著上调($P<0.01$)。

3 讨论

RA 是一种慢性的炎症性关节疾病,可导致不可逆的关节损伤和严重残疾,在过去的几年里,在 RA 治疗方面已经取得了很大的进展,但其治疗机制尚不明确^[11]。而且,仍有一部分的患者对这些治疗并没有得到有效的反应。基于目前对穴位埋线的研究发现,穴位埋线不仅能够有效治疗多种疾病,而且还弥补了传统针灸治疗周期长和刺激时间短的缺点^[12-14]。李小兰等^[15]研究发现,通过穴位埋线联合西药治疗类风湿关节炎,结果实现其治疗效果显著改善。本研究中,通过对大鼠的关节炎评分发现,穴位埋线和来氟米特治疗后,大鼠的关节炎指数明显降低。在 RA 发病机制中,活化的 T 细胞产生炎症细胞因子刺激巨噬细胞和单核细胞。本研究中,在 RA 治疗中通过穴位埋线能够显著降低大鼠血清中 IL-6、IL-8 的含量,缓解了大鼠关节炎症,通过 HE 染色观察滑膜组织发现,在穴位埋线后大鼠滑膜关节的损伤明显的得到缓解。

程序性死亡受体 1(PD-1),是一种重要的免疫抑制分子,负责 T 细胞的激活增殖和细胞毒性的分泌^[16]。在慢性感染期间,PD-1 由于失去甲基化启动子而在耗尽的 CD8 细胞中表达^[17]。在一项研究中表明,与健康者比较,三名 HL 患者肿瘤浸润性 T 细胞中的 PD-1 水平显著升高^[18]。PD-1 能够向下调节免疫系统对人体细胞的反应,以及通过抑制 T 细胞炎症活动来调节免疫系统。OX40 是一种有效的共刺激受体,能够增强 T 淋巴细胞表面的 T 细胞受体信号,是能被特异性识别的信号^[19],其主要由 T 细胞表达,并在 CD4⁺T 细胞上的表达较高^[20],能够增强 T 细胞对效应分子和细胞因子的增殖和表达,对促炎细胞因子的产生有明显的抑制作用。

之前有研究证明,PD-1 的缺失或阻断可导致自身免疫性疾病^[21],而 OX40 信号对自身免疫性疾病具有治疗作用^[22]。Ma 等^[23]发现,具有高水平的 OX40 和低水平的 PD-1 会使晚期胰腺导管腺癌患者具有更长的生存时间。本研究中,在穴位埋线和

给予来氟米特后 OX40 的含量显著增加,CD4⁺CD28⁺和 PD-1 细胞含量显著下降;而 RA 模型组中 OX40⁺的含量最低,CD4⁺CD28⁺和 PD-1 细胞含量较高。我们推测这是在 RA 病理中可能存在 PD-1 和 OX40 共刺激信号的不平衡,使 CD4⁺T 细胞异常激活,从而导致自身免疫。共刺激分子 PD-1 和 OX40 分别属于免疫球蛋白家族和 TNF 家族,均在 CD4⁺T 细胞的激活直接具有重要的作用,其异常信号与多种自身免疫性疾病有关^[9]。

综上所述,本研究采用 CFA 诱导构建 RA 模型,通过实验进行穴位埋线和来氟米特治疗后,能够明显降低 RA 的炎症程度,其作用机制可能与调控 PD-1/OX40 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 吴玉娥,曾业文,罗挺,等. 骨髓间充质干细胞对类风湿关节炎小鼠干预效果研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 27-34.
- [2] Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis [J]. Am Fam Physician, 2011, 84(11): 1245-1252.
- [3] Landewé RB, van den Borne BE, Breedveld FC, et al. Methotrexate effects in patients with rheumatoid arthritis with cardiovascular comorbidity [J]. Lancet, 2000, 355(9215): 1616-1617.
- [4] Zhu SJ, Li X, Wei YW, et al. Acupoint catgut embedding improves learning and memory impairment in vascular dementia rats [J]. Ann Transl Med, 2023, 11(2): 108.
- [5] Song Y, Shi X, Gao Z, et al. Acupoint catgut embedding improves lipid metabolism in exercise-induced fatigue rats via the PPAR signaling pathway [J]. Animals (Basel), 2023, 13(4): 558.
- [6] Li D, Sun T, Chi L, et al. Acupoint catgut embedding improves the lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rats [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2394734.
- [7] Lu J, Zhou J, Wang L, et al. Efficacy and safety evaluation of acupoint embedding for patients with ulcerative colitis: a protocol of systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(34): e21812.
- [8] 蒋觉安. PD-1 负性和 OX40 阳性共刺激信号在类风湿性关节炎免疫病理中的作用机制及临床意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [9] 陈丽川,段波,喻昭,等. 足三里和肾腧穴位埋线对大鼠类风湿关节炎 NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1291-1296.
- [10] Wilkinson LS, Pitsillides AA, Edwards JC. Giant cells in arthritic synovium [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(3): 182-184.

郭中华,史栋梁,曹玉举,等. 柴胡桂枝汤加减通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨质疏松大鼠的改善作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 15-22.

Guo ZH, Shi DL, Cao YJ, et al. Improving effect and mechanism of modified Chaihu Guizhi Decoction on osteoporosis rats by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 15-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.003

柴胡桂枝汤加减通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨质疏松大鼠的改善作用及机制研究

郭中华¹, 史栋梁¹, 曹玉举^{2*}, 王云飞¹, 杨少祥¹, 秦合伟³, 张仲博¹, 任博文¹,
周松林⁴, 王俊杰¹, 王莉莎¹, 万小冠⁵

(1.河南省中医院骨病一科,郑州 450053;2.郑州中医骨伤病医院骨科,郑州 450016;
3.河南省中医院康复科,郑州 450053;4.河南省中医院疼痛科,郑州 450053;
5.郑州市第九人民医院骨科,郑州 450053)

【摘要】 目的 探讨柴胡桂枝汤加减 (CGD) 调节 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路对骨质疏松大鼠的改善作用。**方法** 将 SD 大鼠分组为 Model 组、CK 组、高剂量 CGD 组 (CGD-H 组, 20 g/kg)、低剂量 CGD 组 (CGD-L 组, 5 g/kg)、戊酸雌二醇组 (EV 组, 9 mg/kg)、DKK-1 组 (Wnt/ β -catenin 通路抑制剂, 100 mg/kg) 和 CGD-H+DKK-1 组 (20 g/kg+100 mg/kg), 每组 12 只。除 CK 组外, 其他组大鼠均通过灌胃 70 mg/kg 维甲酸的方式构建骨质疏松症 (OP) 大鼠模型, CK 组大鼠灌胃等量的生理盐水。造模 4 周开始给予相应的药物干预 4 周。ELISA 法检测大鼠血清中 I 型胶原 C 端肽 (CTX-I)、骨钙素 (BGP) 水平; 观察股骨微观结构相关指标骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量的变化; HE 染色检测大鼠股骨病理变化; 碱性磷酸酶 (ALP) 钙-钴染色检测大鼠股骨中成骨细胞活性; 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色检测大鼠股骨组织中破骨细胞活性; Western blot 检测各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白。**结果** 与 CK 组比较, Model 组大鼠股骨组织病理损伤严重, CTX-I 水平、破骨细胞活性升高, BGP 水平、骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量、成骨细胞活性、Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与 Model 组比较, CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨组织病理损伤减轻, CTX-I 水平、破骨细胞活性降低, BGP 水平、骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量、成骨细胞活性、Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达升高, 而 DKK-1 组对应指标变化趋势与上述相反 ($P<0.05$); 与 CGD-H 组比较, CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨组织病理损伤严重, CTX-I 水平、破骨细胞活性升高, BGP 水平、骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量、成骨细胞活性、Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** CGD 可能通过激活 Wnt/ β -Catenin 通路改善大鼠 OP。

【关键词】 柴胡桂枝汤加减; Wnt/ β -连环蛋白信号通路; 骨质疏松症; 成骨细胞; 破骨细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0015-08

Improving effect and mechanism of modified Chaihu Guizhi Decoction on osteoporosis rats by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway

GUO Zhonghua¹, SHI Dongliang¹, CAO Yuju^{2*}, WANG Yunfei¹, YANG Shaoxiang¹, QIN Hewei³,
ZHANG Zhongbo¹, REN Bowen¹, ZHOU Songlin⁴, WANG Junjie¹, WANG Lisha¹, WAN Xiaoguan⁵

【基金项目】 2021 年河南省中医药拔尖人才培养项目资助 (豫卫中医函 (2021) 15 号); 河南省中医药科学研究专项课题 (2021JDZX2121)。

【作者简介】 郭中华 (1981—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 骨关节与骨质疏松。E-mail: gzh1981@163.com

【通信作者】 曹玉举 (1972—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 骨关节相关疾病。E-mail: caoyuju@126.com

- (1. Department 1 of Bone Diseases, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China.
2. Department of Orthopaedics, Zhengzhou Traditional Chinese Medicine Orthopedics Hospital, Zhengzhou 450016.
3. Department of Rehabilitation, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053.
4. Department of Pain, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053.
5. Department of Orthopaedics, Zhengzhou Ninth People's Hospital, Zhengzhou 450053)

【Abstract】 Objective To investigate the improving effect of modified Chaihu Guizhi Decoction (CGD) on osteoporosis rats by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** SD rats were assigned to Model, CK, high-dose CGD (CGD-H; 20 g/kg), low-dose CGD (CGD-L; 5 g/kg), and estradiol valerate (EV; 9 mg/kg), Wnt/ β -catenin pathway inhibitor (DKK-1, 100 mg/kg), and CGD-H+DKK-1 (20 g/kg+100 mg/kg) groups with 12 rats per group. Except for those in the CK group, rats were administered 70 mg/kg retinoic acid to establish the osteoporosis(OP) model, and rats in the CK group were administered the same amount of normal saline. From week 4 of modeling, the corresponding drug was administered for 4 weeks. ELISA were applied to measure serum levels of collagen type I C-terminal peptide (CTX- I) and osteocalcin (BGP). Changes in the bone volume fraction, bone trabecular thickness, bone mineral density, and bone trabecular number were observed. HE staining was applied to assess pathological changes in the rat femur. Alkaline phosphatase (ALP) calcium-cobalt staining was applied to detect osteoblast activity in the rat femur. Osteoclast activity in rat femur tissue was detected by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. Western blot was applied to detect Wnt3a and β -catenin proteins in femoral tissue. **Results** Compared with the CK group, femoral tissue of the Model group had severe pathological damage, the CTX- I level and osteoclast activity were increased, and the BGP level, bone volume fraction, bone trabecular thickness, bone mineral density, bone trabecular number, osteoblast activity, and Wnt3a and β -catenin protein expression were decreased ($P<0.05$). Compared with the Model group, pathological damage of the femur in CGD-L, CGD-H, and EV groups was alleviated, the CTX- I level and osteoclast activity were decreased, the BGP level, bone volume fraction, trabecular thickness, bone mineral density, bone trabecular number, osteoblast activity, and Wnt3a and β -catenin protein expression were increased, and the opposite trends of the corresponding indicators were observed in the DKK-1 group ($P<0.05$). Compared with the CGD-H group, femoral tissue of the CGD-H+DKK-1 group was severely damaged, the CTX- I level and osteoclast activity were increased, and the BGP level, bone volume fraction, bone trabecular thickness, bone mineral density, bone trabecular number, osteoblast activity, and Wnt3a and β -catenin protein expression were decreased ($P<0.05$). **Conclusions** CGD may improve OP in rats by activating the Wnt/ β -catenin pathway.

【Keywords】 modified Chaihu Guizhi Decoction; Wnt/ β -catenin signaling pathway; osteoporosis; osteoblasts; osteoclasts

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种全身性多因素骨骼疾病,其特征是骨量减少、骨微结构破坏和骨脆性增加^[1-2]。随着人口老龄化程度的扩大,OP的患病率不断上升,已成为许多国家的重要公共卫生问题^[3-4]。目前,OP的治疗主要采用药物疗法、物理疗法和运动疗法。尽管OP的治疗取得了很大进展,但治疗效果仍不能达到临床预期,如许多新开发的抗OP药物价格昂贵,限制了其广泛的临床应用,药物不良反应最终影响患者服药依从性等^[5]。因此开发新的治疗OP的药物变得非常重要。柴胡桂枝汤出自张仲景《伤寒论》,已有研究显示其在临床上治疗类风湿关节炎方面疗效显著^[6]。但关于柴胡桂枝汤能否改善OP尚不清楚。最近的研究显示,激活Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通

路可延缓OP的发生和发展^[7]。而柴胡桂枝汤能否通过调节Wnt/ β -catenin信号通路改善OP尚不明确。因此,本研究严格参考临床相关研究^[8]在柴胡桂枝汤原方的基础上通过加减一些药物合为柴胡桂枝汤加减(Chaihu Guizhi Decoction, CGD),观察CGD对OP大鼠的影响并探究相应的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

84只SPF级雌性SD大鼠(7周龄,体重200~210g)购于广东南模生物公司[SCXK(粤)2022-0062],饲养于河南省中医院SPF级实验室[SYXK(豫)2021-0018]。本研究遵循3R原则,且所有动物实验都已获得河南省中医院动物伦理委员会的

审核及批准 (HNSZYY2022010012)。

1.2 主要试剂与仪器

CGD 由黄芩 10 g、葛根 30 g、党参 10 g、桂枝 15 g、柴胡 24 g、生姜 10 g、白芍 15 g、清半夏 12 g、炙甘草 10 g、焦神曲 10 g、白术 20 g、大枣 10 g 组成,购于河南省中医院中药房。加入 5 倍药材质量的水浸泡药材 2 h,大火烧开后转文火煮 1 h,经过滤得煎液,重新加水再煎煮第 2 次。将两次所得的煎煮液混合并加热浓缩至 5 g/mL。

维甲酸(规格 50 mg,批号:20211128)购自深圳振强生物公司;戊酸雌二醇(estradiol valerate, EV)(批号:20220213)购自北京凯诗源生物公司;Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 DKK-1(批号:20211218)购自上海禾午生物公司;大鼠 I 型胶原 C 端肽(C-telopeptide of type I collagen, CTX-I)、骨钙素(osteocalcin, BGP) ELISA 试剂盒(批号:20211123、20220706)购自上海钰博生物公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)钙-钴染色试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒(批号:20220704、20220619)购自上海歌凡生物公司;兔源一抗 Wnt3a、 β -catenin、GAPDH 和二抗(批号:ab219412、ab32572、ab8245、ab97051)均购自英国 Abcam 公司。SktScan 1176 micro-CT 仪购自德国 Bruker 公司;BX53 光学显微镜购自日本奥林巴斯;DYY-7C 型蛋白电泳仪购于北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及 OP 模型的构建

将 84 只 SD 大鼠随机分为 Model 组、CK 组、高剂量 CGD 组(CGD-H 组)、低剂量 CGD 组(CGD-L 组)、戊酸雌二醇组(EV 组)、Wnt/ β -catenin 通路抑制剂(DKK-1)组和 CGD-H+DKK-1 组,每组 12 只。除 CK 组外,其他组大鼠均通过灌胃 70 mg/kg 维甲酸的方式(每天 1 次,持续 4 周)构建 OP 大鼠模型^[9]。CK 组大鼠在相同时间段内灌胃等量的生理盐水。通过观察股骨微观结构以及股骨病理损伤来判断造模是否成功。造模成功后,根据参考文献及前期预实验结果进行给药处理,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组^[10]大鼠分别需灌胃 5 g/kg CGD、20 g/kg CGD、9 mg/kg EV,且均需腹腔注射等量的生理盐水;DKK-1 组^[11]大鼠需腹腔注射 100 mg/kg DKK-1 且灌胃等量的生理盐水;CGD-H+DKK-1 组大鼠在灌胃 20 g/kg CGD 的同时还需腹腔注射 100

mg/kg DKK-1;Model 组、CK 组大鼠均需灌胃及腹腔注射等量的生理盐水,每天给药 1 次,给药共持续 4 周。

1.3.2 标本收集

末次给药 24 h 后,腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉所有大鼠,尾静脉取血(离心收集血清)用于 CTX-I、BGP 的检测;处死大鼠并收集其左右两侧的股骨组织,利用 micro-CT 仪检测左侧股骨微观结构相关指标骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量的变化;将大鼠右侧股骨组织,分为两部分,一部分固定于 4%多聚甲醛中用于 HE、ALP 钙-钴、TRAP 染色,另一部分冻存于 -80℃ 中用于 Western blot 实验。

1.3.3 ELISA 法检测血清中 CTX-I、BGP 水平

按照试剂盒说明检测血清中 CTX-I、BGP 水平。

1.3.4 股骨微观结构相关指标的检测

取各组大鼠左侧股骨固定于 10%福尔马林溶液中,利用 micro-CT 仪扫描大鼠左侧股骨,扫描参数设置为:管电压 50 kV,管电流 400 μ A,分辨率 10 μ m,曝光时间 300 ms,扫描角度 360°。使用 Med Project 4.1 和 Micro View 软件对大鼠左侧股骨二维图像生成三维渲染,并自动计算骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量的变化。

1.3.5 HE 染色检测大鼠股骨病理变化

将固定于 4%多聚甲醛中的股骨组织脱钙、包埋、切片(5 μ m 厚)、HE 染色后,观察股骨病理变化。

1.3.6 ALP 钙-钴染色检测大鼠股骨中成骨细胞活性

取 1.3.5 中的组织切片,经脱蜡后,用 ALP 孵育液孵育 12 h,自来水冲洗;加入硝酸钴孵育 5 min,自来水冲洗;加入硫化工作液孵育 2 min,自来水冲洗;核固红染色,自来水冲洗;将切片脱水、透明、封片。利用光学显微镜观察细胞质内深褐色沉淀形成情况,褐色沉淀形成越多,表明成骨细胞活性越高。

1.3.7 TRAP 染色检测大鼠股骨组织中破骨细胞活性

取 1.3.5 中的组织切片,经脱蜡后,用 TRAP 固定液固定 1 min,自来水冲洗;TRAP 孵育液孵育 1 h,自来水冲洗;苏木素染液染色 7 min,自来水冲洗;将切片脱水、透明、封片。利用光学显微镜观察细

胞质内紫红色沉淀形成情况,紫红色沉淀形成越多,表明破骨细胞活性越高。

1.3.8 Western blot 检测各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、β-catenin 蛋白

用 RIPA 裂解缓冲液提取股骨组织总蛋白,提取的蛋白经定量、电泳、转膜、封闭后,在 4℃ 下将膜分别与一抗 Wnt3a(1 : 1000)、β-catenin(1 : 2000)、GAPDH(1 : 1000)过夜孵育。次日,将膜与二抗(1 : 2000)共同孵育 2 h。ECL 试剂用于蛋白印迹观察,ImagePro Plus 软件评估条带强度。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 8 进行数据分析,所有数据均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据均符合正态且方差齐。单因素方差分析多组间的差异,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGD 对大鼠血清中 CTX- I、BGP 水平的影响

与 CK 组比较,Model 组大鼠血清中 CTX- I 水平升高,BGP 水平降低($P<0.05$);与 Model 组相比,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠血清中 CTX- I 水平降低,BGP 水平升高,DKK-1 组大鼠血清中 CTX- I 水平升高,BGP 水平降低($P<0.05$);与 CGD-H 组比较,CGD-H+DKK-1 组大鼠血清中 CTX- I 水平升高,BGP 水平降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2 CGD 对大鼠股骨微观结构的影响

与 CK 组比较,Model 组大鼠股骨骨体积分数、

骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量降低($P<0.05$);与 Model 组比较,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量升高,DKK-1 组大鼠股骨骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量降低($P<0.05$);与 CGD-H 组比较,CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量降低($P<0.05$)。见图 1 和表 2。

2.3 CGD 对大鼠股骨病理损伤的影响

CK 组大鼠股骨组织切片呈现出丰富、连续、致密的骨小梁;Model 组大鼠股骨组织切片表现为有大的骨髓腔形成以及骨小梁数量减少,符合 OP 的典型特征,见图 2。与 Model 组比较,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨病理损伤减轻,DKK-1 组大鼠股骨中形成的骨髓腔变大,骨小梁数量减少;

表 1 CGD 对各组大鼠血清中 CTX- I、BGP 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 1 Effect of CGD on serum CTX- I and BGP levels of rats in each group		
组别 Groups	CTX- I (ng/mL)	BGP (ng/mL)
CK	12.25±1.03	13.75±1.01
Model	28.74±1.75 *	6.28±0.17 *
CGD-L	23.45±1.61 #	8.25±0.28 #
CGD-H	14.46±0.98 #△	12.31±0.69 #△
EV	14.57±1.05 #△	12.51±0.76 #△
DKK-1	35.56±1.73 #	3.69±0.22 #
CGD-H+DKK-1	20.32±1.77 ▲	9.32±0.45 ▲

注:与 CK 组比较, * $P<0.05$;与 Model 组比较, # $P<0.05$;与 CGD-L 组比较, △ $P<0.05$;与 CGD-H 组比较, ▲ $P<0.05$ 。
Note. Compared with CK group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with CGD-L group, △ $P<0.05$. Compared with CGD-H group, ▲ $P<0.05$.

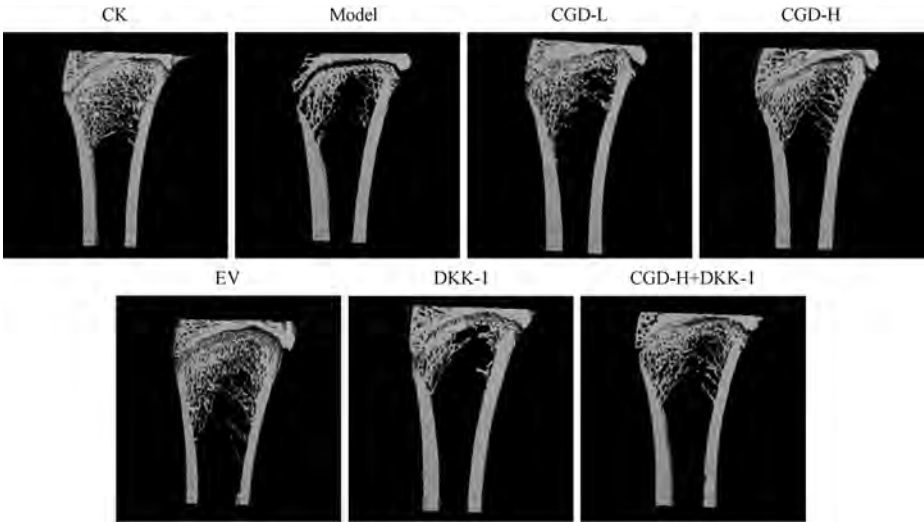


图 1 Micro-CT 仪检测大鼠股骨微观结构
Figure 1 Micro-CT apparatus for detecting the microstructure of rat femur

与 CGD-H 组相比,CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨大的骨髓腔形成以及骨小梁数量减少的特征更加明显。

2.4 CGD 对大鼠股骨组织中成骨细胞活性的影响

如图 3 所示,与 CK 组相比,Model 组股骨组织中成骨细胞质内深褐色沉淀减少;与 Model 组比较,

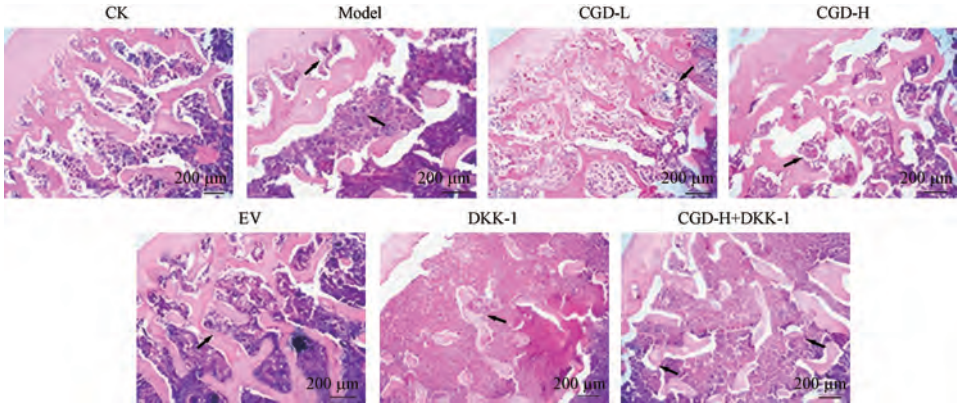
CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨组织中成骨细胞质内深褐色沉淀增多,DKK-1 组大鼠股骨组织中成骨细胞质内深褐色沉淀减少;与 CGD-H 组比较,CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨组织中成骨细胞质内深褐色沉淀减少。

表 2 CGD 对各组大鼠股骨骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量的影响 ($\bar{x}\pm s,n=12$)

Table 2 Effect of CGD on femoral bone volume fraction, trabecular thickness, bone density and trabecular number of rats in each group

组别 Groups	骨体积分数(%) Bone volume fraction	骨小梁厚度(mm) Trabecular thickness	骨密度(g/mm ³) Bone density	骨小梁数量(n/mm) Number of trabeculae
CK	19.67±0.54	0.078±0.002	0.29±0.01	5.89±0.23
Model	9.89±0.34 [*]	0.023±0.001 [*]	0.12±0.01 [*]	1.72±0.14 [*]
CGD-L	12.62±0.42 [#]	0.039±0.002 [#]	0.18±0.01 [#]	2.32±0.15 [#]
CGD-H	17.72±0.48 ^{#△}	0.066±0.004 ^{#△}	0.27±0.02 ^{#△}	5.21±0.26 ^{#△}
EV	17.81±0.50 ^{#△}	0.068±0.003 ^{#△}	0.26±0.01 ^{#△}	5.24±0.27 ^{#△}
DKK-1	6.31±0.27 [#]	0.011±0.001 [#]	0.06±0.01 [#]	1.06±0.09 [#]
CGD-H+DKK-1	13.66±0.45 [▲]	0.042±0.002 [▲]	0.19±0.02 [▲]	2.94±0.20 [▲]

注:与 CK 组比较, ^{*} $P<0.05$;与 Model 组比较, [#] $P<0.05$;与 CGD-L 组比较, [△] $P<0.05$;与 CGD-H 组比较, [▲] $P<0.05$ 。
Note. Compared with CK group, ^{*} $P<0.05$. Compared with Model group, [#] $P<0.05$. Compared with CGD-L group, [△] $P<0.05$. Compared with CGD-H group, [▲] $P<0.05$.

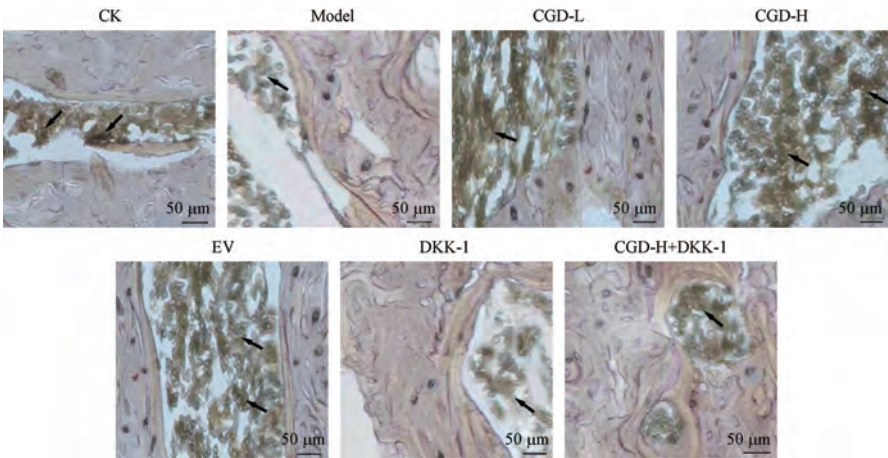


注:箭头所指处为骨髓腔。

图 2 HE 染色检测大鼠股骨病理变化

Note. Arrow pointed to the bone marrow cavity.

Figure 2 Pathological changes of rat femur detected by HE staining



注:箭头所指处为成骨细胞质内深褐色沉淀。

图 3 ALP 钙-钴染色检测大鼠股骨中成骨细胞活性

Note. Arrow pointed to a dark brown deposit in the osteoblastic cytoplasm.

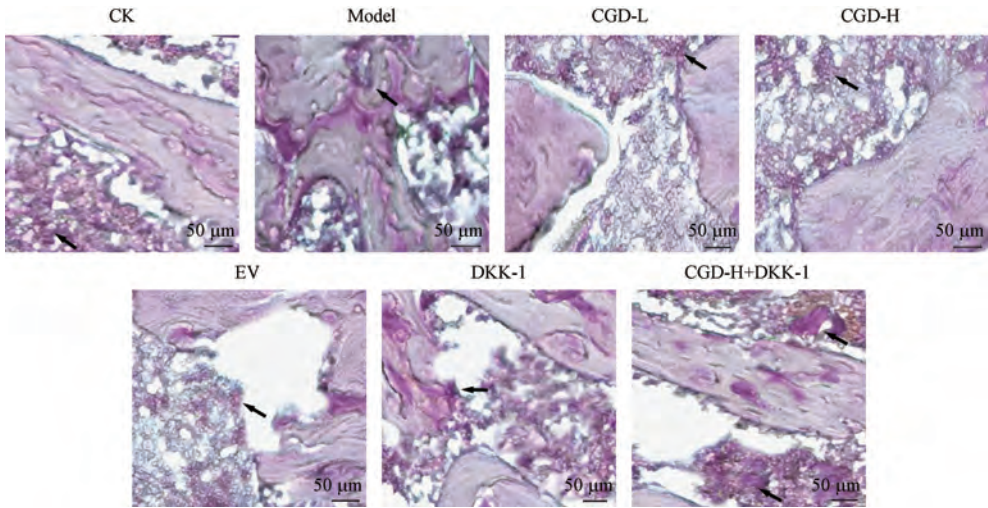
Figure 3 Detection of osteoblast activity in rat femur by ALP calcium cobalt staining

2.5 CGD 对大鼠股骨组织中破骨细胞活性的影响

图 4 结果显示,与 CK 组比较,Model 组大鼠股骨组织中的破骨细胞质内紫红色沉淀(箭头所指处)明显增多;与 Model 组比较,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨组织中的破骨细胞质内紫红色沉淀明显减少,DKK-1 组大鼠股骨组织中的破骨细胞质内深褐色沉淀增多;与 CGD-H 组比较,CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨组织中的破骨细胞质内深褐色沉淀增多。

2.6 CGD 对大鼠股骨组织中 Wnt/ β -catenin 相关蛋白表达的影响

如图 5 所示,与 CK 组比较,Model 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达降低($P<0.05$);与 Model 组比较,CGD-L 组、CGD-H 组、EV 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达升高,DKK-1 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达降低($P<0.05$);与 CGD-H 组比较,CGD-H+DKK-1 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达降低($P<0.05$)。

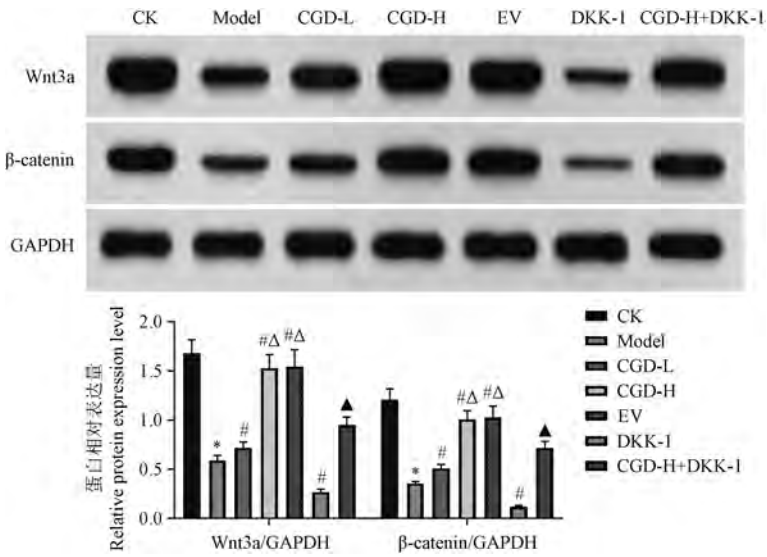


注:箭头所指处为破骨细胞质内紫红色沉淀。

图 4 TRAP 染色检测大鼠股骨组织中破骨细胞活性

Note. Arrow pointed to a purplish red deposit in the osteoclast cytoplasm.

Figure 4 Detection of osteoclast activity in rat femur by TRAP staining



注:与 CK 组比较, * $P<0.05$;与 Model 组比较, # $P<0.05$;与 CGD-L 组比较, Δ $P<0.05$;与 CGD-H 组比较, $\blacktriangle$ $P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测各组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白

Note. Compared with CK group, * $P<0.05$. Compared with Model group, # $P<0.05$. Compared with CGD-L group, Δ $P<0.05$. Compared with CGD-H group, $\blacktriangle$ $P<0.05$.

Figure 5 Western blot detection of Wnt3a and β -catenin proteins in femoral tissue of rats in each group

3 讨论

OP 是一种以矿化骨量减少为特征的疾病,在解剖学上主要表现为皮质厚度和孔隙率减少,松质骨小梁的数量和大小减少,髓质空间扩大^[12]。有研究报道,骨的生物力学能力不仅与存在的骨量有关,还与它的微观结构(骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量等)有关^[13]。本研究通过灌胃维甲酸的方式构建 OP 大鼠模型,结果显示,Model 组大鼠的股骨组织切片表现为有大的骨髓腔形成以及骨小梁数量减少,Model 组大鼠股骨骨体积分数、骨小梁厚度、骨密度、骨小梁数量显著低于 CK 组,提示成功构建了 OP 模型大鼠。研究报道,破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成之间的不平衡导致了 OP,其中,成骨细胞和破骨细胞活性的不平衡起主要作用^[14];CTX-I 是骨吸收标志物,而 BGP 为骨形成的标志物,因此,血清中 CTX-I、BGP 水平可作为衡量 OP 过程中骨形成的重要指标^[15-16]。本研究发现,与 CK 组相比,Model 组破骨细胞活性升高、成骨细胞活性降低,血清中 CTX-I 水平升高、BGP 水平降低,表明成骨细胞介导的骨形成低于破骨细胞介导的骨吸收,导致了骨量减少,进而形成了 OP。

OP 属“骨痿”范畴,中医认为其主要病机为肝失所养、脾失健运,故主张以疏肝理气、健脾为治疗原则^[17]。CGD 在原方的基础上通过去人参避免补益太过;加入焦神曲健脾和胃;白术健脾益气;党参补中益气,合为 CGD 方,以增强其疏肝和胃、健脾之功效。目前,不同种类的 CGD 方已应用于多种疾病的研究,如 CGD 可抑制三阴性乳腺癌裸鼠体内肿瘤的生长^[18];CGD 治疗功能性消化不良效果显著^[19]。而关于 CGD 对 OP 的影响尚未见报道。本研究显示,CGD 可抑制破骨细胞活性及 CTX-I 水平,上调成骨细胞活性并促进 BGP 表达,且 CGD 剂量越高,对应的趋势越明显,而 CGD-H 组与 EV 组相比对应指标的趋势变化差异不显著,说明 CGD 可能是通过促进成骨细胞介导的骨形成,并抑制破骨细胞介导的骨吸收来改善大鼠 OP 的。此外,尽管 EV 治疗 OP 效果显著,但其极易产生胃肠道反应、精神状态不佳等副作用^[20]。提示 CGD 可能成为治疗 OP 的潜在优良药物。

大量研究表明,Wnt/ β -catenin 通路可以刺激成骨细胞增殖和分化,在 OP 进展中发挥重要作用

用^[21]。如二甲双胍激活 Wnt/ β -catenin 通路可治疗糖尿病性 OP^[22];益肾健骨颗粒通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进去卵巢大鼠成骨细胞增殖而改善绝经后骨质疏松^[23]。以上研究表明激活 Wnt/ β -catenin 通路可以改善 OP。本研究显示,经 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂 DKK-1 处理后,Model 组大鼠对成骨细胞介导的骨形成的抑制作用以及对破骨细胞介导的骨吸收的促进作用增强,表明 Wnt/ β -catenin 通路确实参与了 OP 过程。本研究还发现,CGD 可上调 Model 组大鼠股骨组织中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达,且 CGD 剂量越高,Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达上调趋势越明显,猜想 CGD 改善大鼠 OP 可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 通路实现的。为了验证该猜想,本研究在高剂量 CGD 处理的基础上再用 DKK-1 干预 OP 大鼠,结果发现,DKK-1 减弱了高剂量 CGD 对大鼠 OP 的改善作用。

综上所述,CGD 可能通过激活 Wnt/ β -catenin 通路改善大鼠 OP。该研究可能为 OP 的治疗提供了一个新的视角。CGD 对大鼠 OP 的改善作用可能还涉及其他通路,本研究尚未探究,这将是后续研究的重点内容之一。

参考文献:

- [1] Gkataris K, Goulis DG, Potoupnis M, et al. Obesity, osteoporosis and bone metabolism [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2020, 20(3): 372-381.
- [2] 郭志斌, 吴春芳, 张国彬, 等. 辛伐他汀联合利塞膦酸钠对地塞米松诱导大鼠骨丢失的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 742-748.
- [3] Uwagie-Ero EA, Abiaezute CN, Nwachujor CO, et al. Osteocyte viability and bone density in cadmium chloride-induced osteoporosis ameliorated with *Pilostigma thonningii* stem bark-extracted D-3-O-methy-chiroinositol [J]. Animal Model Exp Med, 2019, 2(1): 25-33.
- [4] Rozenberg S, Bruyère O, Bergmann P, et al. How to manage osteoporosis before the age of 50 [J]. Maturitas, 2020, 138: 14-25.
- [5] Liang G, Zhao J, Dou Y, et al. Mechanism and experimental verification of *Luteolin* for the treatment of osteoporosis based on network pharmacology [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 866641.
- [6] 辛小红, 袁晓霞, 蒋洁, 等. 柴胡桂枝汤治疗类风湿关节炎探微 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(8): 39-41.
- [7] 邵荣学, 张亮, 杨贺杰, 等. 泛素-蛋白酶体抑制剂 MG132 上调 Wnt/ β -catenin 信号通路改善骨质疏松的实验研究 [J]. 中国骨伤, 2022, 35(1): 59-64.
- [8] 刘真, 马晔清, 孟云辉. 以脾胃为中心辨治自身免疫性疾病

验案三则 [J]. 山东中医杂志, 2020, 39(1): 74-77.

[9] 邓宁, 胡庆芬, 邱宇阳, 等. NGF 介导 Fabp4/LCN² 蛋白对骨质疏松大鼠骨微结构及骨强度的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(7): 992-997.

[10] 沈琳玲, 戎宽, 叶子丰, 等. 金刚丸对骨质疏松症模型大鼠 p38 MAPK、JNK、IL-1 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 29-35.

[11] 肖强, 郭子龙, 杨晓宏. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨川芎嗪延缓膝关节关节炎软骨退变的机制 [J]. 中医药导报, 2022, 28(2): 37-42, 52.

[12] Queiroz Júnior JRA, Cartaxo MFS, Paz ST, et al. Histomorphometry of bone microarchitecture in rats treated with vitamin D and bisphosphonate in the management of osteoporosis [J]. Rev Bras Ortop (Sao Paulo), 2022, 57(2): 267-272.

[13] 张晓文, 马应卓, 朱佳丽, 等. 橙皮苷对去卵巢骨质疏松症大鼠骨质流失和机制的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(9): 1283-1288.

[14] Yuan Y, Sun J, Zhou H, et al. The effect of QiangGuYin on osteoporosis through the AKT/mTOR/autophagy signaling pathway mediated by CKIP-1 [J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(2): 892-906.

[15] Tripathi AK, Rai D, Kothari P, et al. Benzofuran pyran hybrid prevents glucocorticoid induced osteoporosis in mice via modulation of canonical Wnt/ β -catenin signaling [J]. Apoptosis, 2022, 27(1-2): 90-111.

[16] Mu P, Hu Y, Ma X, et al. Total flavonoids of *Rhizoma Drynariae* combined with calcium attenuate osteoporosis by reducing reactive oxygen species generation [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 618.

[17] 陈世洲, 阿卜, 蒋俊, 等. 基于中医体质理论辨治骨质疏松症 [J]. 湖北中医杂志, 2023, 45(3): 42-44.

[18] 方雨潇, 王淑美, 杨倩, 等. 柴胡桂枝汤加減方联合卡培他滨抑制三阴性乳腺癌裸鼠皮下移植瘤的生长: 基于抑制 IL-6/STAT3 信号通路 [J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(6): 905-912.

[19] 黎飞彬, 王祖棣, 黄芝团, 等. 功能性消化不良应用柴胡桂枝汤加減治疗的临床疗效观察 [J]. 智慧健康, 2022, 8(4): 142-144.

[20] Guo Y, Liu Y, Shi C, et al. Remote-controllable bone-targeted delivery of estradiol for the treatment of ovariectomy-induced osteoporosis in rats [J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 248.

[21] Jiang Q, Lei YH, Krishnadath DC, et al. Curcumin regulates EZH2/Wnt/ β -Catenin pathway in the mandible and femur of ovariectomized osteoporosis rats [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(6): 513-519.

[22] Huang X, Li S, Lu W, et al. Metformin activates Wnt/ β -catenin for the treatment of diabetic osteoporosis [J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 189.

[23] 罗洁, 许辉, 张信成. 益肾健骨颗粒对绝经后骨质疏松大鼠骨组织 Wnt/ β -catenin 通路的影响 [J]. 湖南中医杂志, 2022, 38(7): 166-169.

[收稿日期] 2022-11-17

一种动物联合模型测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠挥发性脂肪酸的净吸收量

厌氧微生物在动物胃肠道中发酵一系列碳水化合物从而生成有机酸和气体等产物,而单胃动物主要在大肠(盲肠、结肠)中进行微生物厌氧发酵产生挥发性脂肪酸(VFAs)和乳酸等。有研究发现:猪大肠利用发酵产生的 VFAs 能满足自身约 5%~20%的能量维持需求,除此之外,这部分 VFAs 还为动物肠道和动物健康提供营养。然而,大肠内微生物发酵生成 VFAs 的产量和模式会受到多种因素的影响,如何监控大肠内产生的内源性 VFAs 情况是一大难点问题,这也是难以对动物进行精准营养调控的原因。

基于上述背景,武汉轻工大学-湖北省动物营养与饲料科学重点实验室赵胜军团队研究构建“血管痿-肠痿”结合“同位素标记法”的动物联合模型,测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠 VFAs 的净吸收量情况。其中为动态检测 VFAs 吸收情况采用手术造肠系膜、门静脉和股左动脉血管痿,来测定单位时间门静脉对 VFAs 的吸收量。为消除前肠道以及外源性 VFAs 的干扰,手术构建回肠痿管并在测定期间灌注碳 13 标记的 VFAs (¹³C-VFAs),通过检测门静脉血液和大肠组织中¹³C-VFAs 含量来计算大肠对 VFAs 的动态净吸收量。

总的来说,本项研究构建了一种新方法来探索动物大肠对 VFAs 的净吸收量,对精准监控大肠的营养吸收提供了新的思路并为进一步的研究奠定了基础。

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*, 2023, 6(4):375-380, <http://doi:10.1002/ame2.12329>)。

唐晓旭,张志乾,李福琴,等. ADAM10 在骨髓间充质干细胞成骨分化及胫骨骨折愈合中的作用及可能机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 23-31.

Tang XX, Zhang ZQ, Li FQ, et al. Role and possible mechanism of ADAM10 in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and tibial fracture union [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 23-31.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.004

ADAM10 在骨髓间充质干细胞成骨分化及胫骨骨折愈合中的作用及可能机制

唐晓旭¹, 张志乾², 李福琴³, 王楠^{4*}

(1. 郑州澍青医学高等专科学校临床医学系, 郑州 450064; 2. 河南省洛阳正骨医院脊柱外科, 郑州 457000; 3. 郑州大学第一附属医院感染管理科, 郑州 450052; 4. 郑州大学第一附属医院急诊外科, 郑州 450052)

【摘要】 目的 探索解整合素金属蛋白酶 10(ADAM10)在骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化及胫骨骨折愈合中的作用及可能机制。**方法** 培养 SD 大鼠 BMSCs, 建立稳定转染阴性对照(NC)shRNA pGFP-V-RS 载体的 BMSCs 并分为 sh-NC 组和 sh-NC+DMSO 组, 建立稳定转染 ADAM10 shRNA pGFP-V-RS 载体的 BMSCs 并分为 sh-ADAM10 组、sh-ADAM10+DMSO 组、sh-ADAM10+丙戊酸(VPA)组。成骨诱导 14 d 后进行茜素红染色并检测 405 nm 波长吸光值、ALP 活性及 ADAM10、成骨标志物基因(骨钙素(OCN)、Runx 相关转录因子 2(Runx2)、胶原蛋白-I(Col-I))、Notch1 信号通路分子(Notch 细胞内片段(NICD)、Hes1)的表达水平。建立 SD 大鼠的胫骨骨折模型, 局部注射 NC shRNA、ADAM10 shRNA 的 pCMV5.0 载体, 4 周后观察骨折愈合的情况以及基因表达水平。**结果** sh-ADAM10 组 BMSCs 中 ADAM10 的表达水平低于 sh-NC 组, 成骨诱导后茜素红染色的 405 nm 波长吸光值、ALP 活性及 OCN、Runx2、Col-I、NICD、Hes1 的表达水平均高于 sh-NC 组($P<0.05$); sh-ADAM10+VPA 组 BMSCs 成骨诱导后茜素红染色的 405 nm 波长吸光值、ALP 活性及 OCN、Runx2、Col-I 的表达水平均低于 sh-ADAM10+DMSO 组($P<0.05$); sh-ADAM10 组胫骨骨折大鼠的骨折愈合情况优于 sh-NC 组, 骨折部位 OCN、Runx2、Col-I、NICD、Hes1 的表达水平均高于 sh-NC 组($P<0.05$)。**结论** 敲低 ADAM10 表达促进 BMSCs 的成骨分化及胫骨骨折愈合, 这一作用与抑制 Notch1 通路有关。

【关键词】 胫骨骨折; 骨髓间充质干细胞; 解整合素金属蛋白酶 10; 成骨分化; 骨折愈合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0023-09

Role and possible mechanism of ADAM10 in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and tibial fracture union

TANG Xiaoxu¹, ZHANG Zhiqian², LI Fuqin³, WANG Nan^{4*}

(1. Department of Clinical Medicine, Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China.
2. Spine Surgery, Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Zhengzhou 457000. 3. Hospital Infection Management Department, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052. 4. Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

【基金项目】 河南省医学科技攻关计划项目(202102310108)。

【作者简介】 唐晓旭(1987—), 男, 实验师, 研究方向: 临床医学骨科方向。E-mail: tangxiaoxu3670@163.com

【通信作者】 王楠(1982—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 创伤骨科(专业), 围骨盆骨折(临床方向), 骨代谢研究(基础方向)。
E-mail: alpha@zzu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the role and possible mechanism of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and tibial fracture union. **Methods** BMSCs of SD rats were cultured, stably transfected with a negative control (NC) shRNA pGFP-V-RS vector, and divided into sh-NC and sh-NC+DMSO groups. BMSCs were stably transfected with an ADAM10 shRNA pGFP-V-RS vector and divided into sh-ADAM10, sh-ADAM10+DMSO, and sh-ADAM10+valproic acid (VPA) groups. After 14 days of osteogenic induction, absorbance at 405 nm after alizarin red staining, ALP activity, and ADAM10, OCN, Runx2, Col-I, NICD, and Hes1 expression levels were analyzed. A tibial fracture model was established in SD rats, and NC shRNA or ADAM10 shRNA pCMV5.0 vectors were injected locally. Fracture healing and gene expression were then observed for 4 weeks. **Results** The ADAM10 expression level in BMSCs of the sh-ADAM10 group was lower than that in the sh-NC group. After osteogenic induction, the absorbance value of alizarin red staining at 405 nm, ALP activity, and OCN, Runx2, Col-I, NICD, and Hes1 expression levels of the sh-ADAM10 group were higher than those of the sh-NC group ($P < 0.05$). The absorbance value of alizarin red staining at 405 nm, ALP activity, and OCN, Runx2, and Col-I expression levels of the sh-ADAM10+VPA group after osteogenic induction were lower than those in the sh-ADAM+DMSO group ($P < 0.05$). Healing of the tibial fracture in the sh-ADAM10 group was better than that in the sh-NC group, and OCN, Runx2, Col-I, NICD, and Hes1 expression levels were higher than those in the sh-NC group ($P < 0.05$). **Conclusions** Knocking down ADAM10 expression promotes osteogenic differentiation of BMSCs and tibial fracture healing, which is related to inhibition of the Notch1 pathway.

【Keywords】 tibial fracture; bone marrow mesenchymal stem cells; a disintegrin and metalloproteinase 10; osteogenic differentiation; fracture healing

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胫骨骨折是临床常见的四肢骨折类型,多由高能量暴力引起,容易造成局部软组织及血供的破坏,进而增加内固定手术后骨折不愈合或延迟愈合的发生风险^[1-2]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在骨折愈合过程中发挥重要作用,骨折断端趋化和浸润的 BMSCs 能够发生成骨分化,进而促进骨质形成、加速骨折愈合^[3];BMSCs 的浸润及成骨分化受阻时,对骨折愈合产生不利影响^[4]。BMSCs 成骨分化的影响因素复杂,通过有效的干预手段促进 BMSCs 的成骨分化有助于增强 BMSCs 在骨折愈合中的作用。

近些年,基因治疗在干细胞成骨分化、骨折愈合中的应用备受关注,解整合素金属蛋白酶 10(a disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)基因的编码产物定位于细胞膜,在调控细胞黏附、运动、分化中均起到作用^[5-7]。一项口腔科相关的研究证实,在牙周膜干细胞成骨分化过程中 ADAM10 的表达逐步降低,通过慢病毒感染的方式进行 ADAM10 过表达对于牙周膜干细胞的成骨分化具有抑制作用且这一作用与抑制 Notch1 信号通路有关^[8],但该基因在 BMSCs 成骨分化中的作用及其在骨折愈合中的潜在效应尚不清楚。因此,本实验通过稳定敲低 ADAM10 表达的细胞实验及胫骨骨折的动物实验分析 ADAM10 基因对 BMSCs 成骨分化及胫骨骨折愈

合的影响,同时也分析 Notch1 信号通路在 ADAM10 基因调控 BMSCs 成骨分化及胫骨骨折愈合中的作用,旨在深入认识 BMSCs 成骨分化的调控机制,发现促进胫骨骨折愈合的新治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠购自上海杰思捷实验动物有限公司[SCXK(沪)2018-0004],共 20 只,8~10 周龄,体重 180~200 g,实验动物于郑州澍青医学高等专科学校动物房饲养[SYXK(豫)2022-0004],温度 20~22℃,湿度 50%~55%,12 h/12 h 光照/黑暗交替,自由饮食饮水。实验经郑州市澍青医学高等专科学校医学伦理委员会批准(2021KYLL-Y-019),动物实验遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

SD 大鼠 BMSCs(货号:RASMX-01001)购自广州赛业生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

阴性对照(negative control, NC) shRNA 及 ADAM10 shRNA 的 pGFP-V-RS 载体、NC shRNA 及 ADAM10 shRNA 的 pCMV5.0 载体(北京傲锐东源生物公司);转染试剂 Lipo2000(美国 Invitrogen 公

司,批号:11668027);地塞米松(批号:D1756)、 β -甘油磷酸钠(批号:G6251)、维生素 C(批号:A7506)、茜素红(批号:A5533)、Notch1 激动剂丙戊酸(Valproic acid, VPA)(批号:P4543)(储存液用 DMSO 配置、浓度 1.0 mol/L)(美国 Sigma 公司);碱性磷酸酶(ALP)活力检测试剂盒(北京索莱宝公司,批号:BC2145);HE 染色试剂盒(上海碧云天公司,批号:C0105);ADAM10(批号:ab124695)、骨钙素(osteocalcin, OCN)(批号:ab133612)、Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)(批号:ab76956)、I 型胶原(Type I collagen, Col-I)(批号:ab34710)、Notch 受体胞内部分(Notch intracellular domain, NICD)(批号:ab52627)、发状分裂相关增强子 1(hairy and enhancer of split 1, Hes1)(批号:ab108937)的特异性一抗(美国 Abcam 公司)。HERAcell 150i 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Tanon4800 型凝胶成像系统(上海天能仪器公司);VISION90 型小动物科研 X 光机检测仪(丹东奥龙射线仪器集团有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞实验

BMSCs 在完全培养基中贴壁培养,消化传代后接种在培养皿内进行分组转染,转染 5 mg/L NC shRNA 的 pGFP-V-RS 载体、5 mg/L ADAM10 shRNA 的 pGFP-V-RS 载体,48 h 后更换为含有 1 g/L 嘌呤霉素的筛选培养基,筛选得到稳定转染的 BMSCs。

稳定转染的 BMSCs 分组:为验证 ADAM10 的调控作用,不进行转染的 BMSCs 作为对照组,稳定转染 NC shRNA 的 BMSCs 作为 sh-NC 组、稳定转染 ADAM10 shRNA 的 BMSCs 作为 sh-ADAM10 组;为验证 Notch1 在 ADAM10 发挥调控作用中的生物学意义,稳定转染 NC shRNA 的 BMSCs 加入体积分数 0.1% 的 DMSO 作为 sh-NC + DMSO 组,稳定转染 ADAM10 shRNA 的 BMSCs 加入体积分数 0.1% 的 DMSO 作为 sh-ADAM10 + DMSO 组,稳定转染 ADAM10 shRNA 的 BMSCs 加入终浓度 1.0 mmol/L 的 VPA 作为 sh-ADAM10+VPA 组。

各组 BMSCs 按照 1×10^5 个/孔加入 6 孔培养板,待细胞密度达到约 80% 后更换为含有 0.1 μ mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C、10% 胎牛血清的成骨诱导培养基,每 2 d 更换 1 次培养基,连续进行成骨诱导 14 d。

1.3.2 动物分组、造模及给药

SD 大鼠随机分为 sh-NC 组和 sh-ADAM10 组,

每组各 10 只,均参照文献^[9]进行胫骨骨折造模,方法如下:腹腔注射 2% 戊巴比妥钠、30 mg/kg 麻醉,在左下肢前外侧、胫骨中上 1/3 处做纵行切口,显露胫骨骨干,手术刀来回横截造成骨折,术中能够明显听到骨头断裂的裂纹声且术后进行胫骨 X 线摄片检查、出现骨折线判断为造模成功。用长度 17 mm 的克氏针固定骨折的胫骨,完成造模后在骨折局部进行 pCMV5.0 载体的注射。sh-NC 组注射 5 mg/kg NC shRNA 的 pCMV5.0 载体、sh-ADAM10 组注射 5 mg/kg ADAM10 shRNA 的 pCMV5.0 载体,4 周后评价骨折愈合情况。

1.3.3 细胞的茜素红染色

成骨诱导 14 d 时,收集细胞并在 0.1% 茜素红中染色 30 min,在显微镜下观察茜素红阳性染色的钙结节,拍照记录后每孔加入 10% 氯化十六烷基吡啶 500 μ L,充分震荡使钙结节溶解,将 50 μ L 液体移入 96 孔培养板的培养孔内,在酶标仪上检测 405 nm 的波长值。

1.3.4 细胞 ALP 活性的检测

成骨诱导 14 d 时,收集细胞并采用细胞 ALP 活性检测试剂盒进行实验,裂解细胞后分别检测 ALP 活性(以 U/L 表示)及蛋白浓度(以 mg/L 表示),计算每 mg 蛋白对应的 ALP 活性。

1.3.5 细胞及组织中蛋白表达的检测

收集成骨诱导 14 d 时的 BMSCs 和胫骨骨折处骨组织,加入裂解液后进行细胞裂解或组织匀浆,提取得到蛋白后检测浓度,将含有 30 μ g 蛋白样本用于 Western blot 检测,电泳、电转 PVDF 膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 : 1000 稀释的 ADAM10、OCN、Runx2、Col-I、NICD、Hes1 一抗或 1 : 5000 稀释的 β -actin 一抗过夜。次日,室温孵育二抗 1 h,最后在凝胶成像仪中显影得到蛋白条带,根据条带的灰度值、以 β -actin 为内参,计算 ADAM10、OCN、Runx2、Col-I、NICD、Hes1 的表达水平。

1.3.6 骨折愈合的评价

首先采用 VISION90 型小动物科研 X 光机检测仪进行 X 线检查,观察骨折局部的影像学变化;而后收集胫骨骨折处的骨组织,4% 多聚甲醛固定后制作组织蜡块及病理切片,采用 HE 染色试剂盒完成染色操作,封片后在显微镜下观察骨折局部的骨痂及骨小梁特征。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行统计学处

理,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较均采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 成骨诱导后不同时间点 ADAM10 表达水平的比较

BMSCs 成骨诱导后不同时间点 ADAM10 表达水平的比较均有统计学差异($P<0.05$),随着成骨诱导时间延长,BMSCs 中 ADAM10 的表达水平呈逐步降低趋势,提示在 BMSCs 成骨分化的过程中 ADAM10 的表达受到抑制。见图 1。

2.2 不同转染组 BMSCs 中 ADAM10 表达水平的比较

对照组与 sh-NC 组 BMSCs 中 ADAM10 表达水平的比较无显著差异($P<0.05$);sh-ADAM10 组 BMSCs 中 ADAM10 表达水平均低于对照组和 sh-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明稳定转染 sh-ADAM10 使 BMSCs 中 ADAM10 表达降低。见图 2。

2.3 抑制 ADAM10 表达对 BMSCs 成骨分化的影响

sh-ADAM10 组 BMSCs 成骨诱导后茜素红染色的 405 nm 吸光值、ALP 的活性均高于对照组和 sh-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明敲低 ADAM10 表达促进 BMSCs 的成骨分化。见图 3。

2.4 抑制 ADAM10 表达对 BMSCs 成骨诱导后成骨标志基因表达的影响

sh-ADAM10 组 BMSCs 成骨诱导后 OCN、Runx2、Col-I 的表达水平均高于对照组和 sh-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明敲低 ADAM10 表达促进 BMSCs 中成骨标志基因的表达。见图 4。

2.5 抑制 ADAM10 表达对 BMSCs 成骨诱导后 Notch1 通路的影响

sh-ADAM10 组 BMSCs 成骨诱导后 NICD、Hes1 的表达水平均低于对照组和 sh-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$),表明敲低 ADAM10 表达抑制 BMSCs 中 Notch1 信号通路的激活。见图 5。

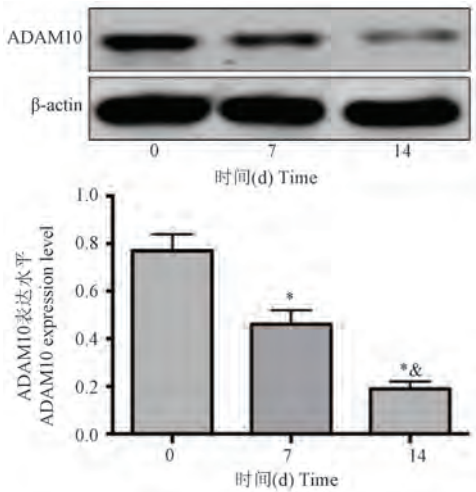
2.6 Notch1 通路激动剂 VPA 对抑制 ADAM10 表达促进 BMSCs 成骨分化的影响

sh-ADAM10+DMSO 组 BMSCs 成骨诱导后茜素红染色的 405 nm 吸光值、ALP 的活性均高于 sh-NC +DMSO 组($P<0.05$);sh-ADAM10+VPA 组 BMSCs 成骨诱导后茜素红染色的 405 nm 吸光值、ALP 的活

性均低于 sh-ADAM10+DMSO 组($P<0.05$),表明激活 Notch1 通路使敲低 ADAM10 表达促进 BMSCs 成骨分化的作用减弱。见图 6。

2.7 Notch1 通路激动剂 VPA 对抑制 ADAM10 表达促进 BMSCs 中成骨标志基因表达的影响

sh-ADAM10+DMSO组BMSCs成骨诱导后OCN、

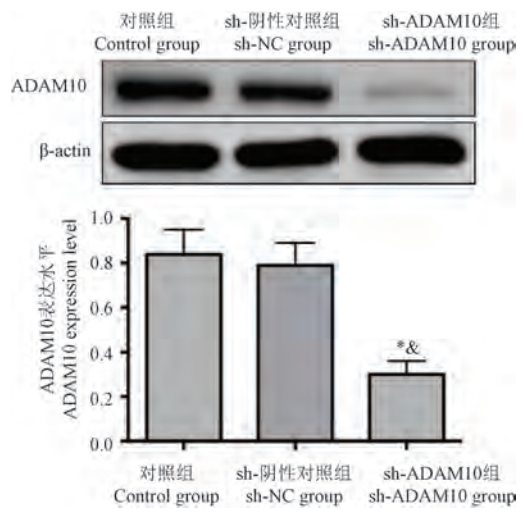


注:与诱导 0 d 时比较, * $P<0.05$;与诱导 7 d 时比较, & $P<0.05$ 。

图 1 BMSCs 成骨诱导后不同时间点 ADAM10 表达水平的比较

Note. Compared with 0 d of induction, * $P<0.05$. Compared with 7 days after induction, & $P<0.05$.

Figure 1 Comparison of ADAM10 expression levels at different time points after osteogenesis induction of BMSCs

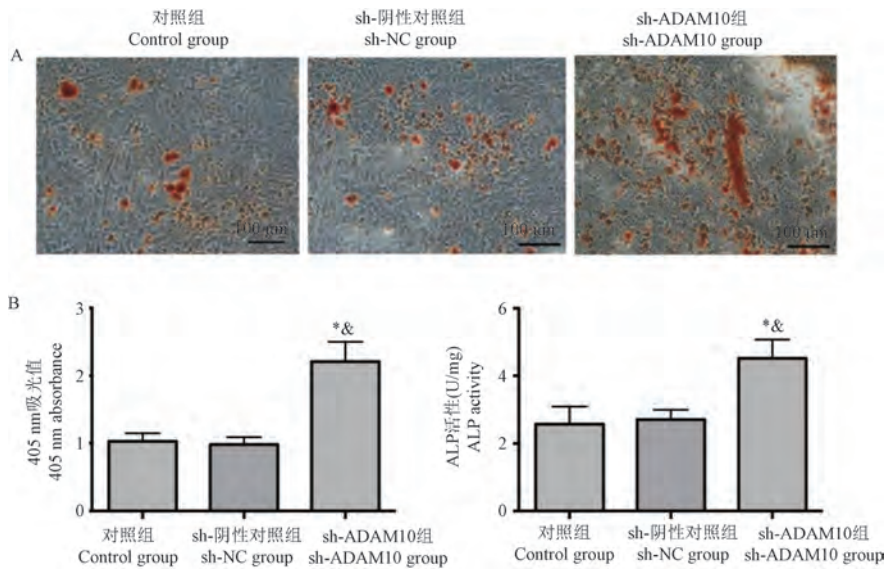


注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 sh-NC 组比较, & $P<0.05$ 。

图 2 不同转染组 BMSCs 中 ADAM10 表达水平的比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with sh-NC group, & $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of ADAM10 expression levels in BMSCs among different transfection groups

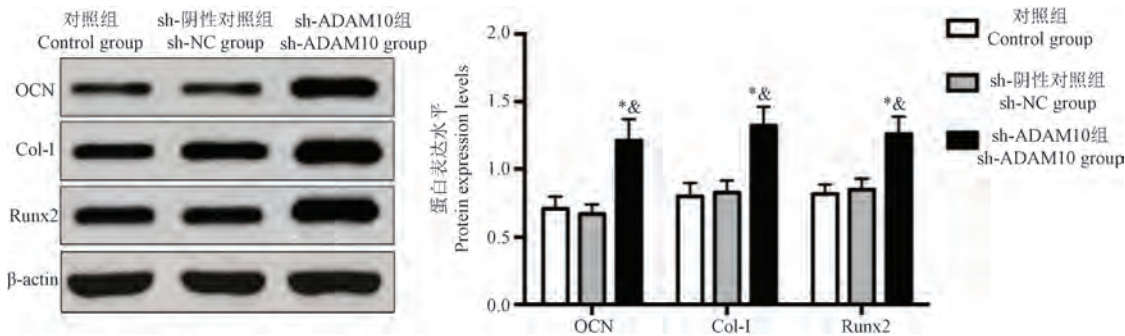


注:A:茜素红染色;B:405 nm 吸光值的比较; C:LP 活性的比较。与对照组比较, * $P<0.05$;与 sh-NC 组比较, & $P<0.05$ 。

图 3 不同转染组 BMSCs 中 ADAM10 表达水平的比较

Note. A, Alizarin red staining. B, Comparison of absorbance at 405 nm. C, Comparison of ALP activity. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with sh-NC group, & $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of ADAM10 expression levels in BMSCs among different transfection groups

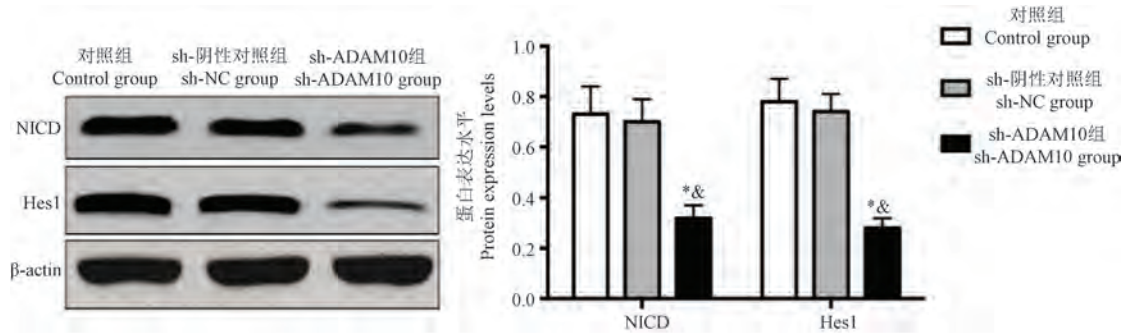


注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 sh-NC 组比较, & $P<0.05$ 。

图 4 不同转染组 BMSCs 中 OCN、Col-I 和 Runx2 表达水平的比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with sh-NC group, & $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of OCN, Col-I and Runx2 expression levels in BMSCs among different transfection groups



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 sh-NC 组比较, & $P<0.05$ 。

图 5 不同转染组 BMSCs 中 NICD、Hes1 表达水平的比较

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with sh-NC group, & $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of NICD, Hes1 expression levels in BMSCs among different transfection groups

Runx2、Col-I 的表达水平均高于 sh-NC+DMSO 组 ($P<0.05$)；sh-ADAM10+VPA 组 BMSCs 成骨诱导后 OCN、Runx2、Col-I 的表达水平均低于 sh-ADAM10+DMSO 组 ($P<0.05$)，表明激活 Notch1 通路使敲低 ADAM10 表达促进 BMSCs 中成骨标志基因表达的作用减弱。见图 7。

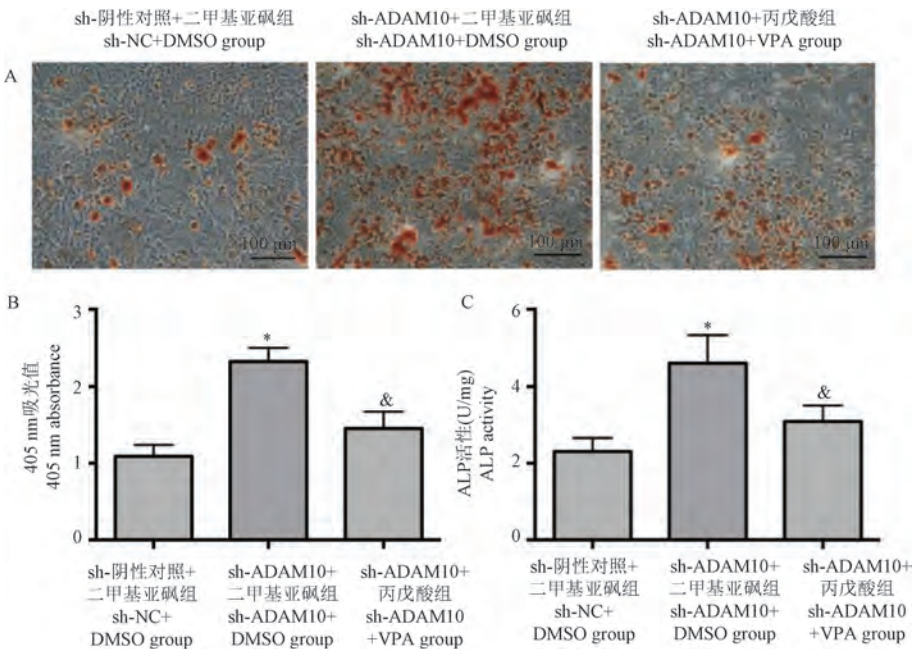
2.8 抑制 ADAM10 表达对大鼠胫骨骨折愈合的影响

经 X 射线检查,sh-NC 组胫骨骨折大鼠的骨折

线清晰,sh-ADAM10 组胫骨骨折大鼠的骨折线几乎消失;经 HE 染色,sh-NC 组大鼠的骨痂纤维较多、成熟的小梁骨较少,sh-ADAM10 组大鼠的骨痂明显增多、且形成成熟的小梁骨,表明敲低 ADAM10 表达促进胫骨骨折愈合。见图 8。

2.9 抑制 ADAM10 表达对大鼠胫骨骨折中成骨标志基因表达的影响

sh-ADAM10 组胫骨骨折大鼠骨折部位中 OCN、Runx2、Col-I 的表达水平均高于 sh-NC 组,差异有统

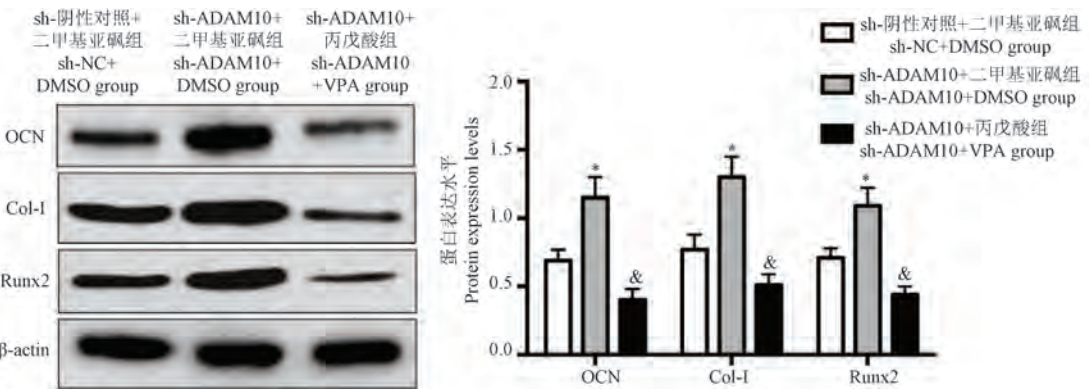


注:A:茜素红染色;B:405 nm 吸光值的比较;C:ALP 活性的比较。与 sh-NC+DMSO 组比较, * $P<0.05$;与 sh-ADAM10+DMSO 组比较, & $P<0.05$ 。

图 6 Notch1 通路激动剂 VPA 对抑制 ADAM10 表达促进 BMSCs 成骨分化的影响

Note. A, Alizarin red staining. B, Comparison of absorbance at 405 nm. C, Comparison of ALP activity. Compared with the sh-NC+DMSO group, * $P<0.05$. Compared with sh-ADAM10+DMSO group, & $P<0.05$.

Figure 6 Effect of Notch1 pathway agonist VPA on the inhibition of ADAM10 expression promoting osteogenic differentiation of BMSCs



注:与 sh-NC+DMSO 组比较, * $P<0.05$;与 sh-ADAM10+DMSO 组比较, & $P<0.05$ 。

图 7 Notch1 通路激动剂 VPA 对抑制 ADAM10 表达促进 BMSCs 中成骨标志基因表达的影响

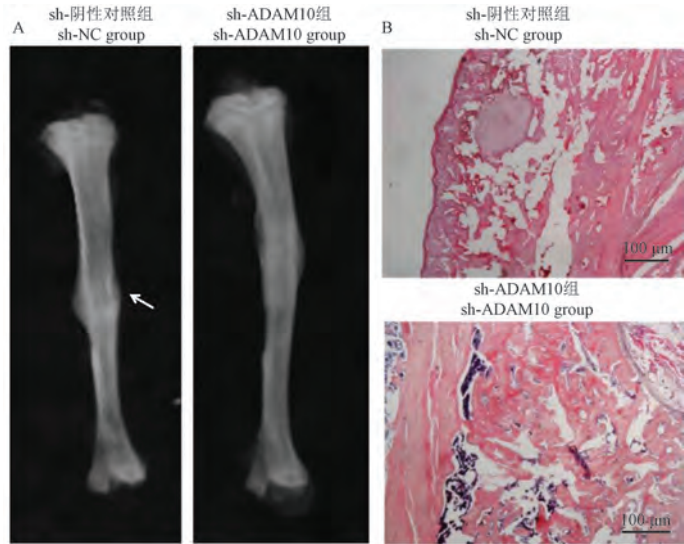
Note. Compared with the sh-NC+DMSO group, * $P<0.05$. Compared with sh-ADAM10+DMSO group, & $P<0.05$.

Figure 7 Effect of Notch1 pathway agonist VPA on the inhibition of ADAM10 expression promoting osteogenic marker genes expression of BMSCs

计学意义($P<0.05$),结果表明敲低 ADAM10 表达促进胫骨骨折愈合过程中的成骨标志基因表达。见图 9。

2.10 抑制 ADAM10 表达对大鼠胫骨骨折中 Notch1 通路的影响

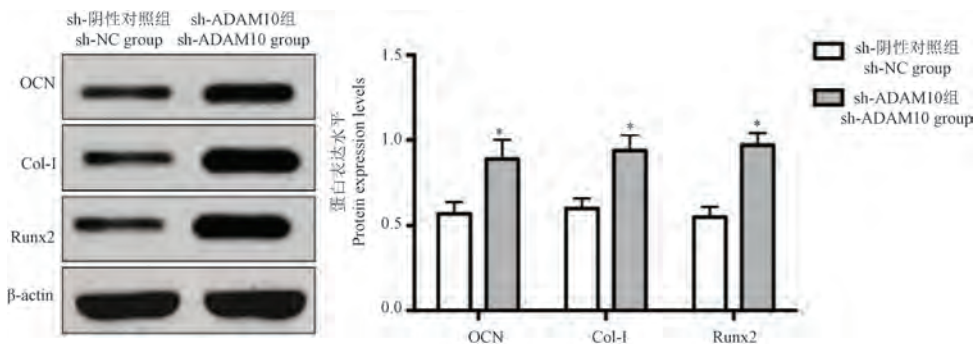
如图 10 所示,sh-ADAM10 组胫骨骨折大鼠骨



注:A:胫骨骨折的 X 射线检查,箭头所指为骨折线;B:胫骨骨折的 HE 染色。
图 8 抑制 ADAM10 表达大鼠胫骨骨折愈合的影响

Note. A, X-ray examination of tibial fracture. B, HE staining of tibial fracture.

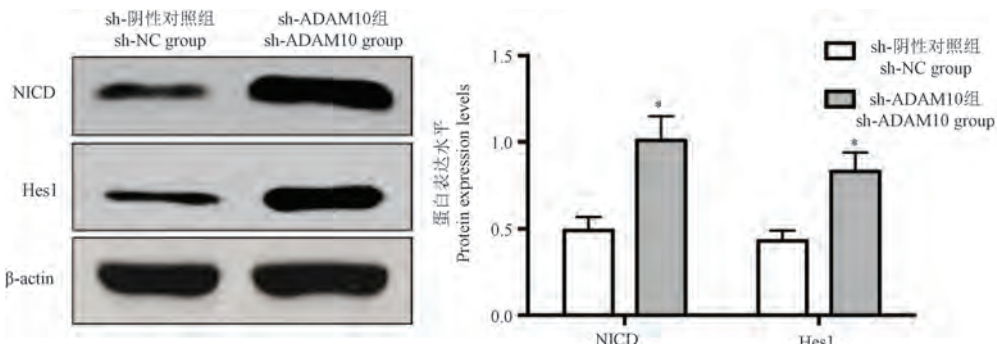
Figure 8 Effect of the inhibition of ADAM10 expression on tibial fracture healing in rats



注:与 sh-NC 组比较, $*P<0.05$ 。
图 9 抑制 ADAM10 表达大鼠胫骨骨折中成骨标志基因表达的影响

Note. Compared with the sh-NC group, $*P<0.05$.

Figure 9 Effect of the inhibition of ADAM10 expression on osteogenic marker genes expression in rat tibia fracture



注:与 sh-NC 组比较, $*P<0.05$ 。
图 10 抑制 ADAM10 表达大鼠胫骨骨折中 Notch1 通路的影响

Note. Compared with the sh-NC group, $*P<0.05$.

Figure 10 Effect of the inhibition of ADAM10 expression on Notch1 pathway in rat tibia fracture

折部位中 NICD、Hes1 的表达水平均低于 sh-NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明敲低 ADAM10 表达促进胫骨骨折愈合过程中 Notch1 信号通路的激活。

3 讨论

胫骨骨折多由交通事故、高处坠落等高能暴力引起, 胫骨局部存在软组织薄弱、穿支血管少的解剖特点, 高能暴力容易引起局部软组织缺损及血供损害, 进行切开复位内固定治疗后的不愈合或延迟愈合发生风险较高。国内葛向荣等^[10]和赵国平等^[2]的临床研究分别报道胫骨骨折后延迟愈合的发生率为 34.31% 和 27.16%。骨折延迟愈合或不愈合不仅影响肢体功能、降低生活质量, 还增加二次手术风险、加大经济负担, 因此需要进行积极防治^[11-12]。本研究通过细胞实验和动物实验分析了 ADAM10 基因对 BMSCs 成骨分化及胫骨骨折愈合的影响。

ADAM10 的主要生物学功能是对各种细胞因子及受体、结构蛋白实现剪切, 进而调控不同的生物学过程^[5-7]。本研究对 BMSCs 进行成骨诱导分化, 在分化过程中 ADAM10 的表达水平也呈逐步降低趋势, 与朱永翠等^[8]的研究结果一致。为了验证 ADAM10 基因在 BMSCs 成骨分化中的调控作用, 本研究在成骨诱导前先构建了稳定转染 pGFP-V-RS 载体的 BMSCs, 而后进行成骨诱导分化并检测, 结果显示, 敲低 ADAM10 表达使 BMSCs 成骨诱导分化后的钙结节数量及 ALP 活性均明显增加。干细胞的成骨分化过程涉及多种标志基因的变化, Col-I 和 OCN 分别是骨基质中主要的胶原成分和非胶原成分, Runx2 是调控成骨分化的关键基因^[13-14], 本研究在稳定敲低 ADAM10 的 BMSCs 进行成骨诱导后检测到 Col-I、OCN、Runx2 的表达水平增加, 与成骨诱导后钙结节数量及 ALP 活性增加的结果吻合。以上结果表明敲低 ADAM10 基因显著抑制 BMSCs 的成骨分化。

根据朱永翠等^[8]的研究, ADAM10 对牙周膜干细胞中 Notch1 通路具有调控作用。Notch1 通路在成骨分化及骨折愈合中起重要作用, 有研究报道抑制 Notch1 通路对干细胞的成骨分化具有促进作用, 在骨折愈合过程中 Notch1 表达下调是骨形成的必备条件^[15-16]。Notch1 是一类膜受体, 与配体结合后通过三次酶切反应将胞内结构域 NICD 释放进入胞

浆, 作用与 Hes1 并调控细胞增殖及分化。ADAM10 具有水解细胞膜受体胞内或胞外结构域的功能, 多项研究证实 ADAM10 能够水解 Notch1 的胞内结构域并产生 NICD^[17-19]。本研究在稳定敲低 ADAM10 的 BMSCs 进行成骨诱导后检测到 NICD 及 Hes1 的表达均明显降低, 在成骨诱导的过程中持续给予 Notch1 激动剂 VPA 干预后, 稳定敲低 ADAM10 促进成骨分化的作用被削弱, 表明敲低 ADAM10 促进成骨分化的作用与抑制 Notch1 通路有关。

在胫骨骨折的愈合过程中, BMSCs 在骨折局部迁移、浸润并发生成骨分化对新骨形成具有重要意义。为了更深入认识 ADAM10 基因调控 BMSCs 成骨分化在胫骨骨折愈合中的生物学意义, 本研究建立了胫骨骨折大鼠模型, 在骨折局部注射 ADAM10 shRNA 的 pCMV5.0 载体以敲低 ADAM10, 通过观察骨折愈合情况可知: 敲低 ADAM10 后加速了胫骨骨折的愈合, 骨折部位的骨折线几乎消失且胶原形成、ALP 活性及 OCN、Runx2、Col-I 的表达水平均明显增加, 同时还观察到 Notch1 通路中 NICD、Hes1 的表达降低。以上动物实验结果与干细胞实验的结果吻合, 表明敲低 ADAM10 显著促进胫骨骨折的愈合。

综上所述, 本研究通过细胞实验及动物实验证实敲低 ADAM10 促进 BMSCs 的成骨分化及胫骨骨折的愈合, 这一促进作用与抑制 Notch1 通路有关, 这为今后胫骨骨折后不愈合及延迟愈合的防治提供了新思路。

参考文献:

- [1] Lv H, Zhang Q, Chen W, et al. Epidemiological study of tibial plateau fractures combined with intercondylar eminence fractures [J]. Orthop Surg, 2020, 12(2): 561-569.
- [2] 赵国平, 苏伟, 赵劲民, 等. 影响胫腓骨开放性骨折愈合的多因素分析 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(14): 1268-1271.
- [3] Wang W, Wang B. Expression of angiogenesis-related proteins in bone marrow mesenchymal stem cells induced by osteoprotegerin during osteogenic differentiation in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107821.
- [4] Li Y, Liu L, Li S, et al. Impaired bone healing by enoxaparin via inhibiting the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells towards osteoblasts [J]. J Bone Miner Metab, 2022, 40(1): 9-19.
- [5] Hsia HE, Tüshaus J, Feng X, et al. Endoglycan (PODXL2) is proteolytically processed by ADAM10 (a disintegrin and metalloprotease 10) and controls neurite branching in primary

- neurons [J]. FASEB J, 2021, 35(9): e21813.
- [6] Pang KT, Ghim M, Liu C, et al. Leucine-rich α -2-glycoprotein 1 suppresses endothelial cell activation through ADAM10-mediated shedding of TNF- α receptor [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 706143.
- [7] Sachs M, Wetzel S, Reichelt J, et al. ADAM10-mediated ectodomain shedding is an essential driver of podocyte damage [J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(6): 1389–1408.
- [8] 朱永翠, 翟蕾, 闫亚姿, 等. 过表达 ADAM10 通过调控 Notch 信号通路对牙周膜干细胞成骨分化的影响 [J]. 口腔医学研究, 2021, 37(5): 468–473.
- [9] 张超, 李兴勇, 马贵福, 等. 沉默 Hoxa9 基因可促进胫骨骨折后的成骨分化及骨折愈合 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(35): 5600–5606.
- [10] 葛向荣, 马红霞, 林继红. 胫骨骨折患者术后血清 IGF-1、 β -CTX、CYR61 蛋白的表达与延迟愈合的关系 [J]. 创伤外科杂志, 2020, 22(3): 205–208.
- [11] Kizkapan TB, Misir A, Oguzkaya S, et al. Reliability of radiographic union scale in tibial fractures and modified radiographic union scale in tibial fractures scores in the evaluation of pediatric forearm fracture union [J]. Jt Dis Relat Surg, 2021, 32(1): 185–191.
- [12] Magnusson EA, Weltsch D, Baldwin KD, et al. Open reduction of closed pediatric tibial shaft fractures treated with intramedullary stabilization does not increase risk of postoperative complications [J]. J Orthop Trauma, 2020, 34(9): 482–487.
- [13] Tabatabai TS, Haji-Ghasem-Kashani M, Nasiri M. *In vitro* osteogenic induction of human adipose stem cells co-treated with betaine/osteogenesis differentiation medium [J]. Mol Biol Res Commun, 2021, 10(2): 93–103.
- [14] Yan Y, Liu Y, Lu R. PELP1 promotes the expression of RUNX2 via the ERK pathway during the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. Arch Oral Biol, 2021, 124: 105078.
- [15] He Y, Zou L. Notch-1 inhibition reduces proliferation and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(3): 1884–1890.
- [16] Lee S, Remark LH, Josephson AM, et al. Notch-Wnt signal crosstalk regulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells during intramembranous bone healing [J]. NPJ Regen Med, 2021, 6(1): 29.
- [17] Cheng Y, Lin L, Li X, et al. ADAM10 is involved in the oncogenic process and chemo-resistance of triple-negative breast cancer via regulating Notch1 signaling pathway, CD44 and PrPc [J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 32.
- [18] Alabi RO, Lora J, Celen AB, et al. Analysis of the conditions that affect the selective processing of endogenous Notch1 by ADAM10 and ADAM17 [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1846.
- [19] Lindsey RC, Xing W, Pourteymoor S, et al. Novel role for claudin-11 in the regulation of osteoblasts via modulation of ADAM10-mediated Notch signaling [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(10): 1910–1922.

[收稿日期] 2022-09-14

陈爽,谢燕燕,徐菊菊,等.骨髓骨片法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞和 PKH26 标记 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (10): 32-37.

Chen S, Xie YY, Xu JJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by bone marrow and slice adherent culture *in vitro* and PKH26 labeling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 32-37.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.005

骨髓骨片法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞 和 PKH26 标记

陈爽¹, 谢燕燕², 徐菊菊¹, 闫振宇^{1,2*}

(1.华北理工大学,河北 唐山 063000;2.华北理工大学附属医院,河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 旨在建立一种高效的方法分离和培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的方法,并应用 PKH26 进行体外标记,探讨 PKH26 标记对 BMSCs 生物学特性的影响,以及体外示踪情况。**方法** 将大鼠 5 d 乳鼠双后肢骨进行分离,去除周围的肌肉和筋膜,并将其剪成小块进行培养,利用换液、传代提纯 BMSCs,应用流式细胞仪测定第 3 代细胞表面抗原。在培养条件相同的情况下,取第 3 代 BMSCs 应用 PKH26 进行标记,标记组与未标记组在荧光显微镜下对细胞形态学、增殖状态进行观察,比较标记组与未标记组成骨成脂诱导特点及鉴定。**结果** 骨髓骨片法分离乳鼠双后肢骨,培养 BMSCs 呈细长梭形,形态均一,短时间内可迅速获得大量 BMSCs;经流式细胞仪鉴定结果表明,表达 CD29 为(91.18±1.29)%,表达 CD90 为(95.04±0.11)%,表达 CD45 为(1.74±0.36)%;PKH26 标记对 BMSCs 细胞形态、增殖无明显影响($P>0.05$),对成骨成脂诱导无影响。**结论** 采用大鼠 5 d 乳鼠骨髓骨片法能够快速培养出大量高纯度的 BMSCs,该细胞可作为种子细胞用于骨组织工程;PKH26 可对体外大鼠 BMSCs 进行标记。

【关键词】 大鼠骨髓间充质干细胞;细胞标记;PKH26;骨组织工程

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0032-06

Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by bone marrow and slice adherent culture *in vitro* and PKH26 labeling

CHEN Shuang¹, XIE Yanyan², XU Jujun¹, YAN Zhenyu^{1,2*}

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China.

2. the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To establish an efficient method to isolate and culture rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) and apply PKH26 to label them *in vitro* to explore the effect of PKH26 labeling on their biological characteristics and achieve *in vitro* tracing. **Methods** Hind limb bones of 5-day-old rats were separated, surrounding muscle and fascia were removed, and the bones were cut into small pieces for culture. BMSCs were purified by fluid exchange and passaging. Cell surface antigens of third passage cells were analyzed by flow cytometry. Under the same culture conditions, third passage BMSCs were labeled with PKH26. Cell morphology and proliferation of labeled and unlabeled groups were observed under a fluorescence microscope. Adipogenic induction characteristics and identification of labeled and unlabeled groups were compared. **Results** The bone marrow slice method was used to separate hind limb

【基金项目】河北省自然科学基金面上资助项目(H2019209154);2019 年河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目。

【作者简介】陈爽(1997—),女,硕士研究生,研究方向:血液内科学。E-mail:tydwly@163.com

【通信作者】闫振宇(1974—),男,博士,教授,主任医师,研究方向:止血与血栓。E-mail:hbyzy2011@163.com

bones of 5-day-old mice. The BMSC shape was slender, spindle, and uniform. A large number of BMSCs was rapidly obtained in a short time. Flow cytometry showed CD29 expression in $(91.18 \pm 1.29) \%$ of cells, CD90 expression in $(95.04 \pm 0.11) \%$ of cells, and CD45 expression in $(1.74 \pm 0.36) \%$ of cells. PKH26 labeling had no significant effect on the morphology or proliferation of BMSCs ($P > 0.05$) or induction of osteogenesis or adipogenesis. **Conclusions** A large number of high-purity BMSCs was rapidly cultured by the method from 5-day-old rat bone marrow slices, which can be used as seed cells for bone tissue engineering. PKH26 can also label rat BMSCs *in vitro*.

[Keywords] rat bone marrow mesenchymal stem cells; cell markers; PKH26; bone tissue engineering
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨再生是各种类型的骨创伤研究的难点问题,因为外伤、车祸等外力难以抵抗的因素造成骨损伤、骨缺损,手术治疗是临床唯一有效的彻底治愈手段。但是,由于身体不能耐受手术、置换材料发生排斥反应、手术费用昂贵等因素使其在临床应用上受到一定限制,部分患者常因无法行走而产生心理抑郁。有研究证实,向牵张成骨模型注射自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)可以对矿化区形成骨再生^[1],并且能够分化为成骨细胞,再通过旁分泌发挥作用,此细胞易分离、扩增、免疫原性低,间充质干细胞提供了骨再生的新方向之一^[2]。BMSCs 属于修复机体某些特定组织的一类干细胞,是一种能够自我复制和分化为多种细胞类型的祖细胞。另外,多项试验的研究结果证实了 BMSCs 与生物材料具有很好的相容性,形成复合支架促进骨缺损修复、骨组织再生的优势^[3-4]。近年来, BMSCs 已经成为理想的骨组织工程种子细胞。有实验研究表明,骨髓的收集技术会影响 BMSCs 的异质性,最后影响软骨细胞分化,而对成骨或成脂肪潜力方面无明显影响^[5]。本实验中,研究者通过 5 d 大鼠乳鼠骨髓骨片法对 BMSCs 进行分离培养,并作出鉴定。然后应用 PKH26 程序性标记,观察对细胞形态、增殖、诱导分化的影响,为 BMSCs 体内移植到软骨的进一步研究提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 5 d 乳鼠和 3~4 周 SD 雄性大鼠分别 2 只,前者体重 11~13 g,后者体重 80~90 g,实验动物均购买于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。动物均饲养在华北理工大学医学实验动物中心 SPF 级屏障实验室环境内[SYXK(冀)2020-007],饲养条件:室温 18~26℃,相对湿度 40%~70%。实验动物福利伦理

审查获得华北理工大学伦理委员会批准(2022-SY-012),所有实验动物在实验过程中均遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

α -MEM 培养基、0.25% EDTA 胰酶、双抗(青链霉素)均购买于 Hyclone 公司,货号 SH30265.01、SH30042.01、SV30010;胎牛血清购买于 Gibco 公司,货号 10099-141;PKH26 试剂盒购买于贝博生物科技有限公司,货号 BB-441125;CCK-8 试剂盒购买于北京聚合美生物科技有限公司,货号 MF128-01;油红 O 染色试剂盒、茜素红 S 染色液(0.2%)购买于北京索莱宝科技有限公司,货号为 G1262、G1450;Anti Rat FITC-CD29、Anti Rat FITC-CD90、Anti Rat FITC-CD45 均购买于美国 BD 公司。细胞培养箱购买于美国 Thermo 公司;流式细胞仪购买于美国 Becton Dickinson 公司;荧光倒置相差电子显微镜购买于日本 Nikon 公司;酶标仪购买于美国 Biotek 公司;生物安全柜购买于美国 Farma 公司,型号为 HR60-IIA2;微量电子天平购买于德国 Satorius 公司,型号为 TE601-L。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠 BMSCs 提取与培养

采用大鼠 5 d 乳鼠骨髓骨片法分离培养大鼠 BMSCs,具体方法为:取 SD 雄性大鼠 5 d 乳鼠 2 只,颈椎脱臼法处死后,用无菌镊子、眼科剪轻轻将其后肢皮肤剥离掉,充分暴露双后肢,分离双侧完整的后肢,去除附着的肌肉和筋膜,用含有 1% 双抗的 PBS 清洗 2 次,并用眼科剪剪成体积小于 3 mm³ 的小碎块转移至含 10% 血清的 α -MEM 培养基中,混匀后接种在细胞培养瓶中,放置在 37℃ 的 5% CO₂ 细胞培养箱中。接种 48 h 后,可观察到骨片周围爬出的是细长的梭形细胞,继续培养至细胞密度达 80% 左右,可进行 1:2 传代,倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

传统大鼠 BMSCs 的分离培养方法是采用 3~4 周 SD 雄性大鼠 2 只,使用 3% 戊巴比妥钠腹腔麻

醉,麻醉剂量 2 mL/kg,然后用 75% 酒精浸泡 10 min,传递至超净台内。取仰卧位,充分暴露膝关节,将后肢皮肤剪开,小心分离股骨胫骨以及肌肉筋膜等,用无菌 PBS 浸泡后,使用 1 mL 注射器冲洗骨髓腔,直至无红色后,收集全部液体,离心,转移到含 10% 血清的 α -MEM 培养基中,混匀后接种在细胞培养瓶中,放置在 37℃ 的 5% CO₂ 细胞培养箱中。48 h 后首次换液,继续培养至细胞密度达 80% 左右,可进行 1:2 传代,倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.3.2 大鼠 BMSCs 鉴定

取第 3 代 BMSCs,对其进行消化、离心、重悬后得到密度为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,分别加入抗大鼠单克隆抗体 CD29、CD45、CD90,在 4℃ 下进行 30 min 避光孵育,最后加入 PBS 重悬,上机检测,重复检测 3 次。

1.3.3 PKH26 标记大鼠 BMSCs

应用 PKH26 对第 3 代细胞进行染色,配制 PKH26 染色工作液:用无血清 α -MEM 培养基将 PKH26 母液稀释 250 倍后备用。用 100 μ L 染色工作液将消化完成的细胞沉淀重悬,直至细胞浓度为 10^7 /mL,吹打混匀后加到用锡纸包裹的 EP 管中,放入 37℃ 的培养箱进行 10 min 的孵育,4℃ 冰箱中孵育 25 min,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 清洗 2 次细胞上未结合的 PKH26 染色液,加入 4 mL 完全培养基重悬细胞,充分吹打混匀,接种在细胞培养瓶中,注意避光,在培养箱内继续培养,传代扩增,随后可以直接在倒置荧光电子显微镜下观察到细胞标记的效果以及荧光的强弱。

1.3.4 CCK-8 法检测标记与未标记细胞增殖活力

取第 3 代被 PKH26 标记(实验)组和未被标记 BMSCs(对照)组,制备成单细胞悬液,操作依据 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力,具体步骤:分别将实验组和对照组的细胞浓度调整为 2×10^3 /L,每孔 100 μ L,接种到 96 孔培养板,设 5 个复孔,在相同条件下培养,每 24 h 分别取 5 个实验组和对照组孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,培养箱中孵育 3 h,在酶标仪 450 nm 参数下读取 OD 值,连续检测 10 d,以培养时间为横坐标,以吸光度为纵坐标,将 PKH26 标记与未标记大鼠 BMSCs 的生长曲线绘制出来。

1.3.5 PKH26 标记与未标记细胞成骨成脂诱导及鉴定

(1)细胞成骨诱导及鉴定:成骨诱导液配方为向含 10% 血清的 α -MEM 培养基中加入 10 mmol/L

β -甘油磷酸钠、0.05 mmol/L Vc 和 100 mmol/L 地塞米松。取第 3 代细胞调整密度为 5×10^5 /孔后,在 6 孔板中接种;当细胞达到 70% 的融合度时,再替换成骨诱导液,培养至第 21 天用茜素红染色。

(2)细胞成脂诱导及鉴定:成脂诱导液配方为向含 10% 血清的 α -MEM 培养基中加入 10 μ mol/L 胰岛素、1 μ mol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 3-异丁基- β -甲基黄嘌呤和 200 μ mol/L 吡啶美辛。取第 3 代细胞调整密度为 5×10^5 /孔后接种于 6 孔板培养;当细胞达到 70% 融合度时,再替换成脂诱导液,培养至第 14 天用油红 O 染色。

1.4 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,用 GraphPad Prism 8 软件进行绘制统计图。计量资料表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),多组数据间差异比较采用单因素方差分析,两组数据之间差异比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的形态观察

将骨髓骨片接种于培养瓶,经过大鼠 BMSCs 原代 36 h 的培养,可见少量从骨片周围爬出,贴壁生长,有大量悬浮的细胞;培养到 72 h,第一次半定量换液,悬浮细胞降低,贴壁细胞逐渐增加,大量细胞爬出,它是细长的梭形、三角形、纺锤形;继续培养到 96 h 以后细胞密集生长,出现大片融合现象,呈漩涡状,可进行 1:2 传代培养。传代到第 3 代细胞均是呈长梭形,形态一致,具有较强的折光性,融合密度较高时可呈漩涡状、鱼群状(图 1)。

传统方法培养的 BMSCs 在 36 h 仅观察到少量细胞贴壁,培养到 48 h 进行首次换液,观察到细胞贴壁数量增加,继续培养到第 72 h,观察到细胞尚未形成群落,排列分散,呈细长梭形;继续培养到 96 h,细胞密度可达 50% 以上,但仍需继续培养,尚无法传代(图 1)。

2.2 流式细胞鉴定

如图 2 所示,经流式细胞仪对表面标志物进行检测,第 3 代大鼠 BMSCs 阴性对照为 $(0.55 \pm 0.73)\%$,高表达 CD29、CD90,表达量分别为 $(91.18 \pm 1.29)\%$ 、 $(95.04 \pm 0.11)\%$,而低表达 CD45,仅有 $(1.74 \pm 0.36)\%$,差异显著($P < 0.001$),证明分离培养的是大鼠 BMSC(表 1)。

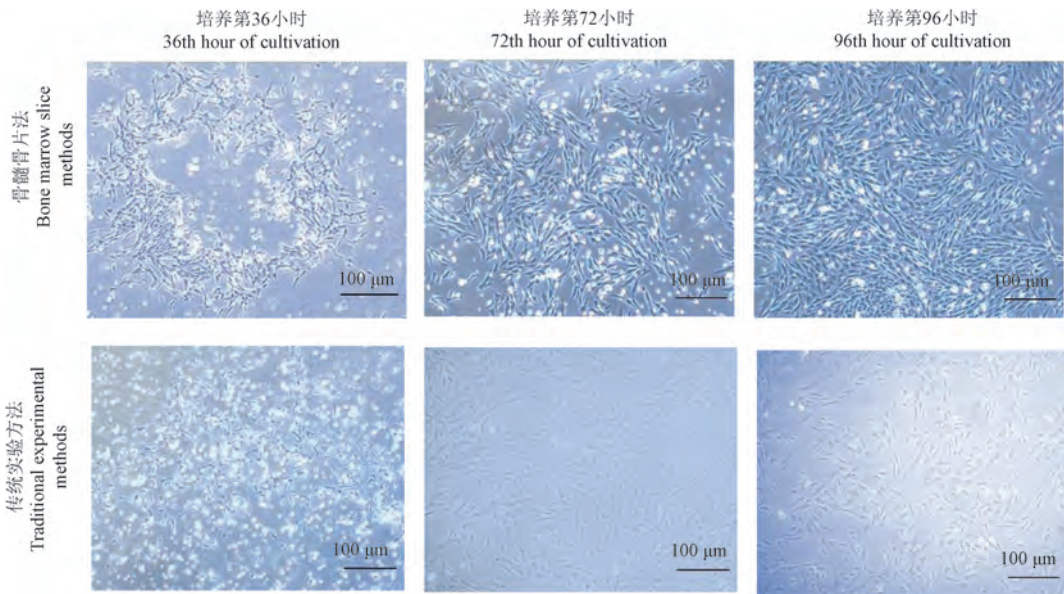


图 1 原代 BMSCs 细胞形态
Figure 1 Morphology of primary BMSCs

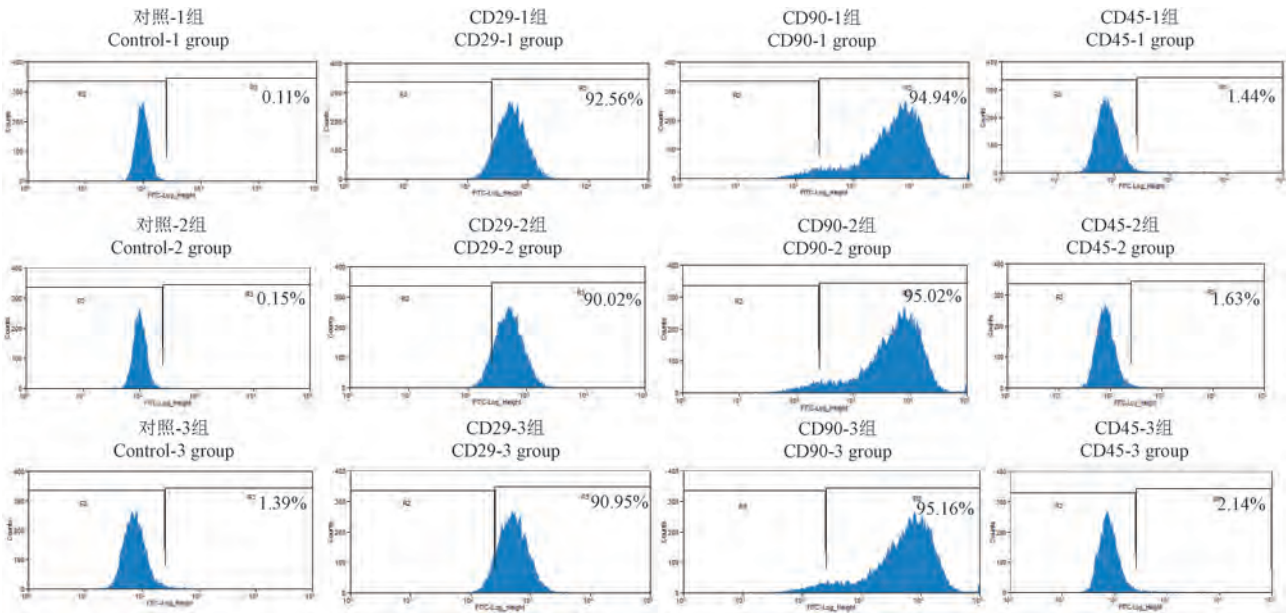


图 2 流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达
Figure 2 Detection of cell surface antigen expression by flow cytometry

2.3 PKH26 标记结果

第 3 代细胞经 PKH26 染色 24 h 后,在荧光显微镜下观察呈红色,荧光在细胞膜上分布均匀一致,标记率为 98%,染色前后 BMSCs 细胞形态没有变化(图 3)。

2.4 CCK-8 法测定细胞生长曲线

PKH26 标记组与未标记组大鼠 BMSCs 第 2 天缓慢生长,第 3 天加快生长,到第 7 天达到生长增殖高峰期,第 8 天至第 10 天生长进入平台期,大体生

长曲线表现为倒“S”形。两组细胞在 460 nm 处的 OD 值无显著差异 ($P>0.05$),说明 PKH26 标记 BMSCs 对增殖无显著影响(图 4)。

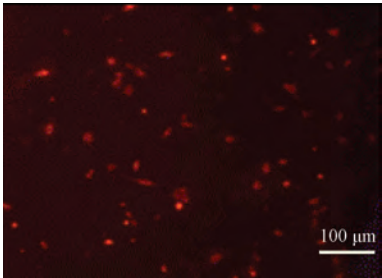
2.5 成骨成脂诱导及染色结果

成骨诱导 21 d 后观察到大量细胞呈絮状,结节状生长,茜素红染色呈红色结节,这种结节就是沉积下来的钙盐;成脂诱导 14 d 后观察到大量细胞内含空泡状透亮圈,具有强折光性,油红 O 染色偏红,是脂滴的形成(图 5)。

表 1 第 3 代大鼠 BMSCs 表面抗原表达
Table 1 Expression of BMSCs surface antigens in the 3rd generation rats

抗体分类	表达率(%)
Antibody classification	Expression rate
对照组 Control group	0.55±0.73
CD29 组 CD29 group	91.18±1.29***
CD90 组 CD90 group	95.04±0.11***
CD45 组 CD45 group	1.74±0.36

注:与对照组比较,****P*<0.001。
Note. Compared with the control group, ****P*<0.001.



注:PKH26 标记 BMSCs 24 h 后。
图 3 PKH26 标记结果
Note. 24th hour of PKH26 marking BMSCs.

Figure 3 PKH26 Mark results

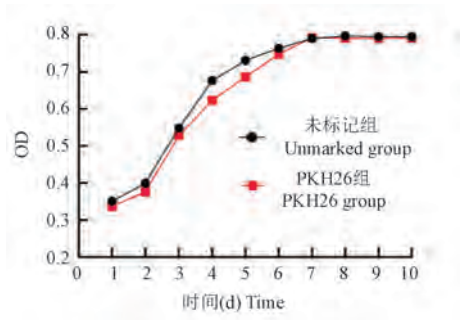
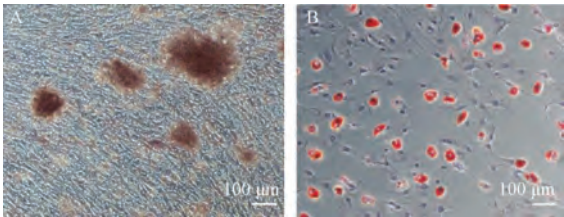


图 4 PKH26 标记组与未标记组生长曲线的比较
Figure 4 Comparison of growth curve between PKH26 labeled group and unlabeled group



注:A:BMSCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色;B:BMSCs 成脂诱导 14 d 后油红 O 染色。
图 5 BMSCs 成骨茜素红染色和成脂油红 O 染色
Note. A, Alizarin red staining 21 days after osteogenesis of BMSCs. B, Oil red O staining after 14 days of lipogenic induction of BMSCs.

Figure 5 BMSCs Alizarin red staining and fatty oil red O staining

3 讨论

BMSCs 具有免疫调节、抗炎、抗纤维化等作用,在炎症环境下,关节腔内注射 BMSCs 可能会增加骨异常增殖和异位钙化的风险^[6]。值得肯定的是,BMSCs 可以代替软骨细胞进行多次扩增,对最终形成的组织几乎没有影响,这使它们成为组织工程中移植细胞来源的主要细胞^[7]。传统的培养方法如胶原酶消化、贴壁法和差速离心法等可培养 BMSCs^[8-10],但短期内大量提取细胞具有一定困难,因此,寻找一种快速高效且稳定的分离纯化途径显得尤为重要。本实验分离培养大鼠 BMSCs 采用大鼠 5 d 乳鼠骨髓骨片法,传代至第 3 代,经流式细胞学鉴定高表达 CD29、CD44、CD90,低表达 CD45,并向成骨、成脂方向诱导,证明该方法可获得纯度较高的大鼠 BMSCs。

近年来发现,BMSCs 已成为细胞移植、组织工程、基因治疗等领域的研究热点。有实验结果证实 BMSCs 移植作为治疗大鼠肺纤维化模型具有前景性的治疗策略,能明显缓解肺泡炎症及肺纤维化^[11]。同时,脑动脉栓塞大鼠模型进行 BMSCs 移植的实验结果表明,BMSCs 可增加趋化因子和聚唾液酸化酶的表达,增加脑缺血条件下内源性神经元祖细胞的迁移,说明该机制可能有助于改善脑缺血^[12]。另外,间充质干细胞对关节炎的修复作用机制已逐渐变得成熟,有研究表明 BMSCs 可促进软骨修复^[13-14]。以上这些治疗作用的关键在于移植过程中对细胞进行标记来观察其分化、存活及迁移。常用的标记细胞方法包括 DAPI 标记、BrdU 标记、Dil 标记等,不过,这些荧光染料都有局限性,DAPI 标记是一种标荧光染料,标记细胞核,当标记的细胞死亡后会释放出 DAPI,不需要标记的细胞也会被标记出来,从而引起假阳性,且容易淬灭,不适合用于长期标记^[15]。BrdU 标记是通过免疫组化的方式进行间接观察,操作不方便,并且标记的细胞死亡后会释放出 BrdU,与 DAPI 类似,同样会造成较高假阳性率^[16]。Dil 标记细胞 3 d 后会出现严重的细胞毒性反应,35 d 后能被检测到的标记细胞不足 1/2,在体外细胞扩增过程中染色的稳定性低^[17]。因此,选择一种合适的染料,对大鼠 BMSCs 进行标记、示踪尤为重要。

荧光染料 PKH26 是一种新型染料,用于标记活细胞可以发出强烈稳定的红色荧光。被标记的细

胞与未被标记的细胞相比,形态良好,没有明显的区别,标记率为 98%,这种方法能较好地检测出体外细胞诱导分化的情况,或将标记的细胞注射到动物体内,便于观察活体内移植细胞的迁移情况,从而达到示踪细胞的目的。由于 PKH26 染色方法简便、毒性小,不用放射性同位素,安全系数高。因此,PKH26 是大鼠 BMSCs 的理想标记方式,为大鼠 BMSCs 在体内迁移分化实验的后续研究打下了坚实基础。

参考文献:

- [1] Lim HJ, Lee EM, Kim WK, et al. Application of autologous human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in distraction osteogenesis for the treatment of bilateral mandibular hypoplasia [J]. J Craniofac Surg, 2018, 29(6): 1629–1632.
- [2] Fellows CR, Matta C, Zakany R, et al. Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair [J]. Front Genet, 2016, 7: 213.
- [3] Jiao D, Cao L, Liu Y, et al. Synergistic osteogenesis of biocompatible reduced graphene oxide with methyl vanillate in BMSCs [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2019, 5(4): 1920–1936.
- [4] Chen Y, Ye SH, Sato H, et al. Hybrid scaffolds of Mg alloy mesh reinforced polymer/extracellular matrix composite for critical-sized calvarial defect reconstruction [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(6): 1374–1388.
- [5] Sivasubramanian K, Ilas DC, Harichandan A, et al. Bone marrow-harvesting technique influences functional heterogeneity of mesenchymal stem/stromal cells and cartilage regeneration [J]. Am J Sports Med, 2018, 46(14): 3521–3531.
- [6] Ding N, Li E, Ouyang X, et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells for articular cartilage regeneration in osteoarthritis [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2021, 16(7): 840–847.
- [7] Li X, Wang M, Jing X, et al. Bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; characterization, differentiation, and applications in cartilage tissue engineering [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2018, 28(4): 285–310.
- [8] Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone [J]. Nat Protoc, 2010, 5(3): 550–560.
- [9] Kitano Y, Radu A, Shaaban A, et al. Selection, enrichment, and culture expansion of murine mesenchymal progenitor cells by retroviral transduction of cycling adherent bone marrow cells [J]. Exp Hematol, 2000, 28(12): 1460–1469.
- [10] 聂文波, 汪明星, 张振华, 等. 密度梯度离心法结合贴壁筛选法分离培养大鼠骨髓间充质干细胞的生物学特性 [J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(21): 69–70.
- [11] Zhang E, Yang Y, Zhang J, et al. Efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in animal models of pulmonary fibrosis after exposure to bleomycin: a meta-analysis [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 2247–2255.
- [12] Shiota Y, Nagai A, Sheikh AM, et al. Transplantation of a bone marrow mesenchymal stem cell line increases neuronal progenitor cell migration in a cerebral ischemia animal model [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14951.
- [13] 廖晴, 李保建, 李洋, 等. 低强度脉冲超声介导骨髓间充质干细胞促进膝关节炎软骨修复 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(31): 4950–4955.
- [14] 孙庆云, 闫振宇. 间充质干细胞对骨关节炎修复机制的研究进展及应用 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(2): 262–267.
- [15] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells [J]. Science, 2002, 297(5590): 2256–2259.
- [16] Burns TC, Ortiz-González XR, Gutiérrez-Pérez M, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution [J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1121–1127.
- [17] Froelich K, Steussloff G, Schmidt K, et al. DiI labeling of human adipose-derived stem cells; evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 197(5): 384–398.

[收稿日期] 2022–09–21

黄冬妍,吴双双,邵丛丛,等. 低剂量 BPA 和 DEHP 对成年大鼠前列腺 AKR1C3 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (10): 38-44.

Huang DY, Wu SS, Shao CC, et al. Effects of low-dose BPA and DEHP on AKR1C3 expression in the adult rat prostate [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 38-44.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.006

低剂量 BPA 和 DEHP 对成年大鼠前列腺 AKR1C3 的影响

黄冬妍^{1,2,3}, 吴双双^{1,3}, 邵丛丛^{1,2,3}, 苏欣^{1,2,3}, 杨荣富^{1,2,3}, 王凯玥^{1,3},
周萍^{1,2,3}, 吴建辉^{1,2,3*}

(1.上海市生物医药技术研究院,上海 200032;2.国家卫生健康委员会计划生育药具重点实验室,上海 200032;
3.复旦大学生殖与发育研究院,上海 200032)

【摘要】 目的 明确低剂量 BPA 和 DEHP 对成年大鼠前列腺 AKR1C3 的影响。方法 56 只成年雄性 SD 大鼠随机分成 7 组,每组 8 只,分别灌胃给予 BPA(10、30 和 90 $\mu\text{g/kg}$),DEHP(30、90 和 270 $\mu\text{g/kg}$)和溶媒,连续 4 周。动物于末次给药 24 h 后,麻醉后采血,剖取前列腺并分叶,利用 ELISA 法检测血清和前列腺中 AKR1C3 水平,利用免疫组化法分析各叶前列腺中 AKR1C3 的表达情况。**结果** 给予 BPA 后,腹侧前列腺 90 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组 AKR1C3 表达显著性高于对照组($P<0.05$);背侧前列腺 10 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组 AKR1C3 水平和蛋白表达均显著性高于对照组($P<0.01$, $P<0.001$)。给予 DEHP 后,270 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组血清 AKR1C3 水平显著性高于对照组($P<0.001$),腹侧前列腺各组 AKR1C3 水平均显著性高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$),270 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组 AKR1C3 蛋白表达显著性高于对照组($P<0.05$);背侧前列腺 30 $\mu\text{g/kg}$ 和 90 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组 AKR1C3 表达显著性高于对照组($P<0.001$, $P<0.05$)。**结论** 低剂量 BPA 和 DEHP 均能促进成年大鼠前列腺 AKR1C3 表达,但各叶前列腺对 BPA 和 DEHP 的敏感度有所不同。

【关键词】 环境内分泌干扰物;双酚 A;邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;醛酮还原酶 1C3;雌激素;雄激素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0038-07

Effects of low-dose BPA and DEHP on AKR1C3 expression in the adult rat prostate

HUANG Dongyan^{1,2,3}, WU Shuangshuang^{1,3}, SHAO Congcong^{1,2,3}, SU Xin^{1,2,3}, YANG Rongfu^{1,2,3},
WANG Kaiyue^{1,3}, ZHOU Ping^{1,2,3}, WU Jianhui^{1,2,3*}

(1. Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200032, China.
2. NHC Key Laboratory of Reproduction Regulation, Shanghai 200032. 3. Reproductive and Developmental Research Institute of Fudan University, Shanghai 200032)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of low doses of bisphenol A (BPA) and di (2-ethyl) hexyl phthalate (DEHP) on aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3) expression in adult SD rats. **Methods** Fifty-six adult male SD rats were randomly divided into seven groups ($n=8$ rats in each group) and administrated BPA (10, 30 and 90 $\mu\text{g/kg}$, i.

[基金项目] 上海市自然科学基金(19ZR1444400)。

[作者简介] 黄冬妍(1989—),女,硕士,助理研究员,研究方向:药物生殖药理毒理学研究。E-mail: hdy043@163.com

[通信作者] 吴建辉(1976—),男,博士,研究员,研究方向:药物药理毒理学研究。E-mail: wujh_731@163.com

g.), DEHP (30, 90 and 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. g.), or the vehicle once a day for 4 weeks. The animals were sacrificed on the day after the last treatment. Blood was collected, and prostate tissues were dissected and categorized into different lobes. Levels of AKR1C3 in serum and prostate were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay, and AKR1C3 expression in each prostate lobe was analyzed by immunohistochemistry. **Results** After BPA administration, AKR1C3 expression in the ventral prostate was increased, and a significant difference was found in the 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group ($P<0.05$). AKR1C3 protein expression in the dorsal prostate was increased, and a significant difference was found in the 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group ($P<0.01$, $P<0.001$). After DEHP administration, the serum level of AKR1C3 in the 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group was significantly higher than that in the control group ($P<0.001$), the AKR1C3 level in the ventral prostate was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$, $P<0.01$), AKR1C3 protein expression was increased, and a significant difference was found in the 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ group ($P<0.05$). The AKR1C3 level in the dorsal prostate of the 30 and 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ groups was higher than that in the control group ($P<0.001$, $P<0.05$). **Conclusions** Low-dose BPA and DEHP promotes AKR1C3 expression in the prostate of adult SD rats, but the sensitivities of ventral and dorsal prostate lobes to BPA and DEHP are different.

【Keywords】 environmental endocrine disruptor; bisphenol A; Di (2-ethylhexyl) phthalate; aldo-keto reductase 1C3; estrogen; androgen

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

双酚 A (bisphenol A, BPA) 和邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(di (2-ethylhexyl) phthalate, DEHP) 是两种较为重要的环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EDCs), 广泛存在于填充剂原料、高分子材料、化妆品以及增塑剂中, 以类激素的形式产生生物学效应, 使体内原有的内分泌机能出现紊乱, 从而对生物或人体的生殖、神经和免疫系统等的功能产生影响^[1]。随着工业的发展, BPA 和 DEHP 环境暴露剂量及在人体内的蓄积量逐年上升。尽管美国食品与药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和美国环保署 (U. S. Environmental Protection Agency, EPA) 将 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 视为每日摄入的“安全”剂量^[2], 但是 BPA 低水平暴露仍是一种潜在的破坏剂, 会对生殖系统如前列腺的生长发育产生影响。研究表明妊娠期口服 BPA (10 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 会导致雄性胎小鼠背外侧前列腺导管数量和体积增加; 青春期长期摄入 BPA (40 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) 促进前列腺细胞增殖, 诱导沙鼠成年前列腺增生^[3]。同样作为一种常见的 EDC, DEHP 的低水平暴露研究相对较少, 有学者发现, 在典型的饮食方式下, 育龄妇女、青少年和婴儿 DEHP 暴露剂量分别为 5.7、8.1 和 42.1 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[4]。欧洲食品安全局规定 DEHP 日耐受摄入剂量为 50 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 而 EPA 将 20 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 作为安全参考剂量^[5]。由于 BPA 和 DEHP 的广泛应用, 我们想明确在环境暴露剂量下两者对前列腺的影响, 为评估 EDCs 潜在的健康风险提供理论基础。

我们在前期研究中发现, 给予成年和老年大鼠

10~90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 BPA 能引起或促进前列腺增生, 0.01~1 nmol BPA 可以促进大鼠原代前列腺上皮细胞增殖, 30~270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DEHP 对老年大鼠前列腺有促进增生作用^[6-8]。BPA 和 DEHP 促进前列腺增生的作用主要通过模拟, 增强或抑制内源性雌激素活性, 干扰雄激素系统, 影响神经-内分泌作用以及诱导激素调控下细胞因子和通路的改变来实现^[6-8], 同时我们还发现在诱导成年大鼠前列腺增生中前列腺素 D₂ 合成酶基因 (prostaglandin D₂ synthase gene, PTGDS) 的转录水平上调^[6], 提示前列腺素合成酶基因调控可能与前列腺疾病的进展相关。

前列腺素合成酶 (prostaglandin synthase, PGS) 是与膜结合的多酶系统, 在体内的花生四烯酸代谢途中催化底物生成各种具有生理活性的前列腺素^[9], 主要包括环氧酶 2 (Cyclooxygenase-2, COX-2)、前列腺素 E 合成酶 (prostaglandin E synthase, PGES)、膜结合型前列腺素 E₂ 合成酶 1 (microsomal prostaglandin E₂ synthase-1, mPGES-1)、Lipocalin 型前列腺素 D 合成酶 (lipocalin-type prostaglandin D synthase, L-PGDS) 和前列腺素 F 合成酶 (prostaglandin F synthase, PGFS) 等。在 PGS 家族中, 多种前列腺素合成酶都具有激素反应性, 如 PGFS 是催化前列腺素 H₂ (prostaglandin H₂, PGH₂) 和前列腺素 D (prostaglandin D, PGD) 转化为前列腺素 F (prostaglandin F, PGF) 的末端酶, PGF 在雌性动物中的表达多与妊娠、动情周期、分娩相关, 雌激素水平升高可能促进 PGFS 的表达和 PGF 增多^[10]。醛酮还原酶 1C3 (aldo-keto reductase family 1 member

C3, AKR1C3) 是 PGFS 的一种, 可催化 5α -二氢睾酮(强雄激素) 转化为 3α -雄甾烷二醇(弱雄激素), $\beta 4$ -雄烯-3, 17 二酮(弱雄激素) 转化为睾酮(强雄激素), 将雌酮(弱雌激素) 转化为 17β 雌二醇(强雌激素) 等^[11]。AKR1C3 参与睾酮和雌激素代谢, 可以参与激素敏感性组织的生长发育和疾病发生发展中, 如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、精子发生异常等^[12]。有研究表明, AKR1C3 位于雄激素合成通路终末端, 是前列腺癌(prostate cancer, PCa) 细胞合成睾酮和双氢睾酮的关键酶, 在一些 PCa 细胞中 AKR1C3 可通过激活雄激素受体(androgen receptors, AR) 信号通路放大外源低水平雄激素信号并增加自身雄激素合成^[13]。

我们还发现低剂量的 BPA 可以上调 COX-2 和 L-PGDS 的表达, 影响细胞增殖和凋亡, 从而诱导前列腺增生^[14]。BPA 和 DEHP 作为典型的环境内分泌干扰物, 是否还能影响其他前列腺素合成酶的表达? 目前还鲜少有人研究。因此, 本文将初步探讨环境暴露剂量下 BPA 和 DEHP 对前列腺种 AKR1C3 的影响, 研究结果将为前列腺疾病的发生机制提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

56 只成年雄性 SD 大鼠(SPF 级), 6~7 周龄, 接收时体重 140~160 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。在上海市生物医药技术研究院[SYXK(沪)2019-0012]屏障系统内饲养至 3 月龄, 室温 20~26℃, 相对湿度 40%~70%, 光照和黑暗各 12 h; 用大小鼠高压饲料喂养, 自由饮水。动物实验已通过上海市生物医药技术研究院动物实验伦理审查批件(2019-28), 严格按照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

BPA(货号: 239658, 含量 $\geq 99\%$)、DEHP(货号: D201154, 含量 $\geq 99.5\%$) 均购于 Sigma-Aldrich 公司; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(货号: 20140520) 购于国药集团化学试剂有限公司; 供试品使用前以 0.5% 的 CMC-Na 均匀分散。大鼠 PGFS ELISA Kit(MBS9310151-96) 购于美国 MyBiosource 公司; Rabbit Anti-AKR1C3 Antibody(ab196673) 购于 Abcam 公司; 即用型免疫组化 UltraSensitive TM SP 试剂盒(鼠/兔)(货号: KIT9720)、粉剂型抗原修复

液(货号: MVS-0066)、DAB 显色试剂(20 $\times$)(货号: DAB-0031)、苏木素体细胞染色液(货号 CTS-1090)、PBS 磷酸盐缓冲液(粉型)(货号: PBS-0060) 均购自福州迈新生物科技有限公司。

低温水平式离心机(Allegra-12R, 美国 Beckman); 恒温振荡培养箱(SI-600R, 韩国杰奥特); 电脑洗板机(DNX-9620, 北京普朗新); Multiskan GO 全波长酶标仪(1510-04177C, Thermo Fisher Scientific); Leica 石蜡切片机(RM2126, 德国徕卡); Leica 全自动染色机(Leica ST5010 德国徕卡); 光学显微镜(DM3000, 德国徕卡)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组和给药

56 只 3 月龄雄性 SD 大鼠按照体重随机分为 7 组, 依次为对照组、BPA 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组和 DEHP 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组, 每组 8 只动物, 分别灌胃(intragastric administration, i. g.) 给予 10 mL/kg 溶媒, 相应剂量的 BPA 和 DEHP, 连续 4 周。动物体重每周称量 1 次, 根据体重调整给药剂量, 于第 4 周末次给药 24 h 后, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠, 麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 处死动物。

1.3.2 前列腺取材

动物处死后, 剖取前列腺组织, 并将其分为腹侧叶和背侧叶, 将各叶前列腺组织分为三部分, 一部分用 10% 的福尔马林溶液固定, 用于病理分析; 另外两部分均保存于液氮中, 用于进一步的分析。

1.3.3 ELISA 法检测 AKR1C3 水平

腹主动脉采血, 静置两小时后离心(3590 r/min, 15 min), 分离出血清。前列腺组织称重后剪碎按照 1:10(w:v) 比例加入生理盐水, 用手动匀浆器在冰上超声匀浆, 重复 3 次, 充分匀浆后离心(3590 r/min, 15 min), 收集匀浆上清液。ELISA 法检测血清和前列腺中 AKR1C3 水平。将所有的试剂平衡至室温; 蒸馏水稀释浓缩洗涤液, 用去离子水重配标准品至相应的浓度, 室温放置 10 min 备用。测定步骤如下:

加样: 加入标准品、样品、和样品稀释液(空白孔)至相应的孔中。

孵育: 每孔加入结合剂, 混合均匀, 封板膜封板后 37℃ 孵育 1 h。

洗涤: 撕掉封板膜后弃去液体, 设置洗板机注水量为 400 μL , 浸润 10 s, 震荡 5 s, 洗板 5 次, 洗涤

后用吸水纸拍干。

显色:每孔依次加入显色试剂,封板膜封板后 37℃ 避光孵育 10 min。

终止:每孔加入 50 μL 的终止液,混合均匀,终止反应(颜色由蓝色变为黄色)。

测定:15 min 以内用酶标仪进行测定(450 nm 波长)。

计算:拟合出标准曲线并生成曲线方程,带入样本 OD 值计算样本浓度。

1.3.4 免疫组化法检测 AKR1C3 表达情况

取前列腺腹侧叶和背侧叶组织,按照免疫组化试剂盒说明书进行如下操作:脱蜡水化:二甲苯(5 min/次,2 次)→无水乙醇(5 min/次,2 次)→95%乙醇(5 min/次,2 次)→75%乙醇(5 min/次,2 次)去离子水(3 min/次,3 次);抗原修复:切片浸没于 0.01 mol 原修复液中,微波修复 20 min,室温冷却,取出后 PBS 浸洗 2 min/次,3 次;内源性过氧化物酶阻断:每张切片滴加一滴试剂 A,室温孵育 10 min, PBS 浸洗 3 min/次,3 次;血清封闭:每张切片滴加一滴试剂 B,室温孵育 10 min;加一抗:每张切片加 50 μL 一抗(阴性对照用 PBS 替代),4℃ 孵育过夜, PBS 浸洗 3 min/次,3 次;加二抗:每张切片滴加一滴试剂 C,室温孵育 10 min;PBS 浸洗 3 min/次,3 次,每张切片滴加一滴试剂 C,室温孵育 10 min;PBS 浸洗 3 min/次,3 次;显色:配制 DAB 溶液(现用现配)每张切片加 100 μL 显色液,显微镜下观察显示棕黄色颗粒即终止显色;复染:苏木素复染 4 min,水化 1 min,盐酸分化 4 s,流水洗 11 min;干燥透明:75%乙醇(5 min/次,2 次)→95%乙醇(5 min/次,2 次)→无水乙醇(5 min/次,2 次)→二甲苯(5 min/

次,2 次);封片:中性树胶封片,显微镜下观察。

每组选取 6 个动物组织切片,随机观察每张切片的 10 个视野,切片出现的棕黄色颗粒为阳性反应,用 Image-Pro Plus 6.0 测定切片图像的平均光密度,进行蛋白表达的半定量统计,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

1.4 统计学方法

实验结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

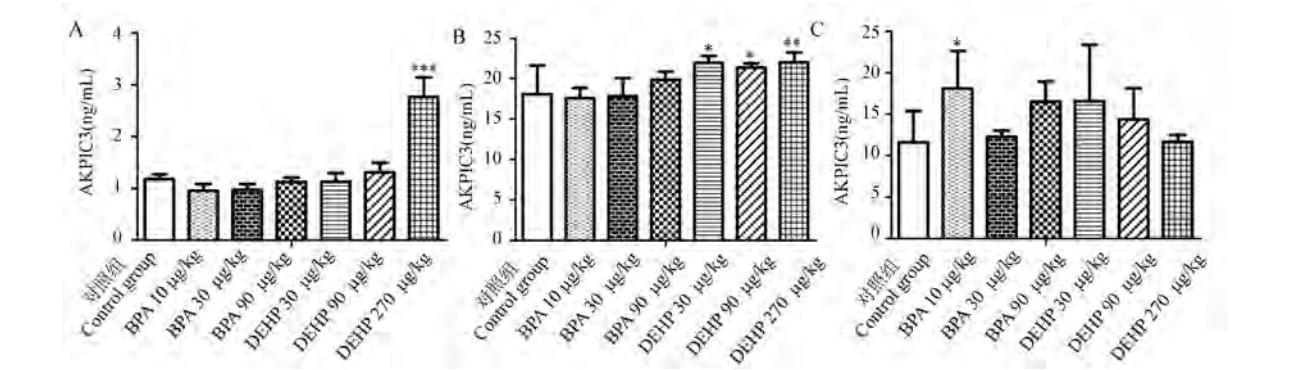
2 结果

2.1 AKR1C3 水平变化

ELISA 检测结果显示(图 1),给予 BPA 后,与对照组相比,各剂量组血清 AKR1C3 水平无显著性变化;腹侧前列腺 AKR1C3 的水平无明显变化,但 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组略高于对照组;背侧前列腺 AKR1C3 的水平升高,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组有显著性差异($P<0.01$)。给予 DEHP 后,随着剂量增加血清 AKR1C3 的水平上升,270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组显著性高于对照组($P<0.001$);腹侧前列腺 AKR1C3 水平均显著性高于对照组($P<0.05, P<0.01$);背侧前列腺中,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组 AKR1C3 的水平高于对照组。(表 1)

2.2 前列腺组织中 AKR1C3 的表达情况

免疫组化结果显示,给予 BPA 后,与对照组相比,腹侧前列腺中,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组 AKR1C3 表达升高,且 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组有统计学意义($P<0.05$),背侧前列腺中,各剂量组 AKR1C3 表达均升高,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量组有统计学意义($P<$



注:A:血清;B:腹侧前列腺;C:背侧前列腺。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 1 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠血和前列腺组织中 AKR1C3 水平的影响

Note. A, Serum. B, Ventral prostatic lobe. C, Dorsal prostatic lobe. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Effects of BPA and DEHP on the level of AKR1C3 in serum and prostate of SD rats

0.001);给予 DEHP 后,与对照组相比,腹侧前列腺中,各剂量组 AKR1C3 表达均升高,270 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组有统计学意义($P<0.05$),背侧前列腺中,各剂量组 AKR1C3 表达也均升高,30 $\mu\text{g/kg}$ 和 90 $\mu\text{g/kg}$ 剂量组有统计学意义($P<0.001$, $P<0.05$) (见表 2,图 2~图 4)。

表 1 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠 AKR1C3 水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 1 Effects of BPA and DEHP on AKR1C3 level in SD rats

组别 Groups	剂量($\mu\text{g/kg}$) Doses	血清(ng/mL) Serum	腹侧前列腺叶(ng/g) Ventral prostatic lobe	背侧前列腺叶(ng/g) Dorsal prostatic lobe
对照组 Control group	0	1.18 $\pm$ 0.09	18.08 $\pm$ 3.55	11.60 $\pm$ 3.78
	10	0.96 $\pm$ 0.13	17.61 $\pm$ 1.24	18.10 $\pm$ 4.57*
	30	0.98 $\pm$ 0.11	17.84 $\pm$ 2.22	12.30 $\pm$ 0.73
	90	1.13 $\pm$ 0.08	19.84 $\pm$ 1.06	16.52 $\pm$ 2.43
DEHP	30	1.14 $\pm$ 0.17	21.66 $\pm$ 1.36*	16.62 $\pm$ 6.79
	90	1.31 $\pm$ 0.18	21.25 $\pm$ 0.51*	14.39 $\pm$ 3.75
	270	2.76 $\pm$ 0.38***	22.03 $\pm$ 1.21**	11.67 $\pm$ 0.82

注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

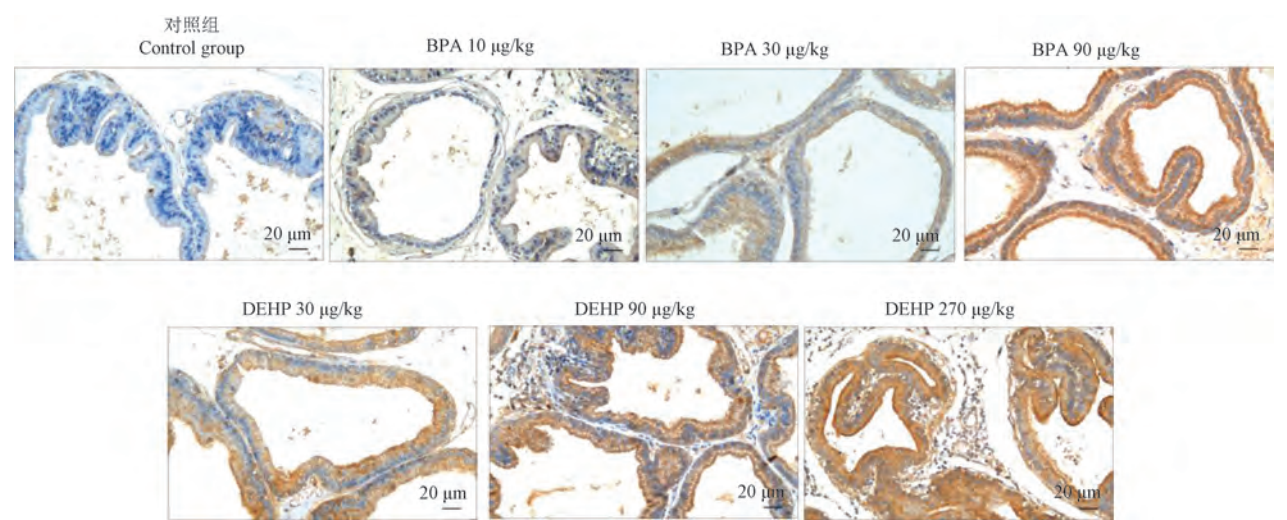


图 2 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠腹侧前列腺 AKR1C3 表达的影响

Figure 2 Effects of BPA and DEHP on the expression of AKR1C3 in ventral prostate of SD rats

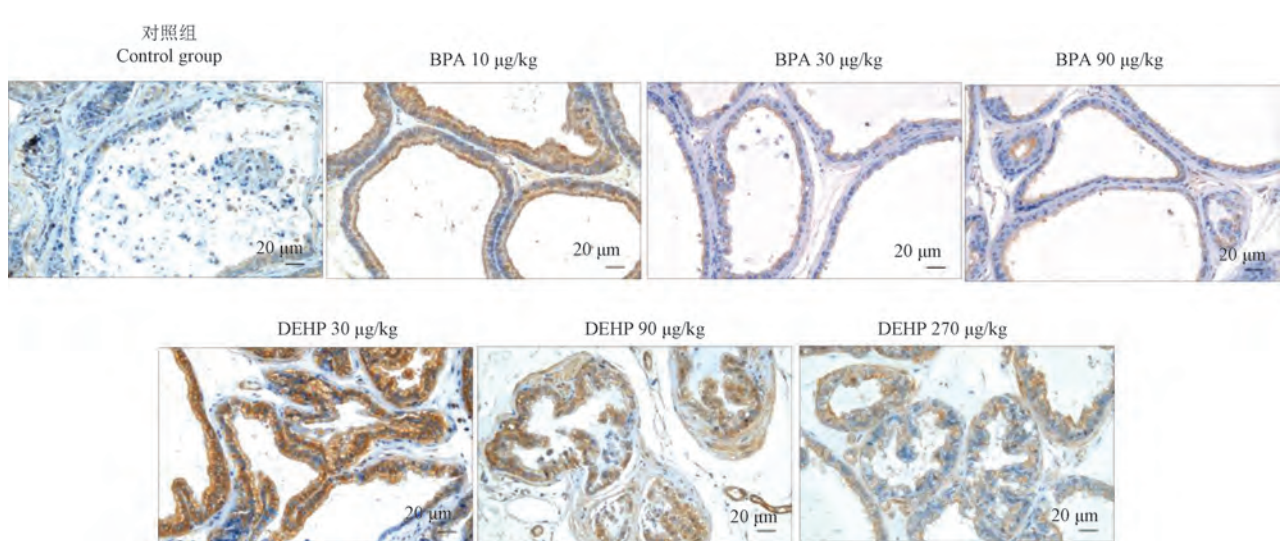
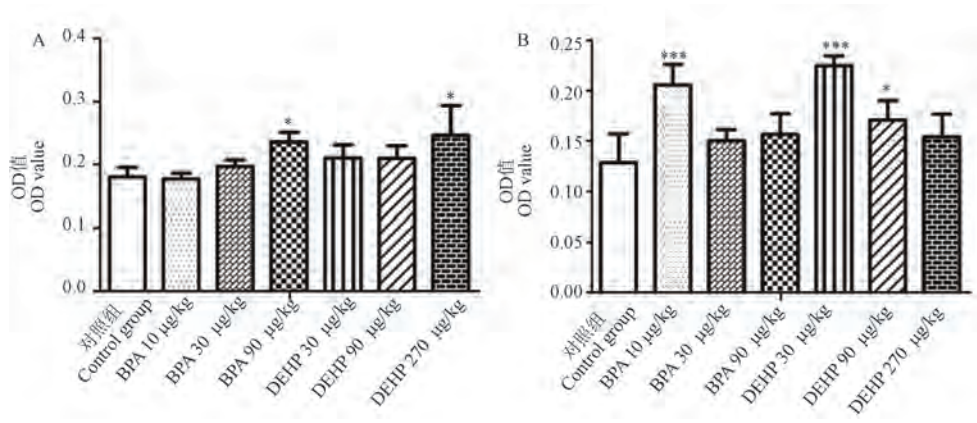


图 3 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠背侧前列腺 AKR1C3 表达的影响

Figure 3 Effects of BPA and DEHP on the expression of AKR1C3 in dorsal prostate of SD rats



注:A;腹侧前列腺;B;背侧前列腺。与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 4 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠前列腺 AKR1C3 表达的影响

Note. A, Ventral prostatic lobe. B, Dorsal prostatic lobe. Compared with the control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effects of BPA and DEHP on the expression of AKR1C3 in prostate of SD rats

表 2 BPA 和 DEHP 对 SD 大鼠前列腺 AKR1C3 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)			
Table 2 Effects of BPA and DEHP on the expression of AKR1C3 in prostateOf SD rats			
组别 Groups	剂量(µg/kg) Doses	腹侧前列腺 Ventral prostatic lobe	背侧前列腺 Dorsal prostatic lobe
对照组 Control group	0	0.181±0.015	0.128±0.029
	10	0.177±0.009	0.206±0.020***
BPA	30	0.197±0.010	0.151±0.011
	90	0.236±0.016*	0.157±0.021
DEHP	30	0.211±0.021	0.225±0.010***
	90	0.201±0.020	0.171±0.019*
	270	0.247±0.047*	0.154±0.022

注:与对照组相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

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

3 讨论

BPA 和 DEHP 应用广泛,人们可以通过摄取、吸入、皮肤接触等多种途径暴露其中。本次研究发现,给予 10~90 µg/kg 的 BPA 和 30~270 µg/kg 的 DEHP 后,AKR1C3 水平和蛋白表达均升高,腹侧前列腺叶中高剂量组表现比较明显,而背侧前列腺叶中低剂量组表现更为明显,提示背侧前列腺叶对 BPA 和 DEHP 更敏感。曾有报道称在成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)表达的转基因小鼠中,背侧前列腺上皮增生比腹侧叶明显,小鼠背侧前列腺可能与人前列腺周围带同源,而前列腺增生和前列腺癌几乎都源于移行带和周围带^[15]。有研究发现雌激素通过细胞核内受体途径促进奶牛输卵管平滑肌组织中 PGFS 的表达,而植物雌激素及其代谢物可以刺激 PGF2α 的分泌,明

显增加前列腺素 FL2 (prostaglandin FL2, PGFL2) 基因的表达,从而促进生殖细胞的活力和增殖^[16-17], BPA 和 DEHP 作为 2 种植物雌激素,与雌激素作用类似,可能通过同样的途径对 AKR1C3 的表达产生影响。

AKR1C3 是 PGFS 的一种,可催化强弱雄激素之间的转化以及弱雌激素转化为强雌激素,这种调节靶组织中雌雄激素局部浓度的作用使其成为多种激素依赖性病变的研究靶点。AKR1C3 可以激活 AR 信号诱导雄激素合成,不仅调节雄激素的生成,还可以作为 AR 的共激活因子以浓度依赖性方式激活 AR。AKR1C3 在前列腺素化合物合成中也有重要作用,分别催化 PGH2 和 PGD2 生成前列腺素 PGF2α、PGF9α 和 11β-PGF2,尤其对 PGD2 的催化活性最高^[18]。前列腺作为雄性生殖系统中重要的附属性腺器官,其生长发育与雌雄激素调节密切相关。在前列腺癌中,AKR1C3 过表达,能调节类固醇类激素,与前列腺腺素受体结合,激活依赖于生长因子的 MAP 激酶途径促进细胞增殖,还能促进肿瘤的侵袭性^[10]。此外,PGD2 和 NF-κB 信号通路相关,AKR1C3 介导的 PGD2 缺失会抑制 NF-κB 通路,AKR1C3 还可以直接与 NF-κB 和雌激素受体 α (estrogen receptor-α, ERα) 的 DNA 结构域残基反应,使 NF-κB 和 ERα 依赖性基因转录增加,从而促进肿瘤的发生^[11]。

综上所述,低剂量 BPA 和 DEHP 可以促进成年 SD 大鼠前列腺 AKR1C3 的表达,我们之前有关环境内分泌干扰物促进前列腺增生的研究,发现 AR 信号通路和 NF-κB 信号通路在 BPH 的发展中均发挥

重要作用^[19-20],提示 AKR1C3 的过表达可能是 BPA 和 DEHP 引起前列腺增生的作用机制之一。但是,前列腺素合成酶在前列腺细胞增殖中的作用机制以及与雌雄激素受体之间的调控关系还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(4): 293-342.

[2] Matzkin ME, Pellizzari EH, Rossi SP, et al. Exploring the cyclooxygenase 2 (COX2)/15d-Δ(12, 14)PGJ(2) system in hamster Sertoli cells: regulation by FSH/testosterone and relevance to glucose uptake [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2012, 179(2): 254-264.

[3] Kim JY, Han EH, Kim HG, et al. Bisphenol A-induced aromatase activation is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in rat testicular Leydig cells [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 193(2): 200-208.

[4] Serrano SE, Braun J, Trasande L, et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data [J]. *Environ Health*, 2014, 13(1): 43.

[5] Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure—an update and latest results [J]. *Int J Androl*, 2006, 29(1): 155-165.

[6] Wu J, Huang D, Su X, et al. Oral administration of low-dose bisphenol A promotes proliferation of ventral prostate and upregulates prostaglandin D₂ synthase expression in adult rats [J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32(11): 1848-1858.

[7] Huang DY, Zheng CC, Pan Q, et al. Oral exposure of low-dose bisphenol A promotes proliferation of dorsolateral prostate and induces epithelial-mesenchymal transition in aged rats [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 490.

[8] Huang D, Wu J, Su X, et al. Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostate epithelial cells in rodents [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3): 2635-2642.

[9] 杨光锐, 管又飞. 前列腺素 E2 合酶的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2006, 37(2): 182-186.

[10] Lacroix P  pin N, Chapdelaine P, Fortier MA. Evaluation of the prostaglandin F synthase activity of human and bovine Aldo-keto reductases: AKR1A1s complement AKR1B1s as potent PGF synthases [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2013, 106:

124-132.

[11] Liedtke AJ, Adeniji AO, Chen M, et al. Development of potent and selective indomethacin analogues for the inhibition of AKR1C3 (Type 5 17  -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase) in castrate-resistant prostate cancer [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(6): 2429-2446.

[12] 吴双双, 吴建辉, 孙祖越. 前列腺素合成酶基因调控与前列腺疾病关系的研究进展 [J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(7): 663-667.

[13] Liu C, Yang JC, Armstrong CM, et al. AKR1C3 promotes AR-V7 protein stabilization and confers resistance to AR-targeted therapies in advanced prostate cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(10): 1875-1886.

[14] Wu S, Huang D, Su X, et al. The prostaglandin synthases, COX-2 and L-PGDS, mediate prostate hyperplasia induced by low-dose bisphenol A [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13108.

[15] Konno-Takahashi N, Takeuchi T, Nishimatsu H, et al. Engineered FGF-2 expression induces glandular epithelial hyperplasia in the murine prostatic dorsal lobe [J]. *Eur Urol*, 2004, 46(1): 126-132.

[16] 黄娜. 雌激素对奶牛输卵管平滑肌前列腺素 E₂ 和 F_{2  } 合成及其受体表达调控的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.

[17] Woclawek-Potocka I, Okuda K, Acosta TJ, et al. Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F_{2  } synthesis via prostaglandin F_{2  } synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2005, 78(1-4): 202-217.

[18] Byrns MC, Steckelbroeck S, Penning TM. An indomethacin analogue, N-(  -chlorobenzoyl)-melatonin, is a selective inhibitor of Aldo-keto reductase 1C3 (type 2 3  -HSD, type 5 17  -HSD, and prostaglandin F synthase), a potential target for the treatment of hormone dependent and hormone independent malignancies [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(2): 484-493.

[19] Wang K, Huang D, Zhou P, et al. BPA-induced prostatic hyperplasia *in vitro* is correlated with the unbalanced gene expression of AR and ER in the epithelium and stroma [J]. *Toxicol Ind Health*, 2021, 37(10): 585-593.

[20] Wang K, Huang D, Zhou P, et al. Individual and combined effect of bisphenol A and bisphenol AF on prostate cell proliferation through NF-  B signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12283.

[收稿日期] 2022-02-25

王剑,孙永东,周兴玮,等.黄芩素介导自噬经由 miR-449a/HDAC1 轴抑制喉癌细胞增殖及迁移的机制研究 [J].中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 45-53.

Wang J, Sun YD, Zhou XW, et al. Effects of baicalin on proliferation and apoptosis of laryngeal cancer cells via the miR-449a/HDAC1 axis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 45-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.007

黄芩素介导自噬经由 miR-449a/HDAC1 轴抑制喉癌细胞增殖及迁移的机制研究

王 剑¹,孙永东^{1,2},周兴玮¹,刘 雷¹,童兴科¹,陈 龙¹,何 娴^{1*}

(1.西南医科大学附属中医院,耳鼻咽喉头颈外科,四川 泸州 646000;
2.西南医科大学中西医结合学院,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探究黄芩素抑制喉癌细胞增殖及迁移的机制。**方法** 采用 Hep-2 细胞为研究对象。MTT 法检测各组细胞增殖活力;划痕实验检测细胞迁移;流式细胞术检测细胞凋亡情况;Western blot 检测各组细胞中 Beclin-1、LC3II/I、p62 及 HDAC1 的表达水平;RT-PCR 检测细胞 miR-449a 的表达水平;生物信息学软件分析 miR-449a 与 HDAC1 的靶向结合位点,双荧光素酶报告基因实验鉴定;透射电子显微镜观察自噬小体数量。**结果** 黄芩素显著抑制了喉癌细胞的增殖和迁移,并诱导细胞凋亡;黄芩素增加了细胞内 Beclin-1 及 LC3II 的蛋白表达水平,减少了 p62 及 LC3I 的蛋白表达水平;黄芩素显著增加喉癌细胞 miR-449a 的表达水平,降低 HDAC1 的蛋白表达量;HDAC1 与 miR-449a 存在结合作用;黄芩素联合 miR-449a mimic 处理喉癌细胞,可以更显著的抑制细胞增殖及 HDAC1 的蛋白表达水平,以及更为有效地上调 miR-449a 的相对表达量和诱导自噬。**结论** 黄芩素可以介导自噬经由 miR-449a/HDAC1 轴抑制喉癌细胞增殖及迁移。

【关键词】 喉癌;黄芩素;自噬;miR-449a;HDAC1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0045-09

Effects of baicalin on proliferation and apoptosis of laryngeal cancer cells via the miR-449a/HDAC1 axis

WANG Jian¹, SUN Yongdong^{1,2}, ZHOU Xingwei¹, LIU Lei¹, TONG Xingke¹, CHEN Long¹, HE Xian^{1*}

(1. Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of baicalein inhibiting the proliferation and migration of laryngeal cancer cells. **Methods** Proliferation of Hep-2 laryngeal cancer cells was measured by MTT assays. Cell migration was assessed by a scratch assay. Apoptosis was detected by flow cytometry. Western blot was used to measure protein expression levels of Beclin-1, LC3II/I, p62 and HDAC1. The expression level of miR-449a was measured by RT-PCR. The binding sites of miR-449a and HDAC1 were analyzed by bioinformatics and identified by dual luciferase reporter assays. The number of autophagosomes was observed by projection microscopy. **Results** Baicalein significantly inhibited

[基金项目] 西南医科大学附属中医医院联合项目课题(2020XYLH-024)。

[作者简介] 王剑(1983—),男,副主任医师,硕士,研究方向:耳鼻咽喉头颈肿瘤。E-mail:wangdaye147258369@163.com

[通信作者] 何娴(1989—),女,主治医师,硕士,研究方向:耳鼻咽喉。E-mail:524897291@qq.com

the proliferation and migration of laryngeal cancer cells, and significantly induced apoptosis. Baicalein increased the protein expression levels of intracellular autophagy-related genes Beclin-1 and LC3II, but decreased the protein expression levels of p62 and LC3I. Baicalein significantly increased the expression level of miR-449a in laryngeal cancer cells and decreased protein expression of HDAC1. Binding was observed between HDAC1 and miR-449a. Cotreatment of laryngeal cancer cells with Baicalein and an miR-449a mimic more significantly inhibited cell proliferation and HDAC1 protein expression, and more effectively upregulated miR-449a expression and induced autophagy. **Conclusions** Baicalein mediated autophagy and inhibited the proliferation and migration of laryngeal cancer cells via the miR-449a/HDAC1 axis.

[Keywords] laryngeal cancer; baicalein; apoptosis; miR-449a; HDAC1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

喉癌起源于喉黏液上皮组织的恶性肿瘤,多为鳞状细胞癌。发病率占全身性癌症的 1.5%^[1]。尽管对早期喉部鳞状细胞癌进行手术干预有很好的治疗效果,但对晚期和转移性肿瘤患者来说临床治疗效果较差,放疗和化疗是晚期病例的主要治疗方法,但有许多患者对放疗敏感或耐药^[2],导致晚期喉癌 5 年生存率仅有 51% 左右^[3]。喉癌具有易复发、易转移等特点,严重危害着人类的生命健康,因此确定喉癌的进展和分子调控机制,寻找新型治疗药物,并为喉癌患者制定新的治疗策略迫在眉睫。

自噬是一种溶酶体降解的途径,可以阻碍早期癌症的发生,又可以促进晚期肿瘤的发展^[4]。当细胞自噬发生异常的时候,会打破平衡导致癌症的发生,将自噬抑制剂与已建立的癌症治疗相结合可以提高癌症细胞的耐受性,起到更好的治疗作用^[5]。microRNAs (miRNAs) 是一类内源性非蛋白质编码小分子 RNA,长度约为 20~24 个核苷酸,通过与 mRNA 互补结合,在转录后水平抑制靶基因的表达^[3]。由于 miRNA 发挥着类似于癌基因或抑癌基因的作用,因此通过外源补充 miRNA 或 miRNA 抑制物可以调控 mRNA 及其蛋白的表达,从而控制肿瘤恶性增殖和促进细胞凋亡^[6]。其中 miR-499 被检测出有多重靶标,可以通过调控基因表达对多种恶性肿瘤发挥抑癌作用^[7]。根据生物信息学在线软件预测发现,HDAC1 与 miR-449a 有靶向结合位点。最新研究发现,miR-449a 能够通过靶向抑制 HDAC1 的表达,抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和转移^[8]。多项研究表明,HDAC 可以调节各种癌症的晚期恶性肿瘤和化疗耐药性,其在喉癌细胞中表达上调^[9]。

黄芩素是我国传统中药黄芩的主要有效成分。黄芩素对多种恶性肿瘤有抑制作用,包括肝癌、结肠癌等^[10-12]。同时,近年来的多项研究发现,黄芩素对喉癌细胞的增殖、迁移和侵袭也具有明显的抑

制作用,且可以诱导其发生凋亡和自噬^[13-15]。基于上述研究背景,本实验将 miR-449a 的表达情况与黄芩素抑制喉癌细胞的作用联系起来,探究了 miR-449a 的靶点,以此深入探究黄芩素的抑癌机制。即探究黄芩素是否能通过介导自噬经由 miR-449a/HDAC1 轴抑制喉癌细胞增殖及迁移,为临床喉癌治疗提供充分实验依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 细胞

人喉癌细胞 (Hep-2) (货号: HTX2247) 购于深圳豪地华拓生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

黄芩素 (C12455217)、6-氨基-3-甲基嘌呤 (C12621613) 购自上海麦克林生化科技有限公司; DMEM 高糖培养基 (G4510) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胰酶 (+EDTA) (SH30042.01) 购自美国 HyClone; 胰酶 (-EDTA) (0420A21)、RNA TRIzol Reagent (BM1144) 购自合肥博美生物科技有限责任公司; 胎牛血清 (P20522) 购自北京鼎国生物技术公司; MTT (1334GR001) 购自德国 BioFRox; 二甲基亚砜 (DMSO, A610163) 购自美国 Sigma; AnnexinV-APC/PE 凋亡试剂盒 (KGF003-20 T) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; microON hsa-miR-125b-5p mimic (miR10000423-1-5)、microOFF hsa-miR-125b-5p inhibitor (miR20000423-1-5)、Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Primer (R10031.7)、Bulge-LoopTM miRNA qRT-PCR Starter Kit (R11067.2) 购买于中国锐博生物; Beclin-1 抗体 (A7353)、HDAC1 抗体 (A19571)、LC3B 抗体 (A19665)、P62 抗体 (A11250)、 β -actin 抗体 (AC026) 及生物素化山羊抗兔 IgG (ab6721) 均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

实时荧光定量(RT-PCR)仪(PIKORed 96,美国 ThermoFisher 仪器有限公司);电泳仪(JY200C,北京君意东方电泳设备有限公司);倒置生物显微镜(DMI1,上海徕卡显微系统贸易有限公司);台式低速离心机(TDZ4-WS,长沙湘仪离心机仪器有限公司);流式分析仪(cytoflex,美国 Beckman);化学发光凝胶成像仪(5200,上海天能科技有限公司);透射电子显微镜(JEM-1400FLASH,日本电子 JEOL)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HEP-2 细胞接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,放入 37℃,含 5% CO₂ 的孵箱培养。选取状态良好的对数生长期的 Hep-2 细胞进行传代,加入胰蛋白酶体积 3 倍的新鲜培养基终止消化,消化后的细胞加入新鲜培养基,以 1:3 传代培养。进行细胞计数并按要求稀释细胞悬液,胰蛋白酶消化收集细胞,吸取上清液后丢弃并加入 1 mL 冻存液(55% FBS+40% FBS+5% DMSO),混匀后转移至冻存管中密封。

1.3.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 Hep-2 细胞,进行细胞计数后调节细胞密度为 5×10^4 /mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,37℃、5% CO₂ 条件下进行恒温培养。待细胞贴壁后,设置组别:正常组、黄芩素组(200 μ mol/L)、黄芩素(200 μ mol/L)+3-MA(4 mmol/L)组、3-MA 组(4 mmol/L),加入相对应浓度的药物。药物作用 24 h 后,吸弃上清,每孔加入 200 μ L 终浓度为 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液,37℃、5% CO₂ 恒温继续培养 4 h。使用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光值。

1.3.3 细胞划痕实验

取对数生长期的 Hep-2 细胞,进行细胞计数后调节细胞密度为 1×10^5 /mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 条件下恒温培养。待细胞贴壁后,设置组别同 1.3,培养 24 h。待细胞长满至单层,吸除上清液,移液枪取 200 μ L 枪头垂直于背后横线划痕。PBS 轻轻洗涤 2 次以去除划下细胞,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。在 0 h 及 24 h 时间点分别取样,50 倍镜下在各水平直线标记处跟踪拍摄细胞划痕状态。测量划痕距离,计算 0 h 和 24 h 内迁移距离的平均值与标准差。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取对数生长期的 Hep-2 细胞,每孔 2 mL 接种于

6 孔板中,37℃、5% CO₂ 恒温培养。待细胞贴壁后,按 1.3 所述方法设置组别加入不同浓度药物培养。根据闫婷婷^[5]的试验方法处理细胞并获得细胞沉淀。用 500 μ L 的 Binding Buffer 重悬细胞后,加入 5 μ L Annexin V APC 轻轻吹匀,再加入 5 μ L 的 PE 混匀;室温避光反应 15 min,上机检测分析。

1.3.5 Western blot 实验

收集黄芩素或 3-MA 处理过或经 miR-449a mimic 转染的喉癌细胞 Hep-2,加入预冷的 RIPA 裂解缓冲液 200 μ L,碎冰上裂解 10 min,收集裂解液,在 4℃、12 000 r/min 下离心 15 min。取出上清液,用 BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白质进行定量。样品加载到 10% 聚丙烯酰胺进行 SDS-PAGE 电泳,并转移到硝酸纤维素薄膜上(PVDF 膜)。将 PVDF 膜放入用 TBST Buffer 稀释的 5% 脱脂奶粉并在室温下摇晃并孵育 2 h,加入一抗(Beclin-1 1:2000;HDAC1 1:2000;LC3B 1:2000;p62 1:2000; β -actin 1:100 000)。在 4℃ 下孵育过夜后,TBST 将膜洗涤 3 次,每次 5 min。然后加入相应的二抗(1:5000),在室温下孵育 2~3 h,TBST 膜洗 3 次共 30 min,进行化学发光反应显色。用 Image-J 图像分析软件分析目标蛋白的表达水平,以同一泳道的目标蛋白与 β -actin 的灰度值比作为测量结果进行比较分析。

1.3.6 RT-PCR 检测

按照试剂盒的说明,分别用 TRIzol 试剂提取转染、黄芩素或 3-MA 处理后的 Hep-2 细胞的总 RNA。取 5 μ g 的总 RNA,通过反转录反应合成 cDNA。纯化的 RNA 作为模板,使用试剂盒合成 cDNA。用 cDNA、Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green[®] 试剂盒和 miR-449a 的基因特异引物进行 RT-qPCR。所有引物都是由生工生物技术(上海)有限公司合成。miR-449a 的引物序列,正向:5'-ACTTTTATTGGTCTCAAGTCAGTGACAG-3',反向由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green[®] Kit 提供。U6 的引物序列由 Mir-X miRNA qRT-PCR TB Green[®] Kit 提供。反应结束后,计算机自动分析每个样品的 Ct 值,miR-449a 以 U6 为内参对照,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对 mRNA 表达量。

1.3.7 生物信息学分析及双荧光素酶试验

为了确定 miR-449a 与 HDAC1 之间的调节关系,本研究使用专门设计的荧光素酶载体进行了荧光素酶试验。含有 miR-449a 结合位点的 HDAC1 的

完整 3' UTR 序列被扩增并亚克隆到 pSI-Check2 载体中,生成 HDAC1 的野生型载体(h-HDAC1-3UTR-wt)。设计不含有 miR-449a 结合位点的 HDAC1 的 3' UTR 序列被扩增并亚克隆到 pSI-Check2 载体中,生成 HDAC1 的突变型载体(h-HDAC1-3UTR-mut)。根据涂友慧^[16]的试验方法,准备好用于转染的细胞和目的质粒 h-HDAC1-3UTR,将细胞转染后分为四组:NC mimics+h-HDAC1-3UTR-wt、hsa-miR-449a+h-HDAC1-3UTR-wt、NC mimics + h-HDAC1-3-UTR-mu 及 hsa-miR-449a+h-HDAC1-3UTR-mu。细胞转染后于 37℃,5% CO₂ 条件下培养。转染 6 h 后换取新鲜培养基,48 h 后收集细胞,使用 Promega Dual-Luciferase system 试剂盒检测。

1.3.8 透射电子显微镜观察自噬小体

Hep-2 人喉癌细胞共分为 5 组,包括 NC 组、黄芩素组、miR-449a mimic 组、黄芩素+mimic NC 组及黄芩素+miR-449a mimic 组。样品经 3% 戊二醛预固定,1% 四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水,Ep812 包埋,半薄切片用甲苯胺蓝染色作光学定位,用钻石刀作超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色,切片使用 JEM-1400FLASH 透射电镜观察,每张铜网先于 6000 倍下观察,选择要观察的区域采集图片,观察具体病变。

1.4 统计学方法

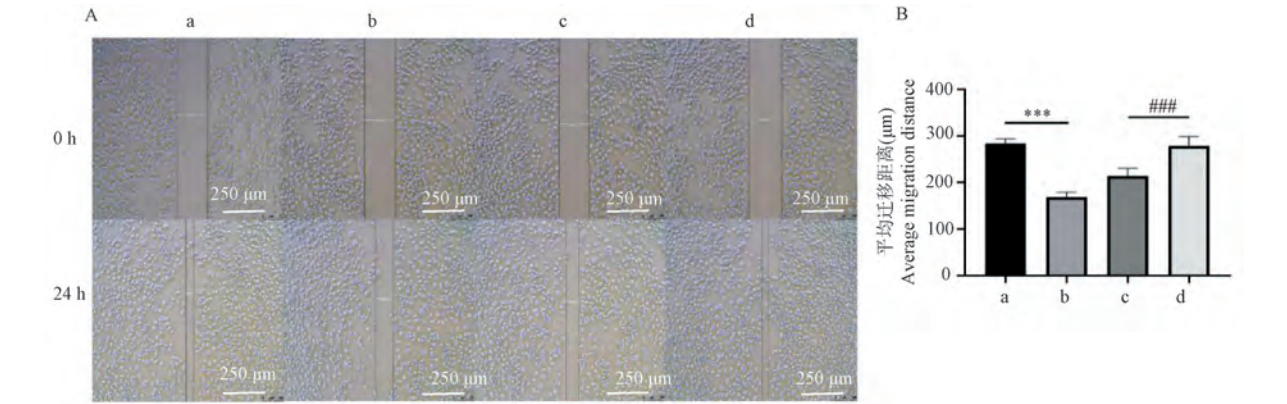
数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 对组间差异进行单因素分析和 Tukey 多重比较检验, $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩素对喉癌细胞增殖、迁移的影响

MTT 实验用于检测细胞存活和生长。结果观察到,黄芩素组细胞增殖抑制率为 $(27.69 \pm 5.66)\%$,正常组增值抑制率为 $(0.00 \pm 0.00)\%$,黄芩素组对比正常组细胞增殖抑制率增加极为明显($P<0.001$)。仅加入 3-MA 处理的细胞增殖抑制率为 $(-3.23 \pm 4.03)\%$,低于正常组,即抑制喉癌细胞自噬后会诱导增加细胞的增殖。同时加入黄芩素后,黄芩素+3-MA 组细胞增殖抑制率为 $(14.97 \pm 4.71)\%$,相较于 3-MA 组细胞极显著增加($P<0.001$)。以上结果说明黄芩素可以抑制喉癌细胞增殖,且黄芩素联合 3-MA 处理喉癌细胞后可逆转 3-MA 抑制自噬引起的细胞增殖。

细胞划痕实验可用来检测细胞的迁移能力变化。实验分别观察了细胞在 0 h、24 h 的划痕愈合情况,结果如图 1A,各组细胞 0~24 h 平均迁移距离如图 1B,其中经黄芩素处理后的细胞迁移距离为 $(168.91 \pm 9.78) \mu\text{m}$,极显著小于正常组迁移距离 $(284.26 \pm 9.66) \mu\text{m}$ ($P<0.001$)。3-MA 组细胞迁移距离较大为 $(279.32 \pm 19.390) \mu\text{m}$,而黄芩素+3-MA 组细胞迁移距离显著小于 3-MA 组为 $(214.18 \pm 16.33) \mu\text{m}$ ($P<0.001$)。以上结果证明黄芩素可使喉癌细胞迁移能力减弱,加入细胞自噬抑制剂 3-MA 时同时加入黄芩素处理可以恢复细胞自噬能力,减弱迁移能力。



注:A:细胞划痕实验观察细胞 24 h 内迁移情况;B:各组细胞平均迁移距离。a:正常组;b:黄芩组;c:黄芩组+3-MA 组;d:3-MA 组。与正常组相比,*** $P<0.001$;与 3-MA 组相比,### $P<0.001$ 。

图 1 黄芩素抑制喉癌细胞的迁移

Note. A, Wound healing test to observe cell migration within 24h. B, Mean migration distance of cells in each group. a, Control group. b, Baicalein group. c, Baicalein+3-MA group. d, 3-MA group. Compared with control group, *** $P<0.001$. Compared with 3-MA group, ### $P<0.001$.

Figure 1 Baicalein inhibits the migration of laryngeal cancer cells

2.2 黄芩素对喉癌细胞凋亡的影响

进一步采用流式细胞仪检测经 3-MA 或黄芩素处理后 Hep-2 细胞的凋亡率变化。在图 2A 的流式细胞图中,I 象限呈现晚期凋亡细胞,IV 象限呈现早期凋亡细胞,细胞凋亡率即第一象限和第四象限百分率的和。细胞凋亡率统计结果详见图 2B。结果显示,与正常组相比,黄芩素处理后的喉癌细胞 Hep-2 在 I 和 IV 象限出现了晚期凋亡和早期凋亡,凋亡率为(17.93±1.5)%,高于正常组细胞的凋亡率(3.71±0.36)%($P<0.05$),具有统计学意义,表明黄芩素具有诱导喉癌细胞 Hep-2 凋亡的作用。3-MA 组细胞凋亡率为(3.25±0.15)%,与之相比,黄芩素+3-MA 组细胞在 I 象限及 IV 象限的凋亡率有显著增加($P<0.01$),为(9.96±0.57)%。说明加入黄芩素可以逆转 3-MA 对细胞自噬的抑制作用,从而诱导细胞凋亡。

2.3 黄芩素对喉癌细胞自噬流调控的影响

为探究黄芩素对喉癌细胞自噬的影响,检测了

各组喉癌细胞中自噬相关蛋白的表达水平。其中,Beclin-1 蛋白是参与自噬的特异性基因之一,在自噬的溶酶体降解途径中发挥抑制肿瘤的作用。LC3 是自噬体形成过程中的特异性标记蛋白,包括 LC3I 及 LC3II。LC3II 与 LC3I 的比值与自噬体形成的数量和自噬发生的程度成正比^[17]。另外,p62 会通过 LC3 的直接结合并选择性地结合到自噬体中,最终在自噬溶酶体内有效降解。因此,LC3II 升高联合 p62 降低可以被认为是自噬水平提高的指标^[18]。Western blot 结果如图 3 所示,黄芩素组细胞的 Beclin-1 蛋白表达显著高于正常组($P<0.01$),LC3II/LC3I 比值极显著高于正常组($P<0.001$),而 p62 蛋白表达水平则显著低于正常组($P<0.01$)。结果表明,黄芩素可以调控喉癌细胞 Hep-2 的自噬相关基因表达,诱导喉癌细胞自噬。经自噬抑制剂 3-MA 处理后的细胞,自噬相关基因蛋白表达水平变化显著,但当黄芩素与 3-MA 联合作用于 Hep-2 细胞后,其中 Beclin-1 蛋白表达高于 3-MA 组($P<$

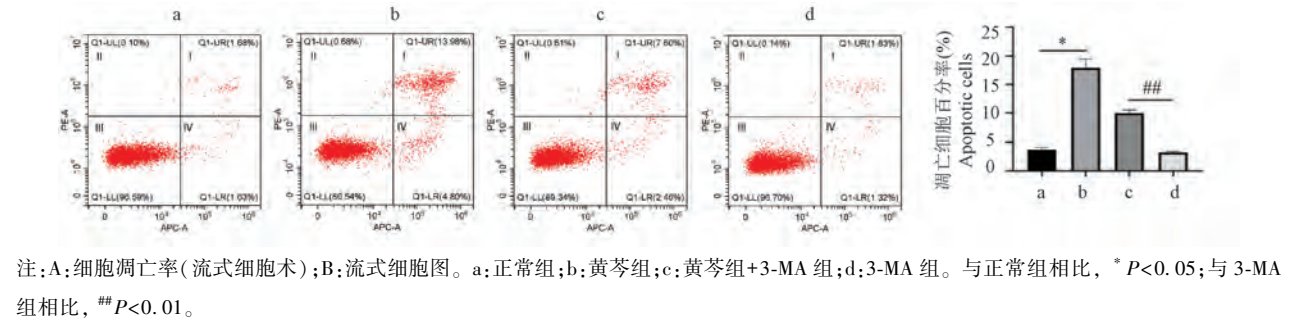
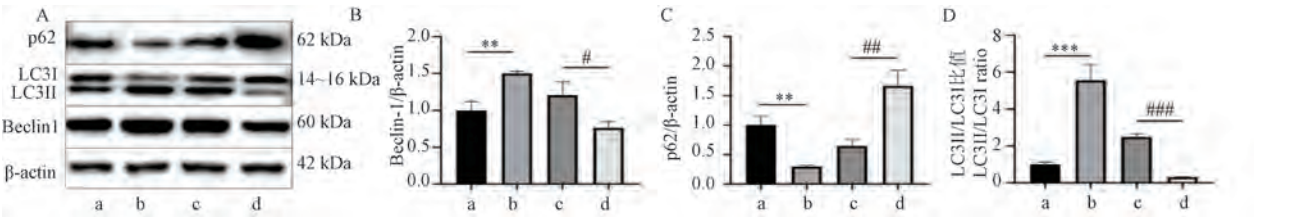


图 2 黄芩素诱导细胞凋亡

Note. A, Apoptosis rate (flow cytometry). B, Flow cytogram. a, Control group. b, Baicalein group. c, Baicalein+3-MA group. d, 3-MA group. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with 3-MA group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Baicalein induces apoptosis



注:A:Hep-2 细胞中 Beclin-1、LC3I、LC3II、p62 蛋白的表达水平;B:Beclin-1 蛋白表达统计;C:p62 蛋白表达统计;D:LC3II/LC3I 蛋白表达比值大小;a:正常组;b:黄芩组;c:黄芩组+3-MA 组;d:3-MA 组。与正常组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与 3-MA 组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图 3 黄芩素调控自噬相关基因表达

Note. A, Expression levels of Beclin-1, LC3I, LC3II, and p62 proteins in Hep-2 cells. B, Statistical graph of Beclin-1 protein expression in Hep-2 cells. C, Statistical graph of p62 protein expression in Hep-2 cells. D, Size of LC3II/LC3I protein expression ratio in Hep-2 cells. a, Control group. b, Baicalein group. c, Baicalein+3-MA group. d, 3-MA group. Compared with control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with 3-MA group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$.

Figure 3 Baicalein regulates autophagy-related gene expression

0.05)和正常组,LC3II/LC3I 比值极显著高于 3-MA 组($P<0.001$)和正常组,而 p62 表达水平显著低于 3-MA 组($P<0.01$)和正常组,说明黄芩素可以逆转 3-MA 的细胞自噬抑制作用并诱导细胞自噬。

2.4 黄芩素对喉癌 miR-449a/HDAC1 轴的影响

miR-449a 被发现在多种癌症中发挥肿瘤抑制作用^[8],但在喉癌细胞中的作用尚不清楚。PCR 结果如图 4A 所示,黄芩素作用下喉癌细胞 Hep-2 的 miR-449a 表达相比正常组细胞有一定增加($P<0.05$),自噬抑制剂 3-MA 作用下喉癌细胞 Hep-2 的 miR-449a mRNA 表达减少,但 3-MA 与黄芩素联合处理后,miR-449a mRNA 表达对比正常组细胞和 3-MA 组细胞均显著增加($P<0.01$),说明黄芩素可以上调 miR-449a 表达,并且可以逆转 3-MA 抑制细胞自噬后引起的 miR-449a 表达下调。

HDAC1 经研究发现在喉癌细胞中表达上调^[19],而 Western blot 结果显示(图 4B、4C),黄芩素组 HDAC1 蛋白表达量低于正常组($P<0.05$),黄芩素联合 3-MA 组低于 3-MA 组($P<0.05$)。这说明黄芩素可以下调喉癌细胞中 HDAC1 表达。

2.5 miR-449a 与 HDAC1 的靶向关系验证

经生物信息学在线软件预测,发现 HDAC1 与 miR-449a 的靶位点结合示意图如图 5A。双荧光素酶报告结果如图 5B,与 NC 组相比,hsa-miR-449a 能够显著下调 h-HDAC1-3UTR-WT 的荧光素酶的表达式($P<0.001$),说明本实验中两者间存在结合作用。

2.6 黄芩素抑制喉癌细胞增殖及迁移的机制研究

MTT 法检测各组细胞增殖活力,结果如图 6A 所示,黄芩素组细胞增殖抑制率相比 NC 组显著增加($P<0.01$),Hep-2 细胞转染 miR-449a mimic 后,

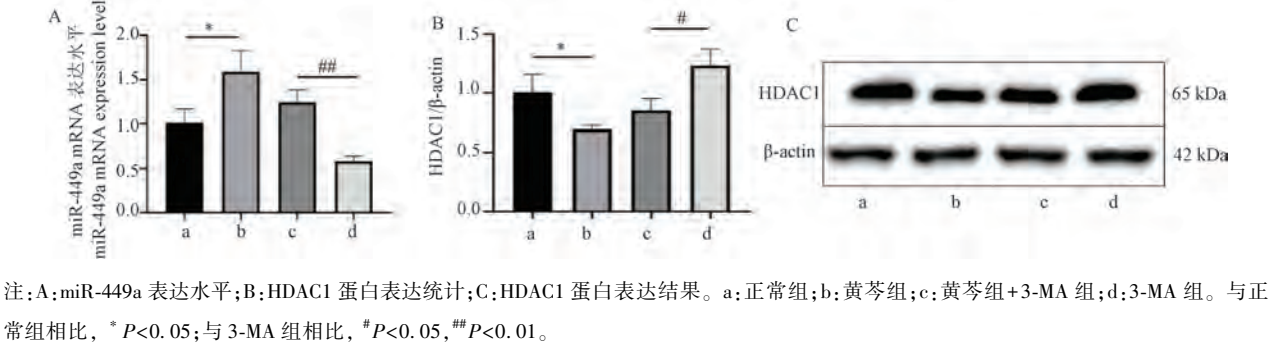


图 4 黄芩素上调 miR-449a 表达水平和下调 HDAC1 蛋白表达

Note. A, miR-449a expression level. B, Statistical plot of HDAC1 protein expression. C, HDAC1 protein expression results. a, Control group. b, Baicalein group. c, Baicalein+3-MA group. d, 3-MA group. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with 3-MA group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 4 Baicalein up-regulates miR-449a expression level and down-regulates HDAC1 protein expression

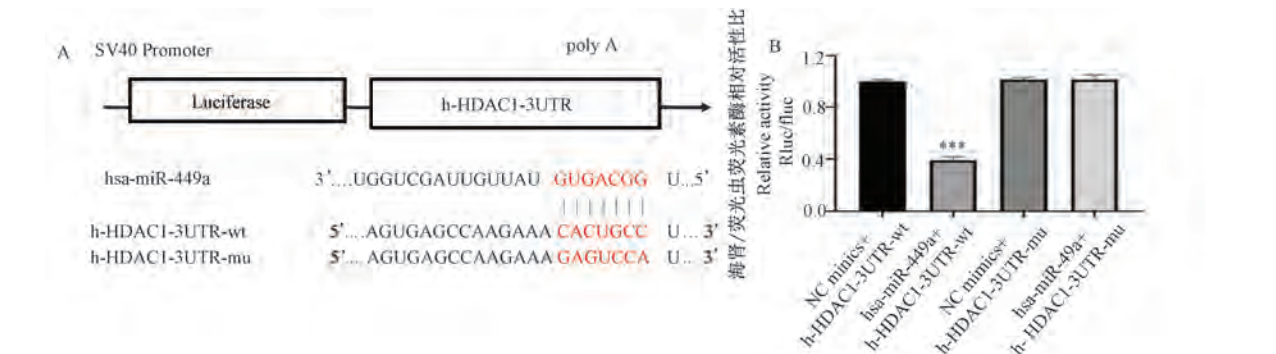
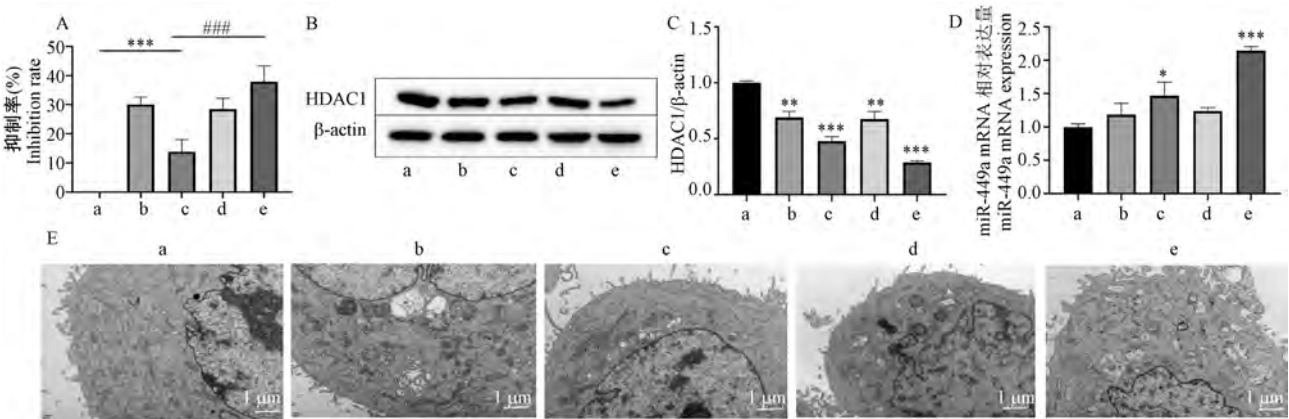


图 5 双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性

Note. A, Schematic diagram of bioinformatics analysis of hsa-miR-449a binding to h-HDAC1-3UTR target site. B, Results of dual luciferase reporter gene assay for hsa-miR-449a interaction with h-HDAC1-3UTR. Compared with NC mimics+h-HDAC1-3UTR-wt group, *** $P<0.001$.

Figure 5 Luciferase activity was detected by Dual-luciferase reporter gene assay



注:A:MTT 法检测细胞增殖抑制率;B:HDAC1 蛋白表达情况;C:HDAC1 蛋白表达统计图;D:miR-449a 表达水平;E:透射电镜(JEM-1400FLASH)观察细胞自噬小体。a: NC 组;b: 黄芩素组;c: miR-449a mimic 组;d: 黄芩素+mimic NC 组;e: 黄芩素+miR-449a mimic 组。与 NC 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 miR-449a mimic 组相比, ### $P<0.001$ 。

图 6 黄芩素诱导细胞自噬,经由 miR-449a/HDAC1 轴作用喉癌细胞

Note. A, Results of cell proliferation inhibition rate by MTT assay. B, HDAC1 protein expression. C, HDAC1 protein expression statistics. D, miR-449a expression level. E, Results of cellular autophagy vesicles observed by transmission electron microscopy (JEM-1400FLASH). a, NC group. b, Baicalein group. c, miR-449a mimic group. d, Baicalein+mimic NC group. e, Baicalein+miR-449a mimic group. Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with miR-449a mimic group, ### $P<0.001$.

Figure 6 Baicalein induces autophagy and acts on laryngeal cancer cells via the miR-449a/HDAC1 axis

细胞的增殖抑制率极显著增加($P<0.001$),说明细胞可以通过黄芩素处理或 miR-449a 上调抑制喉癌细胞的增殖;黄芩素组与黄芩素+mimic 组结果相近,说明 mimic NC 对黄芩素的抑制作用没有影响;若黄芩素联合 miR-449a mimic 转染,其增殖抑制率不仅比黄芩素+mimic NC 组细胞显著增加($P<0.01$),同时比仅转染组的细胞极显著增高($P<0.001$),说明黄芩素联合 miR-449a mimic 处理细胞可以更显著地抑制喉癌细胞的增殖。

Western blot 结果如图 6B、6C,黄芩素联合 miR-449a mimic 转染时,喉癌细胞 HDAC1 表达水平最低,黄芩素组和 miR-449a mimic 组均显著低于 NC 组($P<0.01$)。说明细胞通过黄芩素处理或上调 miR-449a 表达均可以降低 HDAC1 蛋白表达从而抑制喉癌细胞。PCR 结果如图 6D,黄芩素组相比 NC 组,细胞 miR-449a 表达水平有一定升高但不显著,联合 miR-449a mimic 转染后则有极显著增加($P<0.001$)。

为了更直观地证明黄芩素能够诱导 Hep-2 细胞的自噬,通过透射电子显微镜观察自噬小体数量的变化,结果如图 6E,NC 组细胞内细胞质均匀,经黄芩素处理后的 Hep-2 细胞,细胞质中出现囊泡状双膜结构,即自噬小体,当自噬发展到后期则形成自噬溶酶体,当黄芩素与 miR-449a mimic 联合作用于

细胞,喉癌细胞中自噬溶酶体数量明显增加,细胞核开始出现皱缩和裂解,细胞状态变差,更进一步证明了黄芩素可以诱导喉癌细胞 Hep-2 自噬。

3 讨论

喉癌是最常见的头颈部恶性肿瘤之一,其病因主要有吸烟、慢性喉炎及空气污染等,发病率极高且容易复发,这也是其预后效果较差的主要原因^[20]。最近几年来,有关中药抗喉癌的研究取得一定进展。郭俊宇等^[21]研究发现,丹酚酸 B 能够抑制喉癌细胞 Hep-2 增殖并诱导细胞凋亡;周华群等^[22]研究发现姜黄素与白藜芦醇联合处理会抑制 Hep-2 细胞集落的形成并促进凋亡。实验前期通过 MTT 实验及细胞划痕实验,证明了黄芩素对 Hep-2 细胞增殖及迁移的抑制作用。

细胞凋亡是程序性细胞死亡的一种表现形态,主要负责移除机体多余的以及受损的细胞^[23]。癌细胞的凋亡在癌症的恶性进展和转移中起着关键作用^[24]。诱导肿瘤细胞凋亡可用于治疗癌症^[25],但由于凋亡的诱发和调节机制不同,各种肿瘤药物诱发细胞凋亡的机制也不同。有许多天然化合物被证明可以诱导肿瘤细胞中被阻断的细胞凋亡通路^[26],其中包括黄酮类化合物。本研究通过流式细胞仪检测细胞凋亡率发现,黄芩素可以诱导喉癌细

胞 Hep-2 的凋亡。并且,黄芩素与 3-MA 共同作用于细胞时,可以逆转由 3-MA 抑制自噬引起的凋亡抑制作用。

细胞自噬是一种高度保守的自我降解过程,在细胞应激中起关键作用,自噬可以调节肿瘤的形成、增殖、转移及能量代谢等^[27]。凋亡与自噬之间的关系错综复杂,当细胞处于应激条件下,自噬被诱导发生,细胞凋亡被激活,两者之间可以互相转换^[28]。自噬和凋亡过程中涉及到的关键调节蛋白具有双重调节作用。例如,Beclin-1 作为自噬过程中的调节蛋白,同时可以调控凋亡过程。

Beclin-1 是 III 类 PI3K 复合物的亚基,其与自噬前体的结合启动自噬体的形成,该蛋白是自噬体形成所必需^[29]。LC3I 会在自噬形成时被酶解,使其与磷脂酰乙醇胺结合转变为 LC3II,因此检测 LC3II 与 LC3I 的比值可用来评估自噬水平的高低^[30]。p62 是一种泛素结合蛋白,参与多种细胞信号转导调控及自噬调控,p62 表达水平高低与自噬负相关^[31]。为进一步确定黄芩素对喉癌细胞自噬的影响,通过 Western blot 实验检测以上四种自噬相关基因蛋白表达的水平。结果发现黄芩素在作用于 Hep-2 细胞时,同样可以诱导细胞自噬现象。并且实验通过透射电子显微镜观察发现,上调 miR-449a 表达与黄芩素处理均可诱导细胞自噬增加细胞内自噬小体数量。

大量实验证明,miRNA 可以通过多个相关基因调控喉癌的发展和转移^[32],虽然黄芩素对喉癌细胞的作用研究较多,但黄芩素调控 miRNAs 在喉癌中扮演何种的角色,这方面的研究仍然未见报道。miRNA 可以通过多种细胞调节通路调节细胞发育、分化、增殖和凋亡^[33],其中 miR-499a 是 miR-499 家族中最常见的亚型,可以调节多种癌症中的细胞增殖、凋亡、迁移及细胞侵袭^[34-35]。miR-449a 下调会促进乳腺癌细胞迁移和侵袭^[36],抑制 NCCLC(非小细胞肺癌)细胞的增殖、迁移和侵袭^[37],且 miR-449a 在喉癌细胞中表达下调^[38]。本研究通过 PCR 实验检测确定,黄芩素可以上调喉癌细胞 miR-449a 的表达水平,从而达到抑制喉癌细胞增殖等作用。

miR-449 作用机制包括三种,最常见的途径即通过下调组蛋白去乙酰化酶(HDAC1)和沉默调节蛋白 1(SIRT1),诱导肿瘤蛋白 p53 依赖性细胞凋亡。有研究发现 HDAC1 促进了喉癌的形成和发

展^[39],但 HDAC1 在喉癌细胞增殖和迁移中的作用尚不明确。本实验经过生物信息学软件预测分析推测 miR-449a 与 HDAC1 靶向结合参与了喉癌的发生发展,通过双荧光素酶报告基因实验鉴定验证,hsa-miR-449a 能够显著下调 h-HDAC1-3UTR-WT 的荧光素酶的表达,两者间的确存在结合作用。接着通过 Western blot 和 PCR 实验检测发现黄芩素处理或上调 miR-449a 均可以下调 HDAC1 在喉癌细胞中的表达水平,说明黄芩素作用下过表达的 miR-449a 抑制了 HDAC1 的表达,与软件预测结果一致。

综上所述,黄芩素可以介导喉癌细胞 Hep-2 自噬,通过上调 miR-449a 表达达到下调 HDAC1 表达的作用,进而抑制喉癌细胞的增殖及迁移,并诱导细胞凋亡。中药单体可以通过调控多条信号通路来影响喉癌的发展,但对于这些通路如何相互影响的研究不多,本研究结果证明 miR-449a 与 HDAC1 在喉癌细胞发展中的结合作用,可对黄芩素成为临床潜在的新的化疗药物,从而辅助治疗喉癌提供理论及实验依据,黄芩素对于喉癌细胞的作用还需要更加深入研究分子机制,为后期临床试验补充依据。

参考文献:

- [1] Chu EA, Kim YJ. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2008, 41(4): 673-695.
- [2] Cosetti M, Yu GP, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2008, 134(4): 370-379.
- [3] 牛燕燕. miR-9、miR-125b 在喉鳞癌中的生物学功能研究 [D]. 北京:北京协和医学院,2011.
- [4] 汤智平,关中. 自噬调节与肿瘤治疗相关的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(6): 477-480.
- [5] 闫婷婷. 自噬在姜黄素诱导的喉癌 Hep-2 细胞增殖抑制中的作用 [D]. 郑州:郑州大学,2017.
- [6] 汤迪,陶磊. microRNA 在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展 [J]. *中国耳鼻咽喉科杂志*, 2015, 15(2): 135-137.
- [7] 张旗,何湘君,马丽萍,等. p53 通路微小 RNA 在卵巢癌细胞和浆液性卵巢癌组织中的表达及意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(12): 885-890.
- [8] 黄洁,余荣环,王萌萌,等. miR-449a 通过下调 HDAC1 表达抑制肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移 [J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(22): 4046-4051.
- [9] Chistiakov DA, Myasoedova VA, Orekhov AN, et al. Epigenetically active drugs inhibiting DNA methylation and histone deacetylation [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(8): 1167-1174.

- [10] Kim SJ, Kim HJ, Kim HR, et al. Antitumor actions of baicalein and wogonin in HT-29 human colorectal cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1443-1449.
- [11] Bie B, Sun J, Guo Y, et al. Baicalein: a review of its anti-cancer effects and mechanisms in Hepatocellular Carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1285-1291.
- [12] Zhao X, Tang D, Chen X, et al. Functional lncRNA-miRNA-mRNA networks in response to baicalein treatment in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8844261.
- [13] 孙吉凤, 刘剑凯. 黄芩素对喉癌细胞周期、凋亡率及细胞核 DNA 的影响 [J]. *中国医学创新*, 2018, 15(16): 13-16.
- [14] 李登辉, 康健. 黄芩素在人喉癌 Hep-2 增殖抑制中的作用及机制 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(5): 526-529.
- [15] 孙吉凤, 何海涛. 黄芩素通过 Ezrin 相关信号转导通路对喉癌细胞迁移、侵袭的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(12): 2595-2598.
- [16] 涂友慧. 流感病毒 H3N2 激活 lncRNA TUG1/miR-145-5p/NF- κ B 信号通路调控慢性阻塞性肺疾病急性加重气道炎症反应的分子机制及临床研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021.
- [17] 刘炜, 于锋, 周毅波, 等. 原花青素介导的自噬流对喉癌细胞增殖影响及其机制探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(20): 1413-1421.
- [18] Nazim UM, Jeong JK, Park SY. Ophiopogonin B sensitizes TRAIL-induced apoptosis through activation of autophagy flux and downregulates cellular FLICE-like inhibitory protein [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(3): 4161-4172.
- [19] Ding S, Tang Z, Jiang Y, et al. HDAC1 regulates the chemosensitivity of laryngeal carcinoma cells via modulation of interleukin-8 expression [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 896: 173923.
- [20] He G, Karin M. NF- κ B and STAT3-key players in liver inflammation and cancer [J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 159-168.
- [21] 郭俊宇, 陈应超. 丹酚酸 B 对人喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡及侵袭转移能力的影响及机制研究 [J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(12): 112-116.
- [22] 周华群, 张立庆, 徐朝琪, 等. 姜黄素联合白藜芦醇抑制人头颈部肿瘤细胞系增殖的机制研究 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2017, 31(2): 67-72.
- [23] 李敏, 林俊. 细胞凋亡途径及其机制 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(2): 103-107.
- [24] Wang RA, Li QL, Li ZS, et al. Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(1): 205-211.
- [25] 方成, 陈钧辉. 细胞凋亡与癌症治疗 [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21(6): 313-315.
- [26] de Araújo Júnior RF, de Souza TP, Pires JG, et al. A dry extract of *Phyllanthus niruri* protects normal cells and induces apoptosis in human liver carcinoma cells [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(11): 1281-1288.
- [27] 刘虹, 邵荣光. 自噬在肿瘤发生与发展过程中的调节作用 [J]. *药学报*, 2016, 51(1): 23-28.
- [28] 张杨, 孙弯弯, 陆丽丹, 等. 细胞自噬与凋亡相互作用分子机制的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(9): 1342-1346.
- [29] Shi B, Ma M, Zheng Y, et al. mTOR and Beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12562-12568.
- [30] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [31] 于海涛, 张春晶, 刘立琨, 等. 氯喹促进顺铂诱导的人非小细胞肺癌细胞凋亡及其机制 [J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(6): 695-701.
- [32] 龚勇. miR-21-5p 靶向作用喉癌候选抑癌基因 LCRG1 对 Hep2 细胞生物学性状影响的研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2015.
- [33] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, et al. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2094-2105.
- [34] Kumar P, Sharad S, Petrovics G, et al. Loss of miR-449a in ERG-associated prostate cancer promotes the invasive phenotype by inducing SIRT1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 22791-22806.
- [35] Li Q, Peng J, Li X, et al. miR-449a targets Flot2 and inhibits gastric cancer invasion by inhibiting TGF- β -mediated EMT [J]. *Diagn Pathol*, 2015, 10: 202.
- [36] Zhang Z, Wang J, Gao R, et al. Downregulation of microRNA-449 promotes migration and invasion of breast cancer cells by targeting tumor protein D52 (TPD52) [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(5): 753-761.
- [37] Wu D, Liu J, Chen J, et al. miR-449a suppresses tumor growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer by targeting a HMGB1-mediated NF- κ B signaling pathway [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(2): 227-235.
- [38] Piotrowski I, Zhu X, Saccon TD, et al. miRNAs as biomarkers for diagnosing and predicting survival of head and neck squamous cell carcinoma patients [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16): 3980.
- [39] 龚正鹏, 于明, 喻望博, 等. HDAC1 和 SIRT1 在喉鳞癌中的表达及意义 [J]. *贵阳医学院学报*, 2013, 38(4): 356-358.

鲍丹,郭蕊,侯道荣.角蛋白 17 基因敲除加剧糖尿病小鼠的创面愈合障碍 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 54-60.
Bao D, Guo R, Hou DR. Keratin 17 knockout aggravates wound healing in diabetic mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 54-60.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.008

角蛋白 17 基因敲除加剧糖尿病小鼠的创面愈合障碍

鲍 丹¹,郭 蕊¹,侯道荣^{2*}

(1.中国医学科学院皮肤病医院(中国医学科学院皮肤病研究所),北京协和医学院,南京 210000;
2.南京医科大学,南京 210000)

【摘要】 目的 探究角蛋白 17(keratin 17,*Krt17*)基因敲除对糖尿病小鼠创面愈合的影响。**方法** 取 6 周龄野生型小鼠和 *Krt17* 基因敲除小鼠,利用 60%高脂饲料喂养 4 周和腹腔注射链脲佐菌素(40 mg/(kg·d),连续 5 d)联合诱导建立糖尿病小鼠模型;于造模成功后 1 周,小鼠异氟烷全身麻醉,背部剃毛,用 6 mm 环钻制造在体的皮肤圆形损伤;于制造创面后第 8 天,利用 Western blot 和免疫荧光染色检测 KRT17 在创面近端中的表达和定位及病理组织学分析;并于制造创面后第 0、2、4、6 和 8 天拍照记录,计算伤口愈合速率。**结果** 在正常生理情况下,KRT17 主要在小鼠毛囊中表达;当皮肤受到损伤时,创面近端的角质形成细胞中 KRT17 的表达显著升高;而糖尿病小鼠创面中 KRT17 的表达较对照组小鼠显著下调。与野生型小鼠相比,*Krt17* 基因敲除小鼠的伤口愈合速率显著降低;创面局部炎症反应更持续。**结论** *Krt17* 基因敲除加剧了糖尿病小鼠的创面愈合障碍,*Krt17* 可能是参与该病理进程的重要调控基因之一。

【关键词】 角蛋白 17;糖尿病创面;创面愈合

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0054-07

Keratin 17 knockout aggravates wound healing in diabetic mice

BAO Dan¹, GUO Rui¹, HOU Daorong^{2*}

(1. Institute of Dermatology & Hospital for Skin Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210000, China. 2. Nanjing Medical University, Nanjing 210000)

【Abstract】 Objective To explore the effects of keratin 17 (*Krt17*) knockout on wound healing in diabetic mice. **Methods** To establish the diabetic model, a 60% high fat diet was provided and streptozotocin was administered intraperitoneally at 40 mg/kg once per day for 5 consecutive days in wild type (WT) and *Krt17* knockout (*Krt17*^{-/-}) mice at 6 weeks of age. The mice were anesthetized with isoflurane, the back was shaved, and a 6 mm circular skin lesion was made *in vivo* at 1 week after successful modeling. Western blot and immunofluorescence staining were used to assess the expression and localization of KRT17, and histopathology of wound healing was analyzed on day 8. Images were taken at 0, 2, 4, 6, and 8 days after wounding, and the wound healing rate was calculated. **Results** KRT17 was mainly expressed in mouse hair follicles under physiological conditions. When skin was injured, KRT17 expression in keratinocytes in the proximal wound was increased significantly. However, KRT17 expression in wounds of diabetic mice was significantly

[作者简介] 鲍丹(1987—),女,博士,研究方向:糖尿病相关动物模型的建立与相关调节基因功能分析及分子机制研究。
E-mail:baodan@pumcdern.cams.cn

[通信作者] 侯道荣(1979—),男,博士,研究方向:动物模型的表型分析。E-mail:houdaorong@njmu.edu.cn

downregulated compared with that of control mice. The wound healing rate of *Krt17*^{-/-} mice was significantly reduced and the local inflammatory reaction was more persistent compared with WT mice. **Conclusions** *Krt17* knockout aggravates wound healing in diabetic mice. *Krt17* may be an important modifier gene of diabetic wound healing.

[Keywords] keratin 17; diabetic wound; wound healing
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种由于胰岛素分泌缺陷和/或胰岛素生物作用受损所致的,以高血糖为特征的代谢性疾病。国际糖尿病联合会最新数据统计显示,2021 年,全球 20~79 岁的人群 DM 患病率为 10.5%(5.366 亿人),预计到 2045 年将上升至 12.2%(7.832 亿人)^[1]。据报道,全球 30%~97% DM 患者可能有皮肤病变或并发皮肤病^[2]。在中国大庆糖尿病研究中,DM 患者皮肤病的患病率为 93.7%,75.7%的 DM 患者有两种或两种以上的皮肤病^[3],且 DM 患者的皮肤病变多发生在 DM 诊断之前^[4],因此,皮肤的病理性改变对 DM 的初步识别和诊断具有重要意义。

创面愈合障碍是 DM 最常见、最严重的皮肤并发症之一,也是当前 DM 治疗中的一个重要医学问题。DM 患者更容易出现慢性伤口,如糖尿病腿和足溃疡。研究报道,DM 患者慢性伤口的终生患病风险为 12%~25%^[5]。DM 患者的慢性创伤已成为非创伤性下肢截肢的主要原因(在美国,每年约有 65 700 例),并造成严重的经济负担^[6]。现阶段,关于 DM 创面愈合障碍发生发展的分子机制仍不完全清楚。

本实验室的前期研究发现,当皮肤受到损伤时,创面近端的角质形成细胞中角蛋白 17(keratin 17, KRT17)的表达显著升高;而 T2DM 小鼠创面中 KRT17 的表达较对照组小鼠显著下调。KRT17 是一种 I 型角蛋白,在正常生理情况下, KRT17 主要表达于皮肤的附属物中;在某些疾病,如银屑病、乳腺癌、口腔鳞状细胞癌、胃癌等恶性肿瘤中, KRT17 异常过表达^[7-8]。现阶段,关于 KRT17 的研究主要集中在其对银屑病的调控作用和潜在的临床治疗方面。在银屑病的皮肤中,上调的 KRT17 与 T 细胞及细胞因子形成一个自身免疫环路^[9];下调 KRT17 的表达可减轻银屑病模型小鼠皮损的严重程度^[10]。然而, KRT17 在 T2DM 创面愈合中的研究仍较少,因此,本文旨在结合前期研究结果通过 *Krt17* 基因敲除小鼠(*Krt17*^{-/-})分析 *Krt17* 基因敲除对 T2DM 小鼠的创面愈合的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所使用的实验动物为野生型(wild type, WT) C57BL/6J(雄性 30 只) SPF 级小鼠和 *Krt17*^{-/-}(雄性 30 只) SPF 级小鼠, 5~6 周龄, 体重 18~20 g, 由南京医科大学医药实验动物中心提供[SCXK(苏)2021-0001], 小鼠饲养于中国医学科学院皮肤病医院(中国医学科学院皮肤病研究所)实验动物中心 SPF 级屏障设施的饲养间[SYXK(苏)2022-0017], 饲养间温度(23±2)℃, 12 h/12 h 明/暗光照, 动物自由饮水和摄食。实验中涉及动物操作程序均遵循 3R 原则并已取得中国医学科学院皮肤病医院(中国医学科学院皮肤病研究所)实验动物福利伦理审查委员会的批准(2022-DW-026)。

1.2 主要试剂与仪器

链脉佐菌素(streptozotocin, STZ)(S0130)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;柠檬酸钠(#C12931024)和柠檬酸(#C13056322)购自上海麦克林生化科技有限公司;KRT17 抗体(#4543)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;60%高脂饲料购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。电泳仪和电泳槽购自 Bio-Rad 公司;组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机和荧光显微镜均购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠模型并建立创面模型

选用 5 周龄雄性 WT 小鼠和 *Krt17*^{-/-}小鼠普通饲料饲养 1 周适应环境后,随机分成 6 组:WT 空白组、*Krt17*^{-/-}空白组、WT 对照组、*Krt17*^{-/-}对照组、WT-T2DM 组和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组(*n*=10)。空白组小鼠普通饲料喂养且不制造任何伤口;对照组小鼠继续普通饲料喂养, T2DM 组小鼠 60%高脂饲养喂养;4 周后, T2DM 组小鼠腹腔注射 STZ, 剂量为 40 mg/(kg·d), 连续注射 5 d, 对照组小鼠腹腔注射同等量的生理盐水;STZ 注射 1 周后, 对照组和 T2DM 组小鼠禁食 12 h 后检测血糖, 空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol/L 视为 T2DM 造模成功^[11-13]。T2DM 造模成

功后 1 周,小鼠异氟烷全身麻醉,背部剃毛,用 6 mm 环钻制造在体的皮肤圆形损伤,T2DM 组分为 T2DM 空白组(未制造创面)和 T2DM 对照组(制造创面)。

1.3.2 免疫荧光染色和 Western blot 检测 KRT17 在创面愈合中的定位和表达

于制造创面后第 8 天,安乐死牺牲小鼠,取对照组和 T2DM 组小鼠创面周围 2 mm 的皮肤组织,一部分进行 4%多聚甲醛固定 24 h 后进行修块、脱水、包埋和切片;一部分进行 RIPA 裂解液裂解、匀浆提取皮肤总蛋白。免疫荧光染色和 Western blot 检测 KRT17 的定位和表达。

1.3.3 创面愈合速率的计算

于制造创面后的第 0、2、4、6 和 8 天拍照记录,运用 ImageJ 软件定量分析创面愈合速率,创面愈合速率=(基线创面面积-第 *n* 天创面面积)/基线创面面积×100%。

1.3.4 创面愈合近端皮肤的病理组织学观察

于制造创面后第 8 天,安乐死牺牲小鼠,取对照组和 T2DM 组小鼠创面周围 2 mm 的组织,进行 4%多聚甲醛固定 24 h 后进行修块、脱水、包埋、切片和苏木素-伊红(haematoxylin-eosin,HE)染色。

1.4 统计学方法

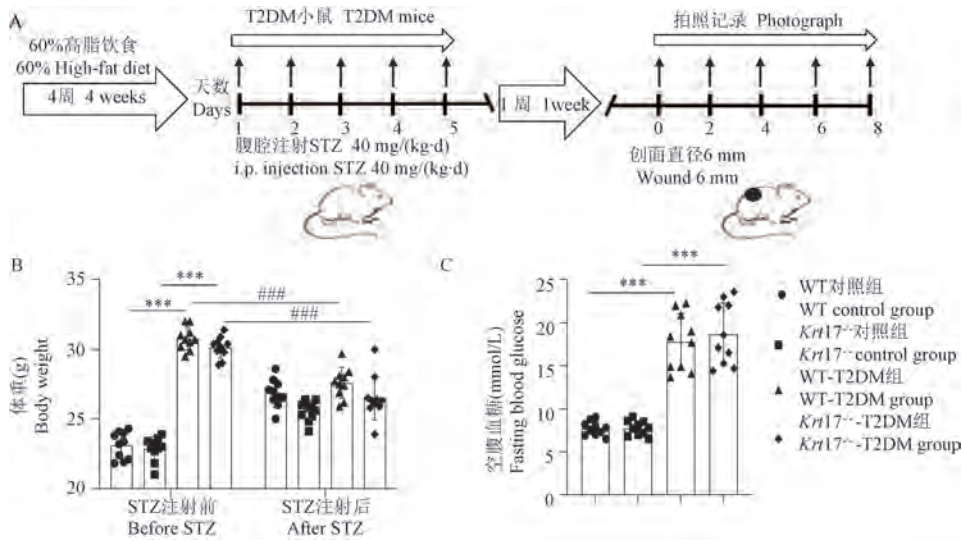
实验数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据运用 SPSS 16.0 统计软件处理。如果数据符合正态

分布,采用单因素方法分析(One-way ANOVA)进行组间比较,若组间差异有统计学意义,进一步采用 Tukey's post-hoc 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠和创面愈合模型的建立

本研究采用高脂饮食和 STZ 联合诱导的方法建立 T2DM 小鼠模型,T2DM 造模成功后,再进行创面愈合模型的建立(图 1A)。STZ 注射前,与正常饮食的对照组小鼠相比,WT-T2DM 和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠 60%高脂饮食 4 周后,均表现出体重显著升高的表型($P<0.001$,图 1B);STZ 注射后 1 周,与 STZ 注射前相比,WT-T2DM 和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠的体重均显著下降($P<0.001$,图 1B),呈现临床上 T2DM 患者体重减轻的表型。于 STZ 注射 1 周后,对 4 组小鼠禁食 12 h 后的空腹血糖检测发现,与 WT 对照组和 *Krt17*^{-/-}对照组小鼠相比,WT-T2DM 组和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠的空腹血糖值均显著升高,且均 ≥ 11.1 mmol/L($P<0.001$,图 1C),表明高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠造模成功。



注:A:高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠和创面愈合模型的实验设计;B:STZ 注射前后的体重;C:STZ 注射 1 周后的空腹血糖。与 WT 对照组和 *Krt17*^{-/-}对照组相比,*** $P<0.001$;与处理前后相比,#### $P<0.001$ 。

图 1 高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠和创面愈合模型的建立

Note. A, Experimental design of high-fat diet combined with STZ to induce T2DM mice and wound healing models. B, Body weight before and after STZ injection. C, Fasting blood glucose after STZ injection 1 week. Compared with WT control group and *Krt17*^{-/-} control group, *** $P<0.001$. Compared with before and after treatment, #### $P<0.001$.

Figure 1 Establishment of T2DM and wound healing mice model induced by high-fat diet combined with STZ

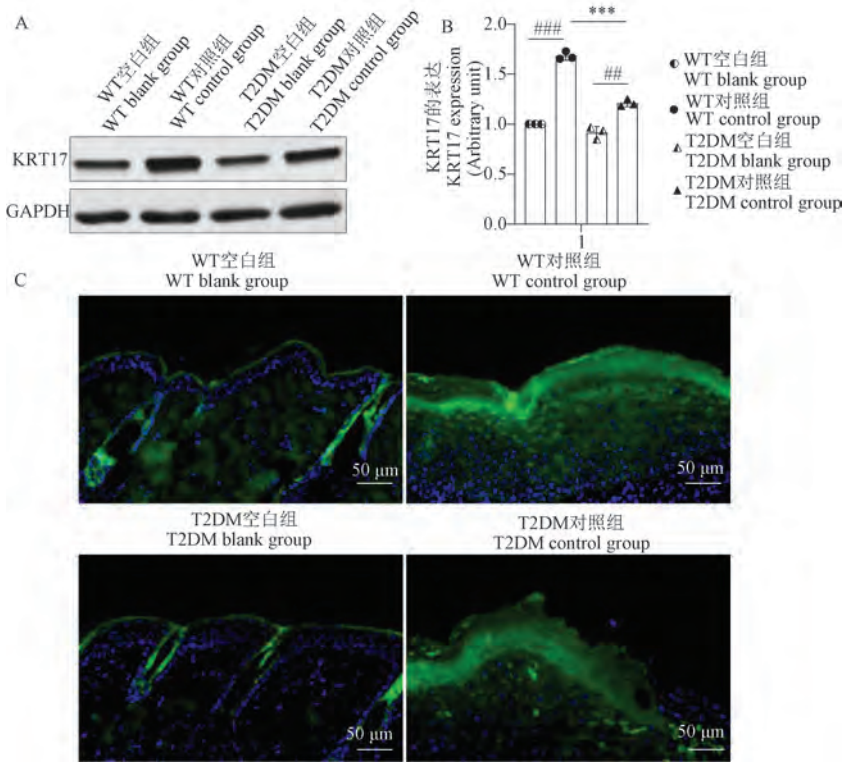
2.2 KRT17 在 T2DM 小鼠创面皮肤组织中的表达显著下调

高脂饮食和 STZ 联合诱导 T2DM 小鼠造模成功后,对 WT 和 T2DM 组小鼠在背部制造 6 mm 在体的皮肤圆形损伤,于制造创面后第 8 天,取 WT 空白组和 T2DM 空白组小鼠的皮肤及 WT 对照组和 T2DM 对照组小鼠创面周围 2 mm 的皮肤组织,检测 KRT17 的表达水平。结果显示,在未制造创面的情况下,WT 和 T2DM 小鼠皮肤组织中 KRT17 的表达水平无显著差别;制造在体皮肤创面后,WT 和 T2DM 小鼠创面周围皮肤组织中 KRT17 的表达水平均显著升高 ($P<0.001$, $P<0.01$,图 2);但与 WT 对照组小鼠相比,T2DM 小鼠创面周围皮肤组织中

KRT17 的表达显著降低 ($P<0.001$,图 2)。IF 染色的检测结果与 Western blot 结果趋势一致,即在未制造创面情况下,KRT17 主要定位在毛囊中,WT 和 T2DM 小鼠无显著差异;制造在体皮肤创面后,WT 和 T2DM 小鼠创面近端的角质形成细胞中 KRT17 的表达均显著升高,但与 WT 小鼠相比,T2DM 小鼠创面近端的角质形成细胞中 KRT17 的表达水平较低(图 2C)。

2.3 Krt17 基因敲除减慢 T2DM 小鼠的创面愈合速率

于制造创面后的第 0、2、4、6 和 8 天分别对 4 组小鼠的创面拍照记录,运用 ImageJ 软件定量分析创面愈合速率发现,在正常生理情况下,与 WT 组小鼠



注:A:Western blot 检测 KRT17 在 WT 空白组和 T2DM 空白组(未制造创面)皮肤组织及 WT 对照组和 T2DM 对照组小鼠创面周围皮肤组织中的表达,内参:GAPDH;B:运用 ImageJ 软件分析密度定量 KRT17 的相对表达水平;C:IF 检测 KRT17 在 WT 和 T2DM 空白组及 WT 和 T2DM 对照组小鼠创面周围皮肤组织中的表达。蓝色:DAPI,细胞核;绿色:KRT17。与 WT 空白组和 T2DM 空白组相比, $^{###}P<0.01$, $^{####}P<0.001$;与 WT 对照组相比, $^{***}P<0.001$ 。

图 2 KRT17 在正常小鼠和 T2DM 小鼠创面愈合皮肤中的表达

Note. A, Expression of KRT17 in skin tissue of WT blank group, T2DM blank group, WT control group and T2DM control group mice detected by Western blot, using GAPDH as normalization. B, Relative expression level of KRT17 quantified by densitometric analysis using ImageJ software. C, Expression of KRT17 in skin tissue of WT blank group, T2DM blank group, WT control group and T2DM control group mice detected by IF. Blue, DAPI, cell nucleus. Green, KRT17. Compared with WT blank group and T2DM blank group, $^{###}P<0.01$, $^{####}P<0.001$. Compared with WT control group, $^{***}P<0.001$.

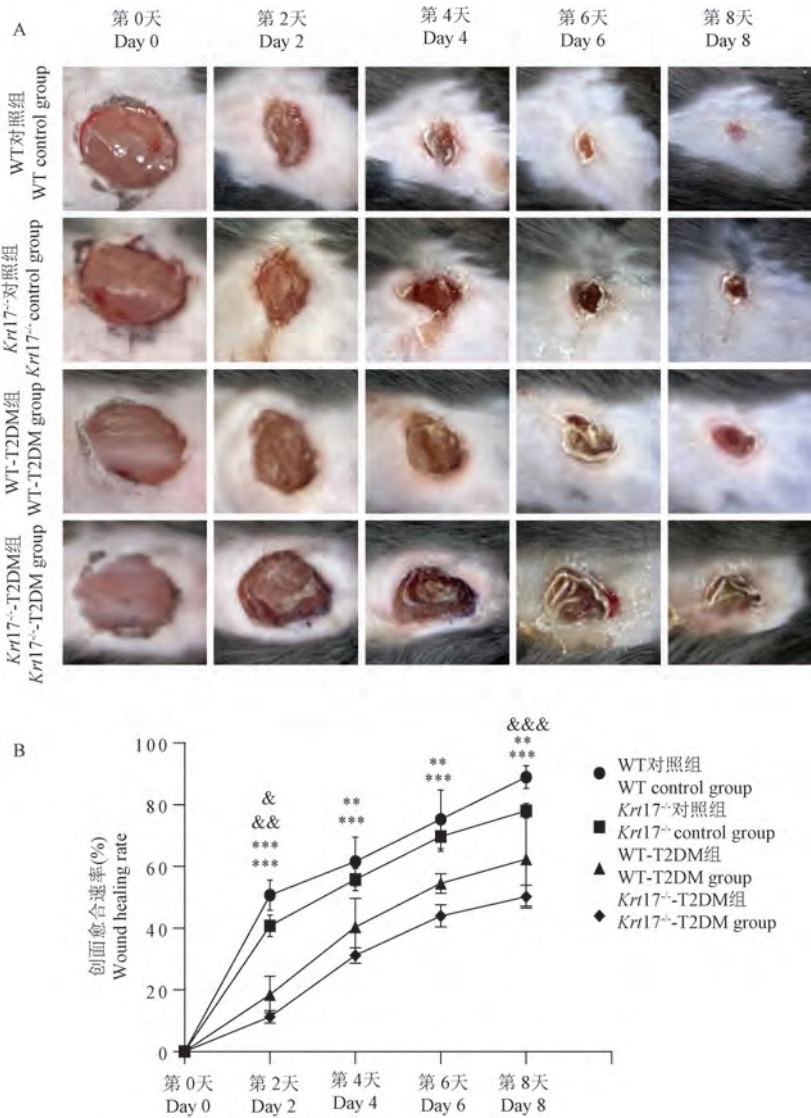
Figure 2 Expression of KRT17 in wound healing skin tissue of normal and T2DM mice

相比,*Krt17*^{-/-}组小鼠的创面愈合速率显著减慢,制造创面后的第 8 天,WT 组小鼠创面愈合率达到 88.94%,而 *Krt17*^{-/-} 组小鼠仅为 78.06% ($P < 0.001$),表明在正常生理情况下,*Krt17* 基因敲除对正常的创面愈合产生一定的影响。在糖尿病病理情况下,与同一品系的对照组小鼠创面愈合率相比,WT-T2DM 和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 模型小鼠的创面愈合速率分别显著减慢 37.65% 和 49.83% ($P < 0.01$, $P < 0.001$),表明 T2DM 存在创面愈合障碍;此外,与

WT-T2DM 组小鼠相比,*Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠的创面愈合速率显著减慢,表明 *Krt17* 基因敲除加剧了 T2DM 创面愈合障碍的表型(图 3)。

2.4 *Krt17* 基因敲除小鼠创面病理组织学变化

于制造创面后第 8 天,分别取 4 组小鼠创面周围 2 mm 的皮肤组织,进行病理组织学表型分析(图 4)。结果显示,对照组:WT 小鼠创面几乎完全愈合,新生表皮较周围组织无显著差别;*Krt17*^{-/-}组小鼠仍可见明显的创面床,且创面新生表皮较周围组

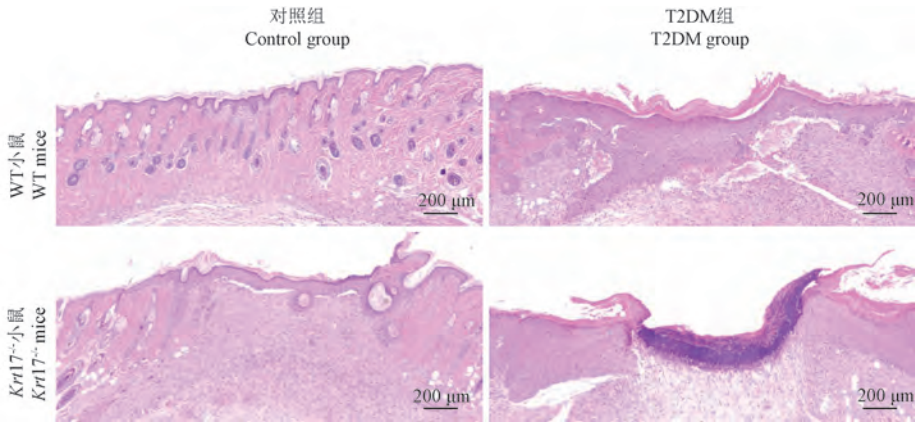


注:A:制造创面后的第 0、2、4、6 和 8 天的照片;B:运用 ImageJ 软件定量分析创面愈合速率。与 WT 对照组和 *Krt17*^{-/-} 对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 WT 对照组和 WT-T2DM 组相比, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ 。

图 3 WT 和 *Krt17*^{-/-} 小鼠在正常生理和糖尿病病理情况下的创面愈合速率

Note. A, Photos taken on days 0, 2, 4, 6 and 8 after wound made. B, Wound healing rate quantified by ImageJ software. Compared with WT control group and *Krt17*^{-/-} control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with WT control group and WT-T2DM group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$.

Figure 3 Wound healing rate in WT and *Krt17*^{-/-} mice under normal physiology and diabetic pathology



注:创面周围 2 mm 的皮肤 HE 染色观察。

图 4 WT 和 *Krt17*^{-/-}小鼠在正常生理和糖尿病病理情况下的皮肤病理组织学表型分析

Note. Magnification of HE-stain sections of skin tissue around wound 2 mm.

Figure 4 Histopathological phenotyping analysis of WT and *Krt17*^{-/-} mice under normal physiology and diabetic pathology

织显著增厚。T2DM 组:与对照组小鼠相比,WT-T2DM 组和 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠创面愈合均显著延迟,且 *Krt17*^{-/-}-T2DM 组小鼠创面近端有较多的炎性细胞浸润,创面局部仍处于持续的炎症状态。

3 讨论

本研究发现,在 T2DM 小鼠创面近端皮肤组织中,KRT17 的表达水平较 WT 对照组小鼠显著降低;Charles 等^[14]利用互补的 DNA 微阵列技术比较愈合的和未愈合的腿慢性伤口的差异表达基因时也发现,与正常皮肤创面愈合相比,在未愈合的慢性伤口中,*Krt17* 是前 15 个表达下调的基因之一;提示 KRT17 表达水平的下调可能阻碍了 T2DM 慢性伤口的创面愈合。随后,在对 WT 和 *Krt17*^{-/-}小鼠进行 T2DM 创面造模后的观察中发现,与 WT 小鼠相比,*Krt17*^{-/-}小鼠表现出明显的创面愈合延迟和炎症反应持续的表型,说明 *Krt17* 基因敲除加剧了 T2DM 小鼠的创面愈合障碍。

创面愈合由 4 个高度整合和重叠的阶段组成:止血、炎症、增殖和组织重构^[15],表皮层的角质形成细胞、真皮层的成纤维细胞和微血管内皮细胞^[16]以及各种炎症免疫细胞共同参与一系列的细胞和分子创面愈合过程。当皮肤发生损伤时,角质形成细胞能迅速被激活并产生各种重要的皮肤屏障损伤相关分子,吸引和/或激活免疫细胞对损伤信号提供及时和长期的保护。同时,创面近端的角质形成细胞也暂时中止末端分化,细胞大小形状、细胞之

间的联系和细胞与基质间的黏附等方面的蛋白翻译也发生巨大变化,为创面愈合的迁移和增殖做准备^[17]。

研究证实,KRT17 是关键的皮肤屏障损伤相关的重要分子之一^[17],皮肤损伤时,角质形成细胞中的 KRT17 迅速被激活,持续表达至创面愈合的重构阶段,直至皮肤屏障功能恢复。激活的磷酸化的 KRT17 与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, Mtor) 通路的正调控因子 14-3-3σ 蛋白特异性相互作用^[18],通过激活 Mtor—蛋白激酶 B (protein kinases B, AKT) 通路促进蛋白质的合成和角质形成细胞的增殖,促进创面愈合^[19]。本研究中 *Krt17*^{-/-}-T2DM 小鼠表现出明显的创面愈合延迟,可能与 *Krt17* 基因缺失后,Mtor-AKT 信号下调有关;此外,*Krt17*^{-/-}-T2DM 小鼠创面局部持续的炎症状态也是导致其创面愈合障碍的一个重要因素^[20]。

如前所述,角蛋白是创面愈合过程中角质形成细胞产生的第一波重要的皮肤屏障损伤相关的分子,为细胞提供锚定骨架、调节角质形成细胞增殖/分化和炎症反应^[21],在创面愈合中发挥重要作用。研究发现,角蛋白敷料可通过增强小鼠角质形成细胞的活化从而加速创面愈合和再上皮化^[22-23]。由此可见,角蛋白的补充在促进创面愈合方面有很大的前景。本研究发现 KRT17 在 T2DM 小鼠创面中表达下调,且敲除 *Krt17* 加剧了 T2DM 小鼠的创面愈合,这一发现为角蛋白在临床上治疗 T2DM 创面愈合障碍的应用研发提供了一定的理论和实验依据。

参考文献:

[1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183; 109119.

[2] de Macedo GMC, Nunes S, Barreto T. Skin disorders in diabetes mellitus: an epidemiology and physiopathology review [J]. Diabetol Metab Syndr, 2016, 8(1): 63.

[3] Shen CB, Qian X, Yu RX, et al. Skin diseases in the Da Qing Diabetes Study: a cross-sectional study [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(10): 1191-1198.

[4] Lima AL, Illing T, Schliemann S, et al. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus: a review [J]. Am J Clin Dermatol, 2017, 18(4): 541-553.

[5] Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes [J]. JAMA, 2005, 293(2): 217-228.

[6] Burgess JL, Wyant WA, Abdo Abujamra B, et al. Diabetic wound-healing science [J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(10): 1072.

[7] Yang L, Zhang S, Wang G. Keratin 17 in disease pathogenesis: from cancer to dermatoses [J]. J Pathol, 2019, 247(2): 158-165.

[8] Samuelov L, Smith FJD, Hansen CD, et al. Revisiting pachyonychia congenita: a case-cohort study of 815 patients [J]. Br J Dermatol, 2020, 182(3): 738-746.

[9] Lin Y, Zhang W, Li B, et al. Keratin 17 in psoriasis: current understanding and future perspectives [J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 128; 112-119.

[10] Chang T, Sun L, Wang Y, et al. Inhibition of keratin 17 expression with antisense and RNAi strategies: exploring novel therapy for psoriasis [J]. Exp Dermatol, 2011, 20(7): 555-560.

[11] Han L, Li T, Du M, et al. Beneficial effects of *Potentilla discolor* bunge water extract on inflammatory cytokines release and gut microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice [J]. Nutrients, 2019, 11(3): 670.

[12] Li T, Chang R, Zhang H, et al. Water extract of *Potentilla discolor* bunge improves hepatic glucose homeostasis by regulating gluconeogenesis and glycogen synthesis in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice [J]. Front Nutr, 2020, 7; 161.

[13] Yuan Q, Zhan B, Chang R, et al. Antidiabetic effect of casein glycomacropeptide hydrolysates on high-fat diet and STZ-induced diabetic mice via regulating insulin signaling in skeletal muscle and modulating gut microbiota [J]. Nutrients, 2020, 12(1): 220.

[14] Charles CA, Tomic-Canic M, Vincek V, et al. A gene signature of nonhealing venous ulcers: potential diagnostic markers [J]. J Am Acad Dermatol, 2008, 59(5): 758-771.

[15] Sawaya AP, Stone RC, Brooks SR, et al. Deregulated immune cell recruitment orchestrated by FOXM1 impairs human diabetic wound healing [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4678.

[16] Zhang S, Ke Z, Yang C, et al. High glucose causes distinct expression patterns of primary human skin cells by RNA sequencing [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12; 603645.

[17] Zhang X, Yin M, Zhang LJ. Keratin 6, 16 and 17-critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis [J]. Cells, 2019, 8(8): 807.

[18] Beck T, Hall MN. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors [J]. Nature, 1999, 402(6762): 689-692.

[19] Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth [J]. Nature, 2006, 441(7091): 362-365.

[20] Hoke GD, Ramos C, Hoke NN, et al. Atypical diabetic foot ulcer keratinocyte protein signaling correlates with impaired wound healing [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016; 1586927.

[21] Toivola DM, Boor P, Alam C, et al. Keratins in health and disease [J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 32; 73-81.

[22] Pechter PM, Gil J, Valdes J, et al. Keratin dressings speed epithelialization of deep partial-thickness wounds [J]. Wound Repair Regen, 2012, 20(2): 236-242.

[23] Konop M, Sulejczak D, Czuwara J, et al. The role of allogenic keratin-derived dressing in wound healing in a mouse model [J]. Wound Repair Regen, 2017, 25(1): 62-74.

[收稿日期] 2022-10-27

王文博,汪清云,郭卫,等. LAMC2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (10): 61-70.

Wang WB, Wang QY, Guo W, et al. LAMC2 regulates the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 61-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.009

LAMC2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖的研究

王文博¹,汪清云¹,郭 卫²,夏 玲^{1*}

(1.武汉大学中南医院腹部肿瘤放疗科,武汉 430071;2.武汉大学泰康医学院(基础医学院)病理教研室,武汉 430071)

【摘要】 目的 探讨层粘连蛋白 $\gamma 2$ (LAMC2) 通过 PI3K/Akt 对胃癌细胞增殖的影响。**方法** 利用癌症基因组图谱 (TCGA) 及基因表达综合数据库 (GEO) 联合分析胃癌中与细胞增殖相关差异基因,根据差异倍数确定候选基因 *LAMC2*。UALCAN 及 Kaplan-Meier plotter 在线数据库分析 *LAMC2* 在胃癌中的表达及其与临床病理特征的关系,采用蛋白印迹 (Western blot) 法检测人胃癌细胞株 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 中 *LAMC2* 的表达。构建 *LAMC2* 敲减胃癌细胞模型,Western blot 检测 *LAMC2* 的表达,确定模型构建效果。将 HGC-27 及 NCI-N87 细胞分成空白对照 (Control) 组、阴性对照 (si-NC) 组及 *LAMC2* 敲减 (si-LAMC2) 组,5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 及平板克隆实验分析细胞增殖及克隆形成能力,Western blot 检测细胞增殖蛋白 (CyclinD1、PCNA、c-Myc) 表达及 PI3K/Akt 通路激活情况。**结果** *LAMC2* 是胃癌中与细胞增殖相关的差异倍数最大的差异基因,其在胃癌中的表达显著上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床病理相关。*LAMC2* 在人胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 中的表达均显著高于 GES-1 细胞 (均 $P < 0.01$)。与 si-NC 组比较,si-LAMC2 显著抑制 HGC-27 及 NCI-N87 细胞增殖,降低细胞克隆形成率 ($P < 0.01$),细胞增殖蛋白 (CyclinD1、PCNA 及 c-Myc) 表达均被显著降低 (均 $P < 0.01$),PI3Kp85 及 Akt 磷酸化水平均被显著下调 (均 $P < 0.01$)。**结论** *LAMC2* 在胃癌中的表达上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床病理相关,其可通过激活 PI3K/Akt 通路促进细胞增殖。

【关键词】 胃癌;层粘连蛋白 $\gamma 2$;细胞增殖;磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0061-10

LAMC2 regulates the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway

WANG Wenbo¹, WANG Qingyun¹, GUO Wei², XIA Ling^{1*}

(1. Department of Medical Oncology and Radiotherapy, Abdominal Tumor Division, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China. 2. Wuhan University TaiKang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan 430071)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of laminin subunit $\gamma 2$ (LAMC2) on the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt pathway. **Methods** Differentially expressed genes related to gastric cancer cell proliferation were analyzed in the cancer genome atlas and gene expression omnibus databases. The candidate gene *LAMC2* was identified in accordance with the multiple of differential. UALCAN and Kaplan-Meier Plotter online databases were used to analyze *LAMC2* expression in gastric cancer and its relationship with clinicopathological features. Western blot was

[作者简介]王文博(1983—),男,博士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤的综合治疗,肿瘤的放射敏感性。
E-mail:wangwenbo@whu.edu.cn

[通信作者]夏玲(1977—),女,博士,研究方向:消化道肿瘤的综合治疗,胃癌的精准治疗。E-mail:christine_xl@163.com

used to detect LAMC2 in human gastric cancer cell lines HGC-27, NCI-N87 and SNU-1. An LAMC2 knockout gastric cancer cell model was established, and LAMC2 was detected by Western blot to determine the effects of model establishment. HGC-27 and NCI-N87 cells were divided into blank control (Control), negative control group (si-NC), and LAMC2 knockout (si-LAMC2) group. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine and colony formation assays were used to evaluate cell proliferation and clonality. Western blot was used to assess expression of cell proliferation-related proteins (Cyclin D1, PCNA and c-Myc) and activation of the PI3K/Akt pathway. **Results** LAMC2 was the most differentially expressed gene associated with cell proliferation in gastric cancer, and its expression was significantly upregulated in gastric cancer, which correlated to the clinicopathological characteristics of the gastric cancer stage, grade, and survival. The expression of LAMC2 in human gastric cancer cells (HGC-27, NCI-N87, SNU-1) was significantly higher than that in GES-1 cells (all $P < 0.01$). Compared with the si-NC group, si-LAMC2 significantly inhibited HGC-27 and NCI-N87 cell proliferation, decreased the colony formation rate ($P < 0.01$), and significantly decreased the expression of cell proliferation-related proteins (CyclinD1, PCNA and c-Myc) (all $P < 0.01$). PI3Kp85 and Akt phosphorylation levels were also significantly downregulated (all $P < 0.01$). **Conclusions** Upregulation of LAMC2 expression in gastric cancer is related to the clinicopathological characteristics of the gastric cancer stage, grade, and survival, and promotes cell proliferation by activation of the PI3K/Akt pathway.

[Keywords] gastric cancer; laminin $\gamma 2$; cell proliferation; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

胃癌 (gastric cancer) 是常见的恶性消化道肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的重要原因^[1]。虽然目前的诊断手段上有较大的改进,但大部分胃癌发病比较隐匿,确诊时,患者已处于中晚期,这是导致胃癌患者生存率低、预后差的主要原因^[2-3],因此,筛选胃癌早期诊断标志物仍是胃癌的研究热点^[3-4]。层粘连蛋白 $\gamma 2$ (laminin subunit gamma 2, LAMC2) 是异三聚体糖蛋白层黏连蛋白 332 (laminin-332, Ln-332) 的 $\gamma 2$ 亚基,是上皮基底膜的基本成分,调节细胞粘附、运动,但越来越多的研究发现 LAMC2 与肿瘤的发生及进展关系密切^[5]。LAMC2 在胰腺导管癌、卵巢癌、喉癌及肺癌等多种肿瘤中均高表达,促进细胞增殖、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT),降低肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,已成为多种肿瘤的候选诊治靶标^[6-9]。但目前, LAMC2 的表达是否影响胃癌细胞的增殖,目前报道较少。本研究利用肿瘤基因图谱 (cancer genome atlas, TCGA)、基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 等数据库,结合细胞生物学的检测手段,观察 LAMC2 的表达对人胃癌细胞增殖的影响及可能调控机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

人胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 均购自于国家模式与特色实验细胞资源库,由本实验室保存;GES-1 人胃黏膜上皮细胞购自于赛百慷 (上海)

生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 细胞培养基 (货号:11875101) 及优质胎牛血清 (货号:16000-044) 购自于美国 Gibco 公司; LipofectamineTM 3000 转染试剂盒 (货号: L3000015) 购自美国 Thermo Fisher 公司; RIPA 裂解液 (货号: LS-W-03268)、PBS (货号: LS-P-0106)、甲醇 (货号: LS-H-0248)、结晶紫染色液 (货号: LS-H-012)、4% 多聚甲醛 (货号: LS-P-113) 及 Western blot 试剂盒 (货号: LS-H-128) 购自于武汉灵思生物技术有限公司; LAMC2 (货号: ab274376)、PCNA (货号: ab29)、PI3 Kinase p85 α (phospho Y607) (货号: ab182651)、pan-AKT (货号: ab8805) 及 AKT (phospho T308) (货号: ab38449) 抗体购自于英国 Abcam 公司; CyclinD1 (货号: 26939-1-AP)、GAPDH (货号: 60004-1-Ig)、c-Myc (货号: 10828-1-AP) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (货号: APC-65210) 购自于武汉三鹰生物技术有限公司; 细胞培养所需 6 孔板、25 cm² 培养瓶、96 孔板及 15 mL 离心管购自美国 Corning 公司。阴性对照及 LAMC2 敲减 siRNA 由广州锐博生物科技有限公司设计及合成,序列参考课题组前期研究^[9]。

BB150 型 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司; Lightcycler480 型荧光定量 PCR 仪购自美国罗氏公司; DM3000 正置荧光显微镜购自德国莱卡; Varioskan LUX 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司; Mini Gel Tank 型垂直电泳槽购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 胃癌差异表达的基因筛选

基于 $|\log FC| > 2$ 及 $P < 0.05$ 标准, edgeR R 分析 TCGA 及 GEO 数据库中 GSE122530 数据, 获得胃癌差异表达基因^[9]。通过 CTD 数据库 (comparative toxicogenomics database, CTD, <http://ctdbase.org/>) 检索与细胞增殖相关的基因。将 TCGA、GEO 所获得的差异基因与 CTD 数据库所检索得到的细胞增殖相关基因联合分析, 以 TCGA 及 GEO 中上调倍数最大的基因为候选基因。利用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 及 Kaplan Meier plotter 数据库 (<http://kmplot.com/analysis/>) 分析候选基因表达与胃癌临床特征的关系。

1.3.2 细胞复苏及培养

GES-1、HGC-27、NCI-N87 及 SNU-1 细胞复苏后, 均利用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 μ g/mL) 的 RPMI 1640 培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 正常更换培养基, 待细胞数量铺满培养瓶 80% 左右时, 按照 1 : 2~3 的比例传代。

1.3.3 Western blot 检测 LAMC2 在人胃癌细胞中的表达

参考课题组前期文献方法^[9], 收集 GES-1 细胞及人胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1), RIPA 裂解液 (RIPA Lysis Buffer) 裂解, 提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 每组细胞按照 20 mg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳完成后转印至 PVDF 膜上, 以 GAPDH (1 : 10 000) 为对照, LAMC2 (1 : 800) 抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的兔抗二抗 (1 : 1000), 37℃ 孵育 2 h, TBST 漂洗, 加入 ECL 发光液, 凝胶成像系统拍照, ImageJ 2x 软件分析各细胞中 LAMC2 及 GAPDH 的灰度值, 以 LAMC2 灰度值/GAPDH 灰度值的比值代表各细胞中 LAMC2 的相对表达量。

1.3.4 LAMC2 敲减胃癌细胞模型构建

按照 1×10^5 /孔处于对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87) 接种于 6 孔板中, 待细胞铺满 6 孔板底部时, 参照 LipofectamineTM 3000 转染试剂盒的说明书, Control 组给予 4 μ L LipofectamineTM 3000 + 196 μ L OptiRPMI 处理; 转染组处理如下: 4 μ L LipofectamineTM 3000 + 196 μ L Opti-MEM 孵育 5 min 后, 将其分别加入 40 μ L si-NC siRNA + 60 μ L Opti-

MEM 和 40 μ L si-LAMC2 siRNA + 60 μ L Opti-MEM 的混合液中, 混合后静置 30 min, 将混合液分别添加至对应的 6 孔板中, 6 h 更换成新的完全培养基。转染 24 h 后, 参考文献^[10], Western blot 检测 LAMC2 的表达, 与 Control 组、si-NC 组比较, LAMC2 表达差异有统计学意义, 表示 LAMC2 敲减胃癌细胞模型构建成功; 同时, 比较 si-LAMC2-1# 及 si-LAMC2-2# 的敲减效率, 筛选敲减效果最明显的 siRNA 进行后续实验。

1.3.5 EdU 检测胃癌细胞增殖能力

按照 1×10^5 /孔处于对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87) 接种于 6 孔板中, 将胃癌细胞分成: Control 组、si-NC 组及 si-LAMC2 组; 各组细胞处理参照 1.3.4, 24 h 后, 每孔细胞中加入总浓度为 20 μ mol/L 的 EdU 工作液, 置于细胞培养箱中继续培养 2 h 后, 吸去培养基, 37℃ 预热 PBS 漂洗 3 次, 每次 3~5 min, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 荧光显微镜拍照, 计算每组细胞中阳性细胞占总细胞数百分比。

1.3.6 平板克隆实验检测胃癌细胞克隆形成能力

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^3 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。细胞培养 2 周后, 观察到每组培养孔形成团状细胞时, PBS 清洗 3 次, 5 min/次, 4℃ 预冷甲醇固定细胞 20 min, 结晶紫染色 1 h, 超纯水漂洗后晾干, 倒置显微镜拍照, 计数每组细胞中的总克隆数。

1.3.7 Western blot 检测胃癌细胞增殖相关蛋白表达

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。24 h 后, 参考文献^[9], 以 GAPDH (1 : 10 000) 为对照, PCNA (1 : 800)、CyclinD1 (1 : 800) 及 c-Myc (1 : 1000) 为一抗, Western blot 检测, 凝胶成像系统拍照, ImageJ2x 软件分析各组细胞中各目的蛋白 (PCNA、CyclinD1、c-Myc) 及 GAPDH 的灰度值, 以各目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值的比值分别代表各目的蛋白相对表达量。

1.3.8 Western blot 检测胃癌细胞 PI3K/Akt 通路激活情况

取对数生长期的胃癌细胞 (HGC-27、NCI-N87), 按照 1×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 分组同 1.3.5。参考文献^[9], PI3Kp85 (1 : 1000)、PI3Kp85 (phospho Y607) (1 : 500)、Akt (1 : 1000) 及 AKT

(phospho T308)(1 : 800)为一抗,Western blot 检测各组胃癌细胞中 PI3Kp85、PI3Kp85 (phospho Y607)、Akt 及 AKT(phospho T308)的相对表达量,评价各组细胞 PI3K/Akt 通路激活情况。

1.4 统计学方法

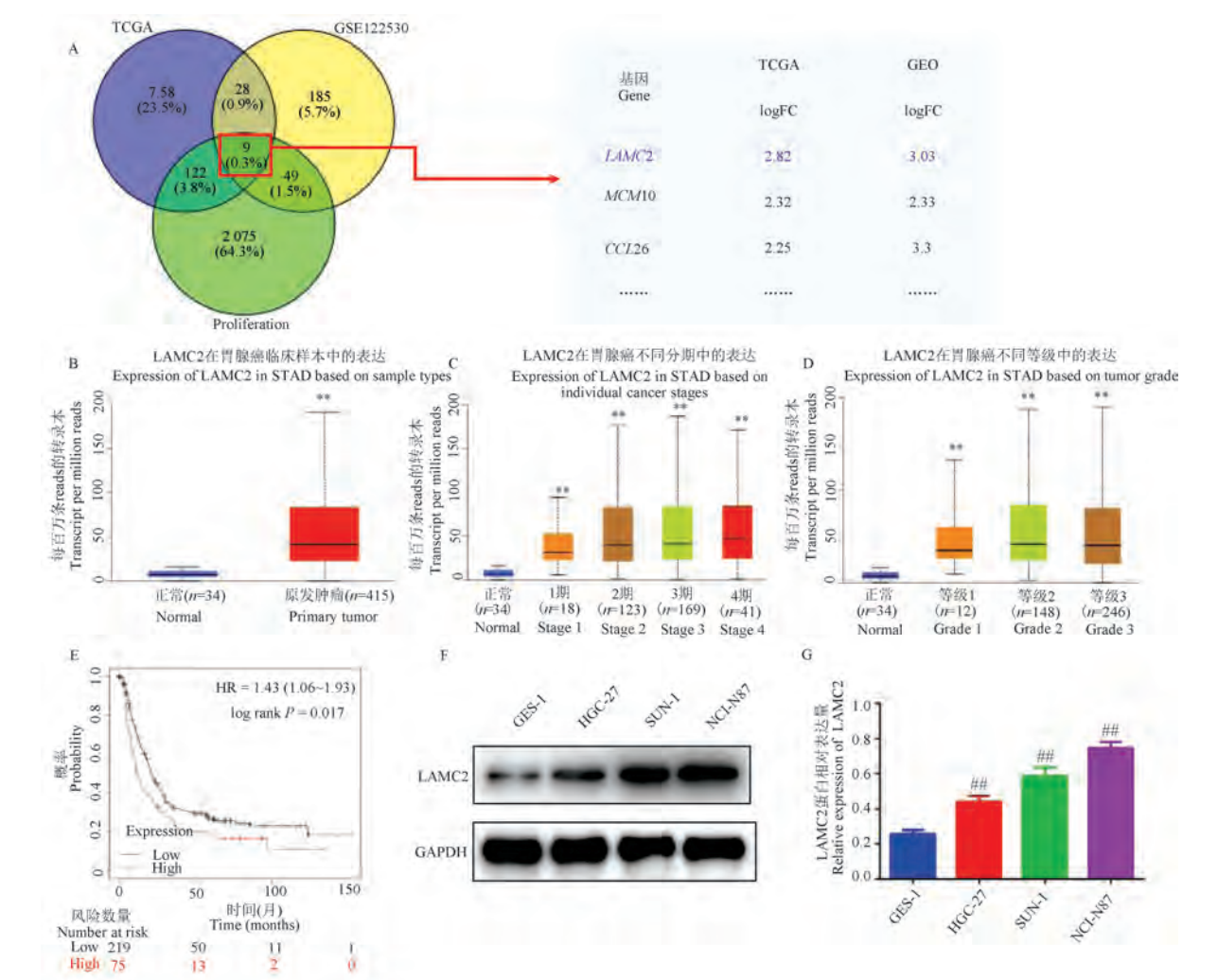
GraphPad Prism 6.0 进行数据统计及绘图,所有实验数据重复 3 次,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较利用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 *P* <

0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAMC2 在胃癌细胞中的表达

TCGA 及 GSE122530 数据联合分析发现,9 个基因与细胞增殖相关,其中 *LAMC2* 上调倍数最大(图 1A),为此,*LAMC2* 为研究的候选基因。胃腺癌是胃癌主要病理表现形式^[1-3],利用 UALCAN 及 Kaplan Meier plotter 数据库分析发现,*LAMC2* 在胃



注:A:通过 TCGA、GEO 及细胞增殖相关基因联合分析获得包括 *LAMC2* 在内的 9 个候选基因;B:TCGA 分析 *LAMC2* 在胃癌中表达;C: *LAMC2* 与胃癌分期关系;D: *LAMC2* 与胃癌分级的关系;E: *LAMC2* 与胃癌生存的关系;F、G:Western blot 检测胃癌细胞中 *LAMC2* 表达。与正常组比较, ** *P* < 0.01;与 GES-1 细胞比较, ## *P* < 0.01。

图 1 LAMC2 在胃癌中的表达及其与临床病理特征相关性分析

Note. A, Nine genes including *LAMC2* were identified as differential expression candidate genes in gastric cancer by combined screening of TCGA, GEO and cell proliferation-related genes. B, TCGA analysis of *LAMC2* expression in gastric cancer. C, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer stage. D, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer grade. E, Relationship between *LAMC2* and gastric cancer survival. F/G, Expression of *LAMC2* in gastric cancer cells was detected by Western blot. Compared with the normal group, ** *P* < 0.01. Compared with GES-1 cells, ## *P* < 0.01.

Figure 1 LAMC2 expression in gastric cancer and its correlation with clinicopathological features

腺癌中的表达显著升高 ($P < 0.01$), 见图 1B。*LAMC2* 表达与胃腺癌的分期 ($P < 0.01$)、分级 ($P < 0.01$) 及生存密切相关 ($P < 0.05$), 如图 1C ~ 1E。Western blot 检测发现, 胃癌细胞中 (HGC-27、NCI-N87、SNU-1) 中 *LAMC2* 的表达显著高于 GES-1 细胞 ($F = 93.780, P = 0.000$), 如图 1F、1G。其中, HGC-27 细胞中 *LAMC2* 表达量最低, NCI-N87 细胞中 *LAMC2* 表达量最高, 同时, 参考文献^[11-12]及中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库及本实验室胃癌细胞种源保藏情况, 后续实验选用 HGC-27 及 NCI-N87 细胞进行研究。

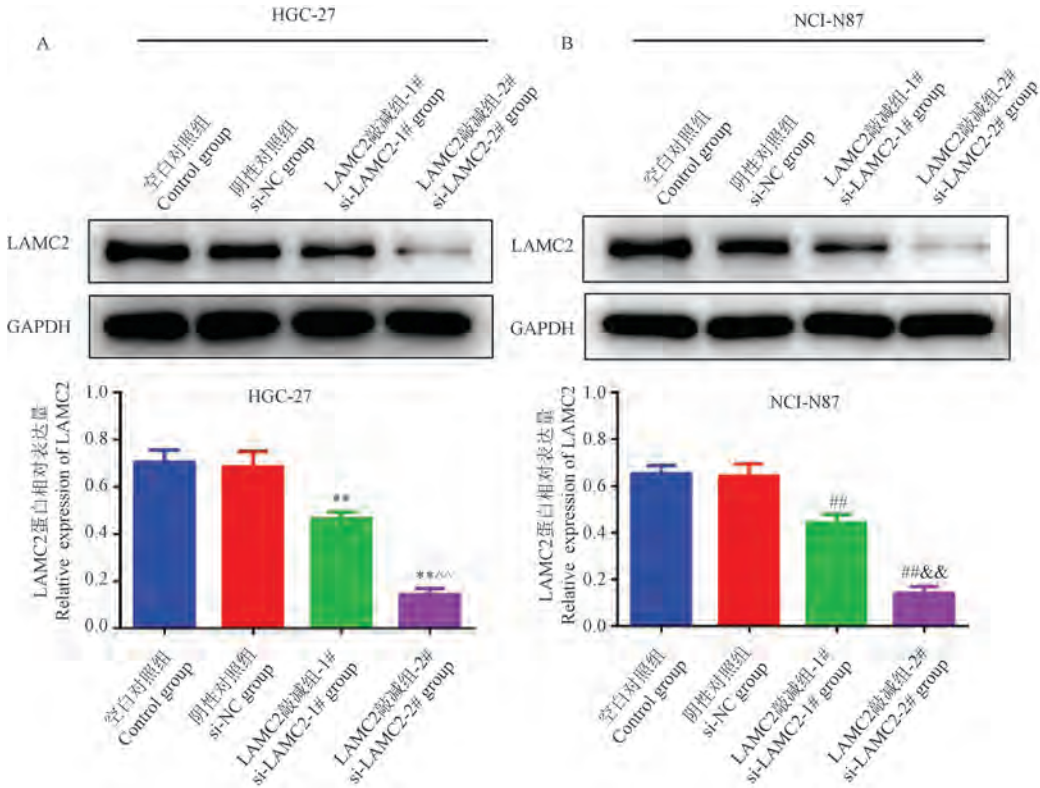
2.2 LAMC2 在 si-LAMC2 组中胃癌细胞中的表达

Western blot 检测发现, 在 HGC-27 细胞中, si-NC 组中 *LAMC2* 的表达与 Control 组无显著变化 ($t = 0.379, P = 0.724$); si-LAMC2-1#, si-LAMC2-2# 胃癌细胞中 *LAMC2* 的表达均显著低于 si-NC 组 ($t =$

6.774、16.290, $P = 0.002、0.000$); 与 si-LAMC2-1# 比较, si-LAMC2-2# 中 *LAMC2* 蛋白表达显著降低 ($t = 13.610, P = 0.000$), 如图 2A 所示。在 NCI-N87 细胞中, 得到类似的结果。同时, 在 HGC-27 及 NCI-N87 细胞中, si-LAMC2-2# 具有更高的抑制效率, 后续实验采用 si-LAMC2-2# 构建 *LAMC2* 敲减胃癌细胞模型。如图 2 所示。

2.3 LAMC2 对胃癌细胞增殖的影响

HGC-27 细胞中, si-NC 组细胞 EdU 阳性率与 Control 组无显著差异 ($t = 1.549, P = 0.196$); si-LAMC2 组细胞 EdU 阳性率较 si-NC 组显著减少 ($t = 6.540, P = 0.002$)。NCI-N87 细胞中, si-NC 组细胞 EdU 阳性率与 Control 组无显著差异 ($t = 0.126, P = 0.906$); si-LAMC2 组细胞 EdU 阳性率较 si-NC 组显著降低 ($t = 8.352, P = 0.001$)。以上暗示抑制 *LAMC2* 后, 可显著抑制胃癌细胞增殖。见图 3, 表 1。



注:A: *LAMC2* 抑制后, Western blot 检测 HGC-27 细胞中 *LAMC2* 表达; B: *LAMC2* 抑制后, Western blot 检测 NCI-N87 细胞中 *LAMC2* 表达。在 HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 si-LAMC2-1# 比较, ~ $P < 0.01$; 在 NCI-N87 细胞中, 与阴性对照组比较, ### $P < 0.01$; 与 si-LAMC2-1# 比较, && $P < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测胃癌细胞中 *LAMC2* 表达

Note. A, After *LAMC2* inhibition, Western blot analysis of *LAMC2* expression in HGC-27 cells. B, *LAMC2* expression in NCI-N87 cells was detected by Western blot after *LAMC2* inhibition. In HGC-27 cells, compared with the si-NC group, ** $P < 0.01$. Compared with si-LAMC2-1#, ~ $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ### $P < 0.01$. Compared with si-LAMC2-1#, && $P < 0.01$

Figure 2 Western blot analysis of *LAMC2* expression in gastric cancer cells

2.4 LAMC2 对胃癌细胞克隆形成能力的影响

通过细胞克隆数量检测分析:HGC-27 细胞中, si-NC 组细胞克隆数与 Control 组比较,无显著变化($t=0.519, P=0.631$);与 si-NC 组比较, si-LAMC2 组较 si-NC 组,细胞克隆数显著减少($t=11.420, P<0.01$)。NCI-N87 细胞中, si-NC 组细胞克隆数与 Control 组比较,无显著变化($t=0.484, P=0.654$); si-LAMC2 组细胞克隆数较 si-NC 组,显著降低($t=12.760, P<0.01$)。见图 4,表 2。

2.5 LAMC2 对胃癌细胞增殖蛋白表达的影响

Western blot 检测发现:HGC-27 细胞中, Control 组 PCNA、CyclinD1 及 c-Myc 的表达分别为(0.58 ± 0.05)、(0.68 ± 0.03)、(0.66 ± 0.03), si-NC 组 CyclinD1、PCNA 及 c-Myc 的表达分别为(0.59 ± 0.02)、(0.67 ± 0.03)、(0.65 ± 0.03), si-LAMC2 组 CyclinD1、PCNA 及 c-Myc 的表达分别为(0.35 ± 0.02)、(0.26 ± 0.01)、(0.32 ± 0.04),与 si-NC 组比较, si-LAMC2 显著抑制 CyclinD1 ($t=27.630, P<0.01$)、PCNA ($t=11.340, P<0.01$) 及 c-Myc ($t=$

11.340, $P<0.01$) 的表达。NCI-N87 细胞中得到类似的结果。见图 5。

2.6 LAMC2 对胃癌细胞 PI3K/Akt 通路激活的影响

如图 6 所示, Western blot 检测发现:HGC-27 细胞中, Control 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为(0.66 ± 0.02)、(0.56 ± 0.04); si-NC 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为(0.65 ± 0.01)、(0.54 ± 0.06); si-LAMC2 组 PI3Kp85 (phospho Y607) 及 Akt (phospho T308) 的表达分别为(0.24 ± 0.03)、(0.18 ± 0.04),与 Control 组比较, si-NC 对 PI3Kp85 (phospho Y607) ($t=1.331, P=0.254$) 及 Akt (phospho T308) ($t=0.308, P=0.773$) 的表达无显著影响。与 si-NC 组比较, si-LAMC2 显著抑制 PI3Kp85 (phospho Y607) ($t=20.570, P<0.01$) 及 Akt (phospho T308) ($t=8.437, P<0.01$) 的表达显著降低。NCI-N87 细胞中得到类似的结果。

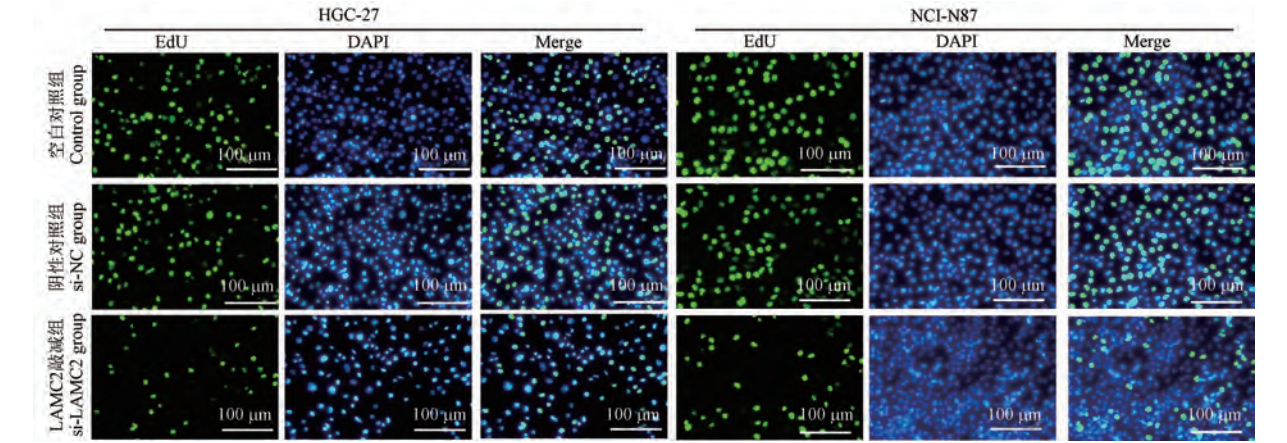


图 3 EdU 检测细胞增殖

Figure 3 Cell proliferation detected by EdU

表 1 各组 EdU 阳性细胞比例($\bar{x} \pm s$)		
Table 1 Edu-positive cells rate in each group		
组别 Groups	HGC-27 EdU 阳性率(%) Edu positive cell rate	NCI-N87 EdU 阳性率(%) Edu positive cell rate
空白对照组 Control group	71.12±6.55	66.34±6.56
阴性对照组 si-NC group	63.00±6.08	65.33±6.43
LAMC2 敲减组 si-LAMC2 group	30.67±6.03**	25.67±5.13##
F	35.280	43.380
P	0.000	0.000

注:HGC-27 细胞中,与阴性对照组比较, ** $P<0.01$; NCI-N87 细胞中,与阴性对照组比较, ## $P<0.01$ 。

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P<0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P<0.01$.

表 2 各组细胞克隆数量($\bar{x} \pm s$)		
Table 2 Number of cell clones in each group		
组别 Groups	HGC-27 克隆数(n) Number of cell clones	NCI-N87 克隆数(n) Number of cell clones
空白对照组 Control group	609.67±18.15	457.27±24.12
阴性对照组 si-NC group	594.16±29.37	439.00±35.34
LAMC2 敲减组 si-LAMC2 group	148.54±18.03**	110.42±18.58##
F	670.500	156.200
P	0.000	0.000

注:HGC-27 细胞中,与阴性对照组比较, ** $P<0.01$; NCI-N87 细胞中,与阴性对照组比较, ## $P<0.01$ 。

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P<0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P<0.01$.

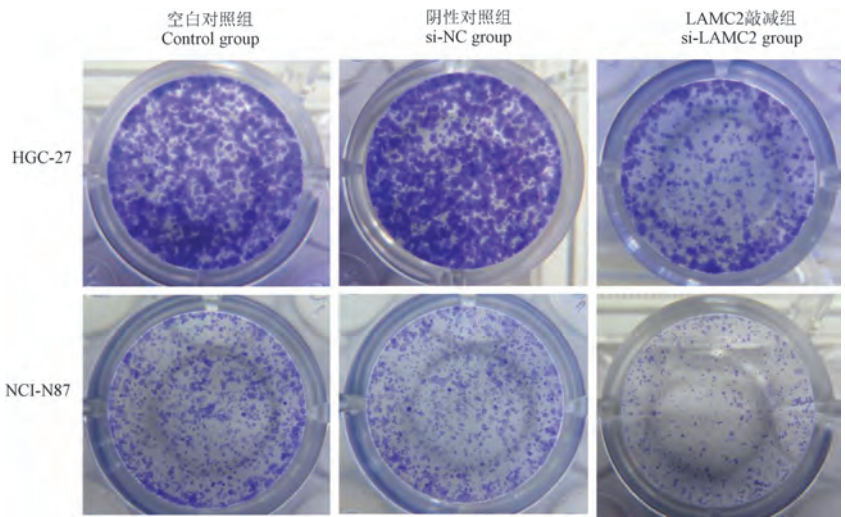


图 4 克隆形成能力检测胃癌细胞增殖

Figure 4 Proliferation of gastric cancer cells detected by clone formation ability

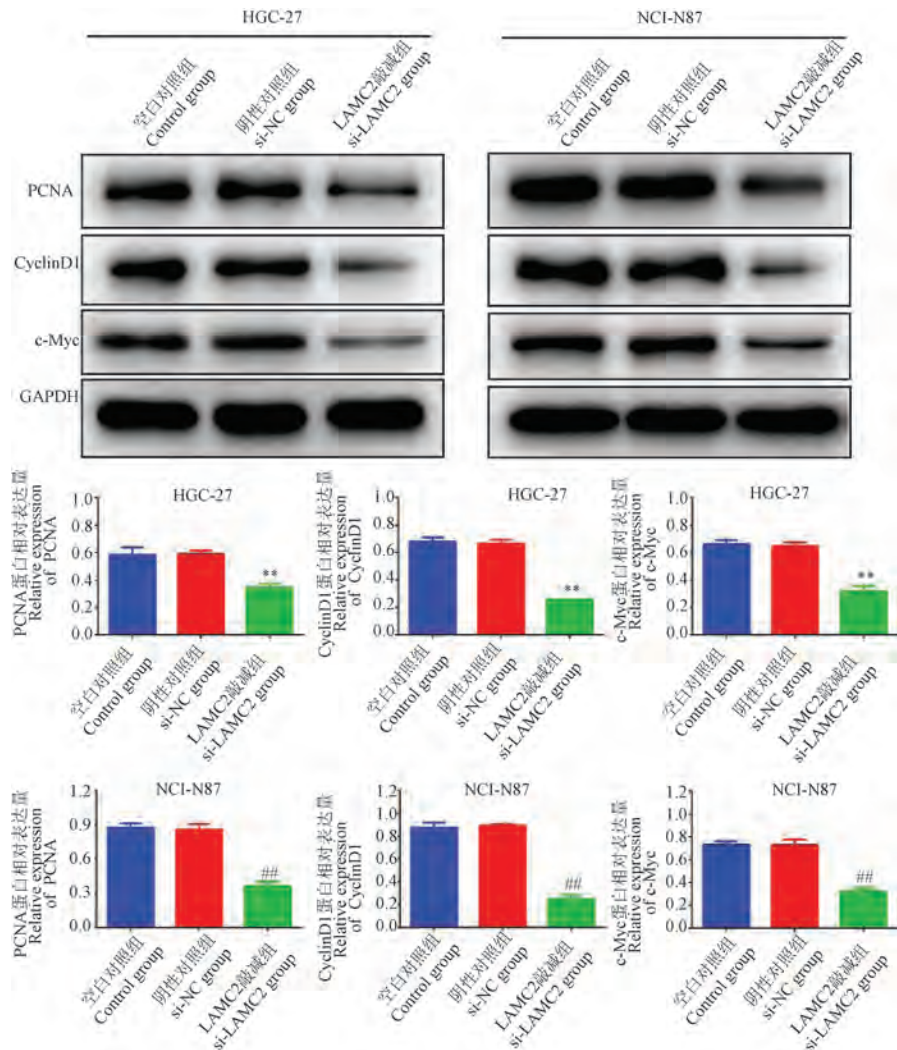
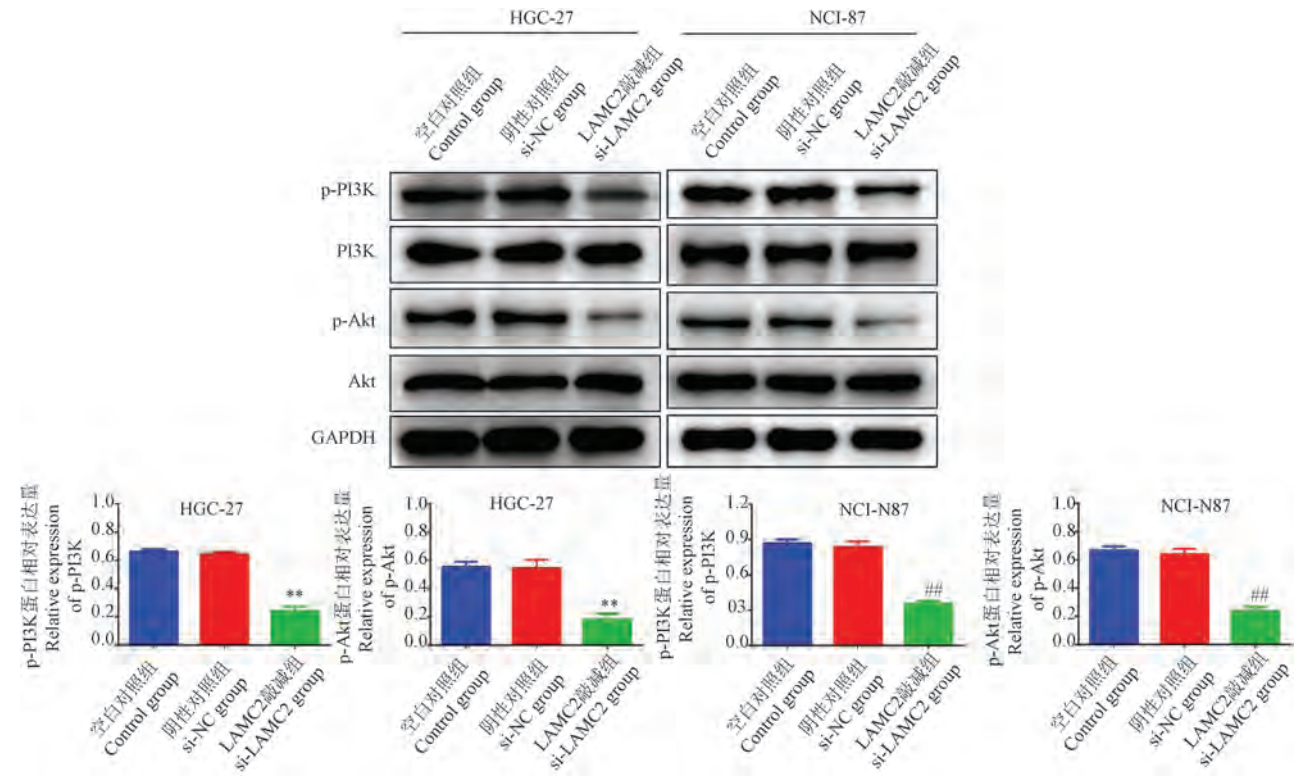


图 5 Western blot 检测细胞增殖相关蛋白表达

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-N87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Expression of proliferation-related proteins detected by Western blot



注: HGC-27 细胞中, 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; NCI-87 细胞中, 与阴性对照组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测胃癌细胞中 p-PI3K、p-Akt 表达

Note. In HGC-27 cells, compared with si-NC group, ** $P < 0.01$. In NCI-87 cells, compared with si-NC group, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Expression of p-PI3K and p-Akt in gastric cancer cells detected by Western blot

3 讨论

胃癌是常见恶性消化道肿瘤之一, 是引起全球范围内癌症相关死亡的主要恶性肿瘤, 严重影响人类的身体健康和生活质量^[1,13-14]。我国是胃癌发病率较高的国家之一, 约占全球病例的 40%^[12]。手术切除和/或化疗是胃癌目前临床主要治疗策略, 但由于胃癌确诊时已处于中晚期, 导致胃癌患者 5 年总生存率仍低于 20%, 并出现远端转移, 预后较差^[15-17]。因此, 深入探讨胃癌发生及进展的分子机制, 筛选胃癌早期诊断靶标, 对胃癌患者的诊治均具有重要意义。

LAMC2 是 laminins 家族成员, 作为 Ln-332 的 $\gamma 2$ 亚基, 参与细胞增殖、侵袭、粘附及迁移等生物学的过程^[18]。但越来越多的研究发现, LAMC2 单亚基与肿瘤的发生及进展关系密切^[5]。LAMC2 在喉癌中的表达显著升高, 其表达量与喉癌患者的 TNM 分期、淋巴结转移、分化程度和总生存期相关, LAMC2 可显著促进喉癌细胞增殖^[19]。在卵巢癌中, LAMC2 的表达较癌旁组显著升高, 抑制 LAMC2

的表达显著降低卵巢癌细胞的增殖及侵袭; 作为 miR-5580-3p 的靶基因, LAMC2 的表达可被 miR-5580-3p 显著抑制^[20]。阴茎鳞状细胞癌患者肿瘤组织及血清中 LAMC2 的表达均显著升高, LAMC2 可影响细胞的迁移、侵袭和 EMT, 进而促进肿瘤进展, LAMC2 可作为阴茎鳞状细胞癌潜在的诊治靶标^[21]。LAMC2 在口腔鳞状细胞癌中的表达显著升高, 沉默 LAMC2 可抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 上调 N-cad、vimentin, 下调 E-cad 蛋白表达, 抑制上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程^[22]。多组学联合分析发现, LAMC2 在多种肿瘤的表达显著升高, LAMC2 的表达不利于泛癌的临床预后, 并跟多种肿瘤免疫浸润相关^[23]。课题组前期研究发现, 抑制 LAMC2 后, 胃癌细胞的侵袭、迁移能力被显著抑制^[9]。本研究首先通过 TCGA、GEO 及介导细胞增殖相关基因联合分析筛选影响胃癌增殖的相关差异表达的候选基因, 结果发现 LAMC2 在胃癌中的表达显著升高, 与胃癌患者的分级、分期及生存等临床病理相关; 体外实验分析发现, LAMC2 的表达与胃癌细胞的增殖

关系密切。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB) 信号通路在胃癌、肝癌、肺癌等肿瘤中均被显著激活,参与肿瘤的发生及进展^[24]。PI3K/Akt 通路激活与肿瘤细胞的发生、增殖、凋亡、侵袭及转移、EMT、免疫微环境和耐药密切相关,该通路抑制剂可显著抑制肿瘤的进展^[25-26]。PI3K/Akt 通路可促进 CyclinD1、p21、PCNA、c-Myc 等相关蛋白的表达,继而促进细胞增殖^[27-29]。LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 通路促进口腔鳞状细胞癌中肿瘤干细胞的侵袭及迁移,进而导致肿瘤的增殖及复发^[30];LAMC2 可通过 integrin β 1/FAK/Src 激活 AKT 促进喉鳞状细胞癌增殖、侵袭和迁移^[31];LAMC2 可通过 EGFR/ERK1/2 通路激活 Akt,导致胰腺导管癌的进展^[32];LAMC2 可激活 PI3K/Akt 通路促进卵巢癌细胞增殖,抑制其对吉西他滨的敏感性^[33]。以上研究说明 LAMC2 可通过直接或者间接激活 PI3K/Akt 通路,参与肿瘤的进展。本研究检测发现,抑制 LAMC2 的表达后,胃癌细胞中 PI3K/Akt 通路被显著抑制,降低 PCNA、CyclinD1 及 c-Myc 等细胞增殖等相关蛋白的表达,抑制胃癌细胞增殖,初步说明, LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 促进胃癌细胞增殖。

综上所述,初步说明 LAMC2 在胃癌中的表达显著上调,与胃癌的分期、分级及生存等临床组织病理相关, LAMC2 可通过激活 PI3K/Akt 通路促进细胞增殖。但本研究仅局限于细胞水平,后续还需利用动物及临床水平深入研究 LAMC2 与胃癌细胞增殖的关系及其影响 PI3K/Akt 的具体作用机制。

参考文献:

- [1] Joshi SS, Badgwell BD. Current treatment and recent progress in gastric cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 264-279.
- [2] Lee IS, Lee H, Hur H, et al. Transcriptomic profiling identifies a risk stratification signature for predicting peritoneal recurrence and micrometastasis in gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(8): 2292-2300.
- [3] Battista S, Ambrosio MR, Limarzi F, et al. Molecular alterations in gastric preneoplastic lesions and early gastric cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(13): 6652.
- [4] 许恒敏,李哲轩,张阳,等.胃癌早期诊断相关生物标志物研究进展 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(11): 1266-1270.
- [5] Liu M, Cai R, Wang T, et al. LAMC2 promotes the proliferation of cancer cells and induce infiltration of macrophages in non-small cell lung cancer [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(17): 1392.

- [6] Okada Y, Takahashi N, Takayama T, et al. LAMC2 promotes cancer progression and gemcitabine resistance through modulation of EMT and ATP-binding cassette transporters in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Carcinogenesis, 2021, 42(4): 546-556.
- [7] Cave DD, Buonaiuto S, Sainz B Jr, et al. LAMC2 marks a tumor-initiating cell population with an aggressive signature in pancreatic cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 315.
- [8] Zhang D, Guo H, Feng W, et al. LAMC2 regulated by microRNA-125a-5p accelerates the progression of ovarian cancer via activating p38 MAPK signalling [J]. Life Sci, 2019, 232: 116648.
- [9] 汪清云,王文博,郭卫,等. LAMC2 对胃癌细胞侵袭、迁移的作用及其机制研究 [J]. 海南医学, 2023, 34(6): 761-768.
- [10] 吴晓婷,路志国,田金成,等. TRIM33 基因对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖及迁移的影响及意义 [J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(3): 219-226.
- [11] Jin G, Zhang J, Cao T, et al. Celecoxib reverse invasion and metastasis of gastric cancer through Lnc_AC006548.28-miR-223-LAMC2 pathway [J]. Comput Intell Neurosci, 2022, 2022: 6140727.
- [12] Xu L, Hou Y, Tu G, et al. Nuclear Drosha enhances cell invasion via an EGFR-ERK1/2-MMP7 signaling pathway induced by dysregulated miRNA-622/197 and their targets LAMC2 and CD82 in gastric cancer [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2642.
- [13] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric cancer: epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012.
- [14] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of gastric cancer [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2020, 18(3): 534-542.
- [15] Johnston FM, Beckman M. Updates on management of gastric cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(8): 67.
- [16] Jin G, Lv J, Yang M, et al. Genetic risk, incident gastric cancer, and healthy lifestyle: a meta-analysis of genome-wide association studies and prospective cohort study [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(10): 1378-1386.
- [17] Smyth EC, Nilsson M, Grabsch HI, et al. Gastric cancer [J]. Lancet, 2020, 396(10251): 635-648.
- [18] Jin G, Ruan Q, Shangguan F, et al. RUNX2 and LAMC2: promising pancreatic cancer biomarkers identified by an integrative data mining of pancreatic adenocarcinoma tissues [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(19): 22963-22984.
- [19] Wang QY, Liu YC, Zhou SH, et al. LAMC2 acts as a novel therapeutic target of cetuximab in laryngeal cancer [J]. Neoplasia, 2021, 68(6): 1257-1264.
- [20] Fang R, Lu Q, Xu B. Hsa-miR-5580-3p inhibits oral cancer cell viability, proliferation and migration by suppressing LAMC2 [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(6): 453.

[21] Zhou QH, Deng CZ, Chen JP, et al. Elevated serum LAMC2 is associated with lymph node metastasis and predicts poor prognosis in penile squamous cell carcinoma [J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 2983-2995.

[22] 黄莹莹, 李海朋, 裴浩. 沉默 LAMC2 基因对口腔鳞状细胞癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(11): 1745-1749.

[23] 苏路瑛, 黄容, 邹定峰, 等. 多组学分析发现 LAMC2 是调节泛癌微环境的关键因子 [J]. 基础医学与临床, 2022, 42(4): 545-552.

[24] Noorolyai S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. Gene, 2019, 698: 120-128.

[25] Jiang N, Dai Q, Su X, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(6): 4587-4629.

[26] 杨志强, 陈路, 张雅茜, 等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 68-74, 96.

[27] He S, Chen M, Lin X, et al. Triptolide inhibits PDGF-induced proliferation of ASMCs through G0/G1 cell cycle arrest and suppression of the AKT/NF-κB/cyclinD1 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 867: 172811.

[28] 徐倩娟, 段海婧, 宁艳梅, 等. 贞芪扶正颗粒调控 PTEN/PI3K/AKT 信号通路影响肺癌 A549 细胞的增殖与凋亡 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 57-62.

[29] 张键, 康敏. EphB1 通过 PI₃ K/AKT 信号通路促进食管鳞状细胞癌 EC-9706 细胞增殖、迁移、侵袭并抑制其凋亡 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(24): 4445-4453.

[30] Zhou YM, Yao YL, Liu W, et al. microRNA-134 inhibits tumor stem cell migration and invasion in oral squamous cell carcinomas via downregulation of PI3K-Akt signaling pathway by inhibiting LAMC2 expression [J]. Cancer Biomark, 2020, 29(1): 51-67.

[31] Yin C, Ma B, Zhang X, et al. Overexpression of laminin 5γ2 chain correlates with tumor cell proliferation, invasion, and poor prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. J Oncol, 2022, 2022: 7248064.

[32] Kirtonia A, Pandey AK, Ramachandran B, et al. Overexpression of laminin-5 gamma-2 promotes tumorigenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma through EGFR/ERK1/2/AKT/mTOR cascade [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(7): 362.

[33] Qiu L, Wang J, Chen M, et al. Exosomal microRNA-146a derived from mesenchymal stem cells increases the sensitivity of ovarian cancer cells to docetaxel and taxane via a LAMC2-mediated PI3K/Akt axis [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(2): 609-620.

[收稿日期] 2022-08-05

陈小丽,罗富里,童梦瑶. HDAC6 抑制剂通过保护肾小球内皮细胞线粒体稳态和 EMT 改善糖尿病肾病 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 71-80.

Chen XL, Luo FL, Tong MY. Histone deacetylases 6 inhibitor improves diabetic nephropathy by protecting mitochondrial homeostasis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 71-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.010

HDAC6 抑制剂通过保护肾小球内皮细胞线粒体稳态和 EMT 改善糖尿病肾病

陈小丽¹, 罗富里², 童梦瑶^{3*}

(1.井冈山大学附属医院肾病风湿免疫科,江西 吉安 343000;2.江西中医药大学附属医院肾病科,南昌 330006;
3.江西中医药大学第二附属医院呼吸科,南昌 330006)

【摘要】 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶 6(histone deacetylases 6,HDAC6)特异性小分子抑制剂 Tubastatin A 对糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)小鼠肾损伤的保护作用和机制。**方法** C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组:对照组、DN 组和 Tubastatin A 组。DN 组和 Tubastatin A 组行包膜下肾切除术以切除右肾,并通过腹膜内注射 STZ 诱导 DN。Tubastatin A 组接受 Tubastatin A 治疗,每 3 d 1 次,连续治疗 8 周。RNA 测序分析 DN 组和 Tubastatin A 组肾组织中差异表达基因。通过透射电子显微镜评估线粒体受损情况,以及 DHE 染色估计肾组织中的活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平。将小鼠肾小球内皮细胞(mice glomerular endothelial cell,mGEC)暴露于高葡萄糖(high glucose,HG)培养基或 40 mmol/L 甘露醇(对照),加入或不加入 Tubastatin A 处理。采用蛋白质印迹分析 HDAC6、肾损伤标志物 KIM1 和上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)标志物的表达情况,以及流式细胞仪检测细胞中线粒体 ROS 和细胞凋亡情况。**结果** DN 小鼠肾组织和暴露于 HG 的 mGEC 细胞中 HDAC6 表达上调,并与 KIM1 水平升高一致。组织学分析显示 DN 小鼠的显著形态学变化,包括肾小球肥大、肾小球系膜基质积聚、肾小球基底膜增厚、肾小管基底膜增厚和出现肾小球、肾小管间质纤维化;Tubastatin A 治疗缓解了这些不良改变。与对照 DMSO 相比,Tubastatin A 在 HG 处理下显著降低了 mGEC 细胞中肾损伤分子 1(kidney injury molecular1,KIM1)、HDAC6、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、N-钙粘蛋白、波形蛋白表达($P<0.05$),并上调 E-钙粘蛋白表达($P<0.05$)。透射电子显微镜显示 Tubastatin A 组小鼠的肾小球内皮细胞受损线粒体的比例较 DN 组显著降低($P<0.01$)。Tubastatin A 组小鼠肾组织中 ROS 水平较 DN 组降低($P<0.01$)。RNA 测序结果表明,与 DN 组小鼠相比,Tubastatin A 组小鼠肾组织中与 ECM-受体相互作用和与三羧酸(TCA)循环相关的基因富集。在 mGEC 细胞中,Tubastatin A 处理下调了 HG 诱导的 mGEC 细胞中的线粒体 ROS 水平($P<0.01$),以及减少了细胞凋亡($P<0.05$)。**结论** Tubastatin A 改善了 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 DN 进展,其作用机制与保护线粒体稳态和抑制 EMT 发生相关。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶 6;Tubastatin A;糖尿病肾病;线粒体;肾小球内皮细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0071-10

Histone deacetylases 6 inhibitor improves diabetic nephropathy by protecting mitochondrial homeostasis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells

【基金项目】 江西省青年科学基金资助项目(20192BAB215051)。

【作者简介】 陈小丽(1976—),女,副主任医师,研究方向:肾病学。E-mail:skyer200207@163.com

【通信作者】 童梦瑶(1993—),女,主治医师,研究方向:肾病学。E-mail:qq09wwq@163.com

CHEN Xiaoli¹, LUO Fuli², TONG Mengyao^{3*}

(1. Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of Jinggangshan University, Ji'an 343000, China.

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

3. Respiratory Department, the Second Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of histone deacetylase 6 (HDAC6)-specific small molecule inhibitor tubastatin A on renal injury in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control, DN and tubastatin A groups. Mice in DN and tubastatin A groups were intraperitoneally injected with 80 mg/kg STZ daily for 3 days after removal of one kidney. The tubastatin A group received tubastatin A treatments every 3 days for 8 weeks. RNA-sequencing of differentially expressed genes was performed in kidney tissue of DN and tubastatin A groups. Mitochondrial damage was assessed by transmission electron microscopy. ROS levels in kidney tissue were estimated by DHE staining. Mouse glomerular endothelial cells (mGECs) were exposed to high glucose (HG) medium or 40 mmol/L mannitol (control) with or without tubastatin A treatment. Western blot was used to analyze expression of HDAC6, kidney injury marker KIM1, and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) markers. Flow cytometry was used to detect mitochondrial ROS and apoptosis in cells. **Results** HDAC6 expression was upregulated in DN mouse kidney tissue and mGECs exposed to HG, which was consistent with the increased level of KIM1. Histological analysis showed significant morphological changes in DN mice, including glomerular hypertrophy, mesangial matrix accumulation, glomerular basement membrane thickening, tubular basement membrane thickening, and the presence of glomerular intertubular fibrosis. Tubastatin A treatment alleviated these changes. Compared with DMSO as the control, tubastatin A significantly decreased expression of KIM1, HDAC6, α -SMA, N-cadherin and vimentin ($P<0.05$) and up-regulated E-cadherin expression ($P<0.05$) in mGECs under HG treatment. RNA-sequencing revealed enrichment of genes related to ECM-receptor interactions and the tricarboxylic acid cycle in kidney tissue of the Tubastatin A group compared with the findings in the DN group. Transmission electron microscopy showed that the proportion of damaged mitochondria in glomerular endothelial cells in the Tubastatin A group was significantly lower than that in the DN group ($P<0.01$). The ROS level in kidney tissue of the Tubastatin A group was lower than that in the DN group ($P<0.01$). In mGECs, tubastatin A treatment downregulated HG-induced mitochondrial ROS levels ($P<0.01$) and reduced apoptosis ($P<0.05$). **Conclusions** Tubastatin A ameliorates HG-induced glomerular endothelial cell injury and DN progression, and its mechanism is related to protection of mitochondrial homeostasis and inhibition of EMT.

【Keywords】 histone deacetylase 6; Tubastatin A; diabetic nephropathy; mitochondria; glomerular endothelial cells
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是全球终末期肾病的主要原因,因为一半以上需要透析的患者患有糖尿病^[1]。尽管目前建议对 DN 治疗进行早期干预,以最佳血糖和血压控制来预防主要不良肾结果,但不良肾和心血管结果的残余风险仍然很高^[2]。因此,理解 DN 的发病分子机制、识别可靠的生物标志物,是开发新的治疗方法来阻止或逆转 DN 进展的必要途径。

肾小球内皮细胞由于其持续高水平的能量消耗而含有丰富的线粒体^[3]。肾疾病的早期阶段通常发生代谢改变,它们会破坏线粒体稳态,如线粒体功能障碍和能量代谢受损^[4],并伴随着线粒体的一系列变化,包括破碎的形态、活性氧的产生升高和线粒体膜电位的丧失,导致足细胞丢失和脱离以及足突消失,最终出现肾小球滤过屏障破坏和蛋白尿^[5]。最近的研究证明组蛋白去乙酰化酶 (histone

deacetylases, HDAC) 在维持足细胞功能平衡方面发挥着至关重要的作用^[6]。在人类鉴定的 18 种 HDAC 中,HDAC6 是特异性的 HDAC,因为它有两个活性去乙酰化酶结构域和一个锌指基序,可优先定位于细胞质^[7]。HDAC6 的亚细胞定位使其与影响细胞迁移、增殖和错误折叠蛋白分解代谢的其他细胞质蛋白和多泛素链相互作用^[8-9]。最近研究证实,HDAC6 可能是 DN 治疗的有希望的治疗靶点^[7]。此外,HDAC6 抑制通过抑制上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 减轻梗阻性肾病的肾纤维化^[8]。还有研究发现 HDAC6 是线粒体动力学多种机制中的关键调节因子,其抑制与减轻线粒体功能障碍密切相关^[10]。然而,目前尚不清楚 HDAC6 是否通过破坏肾小球内皮细胞线粒体稳态参与 DN 的病理机制。

在本研究中,我们从 EMT 以及线粒体介导的细

胞凋亡等方面检测了 HDAC6 特异性小分子抑制剂 Tubastatin A 对 DN 小鼠肾损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(体重 18~22 g)购自南京君科生物科技有限公司[SCXK(苏)2019-0046]。小鼠饲养于江西中医药大学实验动物中心[SYXK(赣)2019-0002],在标准 SPF 级动物房饲养,湿度为 40%~70%,温度为 20~22℃,12 h/12 h 光/暗循环。动物实验经井冈山大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准(JGSH2020016),并严格遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

小鼠肾小球内皮细胞(mice glomerular endothelial cell, mGEC)购自美国 ATCC,维持在含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 中。

1.2 主要试剂与仪器

Tubastatin A、STZ 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;尿蛋白、血清尿素氮和血清肌酐商业试剂盒购自南京建成生物工程研究所;DHE 染色剂、RIPA 缓冲液、BCA 蛋白质定量试剂盒购自上海 Beyotime 公司;5%白蛋白牛 V 购自北京 Solarbio 公司;HDAC6、KIM1 兔一抗购自英国 Abcam 公司;N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、 β -actin 兔一抗、抗兔 IgG 二抗均购自美国 Proteintech 公司。

BX-51 光学显微镜购自日本 Olympus 公司;H7650 显微镜购自日本日立公司;蛋白质印迹检测系统购自美国 Bio-Rad Laboratories;CytoFLEX S 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组($n=10$):对照组、DN 组和 Tubastatin A 组。参照文献方法^[11],对 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠进行 DN 诱导,具体操作为:在异氟醚麻醉下,小鼠进行包膜下肾切除术以切除右肾。每天对小鼠腹膜内注射 STZ (80 mg/kg),持续 3 d。在 STZ 注射后,Tubastatin A 组腹膜内注射 Tubastatin A,剂量为 30 mg/kg^[12],每 3 d 注射 1 次,连续治疗 8 周。对照组和 DN 组在相同时间注射等体积 DMSO。对照组接受剖腹手术,但不进行肾切除和腹膜内注射 STZ。

1.3.2 生化测量

使用商业试剂盒测量小鼠 24 h 尿蛋白、血清尿素氮和血清肌酐。

1.3.3 组织病理学分析

对于苏木精和伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,肾组织用 10%中性甲醛固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切片(5 μ m)。然后将切片分别用苏木精和伊红染色 15 min 和 5 min。对于 PAS 分析,肾切片首先用高碘酸孵育 15 min,然后用希夫溶液染色 10 min。洗涤后,切片用苏木精复染 3 min。对于 Masson 测定,在对肾石蜡切片进行常规脱蜡后,用 Masson 三原色染料对切片进行染色。在 BX-51 光学显微镜下观察组织学变化。从每个肾中随机选择 20 个肾小球,使用 Image J 软件量化系膜面积和 Masson 染色的阳性区域。

1.3.4 RNA 测序分析

8 周后,从 DN 组和 Tubastatin A 组各取 3 只小鼠的肾组织中提取总 RNA。RNA 测序由北京基因组研究所按照标准方案进行。使用 BGISEQ-500 平台对文库进行测序。

1.3.5 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)

对小鼠的肾组织进行 TEM 分析。将肾组织切成 1 mm³ 块并浸入 2.5%戊二醛中。用 0.1 mol/L 磷酸冲洗肾组织并用锇酸固定 30 min。然后将切片脱水并包埋在丙酮中。50~60 nm 切片用 3%醋酸铀-柠檬酸铅钠染色,并安装在铜网格上,在 H7650 显微镜下拍照。将底片数字化,获得最终放大倍数约为 $\times 23\,000$ 的图像。畸形线粒体被定义为具有可见嵴的局灶性丧失、在外周线粒体膜处残留嵴聚集和碎片化(长度 $<2\,\mu$ m)的线粒体。

1.3.6 细胞处理

对于高葡萄糖(high glucose, HG)处理,将 mGEC 细胞暴露于补充有 20 mmol/L 和 40 mmol/L d-葡萄糖的完全培养基 48 h^[13]。用 5.5 mmol/L d-葡萄糖或 40 mmol/L 甘露醇培养的细胞用作对照。为了考察 Tubastatin A 对 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤的改善作用,将细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板中,并分为以下 4 组:对照 + DMSO 组、对照 + Tubastatin A 组、HG + DMSO 组和 HG + Tubastatin A 组。对照 + DMSO 组加入 40 mmol/L 甘露醇和 DMSO 处理细胞 48 h;对照 + Tubastatin A 组加入 40 mmol/L 甘露醇和 500 nmol/L Tubastatin A 处理细胞

48 h; HG + DMSO 组加入 40 mmol/L d-葡萄糖和 DMSO 处理细胞 48 h; HG + Tubastatin A 组加入 40 mmol/L d-葡萄糖和 500 nmol/L Tubastatin A 处理细胞 48 h。所有分组一式三份。

1.3.7 ROS 水平检测

使用线粒体超氧化物指示剂测量 mGEC 细胞中的线粒体 ROS。细胞用 PBS 洗涤两次以去除培养基,随后在 5 μmol/L MitoSOX Red 中于 37℃ 孵育 10 min,用 PBS 洗涤 3 次。然后通过流式细胞术检测细胞。使用 DHE 染色估计肾组织中的 ROS 水平。将冷冻肾切片在丙酮中浸泡 30 min,并在 37℃ 下与 DHE(5 μmol/L)一起孵育 30 min。使用 BX-51 光学显微镜捕获图像。

1.3.8 蛋白质印迹分析

使用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞或肾组织中的总蛋白。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测量蛋白质浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下用含 5%牛血清白蛋白 PBS 液封闭 1 h 后,将膜与兔一抗(HDAC6, 1 : 800; N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、α-SMA, 1 : 500; KIM1, 1 : 500)在 4℃ 孵育过夜。然后洗涤膜并与二抗(抗兔 IgG, 1 : 3000)在室温下孵育 1.5 h。抗 β-actin 抗体(1 : 1000)作为对照。用增强的化学发光试剂观察蛋白质条带,并

使用蛋白质印迹检测系统量化信号密度。

1.3.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

通过流式细胞术估计培养细胞的凋亡。将处理后的细胞加入 5 μL Annexin V-FITC,在室温下避光孵育 10 min。然后加入 10 μL 碘化丙啶染色液,冰浴避光放置 15 min,随后使用 CytoFLEX S 流式细胞仪进行分析。

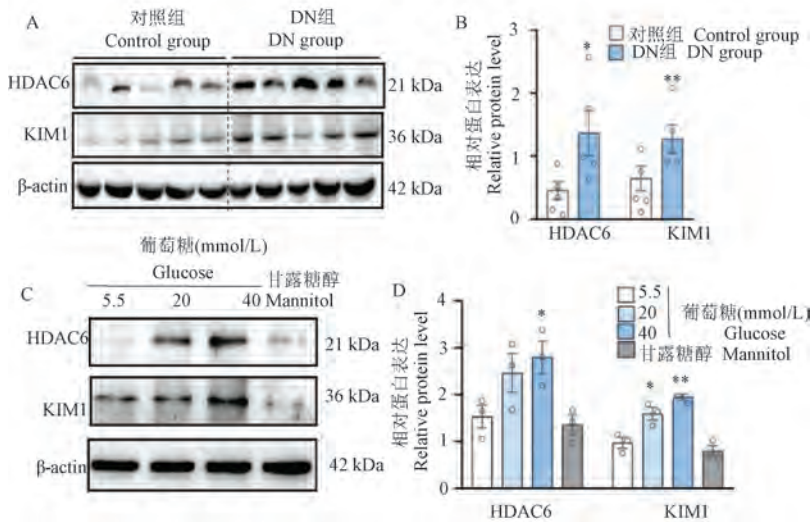
1.4 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 18.0 软件进行分析,并表示为平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)。t 检验用于两组之间的比较,单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 多重比较后检验用于 3 组或更多组的比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HDAC6 在 DN 小鼠的肾组织中上调

为了初步评估 HDAC6 在 DN 中的潜在参与,首先使用免疫印迹分析显示 DN 小鼠肾组织中 HDAC6 的上调,这与肾损伤标志物 KIM1 水平升高一致(图 1A、1B)。在不同浓度葡萄糖(20 mmol/L 和 40 mmol/L)的 mGEC 细胞中,HDAC6 表达也上调,伴随着 KIM1 的表达增加(图 1C、1D)。这些结果表明 HDAC6 表达在 DN 肾组织中增加,提示 HDAC6 可能参与 DN 的发病机制。



注:A、B:对照组小鼠($n=5$)和 DN 组小鼠($n=5$)肾组织中 HDAC6 和 KIM-1 表达的蛋白质印迹分析和蛋白相对量。C、D:用高葡萄糖处理的 mGEC 细胞中 HDAC6 和 KIM-1 的蛋白质印迹分析和蛋白相对量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 HDAC6 在 DN 小鼠的肾组织和高葡萄糖处理的 mGEC 细胞中上调

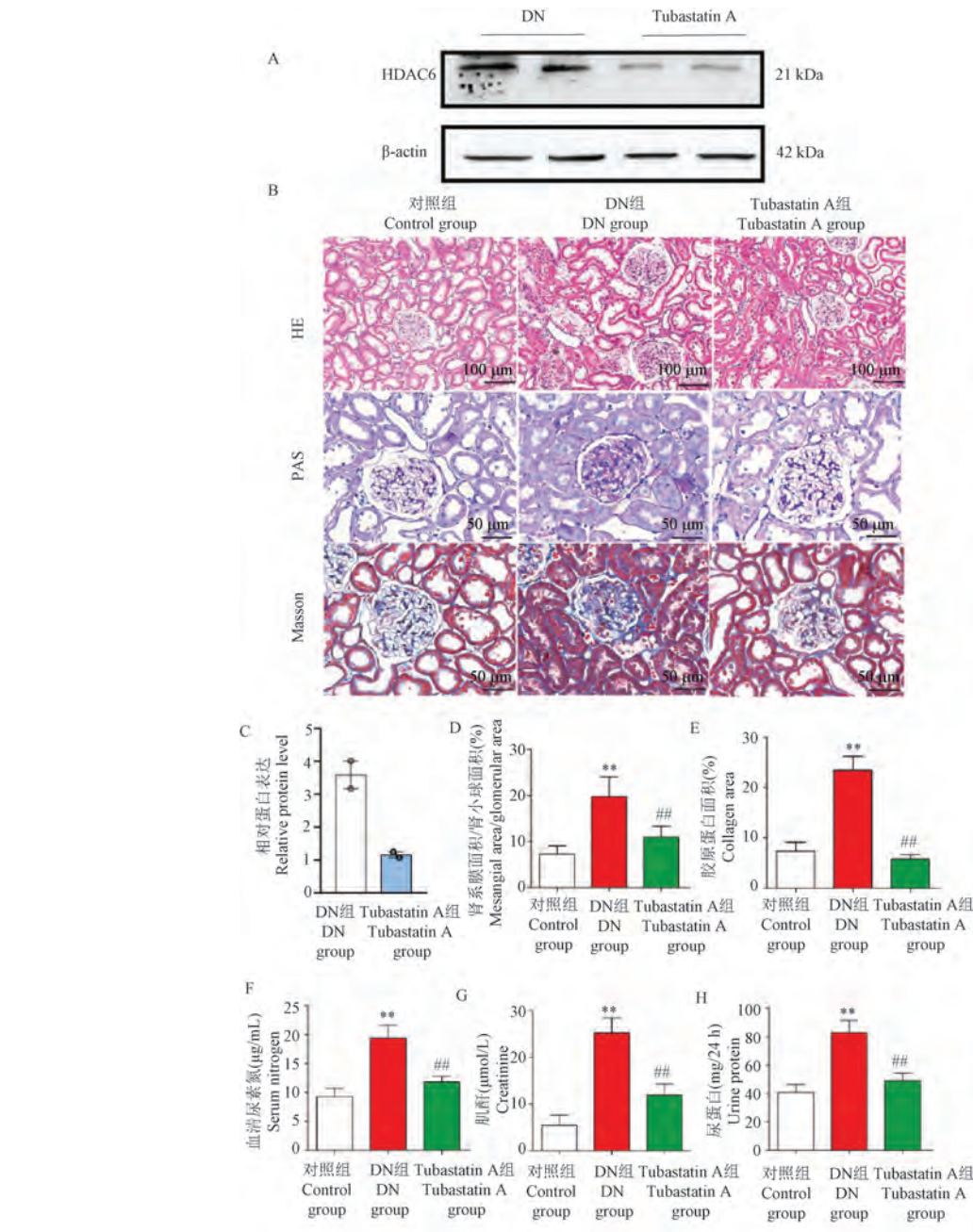
Note. A/B, Western blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 expression in the kidney tissue of control mice ($n=5$) and DN group mice ($n=5$). C/D, Western blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 in mGEC cells treated with high glucose quantification. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Upregulation of HDAC6 in renal tissue and high glucose treated mGEC cells of DN mice

2.2 Tubastatin A 可减轻 DN 中的肾损伤和纤维化

为了进一步评估 HDAC6 在 DN 进展中的作用,

我们向小鼠腹腔注射 Tubastatin A 有效降低了肾组织中 HDAC6 表达(图 2A、2C)。HE 和 PAS 染色显示 DN 小鼠发生显著形态学变化,包括肾小球肥大、



注:A、C:DN 组小鼠($n=5$)和 Tubastatin A 组小鼠($n=5$)肾组织中 HDAC6 和 KIM-1 表达的蛋白质印迹分析和相对蛋白量;B:对照组小鼠($n=5$)、DN 组小鼠($n=5$)和 Tubastatin A 组小鼠($n=5$)肾的 HE、PAS 和 Masson 染色;D:肾系膜面积/肾小球面积的量化;E:肾胶原蛋白面积的量化;F:血清尿素氮;G:血清肌酐;H:24 h 的尿蛋白。与对照组相比, ** $P<0.01$;与 DN 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 2 Tubastatin A 减轻肾的形态变化并改善肾功能

Note. A/C, Protein blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 expression in renal tissue kidney tissues of DN group ($n=5$) and Tubastatin A group ($n=5$). B, HE, PAS and Masson staining of the kidney in control group ($n=5$), DN group ($n=5$) and Tubastatin A group ($n=5$). D, Quantification of renal tract area/glomerular area. E, Quantification of renal collagen area. F, Serum urea nitrogen. G, Serum creatinine. H, Urine protein at 24 h. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with DN group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Tubastatin A attenuates morphological changes in the kidney and improves renal function

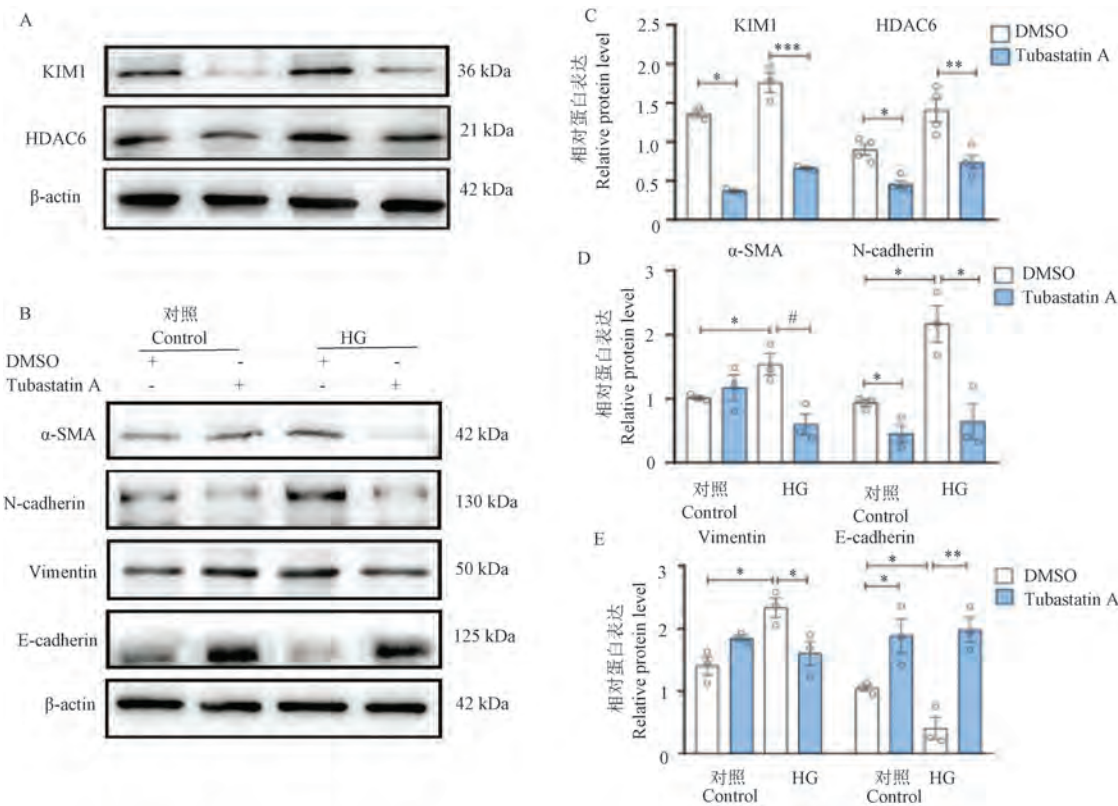
肾小球系膜基质积聚、肾小球基底膜增厚和肾小管基底膜增厚。Tubastatin A 治疗缓解了这些不良改变(图 2B、2D)。Masson 染色显示 DN 小鼠出现肾小球和肾小管间质纤维化,Tubastatin A 治疗后纤维化程度得到缓解($P<0.05$)(图 2E)。此外,与对照组相比,DN 组肾功能标志物尿蛋白/24 h、血清尿素氮和血清肌酐显著升高,而 Tubastatin A 治疗降低了它们的水平($P<0.05$)(图 2F~2H)。这些数据表明,Tubastatin A 改善了 DN 小鼠的肾功能。

2.3 Tubastatin A 改善 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤和 EMT

使用 mGEC 进一步证实了 HDAC6 参与 HG 诱导的肾小球内皮细胞。与体内数据一致,与对照 DMSO 相比,Tubastatin A 在 HG 处理下显著降低了 mGEC 细胞中 KIM1、HDAC6、 α -SMA、N-钙粘蛋白、波形蛋白表达($P<0.05$),并上调 E-钙粘蛋白表达($P<0.05$)(图 3)。

2.4 Tubastatin A 改善线粒体稳态并减少 HG 环境下 mGEC 凋亡

TEM 显示 Tubastatin A 组小鼠的肾小球内皮细胞受损线粒体的比例较 DN 组显著降低($P<0.01$),表现为线粒体肿胀、内膜和/或外膜断裂以及线粒体嵴破裂(图 4A、4B)。此外,DHE 染色显示 Tubastatin A 组小鼠肾组织中 ROS 水平较 DN 组降低($P<0.01$)(图 4C、4D),为了进一步研究 HDAC6 如何调节 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 EMT 进展,我们对 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠的肾进行了转录组学分析。RNA 测序(RNA-seq)揭示了总共 1294 个差异表达基因(DEG),包括 821 个下调基因和 473 个上调基因,1 定义为倍数变化 ≥ 2.00 ,调整后 $P\leq 0.001$ (图 5A)。基因集富集分析(GSEA)揭示了与 DN 组小鼠相比,Tubastatin A 组小鼠肾组织中与 ECM-受体相互作用和与三羧酸(TCA)循环相关的基因富集(图 5B、5C),证实了 HDAC6 的调



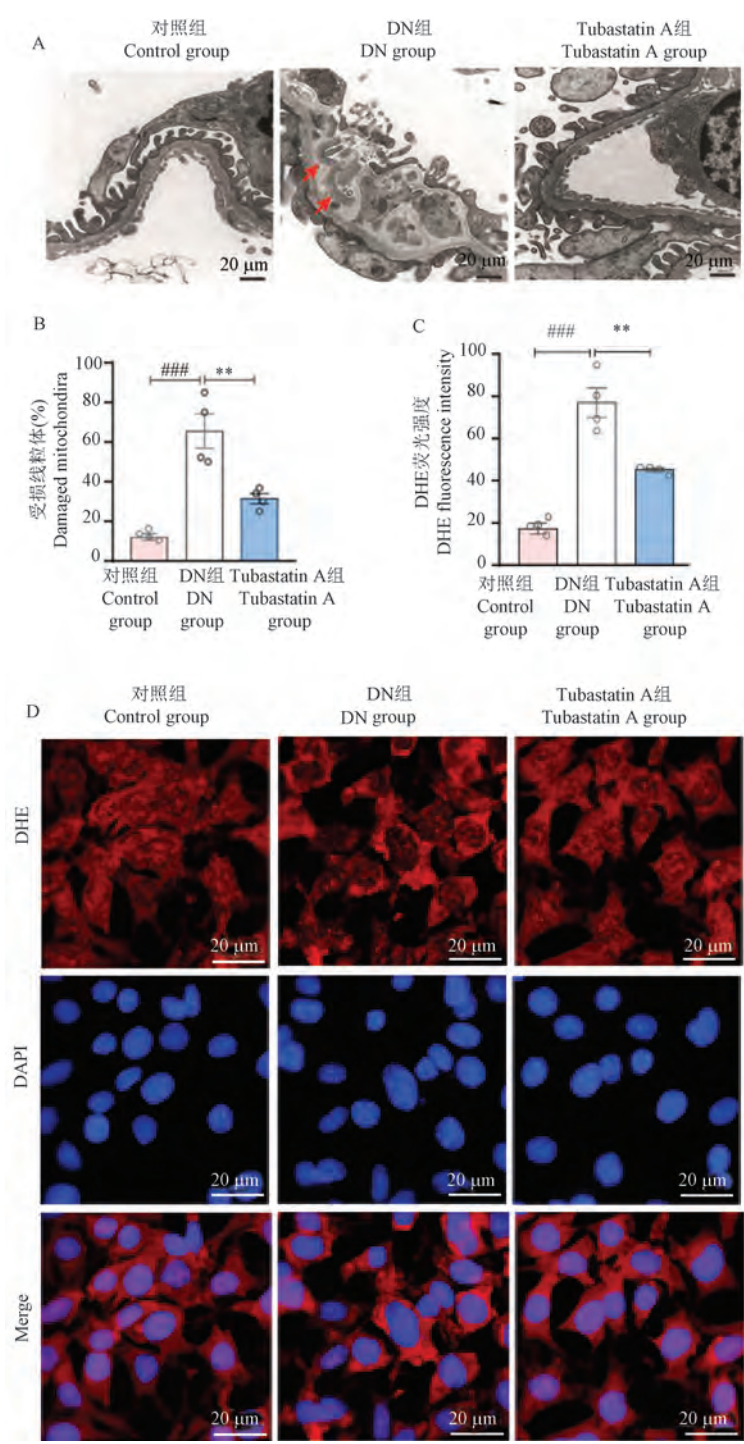
注:A/C;KIM1 和 HDAC6 表达的蛋白质印迹分析和相对蛋白量;B、D、E; α -SMA、N-钙粘蛋白、波形蛋白和 E-钙粘蛋白的蛋白质印迹分析和相对蛋白量。与 Control+DMSO 组相比, $^{\#}P<0.05$;与 HG+DMSO 组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 3 Tubastatin A 改善 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤和 EMT

Note. A/C, Protein blot analysis and optical density quantification of KIM1 and HDAC6 expression. B/D/E, Protein blot analysis and optical density quantification of α -SMA, N-calcineurin, waveform protein and E-calcineurin. Compared with Control+DMSO group, $^{\#}P<0.05$. Compared with HG+DMSO group, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 3 Tubastatin A ameliorates mGEC cell injury and EMT in HG environment

节在 EMT 过程和线粒体受损中的作用。在 mGEC 细胞中,Tubastatin A 处理下调了 HG 诱导的 mGEC 细胞中的线粒体 ROS 水平($P<0.01$) (图 5D、5E), 以及减少了细胞凋亡($P<0.05$) (图 5F、5G)。

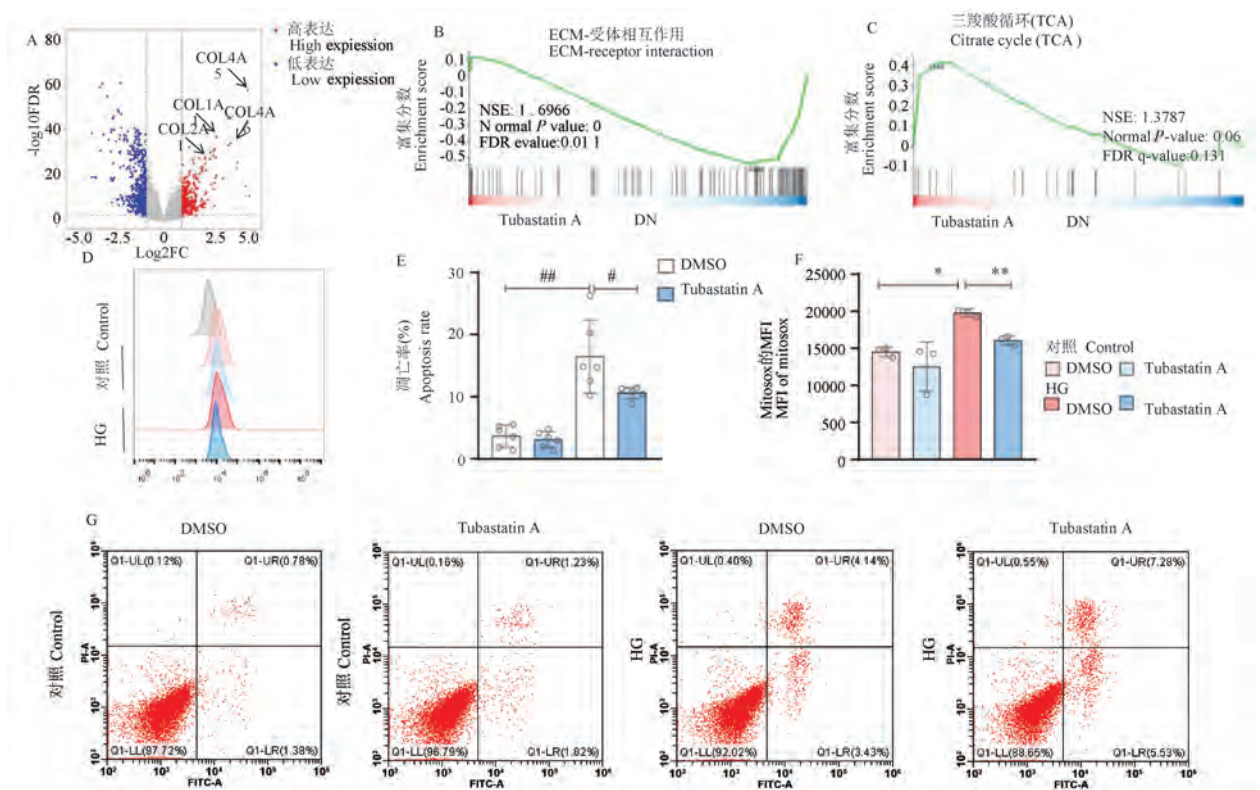


注:A、B:线粒体形态的 TEM 图像和受损线粒体的统计图 (箭头表示细胞中的畸形线粒体);C、D:DHE 染色的代表性图像和统计图。与 DN 组相比, $**P<0.01$;与对照组相比, $###P<0.001$ 。

图 4 Tubastatin A 改善 HG 诱导线粒体损伤和肾氧化损伤

Note. A/B, TEM images of mitochondrial morphology and statistical plots of damaged mitochondria (arrows indicate aberrant mitochondria in cells). C/ D, Representative images and statistical plots of DHE staining. Compared with DN group, $**P<0.01$. Compared with the control group, $###P<0.001$.

Figure 4 Tubastatin A improves HG-induced mitochondrial damage and kidney oxidative damage



注:A:对来自 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠的肾组织进行 RNAseq 分析(Log₂(倍数变化)与 Log₁₀(P 值)的火山图,图中箭头指示 DE 基因中的 EMT 指标);B、C:与 ECM-受体相互作用和柠檬酸循环相关的失调基因的 GSEA 分析;D、E:mGEC 细胞中 MitoSox 的流式细胞术分析的代表性图和统计图。与 DMSO 组相比, **P*<0.05, ###*P*<0.01。F、G:mGEC 细胞中凋亡细胞的流式细胞术分析的代表性图和统计图。与 HG+DMSO 组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01。

图 5 Tubastatin A 调节 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 EMT 进展

Note. A, RNAseq analysis of renal tissues from mice in the DN and Tubastatin A groups (volcano plot of Log₂ (fold change) versus Log₁₀ (P value). The arrow in the figure indicates the EMT index in DE gene). B/C, Dysregulated genes associated with ECM-receptor interactions and citric acid cycle for GSEA analysis. D/E, Representative plots and statistical plots of flow cytometry analysis of MitoSox in mGEC cells. Compared with DMSO group, **P*<0.05, ###*P*<0.01. F/G, Representative plots and statistical plots of flow cytometry analysis of apoptotic cells in mGEC cells. Compared with HG+DMSO group, **P*<0.05, ***P*<0.01.

Figure 5 Tubastatin A modulates HG-induced renal glomerular endothelial cell damage and EMT progression

3 讨论

越来越多的研究证实,Tubastatin A 通过抑制 HDAC6 表达在许多疾病中发挥保护作用^[14],如 Chi 等^[15]报道 Tubastatin A 可有效减轻血管紧张素 II 诱导的高血压;Zheng 等^[16]发现 Tubastatin A 通过改善线粒体功能减轻骨关节炎的进展。近年来,有学者发现,Tubastatin A 能够阻止了错误折叠的蛋白质聚集体在慢性肾病大鼠模型肾小管上皮细胞中的积累,减轻了蛋白尿的进展,限制了肾小管细胞的死亡和减少了肾小管间质胶原基质的沉积^[12]。此外,最近研究证实,Tubastatin A 抑制肾小管上皮细胞-间充质转化及肾间质成纤维细胞活化,表明其有望成为防治肾间质纤维化的新型药物靶点^[17]。与

先前的研究一致,本研究确定了 Tubastatin A 对 DN 小鼠肾损伤的保护作用,提示 HDAC6 在调节 DN 进展中的关键作用。在 HG 条件下,HDAC6 破坏肾小球内皮细胞中的线粒体稳态和诱导了 EMT 发生。我们的数据表明,HDAC6 上调是肾小球内皮细胞损伤和 EMT 的催化剂,通过 Tubastatin A 抑制 HDAC6 上调,最终减缓了 DN 的发展。

近年来肾小球损伤在糖尿病肾病发病机制中的重要性得到强调^[18-19]。据报道,肾小球损伤是 DN 进展的独立预测因子,并且 EMT 是肾小球损伤的始动因素之一^[20]。我们的数据表明,HDAC6 表达在 DN 小鼠模型的肾组织中显著上调。重要的是,通过腹腔注射 Tubastatin A 抑制肾组织中 HDAC6 表达显著减弱了 STZ 诱导的糖尿病小鼠的

肾损伤和纤维化,而且还改善了肾功能(即尿蛋白/24 h、血清尿素氮和血清肌酐显著降低)。与体内数据一致,体外结果证实了 Tubastatin A 抑制了 HG 诱导的 mGEC 细胞的 EMT 发生,表明 Tubastatin A 可能通过减轻 EMT 的发生减缓 DNDN 的发展。因此,HDAC6 是 DN 肾小球细胞损伤的关键调节因子。

肾小球内皮细胞富含线粒体以满足高代谢能量需求,因此,它们容易受到线粒体生物能量学紊乱的影响^[21]。肾小球内皮细胞线粒体中 ATP 产生不足与各种肾疾病有关,包括 DN^[22]。越来越多的证据表明,线粒体动力学缺陷和线粒体过度氧化应激是 DN 肾小管损伤的主要原因^[23]。因此,目前正在开发许多新的线粒体靶向策略来治疗肾疾病^[24]。在这项研究中,我们发现 Tubastatin A 显著改善了线粒体形态,同时在 HG 条件下降低了线粒体 ROS 水平。因此,HDAC6 的抑制降低了肾小球内皮细胞的凋亡率。这些数据表明,HDAC6 通过破坏线粒体稳态导致 HG 诱导的肾小球内皮细胞凋亡。先前研究将 HDAC6 确定为参与坏死性凋亡和细胞凋亡的候选分子^[7]。据报道 HDAC6 通过作用于多种信号通路来调节细胞死亡,例如 Rac1 和 p53 通路^[25]。本研究扩展了先前的发现,证明了 HDAC6 破坏线粒体稳态并导致细胞凋亡,突出了 HDAC6 在操纵细胞命运中的多种调节机制。

总之,这项研究表明,Tubastatin A 改善了 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 DN 进展,其作用机制与保护线粒体稳态和抑制 EMT 发生相关。这些发现为 DN 的治疗策略提供新的启示。然而,Tubastatin A 通过何种途径调节线粒体稳态和 EMT 有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘苏,徐魏龙,查敏,等. miR-296-5p 在糖尿病肾病 db/db 小鼠血浆外泌体中的表达及功能 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(1):14-22.
- [2] Wang Y, Niu A, Pan Y, et al. Profile of podocyte transcriptome during development of type 2 and type 1 diabetic nephropathy using podocyte-specific TRAP mRNA RNA-seq [J]. Diabetes, 2021, 70(10): 2377-2390.
- [3] Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(10): 770-788.
- [4] Hernández-Cruz EY, Amador-Martínez I, Aranda-Rivera AK, et al. Renal damage induced by cadmium and its possible therapy by mitochondrial transplantation [J]. Chem Biol Interact, 2022, 361: 109961.

- [5] Brinkkoetter PT, Bork T, Salou S, et al. Anaerobic glycolysis maintains the glomerular filtration barrier independent of mitochondrial metabolism and dynamics [J]. Cell Rep, 2019, 27(5): 1551-1566.
- [6] Liu Q, Cui Y, Ding N, et al. Knockdown of circ_0003928 ameliorates high glucose-induced dysfunction of human tubular epithelial cells through the miR-506-3p/HDAC4 pathway in diabetic nephropathy [J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 55.
- [7] Liang T, Qi C, Lai Y, et al. HDAC6-mediated α -tubulin deacetylation suppresses autophagy and enhances motility of podocytes in diabetic nephropathy [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(19): 11558-11572.
- [8] Chen X, Yu C, Hou X, et al. Histone deacetylase 6 inhibition mitigates renal fibrosis by suppressing TGF- β and EGFR signaling pathways in obstructive nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 319(6): F1003-F1014.
- [9] Magupalli VG, Negro R, Tian Y, et al. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation [J]. Science, 2020, 369(6510): eaas8995.
- [10] Guo SD, Yan ST, Li W, et al. HDAC6 promotes sepsis development by impairing PHB₁-mediated mitochondrial respiratory chain function [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(6): 5411-5422.
- [11] Sharma D, Kumar Tekade R, Kalia K. Kaempferol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: an *in vitro* and *in vivo* study in diabetic nephropathy mice model [J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153235.
- [12] Brijmohan AS, Batchu SN, Majumder S, et al. HDAC6 inhibition promotes transcription factor EB activation and is protective in experimental kidney disease [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 34.
- [13] Wang Q, Ren D, Li Y, et al. Klotho attenuates diabetic nephropathy in db/db mice and ameliorates high glucose-induced injury of human renal glomerular endothelial cells [J]. Cell Cycle, 2019, 18(6-7): 696-707.
- [14] Shen S, Svoboda M, Zhang G, et al. Structural and *in vivo* characterization of tubastatin A, a widely used histone deacetylase 6 inhibitor [J]. ACS Med Chem Lett, 2020, 11(5): 706-712.
- [15] Chi Z, Byeon HE, Seo E, et al. Histone deacetylase 6 inhibitor tubastatin A attenuates angiotensin II-induced hypertension by preventing cystathionine γ -lyase protein degradation [J]. Pharmacol Res, 2019, 146: 104281.
- [16] Zheng Y, Chen Y, Lu X, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 by tubastatin A attenuates the progress of osteoarthritis via improving mitochondrial function [J]. Am J Pathol, 2020, 190(12): 2376-2386.
- [17] 施映枫,周瑀,马晓燕,等. 组蛋白去乙酰化酶 6 在肾小管上皮细胞-间充质转化及成纤维细胞活化中的作用 [J]. 中华肾病杂志, 2021, 37(11): 911-917.
- [18] 查淑娟,晏继喜. 己酮可可碱对间充质干细胞修复糖尿病肾病小鼠肾小球内皮细胞损伤的促进作用 [J]. 医药导报, 2020, 39(9): 1192-1198.

[19] Tung CW, Hsu YC, Shih YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(Suppl 4): 32-37.

[20] 聂广燕, 孙连芹, 钱军, 等. 肾小球补体 C1q 及 C3c 沉积与糖尿病肾病进展的相关性分析 [J]. 中华糖尿病杂志, 2020, 12(12): 999-1005.

[21] Bhatia D, Capili A, Choi ME. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: potential therapeutic approaches [J]. Kidney Res Clin Pract, 2020, 39(3): 244-258.

[22] Tan SM, Ziemann M, Thallas-Bonke V, et al. Complement C5a induces renal injury in diabetic kidney disease by disrupting mitochondrial metabolic agility [J]. Diabetes, 2020, 69(1): 83-98.

[23] Wei PZ, Szeto CC. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease [J]. Clin Chim Acta, 2019, 496: 108-116.

[24] Dai W, Lu H, Chen Y, et al. The loss of mitochondrial quality control in diabetic kidney disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 706832.

[25] Pham TQ, Robinson K, Xu L, et al. HDAC6 promotes growth, migration/invasion, and self-renewal of rhabdomyosarcoma [J]. Oncogene, 2021, 40(3): 578-591.

[收稿日期]2022-09-23

(上接第 14 页)

[11] Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(5): 1366-1377.

[12] 刘霞, 郭俊峰, 蒋德梅, 等. 穴位埋线联合东莨菪碱治疗对吗啡依赖大鼠十二指肠表达 5-羟色胺的影响 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(5): 43-47, 51.

[13] Chen T, Zhang WW, Chu YX, et al. Acupuncture for pain management: molecular mechanisms of action [J]. Am J Chin Med, 2020, 48(4): 793-811.

[14] 梁龙, 杨克新, 周帅琪, 等. 穴位埋线治疗神经根型颈椎病系统评价 [J]. 中医药导报, 2020, 26(12): 133-138.

[15] 李小兰, 赵会娟, 杜燕. 穴位埋线联合西药对活动期类风湿关节炎患者的治疗作用探讨 [J]. 饮食保健, 2019, 6(52): 91.

[16] Wang Y, Li Z, Zhang Z, et al. Identification ACTA2 and KDR as key proteins for prognosis of PD-1/PD-L1 blockade therapy in melanoma [J]. Animal Model Exp Med, 2021, 4(2): 138-150.

[17] Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8⁺ T cells [J]. Immunity, 2011, 35(3): 400-412.

[18] Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma [J]. Blood, 2008, 111(6): 3220-3224.

[19] Curti BD, Kovacsics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients [J]. Cancer Res, 2013, 73(24): 7189-7198.

[20] Buchan SL, Rogel A, Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy [J]. Blood, 2018, 131(1): 39-48.

[21] Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship [J]. Cell Immunol, 2016, 310: 27-41.

[22] Messenheimer DJ, Jensen SM, Afentoulis ME, et al. Timing of PD-1 blockade is critical to effective combination immunotherapy with Anti-OX40 [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(20): 6165-6177.

[23] Ma Y, Li J, Wang H, et al. Combination of PD-1 inhibitor and OX40 agonist induces tumor rejection and immune memory in mouse models of pancreatic cancer [J]. Gastroenterology, 2020, 159(1): 306-319.

[收稿日期]2022-12-12

李会萍,陈梅丽,赵维波. 中国实验动物许可证管理现状比对分析及对策建议 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 81-90.
Li HP, Chen ML, Zhao WB. Comparative analysis and countermeasure suggestion on the current administrative situation of laboratory animal licenses in China [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 81-90.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.011

中国实验动物许可证管理现状比对分析及对策建议

李会萍,陈梅丽,赵维波*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 归纳和梳理 2018 年~2022 年来中国的实验动物许可证情况,分析当前中国的实验动物许可证管理现状以及发展趋势,为我国的实验动物管理工作提供依据。**方法** 将实验动物许可证数据按被许可总体情况、被许可的四大区域、被许可省(市)、被许可动物种类、被许可环境设施的不同维度进行数据整理和数据预处理,通过数据统计、图表化比对和相关文献查阅比对研究相结合的方法进行分析、总结。**结果** 中国的实验动物许可证数量总体呈上升趋势,充分体现中国实验动物行政许可管理逐步实现法制化与科学监管,行政许可管理效能和服务不断提升。**结论** 文章阐述和分析了中国实验动物许可证发展趋势和存在问题并提出对策和建议,建议完善实验动物法规制度,加强实验动物行政许可监管力度,提升实验动物增量资源标准化程度,对推动中国实验动物行业的健康发展具有重要作用。

【关键词】 实验动物;行政许可;许可证;对策

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0081-10

Comparative analysis and countermeasure suggestion on the current administrative situation of laboratory animal licenses in China

LI Huiping, CHEN Meili, ZHAO Weibo*

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective Summarize the situation of laboratory animal licenses in China from 2018 to 2022, analyze the current situation and development trend of laboratory animal license management in China, and provide a basis for managing laboratory animals in China. **Methods** Laboratory animal license data were collated and preprocessed in accordance with the overall situation of the license, the four major regions licensed, the provinces (cities) licensed, the types of licensed animals, and different dimensions of the licensed environmental facilities. Data were analyzed and summarized through a combination of data statistics, graphical comparisons, related literature review, and comparative studies. **Results** The overall trend of the number of laboratory animal licenses in China is increasing, fully reflecting the gradual realization of legalization and scientific supervision in the administrative license management of laboratory animals in China and the continuous improvement of the administrative license management efficiency and services. **Conclusions** This article describes and analyzes the developmental trend and existing problems of laboratory animal licenses in China and provides countermeasures and suggestions. It is recommended to improve the regulations and systems for laboratory animals, strengthen the supervision of administrative licenses for laboratory animals, and enhance the standardization of incremental

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81941010); 广东省科技计划项目 (2017B070705007); 广东省科技计划项目 (2016A040404009)。
[作者简介] 李会萍 (1980—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 实验动物信息管理与科技服务。E-mail: 84178102@ qq. com
[通信作者] 赵维波 (1976—), 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 实验动物科技管理。E-mail: 183775444@ qq. com

resources for laboratory animals, which play an important role in promoting the development of China's laboratory animal industry.

【Keywords】 laboratory animals; administrative license; license; countermeasures

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验动物是生命科学、医学创新研究的重要组成部分,是“创新型国家”的战略资源之一,对保障人类健康、食品安全、生物安全等具有重要的战略意义^[1-3]。与欧洲、美国等发达国家或地区相比,美国、日本、英国及其他欧洲国家在 20 世纪 50 到 70 年代先后对实验动物施行行业立法、自律管理,使其逐步走上了法制化管理的道路^[4]。实验动物学在中国的起步和发展始于 20 世纪 80 年代初,实验动物管理工作由国家科学技术部统一规划管理。1982 年,国家科学技术委员会召开了第一届全国实验动物工作会议,首次将发展实验动物科学纳入国家计划,1988 年,经国务院批准,国家科学技术委员会第 2 号令发布了中国首部《实验动物管理条例》^[5-6](以下简称《条例》),开启了中国政府对实验物的法制化管理的轨道,《条例》明确提出国家实行实验动物的质量监督和质量合格证制度^[7]。1997 年,国家科委、国家技术监督局共同发布《实验动物质量管理办法》(国科发财字[1997]593 号),要求全国实验动物实行统一的质量标准,生产、使用实验动物的单位和个人必须申领许可证^[8]。2001 年,国家科技部等七部局联合发布《实验动物许可证管理办法(试行)》(国科发财字[2001]545 号)(以下简称《管理办法》),中国的实验动物许可证管理工作正式实施,《管理办法》明确:各省、自治区、直辖市科技主管部门是具体的实施部门,全国实验动物管理办公室负责军队实验动物许可证的发放,军队系统实验动物许可证具有与地方许可证相同的效能,并且针对实验动物许可证的申请、审批、发放与监督管理等相关工作提出了要求^[9]。《实验动物许可证管理办法(试行)》是中国实验动物质量管理的一个核心性文件,为实验动物单位和个人从事实验动物工作设置了行业准入的门槛,实施实验动物许可证制度也是中国实验动物法制化管理的重要举措,通过该许可证认证这一法制化管理模式,既规范了科学研究行为,同时又促进实验动物行业的发展^[1]。随后,各省、自治区、直辖市也先后出台地方管理办法,如《上海市实验动物许可证管理办法》《江苏省实验动物许可证管理办法》《湖南省实验动物许可证管理实施细则》等,为贯彻

落实实验动物许可证管理工作提供了具体的措施。2019 年,国家科技部印发《自贸区实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》(国科发基[2019]398 号)^[10],2021 年,国家科技部印发《实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》(国科发基[2021]354 号)^[11],在一系列国家推出的“放管服”“证照分离”等重大改革举措下,中国的实验动物许可证管理工作稳步推进,特别是近 5 年来发展迅猛,取得了显著成效,对我国生命科学、生物医药产业发展发挥了重要的支撑作用。

本文对 2018 年~2022 年的中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市(除西藏)的实验动物许可证数据进行比对,分析近年来中国的实验动物许可证管理现状以及发展趋势。

1 数据对象和范围

数据主要来自全国实验动物许可证查询管理系统(http://www.lascn.net/Category_1377/Index.aspx)^[12],重点收集和整理的范围数据范围为系统保存的中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市(除西藏外)2018 年、2020 年和 2022 年获得实验动物生产和使用许可证的单位数据。需要说明的是本文主要以中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市(除西藏、部队系统外)实施实验动物许可证制度地区获得的实验动物许可证数据为代表进行统计分析,其中西藏自治区的西藏军区总医院申领了全军动管办发放的实验动物使用许可证^[1],其归属部队系统管理,由于部队系统的实验动物许可证受严格保密管理,因此就部队系统的实验动物许可证不纳入此次数据统计的范围;另外,港、澳、台所涉及的实验动物管理体系不一致^[13],也不在本次讨论的范围。

2 研究方法

将实验动物许可证数据按被许可总体情况、被许可的四大区域、被许可省(市)、被许可动物种类、被许可环境设施的不同维度进行数据整理和数据预处理,通过数据统计、图表化比对、相关文献查阅比对、深层次关联比对研究相结合的方法,对中国实验动物许可证的现状进行梳理,总结、分析当前

中国实验动物行政许可管理成效、存在问题,并提出相关对策建议。

3 实验动物许可证现状分析比对

3.1 实验动物许可证发放总体情况

截至 2022 年 12 月底,对中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市数据统计显示,中国目前共发放实验动物许可证 2691 家,其中生产许可证单位 511 家,使用许可证单位 2180 家,分别占许可证总数量 19%、81%。江苏省、北京市、广东省、浙江省、上海市、山东省、四川省、吉林省等地区实验动物许可证数量位居前 8 位,分别占 13.15%、12.37%、8.80%、7.54%、6.76%、6.28%、4.80%、4.31%,合计占全国实验动物许可证总数的 64%,且他们的实验动物

使用许可证单位超过 100 家以上。除青海省未发放实验动物生产许可证外,中国大陆地区 30 个省、自治区、直辖市均有发放生产和使用许可证,其中北京市实验动物生产许可证数量居首位,其次是江苏省、广东省、浙江省、山东省和上海市。见表 1。

3.2 2018 年~2022 年实验动物许可证发放情况比对

从 2018 年~2022 年的统计数据 displays,中国的实验动物许可证发放数量呈逐年上升趋势,与 2018 年相比,实验动物许可证数量总体增长 27.3%。2018 年、2020 年、2022 年期间中国的实验动物许可证分别新增 129 家、196 家、381 家单位,增长率为 6.5%、9.3%、16.5%。其中实验动物生产许可证增长率为 6.0%、9.7%、10.4%,实验动物使用许可证增长率为 6.6%、9.2%、18.0%,可见,实验动物生产许可证

表 1 31 个省、自治区、直辖市实验动物许可证发放情况

Table 1 Issuance of laboratory animal licenses in 31 provinces, autonomous regions and municipalities directly under the Central Government				
地区 Areas	生产许可 Breeding licenses	使用许可 Experiment licenses	合计 Total	比例 Percentage
江苏 Jiangsu	56	298	354	13.15%
北京 Beijing	66	267	333	12.37%
广东 Guangdong	37	200	237	8.81%
浙江 Zhejiang	35	168	203	7.54%
上海 Shanghai	28	154	182	6.76%
山东 Shandong	32	137	169	6.28%
四川 Sichuan	26	102	128	4.76%
吉林 Jilin	11	105	116	4.31%
黑龙江 Heilongjiang	20	71	91	3.38%
河南 Henan	14	68	82	3.05%
湖北 Hubei	17	64	81	3.01%
天津 Tianjin	12	58	70	2.60%
重庆 Chongqing	20	44	64	2.38%
河北 Hebei	15	46	61	2.27%
湖南 Hunan	15	41	56	2.08%
昆明 Kunming	16	34	50	1.86%
安徽 Anhui	4	45	49	1.82%
辽宁 Liaoning	12	35	47	1.75%
陕西 Shanxi	9	36	45	1.67%
福建 Fujian	6	34	40	1.49%
广西 Guangxi	14	26	40	1.49%
山西 Shanxi	9	28	37	1.37%
江西 Jiangxi	3	29	32	1.19%
甘肃 Gansu	6	19	25	0.93%
贵州 Guizhou	6	18	24	0.89%
云南 Yunnan	11	10	21	0.78%
新疆 Xinjiang	5	12	17	0.63%
内蒙古 Neimenggu	2	12	14	0.52%
海南 Hainan	3	7	10	0.37%
青海 Qinghai	0	8	8	0.30%
宁夏 Ningxia	1	4	5	0.19%
合计 Total	511	2180	2691	100.00%

增幅相对比较平缓,实验动物使用许可证的增幅明显。总体来看,特别是近 3 年中国的实验动物许可证呈快速增长势头。见图 1。

3.3 被许可单位按区域比对分析

按中国大陆 4 个区域(华东区、北方区、华南区、西部区)分布来看,2018~2022 年中国实验动物许可证数量以长江三角洲(江苏、上海、浙江等)定位的华东区占据领先地位,第二是以京津冀(北京、天津、河北等)定位的北方地区,其次是以珠江三角洲、粤港澳大湾区(广东等)定位的华南地区,西部地区相对较少。见表 2。

从 2018~2022 年各区域许可证数量比对分析来看,各区域的实验动物生产和使用许可证均呈上升态势。其中 2022 年实验动物许可证数量华东区有 1029 家,北方区有 769 家,华南区 506 家,西部区

387 家,分别占全国总数量的 38.2%、28.6%、18.8%、14.4%,见表 2。从增长趋势来看,各区域许可证 2020 年同比 2018 年增长率为:11.4%、4.9%、9.7%、12.4%,2022 年同比 2020 年增长率为 17.9%、16.2%、17.4%、12.5%,5 年合计增长率分别为 31.3%、21.9%、28.8%、26.5%,可见,各区域总体增长趋势华东地区居首位,华南区增长态势迅猛,其次是西部和北方区域。

3.4 被许可单位按省(市)比对分析

从 2018~2022 年中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市的实验动物许可证统计数据可见,5 年来,中国大陆地区的 27 个省(市)的实验动物许可证发放数量均有一定比例的增长,浙江省、山东省、陕西省、广东省呈快速增长趋势,增长水平超 50%。有 4 个省(市)的实验动物许可证发放数量呈下降

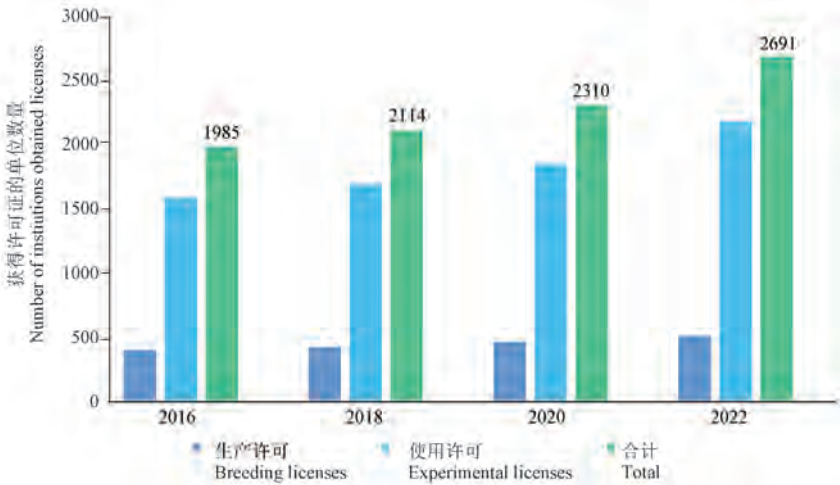


图 1 2018 年~2022 年中国实验动物许可证发放情况比对
Figure 1 Comparison of laboratory animal license issuance in China from 2018 to 2022

表 2 2018 年~2022 年各区域实验动物许可证发放情况
Table 2 Issuance of laboratory animal licenses in various regions from 2018 to 2022

年度 Year	类型 Type	华东区 Eastern China	北方区 Northern Region	华南区 Southern China	西部区 Western Region	合计 Total
2018	生产许可 Breeding licenses	136	131	79	76	422
	使用许可 Experiment licenses	648	500	314	230	1692
	合计 Total	784	631	393	306	2114
	占比(%) Percentage	37.1%	29.8%	18.6%	14.5%	100%
2020	生产许可 Breeding licenses	143	139	92	89	463
	使用许可 Experiment licenses	730	523	339	255	1847
	合计 Total	873	662	431	344	2310
	占比(%) Percentage	37.8%	28.6%	18.7%	14.9%	100%
2022	生产许可 Breeding licenses	164	147	100	100	511
	使用许可 Experiment licenses	865	622	406	287	2180
	合计 Total	1029	769	506	387	2691
	占比(%) Percentage	38.2%	28.6%	18.8%	14.4%	100%

趋势,分别是海南、新疆、福建、辽宁,其中海南从 2018 年的 19 家到 2022 年减少为 10 家许可证单位,降幅达 47.37%,其它 4 省份降幅不大。见表 3。

从 2018~2022 年许可证数量在全国前 10 位省份的排名变化情况看,2018 年排名前 10 位的省份分别是江苏、北京、上海、广东、四川、浙江、吉林、山东、黑龙江和湖北,10 个省份合计实验动物许可证发放 1438 家,占全国总数量的 68%;2020 年排名前 10 位的省份分别是江苏、北京、广东、上海、山东、浙江、四川、吉林、河南和湖北,广东排位从原第 4 位上

升至第 3 位,山东排位从原第 8 位上升至第 5 位,10 个省份合计实验动物许可证发放 1587 家,占全国总数量的 68.7%;2022 年排名前 10 位的省份分别是江苏、北京、广东、浙江、上海、山东、四川、吉林、黑龙江和河南,浙江排位从原第 6 位上升至第 4 位,10 个省份合计实验动物许可证发放 1895 家,占全国总数量的 70.4%。5 年来前 10 位排名省份基本比较平稳,江苏、北京稳居第一、第二,其他省份排位上有所变化,尤其是广东、浙江、山东的许可证数量明显增加其排位相应的得到上升。

表 3 2018 年~2022 年 31 个省、自治区、直辖市实验动物许可证发放情况

Table 3 Issuance of laboratory animal license in 31 provinces, autonomous regions and municipalities directly under the Central Government from 2018 to 2022						
地区 Areas	获得许可证的单位数量 Number of institutions obtained licenses			增长率比对 Growth rate comparison		
	2018	2020	2022	2020 年同比 增长率	2022 年同比 2020 年增长率	增长率 (5 年合计)
				Year-on-year growth rate in 2020	Growth rate in 2022 compared to 2020	Growth rate (Total 5-year)
江苏 Jiangsu	307	306	354	-0.33%	15.69%	15.31%
北京 Beijing	283	305	333	7.77%	9.18%	17.67%
广东 Guangdong	156	192	237	23.08%	23.44%	51.92%
浙江 Zhejiang	98	126	203	28.57%	61.11%	107.14%
上海 Shanghai	161	178	182	10.56%	2.25%	13.04%
山东 Shandong	94	139	169	47.87%	21.58%	79.79%
四川 Sichuan	101	113	128	11.88%	13.27%	26.73%
吉林 Jilin	98	89	116	-9.18%	30.34%	18.37%
黑龙江 Heilongjiang	72	67	91	-6.94%	35.82%	26.39%
河南 Henan	68	71	82	4.41%	15.49%	20.59%
湖北 Hubei	68	68	81	0.00%	19.12%	19.12%
天津 Tianjin	48	53	70	10.42%	32.08%	45.83%
重庆 Chongqing	50	53	64	6.00%	20.75%	28.00%
河北 Hebei	46	50	61	8.70%	22.00%	32.61%
湖南 Hunan	51	47	56	-7.84%	19.15%	9.80%
昆明 Kunming	44	47	50	6.82%	6.38%	13.64%
安徽 Anhui	42	41	49	-2.38%	19.51%	16.67%
辽宁 Liaoning	49	52	47	6.12%	-9.62%	-4.08%
陕西 Shanxi	29	41	45	41.38%	9.76%	55.17%
福建 Fujian	50	49	40	-2.00%	-18.37%	-20.00%
广西 Guangxi	31	38	40	22.58%	5.26%	29.03%
山西 Shanxi	27	34	37	25.93%	8.82%	37.04%
江西 Jiangxi	32	34	32	6.25%	-5.88%	0.00%
甘肃 Gansu	19	20	25	5.26%	25.00%	31.58%
贵州 Guizhou	22	22	24	0.00%	9.09%	9.09%
云南 Yunnan	15	17	21	13.33%	23.53%	40.00%
新疆 Xinjiang	20	23	17	15.00%	-26.09%	-15.00%
内蒙古 Inner Mongolia	12	12	14	0.00%	16.67%	16.67%
海南 Hainan	19	15	10	-21.05%	-33.33%	-47.37%
青海 Qinghai	2	4	8	100.00%	50.00%	300.00%
宁夏 Ningxia	4	4	5	0.00%	25.00%	25.00%
合计 Total	2114	2310	2691	9.27%	16.49%	27.29%

3.5 被许可的动物种类比对分析

截至 2022 年 12 月底,中国生产的实验动物种类有 16 种,使用的实验动物种类有 27 种。与 2018 年相比,中国生产和使用的实验动物各种类的许可证数量均呈上升趋势(2018 年生产动物种类 15 种,使用动物种类 24 种)^[14]。小鼠、大鼠、实验兔、豚鼠的许可证数量总体增长率分别为:30.3%、36.9%、16.2%、21.5%,其许可证数量仍位居前 4 位。据不完全估计,由于受到新冠肺炎疫情的影响,中国的实验用大动物许可证数量增长迅猛,实验犬、小型猪、实验猴大动物许可证数量总体增长率达 46.8%、53.7%、40.7%。近年来,特色实验动物如实验羊、牛、鸭、实验鱼、雪貂、树鼩等使用许可证增加显著,与 2018 年同比分别增加 55 家、18 家、16 家、11 家、10 家、8 家。见表 4。

3.6 被许可的环境设施分析

按照《实验动物环境及设施》(GB14925-2010),把环境设施分为普通环境、屏障环境和隔离环境^[15]。不同设施环境其使用功能也不同,其中普通环境设施适用的等级为普通级动物;屏障环境设施适用的等级为 SPF 级动物;隔离环境设施适用的等级包括 SPF 级、悉生动物和无菌级动物^[16]。

据不完全统计,中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市 2022 年的环境设施实验动物许可证(包括生产和使用许可证)中普通环境有 1590 家、屏障环境 1958 家、隔离环境 104 家。其中实验动物生产设施普通环境许可证数量排名前五位的是北京、江苏、广东、浙江、重庆,分别有 32 家、28 家、16 家、14 家、14 家;屏障环境排名前五位的是上海、北京、江苏、广东以及浙江、山东,分别有 30 家、26 家、26 家、23 家、20 家。实验动物使用设施普通环境许可证数量排名前五位的是北京、江苏、广东、浙江、山东,分别有 147 家、129 家、123 家、100 家、97 家,屏障环境排名前五位的是北京、广东、江苏、上海、浙江。而隔离设施无论是生产还是使用许可证数量均北京最多。见图 2、图 3。

4 中国实验动物许可证管理现状分析

中国自 2001 年颁布《实验动物许可证管理办法(试行)》至今已实施 20 年,对实验动物许可证法制化管理提供了依据,推动了中国实验动物行业的快速发展,是实验动物生物安全的重要保障。从以上数据比对分析可见,中国实验动物许可证数量总

体呈上升趋势,按被许可的中国大陆四大区域、被许可省(市)、被许可动物种类、被许可环境设施的划分进行比对分析均呈增长态势,中国实验动物许可证分布与管理呈现出鲜明的特点,也间接说明中国实验动物行业的管理逐渐规范。同时,受中国经济、社会、科技发展长期向好趋势影响,实验动物资源与动物实验市场需求潜力巨大,实验动物学科与实验动物资源优势明显,也进一步推动了中国实验动物行业的快速发展^[17]。

4.1 实验动物行政许可管理实现法制化与科学监管

截至目前,中国大陆地区 31 个省、自治区、直辖市科技主管部门严格按照《实验动物许可证管理办法(试行)》进行许可证申请、审批、发放和管理。《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》和《实验动物许可证管理办法(试行)》是中国实验动物管理政策法规的主要架构和主旨思想,《条例》是中国实验动物法制化管理的法律基础,《实验动物质量管理办法》和《实验动物许可证管理办法(试行)》是贯彻落实《条例》的具体措施和方法^[18-19]。在《条例》的基础上,北京、黑龙江、广东、湖北、云南、吉林等 6 个省(市)颁布了实验动物地方性管理条例,相关省(市)出台了《实验动物管理办法》《实验动物许可证管理办法》或/和《实验动物许可证管理办法实施细则》,有效完善了中国实验动物管理制度体系^[19]。该套机制是具有中国特色的实验动物管理模式,无论从国家层面还是到地方基层,自上而下的建立有针对性的实验动物行业的监督与管理机制,以此对加强中国及各地区实验动物工作规范化、法制化管理、科学监管起到关键性的作用,有力地促进了实验动物行业健康发展。

4.2 实验动物行政许可管理效能和服务不断提升

《实验动物许可证管理办法(试行)》明确规定:实验动物许可证有效期 5 年,到期重新审查发证;许可证实行年检管理制度;年检不合格的单位,由省、自治区、直辖市科技主管部门吊销其许可证,并报科技部及有关部门备案予以公告^[9]。随着国家推出一系列“放管服”政策以及科技部推出“实验动物许可‘证照分离’”等重大改革措施,各地方依据国家依法行政的新要求、新举措,进一步明确和规范实验动物行政许可管理权责和流程,以广东为例,广东省科技厅先后出台了《广东省科技厅关于实验动物行政处罚自由裁量权的规定》和《广东省科学

表 4 2018 年~2022 年实验动物种类许可证发放情况
Table 4 Licensing of laboratory animal types from 2018 to 2022

年度 Year	种类 Type	生产许可 Breeding licenses	使用许可 Experiment licenses	合计 Total
2018	小鼠 Mouse	190	1337	1527
	实验兔 Rabbit	137	1065	1202
	豚鼠 Guinea pig	137	943	1080
	大鼠 Rat	120	906	1026
	实验犬 Dog	34	351	385
	小型猪 Mini pig	27	301	328
	实验猴 Monkey	44	202	246
	实验猫 Cat	3	187	190
	鸡 Chicken	23	122	145
	地鼠 Hamster	18	116	134
	实验羊 Sheep	1	42	43
	鸭 Duck	1	23	24
	树鼩 Tree shrew	1	9	10
	牛 Cattle	0	10	10
	沙鼠 Gerbil	1	8	9
	鹅 Goose	0	8	8
	鸽子 Dove	0	7	7
	雪貂 Marten	1	4	5
	实验鱼 Fish	1	4	5
	马 Horse	0	2	2
	鹌鹑 Quail	0	2	2
	貉 Raccoon dog	0	1	1
	蟾蜍 Toad	0	1	1
	驴 Donkey	0	1	1
	鹿 Deer	0	1	1
2022	小鼠 Mouse	246	1748	1994
	大鼠 Rat	161	1244	1405
	实验兔 Rabbit	161	1236	1397
	豚鼠 Guinea pig	146	1166	1312
	实验犬 Dog	65	500	565
	小型猪 Mini pig	50	454	504
	实验猴 Monkey	60	286	346
	地鼠 Hamster	16	207	223
	实验猫 Cat	6	205	211
	鸡 Chicken	23	144	167
	实验羊 Sheep	7	97	104
	鸭 Duck	1	40	41
	牛 Cattle	0	28	28
	树鼩 Tree shrew	2	17	19
	实验鱼 Fish	3	15	18
	鹅 Goose	0	16	16
	沙鼠 Gerbil	2	13	15
	雪貂 Marten	1	14	15
	马 Horse	0	5	5
	鹌鹑 Quail	0	5	5
	貉 Raccoon dog	0	3	3
	鸽子 Dove	0	3	3
	蟾蜍 Toad	0	2	2
	狐 Fox	0	2	2
	驴 Donkey	0	2	2
	棉鼠 Cotton rat	0	2	2
	鹿 Deer	0	1	1

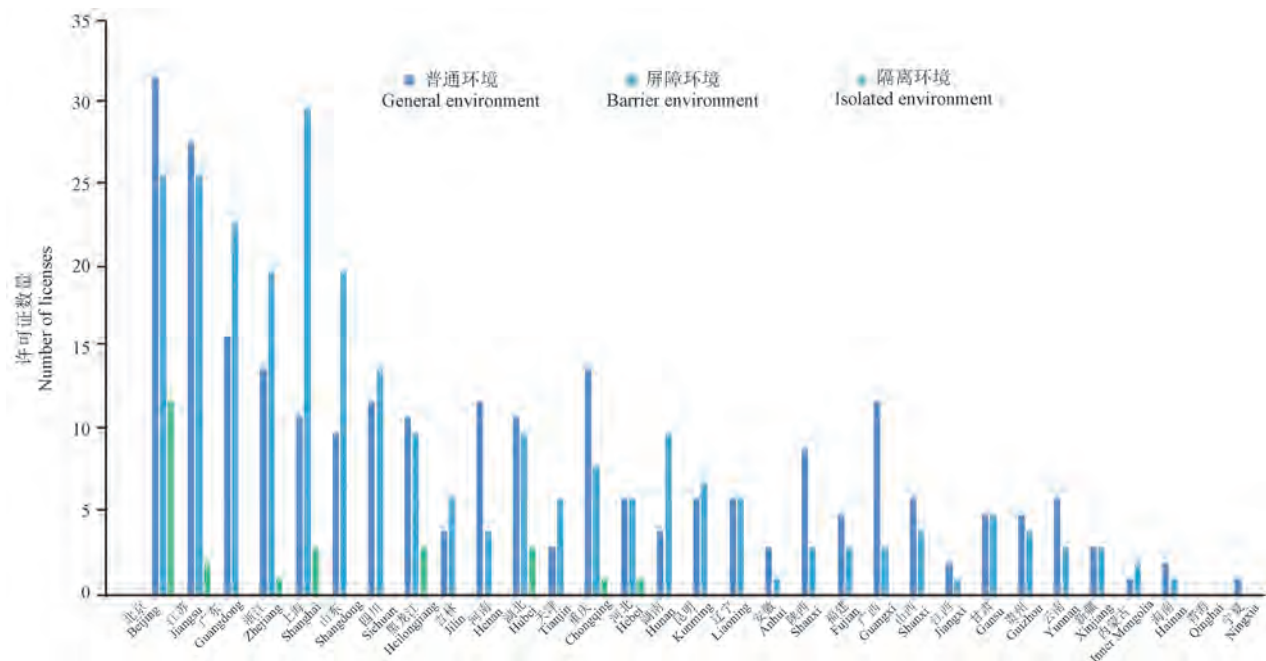


图2 2022年31个省、自治区、直辖市实验动物生产许可证中环境设施情况汇总

Figure 2 Situation of environmental facilities in the breeding license of laboratory animals in 31 provinces, autonomous regions and municipalities directly under the Central Government in 2022

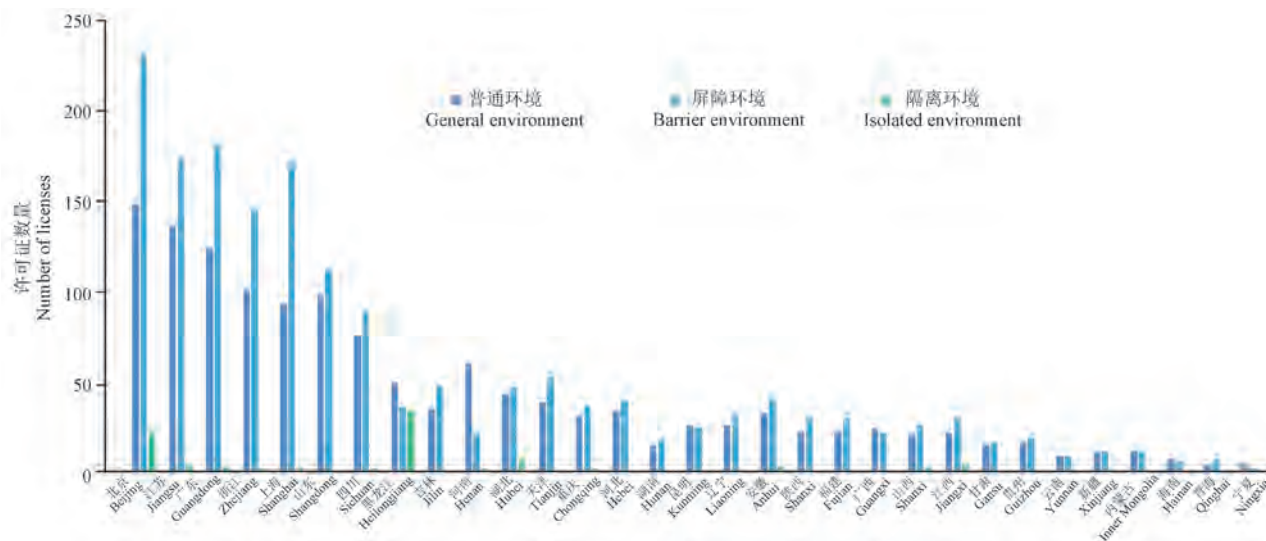


图3 2022年31个省、自治区、直辖市实验动物使用许可证中环境设施情况

Figure 3 Situation of environmental facilities in the experiment license of laboratory animals in 31 provinces, autonomous regions and municipalities directly under the Central Government in 2022

技术厅实验动物行政处罚自由裁量权执行标准》,规范了广东省实验动物行政处罚自由裁量权的相关标准,并通过缩减行政许可事项承诺办理时限和申请材料、实行行政许可“0 跑动”“不见面审批”等举措,广东省实验动物行政许可管理质量和服务效率不断提升^[20-21]。北京市的实验动物行政许可检查推出实验动物质量抽查、定期检查以及针对设施管理的双随机抽查和网上年检机制且实验动物行

政检查的结果全部公开发布^[19]。山西省经过优化调整,实验动物生产和使用许可事项办理时限由原来 20 个工作日减少到 15 个工作日,时限压缩了 20%,山西省实验动物行政许可审批效能大幅提升^[22]。各项制度和举措的实施有力地推动了中国实验动物行政许可工作整体水平的提升与发展。

4.3 实验动物行政许可区域性特征显著

数据显示,中国大陆地区发放的实验动物许可

证呈现出明显的区域性分布状态,以长三角的华东区居首位,第二是京津冀区域,其次是以珠三角、粤港澳大湾区的华南地区,西部地区相对薄弱,说明了实验动物科技发展与区域经济发展水平、科学研究活跃程度、生命科学与生物医药的发展水平有着密切的关系。从地区性来看,突显了各地方优势,如广东、广西、云南、四川、海南等其地理和资源环境适合实验猴的繁育,成为实验猴的主要生产省份^[23-24]。江苏省拥有雪貂、史宾格犬和实验猪等地方特色品种^[25-28]。而农业实验动物(指马、牛、羊、貂、猪、禽、狐、貉等)主要分布在黑龙江省,是黑龙江省实验动物行业的明显特色^[17]。近年来上海、江苏、重庆等地区还发放了隔离环境无菌级小鼠的生产和使用许可证,对实验动物科研和产业发展具有非常重要的作用。

5 中国实验动物行政许可管理存在的问题及建议

通过数据进一步分析,中国实验动物管理工作推进过程中也发现和暴露出了当前管理工作的一些新问题和新需求。

5.1 实验动物法规制度有待加快完善

随着国家一系列“放管服”政策的实施,依法治国的不断深入,当前中国一些实验动物行政法规及规章制度已不能满足实验动物行业发展的需要,如 1988 年颁布的《条例》已和当前实验动物管理工作的实际需要不符,对中国实验动物行政许可监管和实验动物资源建设等工作带来严峻挑战^[29]。目前中国 31 个省、自治区、直辖市仅 6 个省(市)颁布了实验动物地方性条例,江苏省作为实验动物科技与产业发展大省其法规尚无“条例”。广东、北京先后于 2019 年、2020 年对地方性《实验动物管理条例》进行了修订^[30-31]。黑龙江等其他省(市)的法规及相关配套管理办法在讨论或启动修订中,制修订进展缓慢。因此,进一步加快制修订中国及地方性相关实验动物法规及配套的规章制度,对完善中国实验动物管理体系,促进实验动物行政许可的精准监管,推动实验动物产业的健康发展具有重要的现实意义。

5.2 实验动物行政许可监管力度有待加强

实验动物行政许可监管是指对获得实验动物生产、使用许可证的单位和个人开展的定期与不定期的监督检查,包括实验动物遗传、微生物、寄生虫和病理,以及对实验动物饲料、饮用水、笼具、设施

环境等的质量检测,并依据相关国家标准、行业标准或地方标准判定检测结果的符合性^[13]。目前,北京、上海、广东等具有地方性法规的省份有设立专职机构、专职人员开展实验动物许可监督和检测,而在中国大陆其他大部分省级科技主管部门主要以委托本省相关机构开展实验动物许可监督和检测,缺少专门负责监督及检测和管理机构,实验动物行政执法专业人员不足,行政许可奖惩制度欠缺,造成许可事项监管不充分、许可延期等现象^[32-34]。建议有条件的省(市)成立专门实验动物监管单位或部门,加强监管力度,及时掌握被许可单位的实验动物生产和使用情况,执行有力的管理制度。

5.3 实验动物增量资源标准化程度有待提升

世界上用于实验动物研究的动物物种有 200 多种,中国的实验动物物种资源约 30 种,最常用的实验动物涉及这七种包括小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬、猴^[35-37]。随着中国的生命科学、生物医药产业发展,实验动物生产和使用资源进一步丰富,常用实验动物基本能满足需求,但特殊实验动物增量资源存在倒挂现象。从实际数据结果显示,中国的生产与使用许可实验动物种类差距明显,生产许可动物种类 16 种,使用许可动物种类 27 种,其中牛、鹅、鸽子、马、鹌鹑、貉、蟾蜍、驴、鹿、狐、棉鼠等由于目前尚没有相关国家标准、地方标准,这些使用动物均未发放生产许可证,因此使得实验动物使用种类远远超出合法生产实验动物的范围。当前,实验动物相关国家标准、行业标准以及地方标准等的制修订跟不上发展需求,标准覆盖面不全,特色实验动物、农用实验动物等标准缺乏,严重影响中国的科学研究、重大疫病、药品研发与检验以及生物制品研发。因此,在当前国家标准受控制情形下,建议有条件的省(市)加快推进急需的、有地区优势的地方标准的制定,从而提升中国实验动物新资源、增量资源的标准化程度,为实验动物行政许可与科学监管提供重要的技术支撑作用。

参考文献:

- [1] 夏咸柱,秦川,钱军. 实验动物科学技术与产业发展战略研究 [M]. 北京:科学出版社;2016.
- [2] 秦川,孔琪,钱军,等. 实验动物科学技术是生命科学和健康中国建设的基础支撑条件 [J]. 科技导报, 2017, 35(11): 10-14.
- [3] 贺争鸣. 基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景 [J].

- 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 85-90.
- [4] 赵心刚, 卢凡, 程革, 等. 我国实验动物资源建设的问题与展望 [J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12): 1371-1378.
- [5] 中国科学技术协会. 2014-2015 实验动物学学科发展报告 [M]. 北京: 中国科学技术出版社; 2016.
- [6] 秦川. 中国实验动物学科发展 40 年 [J]. 科技导报, 2017, 35(24): 20-26.
- [7] 国家科学技术委员会. 实验动物管理条例 [EB/OL]. [2023-03-03]. https://www.gov.cn/zhengce/2020-12/25/content_5574003.html.
- [8] 国家科委、国家技术监督局. 关于印发《实验动物质量管理办法》的通知 [EB/OL]. [2023-03-03]. http://www.nrlarc.cn/static/admin/kindeitor/attached/file/20210201/20210201171611_18245.pdf.
- [9] 科学技术部; 卫生部; 教育部; 农业部; 国家质量监督检验检疫总局; 国家中医药管理局; 中国人民解放军总后勤部卫生部. 关于发布《实验动物许可证管理办法(试行)》的通知 [EB/OL]. (2001-12-05) [2023-03-03]. https://most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2010before/201712/t20171227_137230.html.
- [10] 科技部. 关于印发《自贸区实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》的通知 [EB/OL]. (2019-11-29) [2023-03-03]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2019-12/25/content_5463952.htm.
- [11] 科技部. 关于印发《实验动物许可“证照分离”改革工作实施方案》的通知 [EB/OL]. (2021-11-29) [2023-03-03]. https://www.most.gov.cn/xxgk/xinxifenlei/fdzdgknr/fgzc/gfxwj/gfxwj2021/202111/t20211129_178248.html.
- [12] 中国实验动物信息网. 实验动物许可证查询管理系统 [DB/OL]. 2018. http://www.lascn.net/Category_1377/Index.aspx.
- [13] 国家科技基础条件平台中心. 中国实验动物资源调查与发展趋势 [M]. 北京: 科学出版社; 2017.
- [14] 李会萍, 王晓明, 杨锦涛, 等. 2018 年我国实验动物许可证管理的现状及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(7): 131-136.
- [15] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物机构、人员和设施现状分析 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(3): 66-70.
- [16] 赵效国. 实验动物屏障环境与设施管理技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2015.
- [17] 李宝龙, 王玉娥, 司昌德, 等. 黑龙江省实验动物管理现状与发展对策 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3): 181-189.
- [18] 巩和凌子, 孔琪, 刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 71-75.
- [19] 王锡乐, 巩薇, 胡建武, 等. 我国实验动物科技工作发展的政策支撑与思考 [J]. 实验动物科学, 2020, 37(4): 64-68.
- [20] 广东省科技厅. 关于印发《广东省科技厅关于实验动物行政处罚自由裁量权的规定》和《广东省科学技术厅实验动物行政处罚自由裁量权执行标准》的通知 [EB/OL]. (2016-12-23) [2023-03-03]. http://gdsc.gd.gov.cn/zwgk_n/tzgg/content/post_2686790.html.
- [21] 广东省科技厅. 关于印发《广东省科学技术厅关于实验动物行政处罚自由裁量权的规定》《广东省科学技术厅实验动物行政处罚自由裁量权执行标准》的通知 [EB/OL]. (2022-04-19) [2023-03-03]. http://gdsc.gd.gov.cn/zwgk_n/zcfg/gfwj/content/post_3914423.html.
- [22] 山西省科技厅. 山西省科技厅全面深化“放管服效”改革行政审批效能大幅提升 [EB/OL]. (2021-10-09) [2023-03-03]. https://www.safec.gov.cn/dfkj/sx/zxdt/202110/t20211009_177176.html.
- [23] 李会萍, 梁楚军, 赵维波. 广东省实验动物许可证管理现状 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(6): 577-582.
- [24] 李彪, 余亮, 陈梅丽, 等. 广东省实验动物许可证管理工作的现状及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 73-77.
- [25] 漆重阳, 陈林, 艾曼, 等. 基于江苏省实验动物行政许可现状的安全管理对策 [J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(1): 79-85.
- [26] 陈林, 艾曼, 徐航, 等. 江苏省实验动物行政许可现状 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(4): 284-289.
- [27] 王汉婷, 邱苏楠, 孙游天, 等. 简谈苏州市实验动物行政许可及对策 [J]. 云南科技管理, 2022, 35(1): 29-31.
- [28] 陈怡, 宗卫峰, 肖杭. 江苏省与浙江省实验动物许可证发放及管理现状对比 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 98-102.
- [29] 秦川. 中国实验动物学科发展的关键问题与对策的思考 [J]. 科学通报, 2017, 62(30): 3413-3419.
- [30] 北京市人民代表大会常务委员会. 关于修改《北京市实验动物管理条例》的决定 [EB/OL]. (2021-7-30) [2023-03-03]. https://www.beijing.gov.cn/zhengce/zhengcefaui/202107/t20210731_2453243.html.
- [31] 广东省人民代表大会常务委员会. 《广东省实验动物管理条例》(修订版) [EB/OL]. (2019-11-29) [2023-03-03]. https://www.gd.gov.cn/zwgk/wjk/zcfgk/content/post_2524545.html.
- [32] 罕园园, 李娜, 代解杰. 云南省实验动物工作 40 年发展历程与思考 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 399-408.
- [33] 师长宏, 刘恩岐, 张海. 陕西省实验动物工作近 10 年发展历程 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1): 14-16.
- [34] 褚芳, 罗小泉, 许宝华, 等. 江西省实验动物科技发展回顾与思考 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(1): 11-17.
- [35] 吴玥, 薛婧, 魏强, 等. 国家动物模型资源共享信息平台的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1080-1086.
- [36] 贺争鸣, 陈振文, 代解杰, 等. 实验动物品种增量建设与野生动物科学利用现状与建议 [J]. 中国科技资源导刊, 2021, 53(2): 50-58.
- [37] 孔琪, 夏霞宇, 秦川. 实验动物品系数据库的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 78-83.

高冉冉,申振,连梦慧,等.气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展[J].中国比较医学杂志,2023,33(10):91-99.
Gao RR, Shen Z, Lian MH, et al. Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 91-99.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.012

气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展

高冉冉¹,申 振²,连梦慧²,韩 聪^{3,4*},李 伟^{4*}

(1.山东中医药大学中医学院,济南 250014;2.山东中医药大学第一临床医学院,济南 250014;
3.山东中医药大学,济南 250014;4.山东中医药大学附属医院,济南 250014)

【摘要】 动物模型是中医药基础研究的重要手段,气虚湿瘀是肾纤维化的主要证候。随着慢性肾病患率及死亡率的逐年升高,气虚湿瘀型肾纤维化研究成为近年来的热点,亟须其病证结合动物模型的建立。本研究综述近年来相关造模方法,基于西医外科手术及化学因素建立肾纤维化病理模型,通过劳则气耗或饥则气损、内外湿相引加之客邪影响理论以及化学药物因素等从病因、病理角度建立气虚湿瘀病证结合模型,并从宏观表征、实验室指标、病理改变等角度制定气虚湿瘀型肾纤维化动物模型评价标准。将中医病证模型同现代科学相结合,构建相对完善的气虚湿瘀型肾纤维化动物模型造模方法及评价标准,为今后探究其发病机制及新的治疗思路提供模型支持,更有效地发挥中医药在肾纤维化中的治疗作用,推动中医药走向国际。

【关键词】 气虚湿瘀;肾纤维化;动物模型;模型评价方法;病证结合
【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856 (2023) 10-0091-09

Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome

GAO Ranran¹, SHEN Zhen², LIAN Menghui², HAN Cong^{3,4*}, LI Wei^{4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China.
2. First Clinical Medical School, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014. 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014. 4. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014)

【Abstract】 Animal models are important means for basic research in traditional Chinese medicine (TCM). Qi deficiency, dampness, and blood stasis are the main syndromes of renal fibrosis. With the increase in the morbidity and mortality of chronic kidney disease, study of renal fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome has become a hotspot in recent years. Additionally, establishment of combined disease and syndrome animal models is urgently needed. This article reviews the recent modeling method that established the renal fibrosis pathological model based on western medicine surgery and chemical factors, and established the model of qi deficiency, dampness and blood stasis disease from the aspect of etiology and pathology through the theory of exhaustion leading to qi loss or hunger leading to qi loss, internal and external dampness combination, exogenous pathogenic factors, and chemical drugs. Additionally, these studies established the evaluation standard of the renal fibrosis animal model of qi deficiency, dampness and blood stasis type from the aspects of macroscopic characterization, laboratory indexes, and pathological changes. The TCM disease and

【基金项目】国家自然科学基金(82174179);山东省自然科学基金(ZR2021LZY041);国家自然科学基金(82204886);山东省自然科学基金(ZR2022QH133);中国博士后科学基金(2021M702039);中国博士后科学基金(2023T160398)。

【作者简介】高冉冉(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:1377142543@qq.com

【通信作者】韩聪(1992—),男,主治医师,博士后,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:1585285585@qq.com

李伟(1962—),女,主任医师,博士,研究方向:中西医结合治疗肾系疾病的临床研究。E-mail:lweidw@163.com

* 共同通信作者

syndrome model has been combined with modern science to establish a relatively perfect qi deficiency and dampness stasis kidney fibrosis animal model with evaluation criteria. Exploring its pathogenesis and new treatments supports the therapeutic role of TCM in kidney fibrosis and promotes TCM internationally.

[Keywords] qi deficiency and dampness stasis; kidney fibrosis; animal model; model evaluation method; combination of disease and syndrome

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

动物模型最早可追溯到公元前 6 世纪,人类疾病发生发展复杂,借助动物模型间接研究可调控变量,有助于方便、有效地认识人类疾病的发生发展规律,促进医学发展与进步^[1]。传统医学因其独特性及病证复杂性,单纯西医病理模型不能充分反映其病因及临床实际,在现代实验研究中病证结合动物模型发挥着重要作用。近年来有关中医动物模型的研究不断发展,逐渐由单纯病理模型到病因模型再到病证结合模型,使动物模型同时具备疾病与证候的特征,更加贴近于中医理论特色。但是目前病证结合动物模型仍缺乏规范化的评价体系及可重复性,建立规范且具有复刻性的病证结合动物模型成为近年来研究的热点。

气虚湿瘀是慢性肾病 (chronic kidney disease, CKD) 的常见证候,肾纤维化是 CKD 的主要病理特征,胡洪贞等^[2]提出 CKD 以气虚为本,血瘀、湿浊为标,主要由劳倦、内外湿邪及外邪侵袭等所致。气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的建立有助于把握该证候疾病的本质及病理生理变化特点,利于 CKD 的研究及更好地指导临床用药诊疗。目前并无气虚湿瘀型肾纤维化动物模型造模的先例,本文从病理造模、病因造模及病证结合造模、模型评价角度出发,综述并探讨气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的造模方法及模型评价,以期气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的构建及复制提供参考。

1 气虚湿瘀

1.1 气虚血瘀

中医认为气为血之帅,气行则血行、气止则血止,气虚无力推动血液运行,血行不畅而致瘀;血为气之母,血瘀致脏腑失养,生化乏源,进一步导致气虚,气虚与血瘀二者互为因果,相互关联,临床多气虚血瘀并见。该证候动物模型的构建可从其病理及病因角度出发,单因素与多因素相结合。

1.1.1 病理造模

气虚血瘀多表现为免疫学、血液流变学及行为学上的改变如免疫功能下降、能量代谢紊乱、神疲

乏力、血液高凝状态、黏度增高、纤维蛋白原含量增高等。病理造模根据气虚血瘀特定的病理表现,运用相关实验技术对动物进行造模,使动物表现出该特定的病理改变。

林家茂等^[3]通过阿霉素腹腔注射联合丙基硫氧嘧啶混悬液灌胃,从血流动力学方面降低心肌收缩力,减少心排量制备心气虚兼血瘀证心衰模型,造模 6 周后,造模组出现饮食量减少、生长缓慢、精神萎靡、活动力下降、甲状腺激素 T₃、T₄ 降低等气虚表现以及毛色枯槁、爪甲紫绀、左室射血分数下降、心排量减少等血瘀表现,提示心气虚兼血瘀证的 SD 大鼠模型造模成功。罗泽飞等^[4]以环磷酸腺苷腹腔注射使血液呈高凝状态制备气虚血瘀大鼠模型,模型组大鼠全血黏度、血沉、血浆黏度、红细胞压积和内皮缩血管肽 (endothelin, ET)-1 均明显高于空白组,NO 含量低于空白组,提示造模成功。张玉昆等^[5]通过注射博来霉素生理盐水溶液 (5 mg/kg) 法过表达 TGF- β 1,制备气虚血瘀动物模型,造模结束后大鼠的中、低、高切变率的全血黏度、血小板聚积性相关指标 cGMP、血小板纤溶相关指标 PAI-1 以及血小板释放相关指标如 β -TG 和 PF4 水平均升高, cAMP、TT 缩短,并以方测证,运用行气活血方丹参饮后,大鼠气虚血瘀状态得到改善。此外,还有研究采用利血平肌肉注射,消耗小鼠体内儿茶酚胺导致脾虚,模型小鼠出现耳缘、脚趾等局部微循环血流量的降低,表现出气虚血瘀的临床及病理改变^[6-7]。

1.1.2 病因造模

病因造模指基于中医病因学说和发病理论将符合单一或多种病因理论的致病因素作用于实验动物^[8],符合“因-证理论”,符合中医机理,具有逻辑性。气虚血瘀依据中医“劳则气耗、饥则气损”的病因,多采用力竭游泳、疲劳跑步、睡眠剥夺法进行“气虚血瘀”模型构建。扈新刚等^[9]以大鼠沉入水中 10 s 不能自行浮出水面为力竭标准,制备大鼠气虚血瘀模型,对大鼠表征进行动态观察并检测相关血液流变学指标,发现经过长期的力竭游泳后均表

现出气虚相关表征,血液流变学指标符合气虚血瘀表现。郝婷婷等^[10]通过对大鼠每天睡眠剥夺 16 h 造成中枢性神经疲劳并联合长时间站立所致形体疲劳制备气虚血瘀型大鼠,大鼠出现舌象、足底图像 R、G、B 下降,足底变紫暗、舌呈淡紫,耳廓、足底体表激光多普勒血流灌注量降低等气虚血瘀表现。后陈进成等^[11]采用睡眠剥夺法成功复制气虚血瘀动物模型。甘加宽等^[12]曾用睡眠剥夺、力竭游泳、睡眠剥夺结合力竭游泳 3 种方法进行小鼠造模,对小鼠体重、抓力、舌象、脉搏、脾指数与胸腺指数、脾淋巴细胞亚群进行比较,结果显示三种造模方式均能引起小鼠乏力,睡眠剥夺与力竭游泳均能引起小鼠脉象变细,并最终得出睡眠剥夺组为三者间更优造模方法。李雅君等^[13]通过饥饿和力竭游泳的方法成功复制大鼠气虚血瘀模型,与王晚霞等^[14]的实验结果基本一致,表现为血液黏度低、纤维蛋白原等凝血因子显著不足的低流变性型血瘀证。彭桂原等^[15]采用小承气汤耗气破气加饥饱失常(足量给食-限量给食循环)进行气虚造模后,再用光化学反应法制备气虚血瘀证耳蜗 Corti 器毛细胞损伤的豚鼠动物模型,造模后豚鼠均出现不同程度的中医气虚证的典型症状表现,耳蜗病理切片提示耳蜗血管纹、Corti 器等结构出现不同程度的缺血性病变,体现血瘀表现,提示造模成功。

1.1.3 病证结合造模

病证结合造模即在充分考虑气虚血瘀证类疾病病因的前提下,人为地制造病理产物,使之既符合西医病理特点又符合中医证候特点,同时使用一些动物体表特征来模拟人类证候特征的生物表征,可更好地体现中医理论和评价中药疗效^[16]。

杨霓芝等^[17]在 Thy-1 抗体制备慢性肾炎模型的基础上采用游泳疲劳实验制备气虚血瘀病证结合模型,模型组大鼠出现气虚血瘀表征,机体细胞免疫功能紊乱,血液流变学异常。任建勋等^[18]依据“劳则气耗”理论,采用睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎的方法建立心力衰竭气虚血瘀病证结合大鼠模型,模型组体重、抓力、脉搏幅度及自主活动总路程和平均速度较空白对照组均明显下降,主动脉血流速度下降,在多因素复合干预下气虚血瘀病证结合更为明显。王瑾茜等^[19]通过控食复合力竭游泳联合结扎左冠状动脉前降支造模,造模结束后分析大鼠舌面 RGB 值属“紫舌”,舌面微血管数量增加,符合冠心病气虚血瘀病证结合模型特点。戴

姣等^[20]依据“生物表征”及“因、脉、证、治”理论通过声、光、电、夹尾、冰水浴、束缚等消耗正气,“元气既虚,必不能达于血管;血管无气,必停留而瘀”,从而构建气虚血瘀大鼠模型,通过注射野百合碱诱导肺动脉高压,大鼠注射部分出现不同程度的紫肿、出血等血液循环瘀滞表现,同时血流动力学指标体现血瘀。

综上,气虚血瘀模型多表现为血流动力学及肢体行为学上的改变,可采用化学法如阿霉素、环磷酸胺、博来霉素等靶向病理造模,同时采用劳倦过度、饮食失节的方法进行病因造模,病证结合。

1.2 气虚湿盛

气主推动,气行津行,气虚气化无力、气机阻滞可致运化失司,水湿停聚。《景岳全书》云“盖水为至阴,故其本在肾;水化于气,故其标在肺;水唯畏土,故其制在脾”。肾者水脏,主津液。肾气虚,气化不利,水液输布失常,则湿浊内生。肾气虚,邪能客之,外湿客表,久则深入血络,导致气滞湿阻,气化失司,加重湿浊。湿浊内停化热,可见湿热,而浊毒日久损及肾阳,失于温煦,可致寒湿。故从湿热与寒湿两方面论述。

1.2.1 湿热证

肾者,胃之关也,关门不利,故聚水而从其类也。肾气亏虚,失于气化蒸腾,可见水湿停聚。徐灵胎云:“有湿则有热,虽未必尽然,但湿邪每易化热。”肾气亏虚,津液输布排泄障碍,水湿停聚,郁久化热。肾与脾先后天相互滋生、相互影响,薛生白云“太阴内伤,湿饮停聚,客邪再至,内外相引,故病湿热”。嗜食肥甘厚味、饮酒无度、年老久病或房劳过度损伤脾肾、聚湿生热,加之外界环境湿热氤氲,同气感召,另受客邪引动致湿热,故湿热模型构建可从“内湿+外湿+客邪+脾肾亏虚”角度出发,内外因结合。

(1) 病理造模

湿热证病理多表现为舌苔黄腻、小便黄赤、大便黏滞或溏泄、炎症因子升高等,杜恒^[21]通过在口服并定时尾静脉注射牛血清白蛋白(BSA)的基础上注射葡萄球菌肠毒素 B 制备大鼠肾炎湿热证模型,大鼠出现大便溏泄等湿热证表征同时伴有 IL-6 等炎症因子升高。齐文杰等^[22]、Cao 等^[23]通过用胆胰管推注 5% 牛磺胆酸钠、异硫氰酸 α -萘酯和四氯化碳进行病理造模,呈现湿热证候。此外,多研究发现在肥甘饮食+恒温恒湿的基础上加用水杨酸、大

肠杆菌、克林霉素磷酸酯、鼠伤寒沙门氏菌灌胃等生物、化学因子均可制备湿热模型^[24-27]。

(2) 病因造模

基于饮食不节、外感湿邪及脾胃不和酿湿生热病因,季旭明等^[28]通过高脂饮食+游泳内外相引制备湿热证小鼠模型,模型小鼠出现脂质代谢紊乱。王婷等^[29]通过高蛋白饲料+糖水+酒营造内湿,恒温恒湿气候箱制备外湿,分别用花生油脂模拟肥甘厚腻致脾气虚、番泻叶寒凉致脾阳虚,两种湿热模型均出现喜聚堆蜷卧、喜闭眼、嗜睡懒动、被毛无光泽、尾部肛周、腹部毛色黯黄、饮水减少、大便溏泄等湿热证的临床表现和体征,以及干扰素 γ (INF- γ)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子的改变和肠道菌群结构的失调。周祎青等^[30]通过高蛋白饮食+人工气候箱+隔日灌服白酒+跑步制造“外湿+内湿+脾虚”的复合因素造模,模型组小鼠出现湿热证症状,机体发生炎性改变以及小肠组织黏膜层上皮细胞破坏,舌组织黏膜层角化增加、舌乳头排列不均匀等湿热证的病理表现。

(3) 病证结合造模

病证结合模型可反映疾病病理与湿热证候特征,熊宁宁等^[31]早在 1991 年就报道了采用给家兔注射血清白蛋白并加用大肠杆菌内毒素感染造成免疫复合物沉积模仿人类反复感染后导致的湿热型进行性肾炎,制备肾炎湿热病证结合模型。刘晓鹰等^[32]复刻肾炎湿热动物模型,通过在对 Wistar 大鼠口服并定时尾静脉注射牛血清白蛋白的基础上,分别施以葡萄菌肠毒素 B 或高糖高脂饮食联合恒温恒湿外环境影响构建湿热模型动物,造模中晚期动物出现血尿、蛋白尿、血清胆固醇、三酰甘油、血肌酐、尿素氮等升高,弥漫性肾小球系膜区增宽、系膜细胞、系膜基质增生、肾小管间质炎细胞浸润等类似于肾炎湿热证的生化及病理改变。

1.2.2 寒湿证

疾病日久,损及肾阳,肾阳不足,命门火衰,火不暖土,寒湿内生,另加之外受寒邪影响,内外寒湿互病。劳则耗气、饮食失节、苦寒药物、年老久病等损伤脾肾、寒湿内生,外界寒湿环境、寒湿邪气乘虚而入,内外因相互影响导致寒湿证候。故寒湿模型构建可基于“内伤+外感”,病因病理相结合。

寒湿证病理多表现为畏寒肢冷、肤色青暗、大便稀溏、体重下降、炎症因子升高、血清皮质醇下降等,病因多与饮食不节、苦寒泻下、年老久病气耗阳

损、外感寒湿侵袭等有关。戴冰等^[33]基于抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴原理通过给予 25 mg/kg 氢化可的松灌胃 10 d 后小鼠出现肢尾冷、体重下降、大便稀溏等寒湿表征。刘同林^[34]、吴君等^[35]选取老年大鼠与青年大鼠比较,发现老年大鼠具有体温下降、尿量增多、血清皮质醇下降等阳虚寒湿表现。靳荃等^[36]以冷水游泳力竭联合人工气候箱模拟外界寒湿环境制备小鼠寒湿证疼痛模型,造模后小鼠出现尾巴皮肤青暗、体重增长变慢等寒湿证病理特征。雷鸣等^[37]基于外湿病因以温度 4℃,湿度 60% 构建外湿环境进行寒湿痹阻模型造模,大鼠皮下胶原及肌组织出现肌纤维变性、坏死,纤维化伴淋巴细胞浸润提示造模成功。王常松等^[38]通过采取寒湿环境+寒凉饮食+高脂饲料的多因素造模,在外在表现及尿 D-木糖排泄率、血浆胃动素等微观指标上均符合寒湿证模型特征。

综上,气虚湿盛证候模型分为湿热与寒湿两个方面。湿热证主要根据中医“肥甘厚腻,酿湿生热”“湿热胶着,内外相引”理论再加以生活因素、生物化学因素等影响而建立,大致可概括为“内外湿热+脾肾亏虚+致病因子”的多因素病证结合造模。气虚阳损可见寒湿,寒湿证动物模型可通过糖皮质激素等抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴靶向病理联合中医寒湿“内生+外感”病因建立。

2 肾纤维化病理模型

肾纤维化发生发展机制复杂,涉及多细胞及多条细胞信号通路,其动物模型的制备方式多样。胡安康等^[39]通过大鼠肾大部分切除 (Platt 法) 和腺嘌呤 (Yokozawa 法) 灌胃法制备肾衰竭模型,两组大鼠肾均见局灶性间质纤维化,伴大量淋巴和单核细胞的浸润。麻志恒等^[40]成功复刻 5/6 肾切除慢性肾纤维化小鼠模型,可见肾小球明显肿大、增生,系膜细胞增殖变大变厚,局部粘连和硬化,基底膜增宽明显,肾小管管腔不完整,有蛋白管型,胶原纤维增生。李艺文等^[41]单侧输尿管结扎大鼠后,大鼠肾盂扩张、皮质变薄,上皮标志物 E-cadherin 表达下降,肌成纤维细胞标志 α -SMA 表达增加,EMT 形成,提示肾纤维化模型成功。Han 等^[42]用环孢素 (30 mg/kg) 灌胃配合低盐饮食建立环孢素肾毒性小鼠模型,造模后小鼠体重减轻,肾功能下降,肾小球基底膜增厚、肾小管扩张,空泡化或萎缩。高健^[43]通过单侧肾切除加阿霉素尾静脉注射制作大鼠肾小

球硬化模型,模型组可见肾小球局灶节段性肾小球硬化,肾小球毛细血管内皮细胞和足细胞肿胀、足突融合消失,加重病理进展,最终致肾纤维化。多项实验研究采用链脲佐菌素均成功制备糖尿病肾病肾纤维化模型,方便稳定且对组织器官的毒性小,相对安全,实验动物的死亡率小^[44-47]。

综上,肾纤维化造模方式多样,主要基于其病理变化可通过肾大部分切除、单侧输尿管结扎等外科手术方法及腺嘌呤、环孢素 A 灌胃,阿霉素尾静脉注射、链脲佐菌素腹腔注射等化学方法造成肾功能和结构的损害,最终导致肾纤维化。

3 “气虚湿瘀”肾纤维化模型造模方法

气虚无力推动运化水湿,水液输布代谢障碍可致水湿停滞,湿饮停聚,客邪再至内外相引,故病湿浊。湿浊阻滞气机加之热伤阴损络、寒凝络阻,使血瘀加重,湿瘀又可耗伤人体正气,故气虚湿瘀相互影响,互为因果。

目前并无气虚湿瘀型肾纤维化造模先例,基于以上气虚血瘀、湿热、寒湿证及肾纤维化造模方法,总结气虚湿瘀型肾纤维化模型可通过劳则气耗或饥则气损联合内外湿邪及多因素破坏肾结构及功能的原理制备,具体造模方法见表 1。

4 “气虚湿瘀”肾纤维化模型评价

4.1 宏观表征

动物模型所指宏观表征常涵盖习性、一般生活状态、生命体征、外观形态及舌象等多个方面^[48]。气虚运化失常可见饮食减少、体重下降以及消瘦等症状。气为“神之母”,气充则神明,气虚则神衰,故气虚可见精神倦怠、眼光无神、活动性差。脾气亏虚,脾失健运,肌肉毛发失于濡养可见皮毛色暗、无光;脾气亏虚转运不利、清浊不分可见大便稀溏。气虚无力推动血行,血液瘀滞,气虚血瘀常并见,血瘀多见舌质紫暗,舌面瘀斑瘀点,实验小鼠尾部可出现不同程度的瘀紫或青斑^[49]。湿热内蕴舌苔多黄腻,熏蒸水液常见小便黄赤,湿热壅阻大肠,大肠传导失常可见大便溏泄。湿热下注而为蛋白尿,久则耗血伤阴,终致肾气匮乏,肾阳耗损,肾虚无力主水、司开合,而见尿少等症。肾阳虚衰、失于温煦见畏寒肢冷、肤色青暗、大便稀溏、体重下降等症。同时根据《中医临床诊疗术语证候部分(修订版)》、

《中药新药临床研究指导原则》概括动物模型宏观表征主要为:(1)气虚:倦怠嗜睡,精神萎靡,四肢蜷缩,活动性差,对外界刺激反应迟钝;进食量逐渐减少,消瘦,大便稀薄;皮毛色暗、蓬松无光;(2)血瘀:舌面瘀点,舌质淡紫;尾部出现不同程度瘀紫或青斑。(关于舌象分析多采用 Adobe Photoshop CS5 软件进行,选取舌面 3 点,读取像素区域 R(红色)、G(绿色)及 B(蓝色)分量值进行比较);(3)湿热:小便黄赤、量少、泡沫尿;大便溏泄或黏滞;体温不变或升高;舌苔黄厚;(4)寒湿:畏寒肢冷、倦怠乏力、食少纳呆、小便清长,肢体水肿,大便溏泄,舌苔白腻。

4.2 实验室指标

所谓“正气存内,邪不可干”,有研究表明气虚证与机体免疫能力紊乱有关,临床上气虚患者多伴有免疫功能低下,CD4⁺、CD19⁺等免疫指标及血浆免疫球蛋白 IgG、IgA 下降^[50-52]。2021 年国际血瘀证诊断指南^[53]将血流动力学、血液流变学、血小板功能、凝血功能、纤溶功能列为血瘀证的主要诊断标准。血瘀证血液流变学特征主要包括浓、黏、凝、聚四个方面,体现在血液黏度增高、血小板黏附率增高、凝血时间缩短、纤维蛋白原含量增高等。Ran 等^[54]采用血液流变学指标评价血瘀证大鼠模型,血瘀证大鼠的全血黏度和血浆黏度较正常大鼠显著增加。

钟云良等^[55]综述见肾系疾病湿热证与感染之间存在一定的相关性,湿热证 C-反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-6(IL-6)水平明显高。此外,慢性肾病湿热病理可表现蛋白尿、血尿、胆固醇血症、氮质潴留、血流变异常等^[56]。李威莹等^[57]得出脾胃湿热证模型评价多涉及血糖血脂、氧化应激、炎症细胞、水通道蛋白等指标。陈佳美等^[58]制定了湿热证动物的模型评价指征,通过评估氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等氧化指标,IgM、IgG、CD4⁺T、CD8⁺T 等免疫指标,CRP、TGF-α、IFN-γ、IL-6 等炎症指标,水通道蛋白(AQP2、AQP3、AQP4)等水液代谢相关指标进行评价。糖尿病肾病寒湿证可见血清 MCP-1、IL-6 等炎症因子升高^[59],在肾阳气虚寒湿证中血清皮质醇及三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)下降^[34]。此外,血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、尿 NAG 酶(NAG)、尿蛋白/肌酐比值升高,eGFR 下降是 CKD 的主要表现。

表 1 气虚湿瘀型肾纤维化模型构建方法

Table 1 Method for constructing kidney fibrosis model of qi deficiency and dampness stasis type

气虚血瘀		气虚湿盛		肾纤维化(手术/化学) Renal fibrosis (surgery/chemistry)
Qi deficiency and blood stasis	Qi deficiency and dampness			
	湿热 Damp and hot	寒湿 Cold-dampness		
病理造模 Pathological modeling	1. 阿霉素腹腔注射联合丙基硫氧嘧啶灌胃 1. Intraperitoneal injection of adriamycin combined with oral administration of propylthiouracil	1. 大肠杆菌 1. <i>Bacillus coli</i>	1. 糖皮质激素 1. Glucocorticoid	1. 5/6 肾切除 1. 5/6 Renal resection
	2. 环磷酰胺腹腔注射 2. Intraperitoneal injection of CTX	2. 水杨酸 2. Salicylic acid	/	2. 单侧输尿管结扎 2. Unilateral ureter obstruction
	3. 博来霉素气管注射 3. Intratracheal injection of bleomycin	3. 克林霉素磷酸酯 3. Clindamycin phosphate	/	3. 腺嘌呤灌胃 3. Oral administration of adenine
	4. 利血平肌肉注射 4. Intramuscular injection of reserpine	4. 鼠伤寒沙门氏菌 4. <i>Salmonella typhimurium</i>	/	4. 低盐饮食+环孢素灌胃 4. Low salt diet + oral administration of CsA
	/	5. 血清白蛋白+大肠杆菌 5. Serum albumin+ <i>Bacillus coli</i>	/	5. 单侧肾切除+阿霉素尾静脉注射 5. Unilateral ureter obstruction+tail vein injection of adriamycin
	/	6. 血清白蛋白+葡萄球菌肠毒素 6. Serum albumin + staphylococcal enterotoxin	/	6. 链脲佐菌素腹腔注射 6. Intraperitoneal injection of streptozotocin
病因造模 Etiological modeling	1. 力竭游泳 1. Exhaustive swimming	1. 高糖高脂+游泳 1. High-sugar and high-fat diet + swimming	1. 年老动物 1. Aged animal	/
	2. 睡眠剥夺 2. Sleep deprivation	2. 高蛋白饲料+糖水+酒+恒温恒湿+花生油 2. High protein feed + sugar water + constant temperature and humidity + peanut oil	2. 寒湿环境 2. Cold-damp environment	/
	3. 疲劳跑步 3. Tired running	3. 高蛋白饲料+糖水+酒+恒温恒湿+番泻叶 3. High protein feed+sugar water+alcohol + constant temperature and humidity + folium sennae	3. 冷水游泳力竭+寒湿环境 3. Cold water swimming exhaustion + cold-damp environment	/
	4. 饥饿+力竭游泳 4. Hunger + exhaustive swimming	4. 高蛋白饮食+恒温恒湿+隔日灌服白酒+跑步 4. High protein feed + constant temperature and humidity+alcohol+run	4. 寒湿环境+寒凉饮食+高脂饲料 4. Cold-damp environment+cold diet+high-fat diet	/
	5. 耗气破气+饥饱失常 5. Exhausting, dissipating qi +irregular diet	/	/	/

注:各因素选其一组合进行“气虚湿瘀肾纤维化造模”。
Note. Each factor selects one combination to construct kidney fibrosis model of “qi deficiency and dampness stasis type”.

4.3 病理表现

肾固有细胞凋亡,炎细胞浸润,肌成纤维细胞异常增殖,ECM 过度沉积最终形成肾纤维化,主要病理表现是肾小球的硬化、肾小管间质的纤维化以及肾内血管的硬化或堵塞等。李春庆等^[56]综述各医家研究,认为系膜细胞增生和基质增多、纤维素

样坏死及炎细胞浸润是肾小球疾病湿热证的特异性表现。寒湿证可表现为系膜细胞增生,小管上皮空泡样变,肾间质炎细胞浸润^[60]。局灶增生硬化、肾小球肥大在慢性原发性肾小球疾病气虚证中多见^[61]。血瘀证主要表现为胶原纤维增生、毛细血管襻内微血栓形成^[62]。

综上,气虚湿瘀肾纤维化的模型评价标准主要涉及宏观表征、实验室指标以及病理改变 3 个方面,宏观表征主要表现为气虚、血瘀与湿热、寒湿证的

症状与体征;化学指标与病理改变通过现代分析检测技术,明确疾病引起的微观改变,将评价指标量化,具体评价标准见表 2。

表 2 气虚湿瘀型肾纤维化模型评价标准

Table 2 Evaluation criteria of kidney fibrosis model of qi deficiency and dampness stasis syndrome		
指标类型 Indicator type		具体表现 Specific description
肾功能指标 Renal function	实验室指标 Laboratory indicators	血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、尿 NAG 酶(NAG)、尿蛋白/肌酐比值升高,eGFR 下降 Blood creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN), urinary NAG enzyme (NAG), urinary protein / creatinine ratio were increased, and eGFR were decreased
	影像学 Medicalimageology	肾变小或弥漫性病变 Small or diffuse lesions of the kidney
		进食量逐渐减少、体重减轻 Food intake decreases gradually and body mass decreases
气虚(脾肾) Qi deficiency (spleen and kidney)	宏观表征 Macroscopic characterization	精神萎靡、倦怠嗜睡、四肢蜷缩、活动性差、对外界刺激反应迟钝 Mental depression, tiredness and lethargy, limbs curling up, poor mobility and slow response to external stimuli
		皮毛色暗、蓬松无光 Fur is dark and dull
		大便稀薄 Thin stool
	实验室指标 Laboratory indicators	免疫指标:CD4 ⁺ 、CD19 ⁺ 、血浆免疫球蛋白 Ig G、Ig A 下降 Immune index: CD4 ⁺ , CD19 ⁺ , plasma immunoglobulin IgG, IgA were decreased
	病理表现 Pathological	肾小球硬化、小管萎缩 Glomerular sclerosis and tubular atrophy 肾组织凋亡细胞增多 Apoptotic cells increased in renal tissue
血瘀 Blood stasis	宏观表征 Macroscopic characterization	舌面瘀点、舌下脉络紫暗、尾部出现不同程度瘀紫或青斑 Tongue surface is petechiae, the sublingual vein is dark purple, and the tail appears different degrees of purple or green spots
		肾血流指数升高 Renal blood flow index was increased
	实验室指标 Laboratory indicators	血流动力学改变:全血粘度切变率(WBV)、血浆粘度(PV)、红细胞压积(HCT)升高 Hemodynamic changes: whole blood viscosity shear rate (WBV), plasma viscosity (PV) and hematocrit (HCT) were increased
	病理表现 Pathological	胶原纤维增生 Collagen fiber proliferation
	宏观表征 Macroscopic characterization	小便黄赤、量少、泡沫尿 Yellow and red urine, little urine, foam urine 体温不变或升高 Body temperature unchanged or increased
湿热 Damp and hot		舌苔黄腻 Yellow and greasy of tongue
	实验室指标 Laboratory indicators	血糖血脂:血糖升高或不变,总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)升高 Blood glucose and lipid: Blood glucose was increased or unchanged, and total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein (LDL-C) were increased
		氧化指标:血清超氧化物歧化酶(SOD)降低、丙二醛(MDA)升高 Oxidation index: decrease of serum superoxide dismutase (SOD) and increase of malondialdehyde (MDA)
	病理表现 Pathological	炎性指标:血 C 反应蛋白(CRP)、白介素 6(1L-6)升高 Inflammatory index:blood C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (1L-6) were increased
		水液代谢:尿液水通道蛋白(AQP2 与 AQP4)升高 Water-fluid metabolism:AQP2 and AQP4 were increased 肾炎细胞浸润 Renal inflammatory cell infiltration

续表2

	指标类型 Indicator type	具体表现 Specific description
寒湿 Cold-dampness	宏观表征 Macroscopic characterization	畏寒肢冷、倦怠乏力、食少纳呆、小便清长、肢体水肿、大便溏泄 Chills and cold limbs, tired and weak, eating less, clear and long urine, body edema, loose stool
	实验室指标 Laboratory indicators	MCP-1、IL-6 升高,血清皮质醇、三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)下降 MCP and IL-6 were increased, serum cortisol, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were decreased
	病理表现 Pathological	系膜细胞增生,炎细胞浸润 Mesangial cell hyperplasia and infiltration of inflammatory cells

注:指标至少满足一半。
Note. At least half of the indicators are met.

5 总结与展望

“病证结合”动物模型以中医理论为基础,要求不仅符合西医各种疾病的病理特征,具备与临床疾病相似的演变和发展过程,而且要与中医临床病证特点相结合,是中医药基础研究的重要手段。

气虚湿瘀型病证结合肾纤维化的造模方法基于中医病因并结合西医病理制备,可通过肾大部分切除、单侧输尿管结扎等外科手术方法或腺嘌呤、环孢素 A 灌胃、阿霉素尾静脉注射、链脲佐菌素腹腔注射等化学方法建立西医肾纤维化模型,结合饥饿、力竭游泳、疲劳跑步、睡眠剥夺、高糖高脂饮食、外湿环境、灌服白酒、注射药物、选择年老体虚动物等单一或者复合手段建立气虚湿瘀模型,此模型同时满足病证特征,符合中医与现代医学理论,具有可行性。此外,模型评价从疾病与证候分而论之,将中医临床表现与西医微观指标结合,多维度、标准化、具体化。但是本证候模型无先例,造模中考虑条件众多,需下一步实验验证。制备稳定有效,成本低,操作简便的气虚湿瘀型肾纤维化模型,可为气虚湿瘀型肾纤维化的研究提供有效的模型支持,并进一步促进其基础及临床研究,更有效地发挥中医药在肾纤维化中的治疗作用。

参考文献:

[1] Robinson NB, Krieger K, Khan FM, et al. The Current state of animal models in research; a review [J]. Int J Surg, 2019, 72: 9-13.

[2] 胡洪贵, 齐振强, 李伟. 李伟中西医结合治疗慢性肾脏病经验撷菁 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(2): 260-262.

[3] 林家茂, 郭伟星, 王营, 等. 慢性心力衰竭心气虚兼血瘀水肿证大鼠模型的建立与整合判定 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1457-1462.

[4] 罗泽飞, 苏旭春, 孔嘉欣, 等. 黄芪多糖对环磷酸腺苷导致大鼠气虚血瘀证的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2016(1): 30-32.

[5] 张玉昆, 冯月男, 卞敬琦, 等. 丹参饮对气虚血瘀模型大鼠的血小板生物学 [J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 848-851,

858.

[6] 郑翔, 郭勇, 李妍. 乳腺癌气虚血瘀证小鼠模型的建立及益气活血法的干预研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(10): 849-855.

[7] 金莉, 刘鲁明. 小鼠脾虚血瘀动物模型的建立 [J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(6): 352.

[8] 钟森杰, 李琳, 胡思远, 等. 中医病因型证候模型建立的思考 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2): 310-314.

[9] 扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血大鼠模型表征及血液流变学研究瘀 [J]. 天津中医药, 2007, 24(2): 138-141.

[10] 郝婷婷, 郭浩, 刘建勋, 等. 2 种分析方法对睡眠剥夺大鼠血瘀证评价的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1880-1885.

[11] 陈进成, 刘建勋, 马博, 等. 气虚血瘀证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(3): 229-234.

[12] 甘加宽, 樊憬懿, 王冬芝, 等. 睡眠剥夺诱导小鼠气虚证模型的方法研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2016, 18(10): 1801-1806.

[13] 李雅君, 程嘉艺. 纳豆+甘麦大枣加味汤对气虚血瘀证大鼠血液流变学和凝血功能的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(1): 13-16.

[14] 王晚霞, 李荣亨. 气虚血瘀证患者血黏度与心功能相关性研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(1): 80-81.

[15] 彭桂原, 李松键, 杨黎, 等. 气虚血瘀型 Corti 器毛细胞损伤动物模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49): 7384-7390.

[16] 李祥, 张悦, 张文智, 等. 气虚血瘀证动物模型的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 228-234.

[17] 杨宽芝, 包崑, 王立新, 等. 通脉口服液对慢性肾炎气虚血瘀证大鼠模型的药效学研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(4): 332-336.

[18] 任建勋, 尹春园, 史雅红, 等. 睡眠剥夺复合冠状动脉左前降支结扎建立心力衰竭气虚血瘀证大鼠模型的评价 [J]. 中医杂志, 2020, 61(5): 428-434.

[19] 王瑾茜, 蔺晓源, 刘佩, 等. 冠心病气虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 602-609.

[20] 戴姣, 王雷, 龚桂姿, 等. 多因素整合诱导证属“气虚血瘀”型肺动脉高压大鼠模型的建立 [J]. 中医药导报, 2018, 24(17): 19-22.

[21] 杜恒. 大鼠肾炎湿热证血尿模型的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2008.

[22] 齐文杰, 张淑文, 王红, 等. 急性重症胰腺炎湿热证动物模型建立初探 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(2): 47

- 50.
- [23] Cao HX, Sun H, Jiang XG, et al. Comparative study on the protective effects of Yinchenhao Decoction against liver injury induced by alpha-naphthylisothiocyanate and carbon tetrachloride [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(3): 204-209.
- [24] 韦嵩, 劳绍贤, 黄志新, 等. 脾胃湿热证模型大鼠胃黏膜 AQP3、AQP4 基因的表达 [J]. 中国中医急症, 2008, 17(3): 357-358, 384.
- [25] 王瑞琼, 郭超, 王志旺, 等. 内外合邪诱导抗生素相关性大肠湿热证大鼠模型的建立与评价 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(1): 5-10.
- [26] 吴仕九, 杨运高, 杨钦河, 等. 温病湿热证动物模型的研制及清热祛湿法机理的探讨 [J]. 中国中医药科技, 1999, 6(2): 65-67, 5.
- [27] 廖荣鑫, 刘小虹, 许仕杰. 脾胃湿热证大鼠模型血清蛋白质组学差异表达研究 [J]. 新中医, 2018, 50(7): 15-18.
- [28] 季旭明, 庄凌云, 崔有利, 等. 三仁汤对湿热证型病毒性肺炎小鼠模型的多靶点干预作用 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(6): 1287-1289, .
- [29] 王婷, 郑锋玲, 骆欢欢. 岭南温病湿热证小鼠模型的建立及肠道菌群的研究分析 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(6): 1361-1365.
- [30] 周韦青, 郑裕华, 陈颂, 等. 连翘对岭南湿热模型小鼠的作用及其肠道菌群变化的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 678-685.
- [31] 熊宁宁, 徐长照, 余江毅, 等. 家兔肾炎湿热证模型的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 1991, 18(4): 42-43.
- [32] 刘晓鹰, 王文广, 杜恒. 两种肾炎湿热证血尿模型的比较 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(2): 122-124.
- [33] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [34] 刘同林. 自然衰老 SD 大鼠肾阳虚模型的研究 [D]. 广东: 广州中医药大学, 2005.
- [35] 吴君, 韩芸, 梁伟玲, 等. 老龄大鼠尿量、离子浓度及皮质醇的变化 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(5): 515-516.
- [36] 靳荃, 青千裕, 郜宪明, 等. 甘草附子汤对小鼠疼痛模型及寒湿证疼痛模型止痛作用比较研究 [J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(5): 338-341.
- [37] 雷鸣, 周杰, 王美元, 等. 腰痹舒胶囊对寒湿痹阻腰痛模型大鼠血液流变学等相关指标的影响 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(11): 1936-1939.
- [38] 王常松, 吴同玉, 陈学习, 等. 寒湿困脾证动物模型的建立和评价 [J]. 上海中医药大学学报, 2011, 25(5): 75-78.
- [39] 胡安康, 朱孝荣, 袁红花. 慢性肾衰竭大鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 34-38.
- [40] 麻志恒, 倪健俐, 钟利平, 等. Smad3 基因敲除对 5/6 肾切除慢性肾脏纤维化小鼠模型的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(1): 189-194, I0006, I0007.
- [41] 李艺文, 唐志书, 张珍, 等. 异鼠李素抗 UUO 大鼠肾脏纤维化作用及机制 [J]. 中成药, 2021, 43(11): 3172-3177.
- [42] Han C, Jiang YH, Li W, et al. Astragalus membranaceus and Salvia miltiorrhiza ameliorates cyclosporin A-induced chronic nephrotoxicity through the “gut-kidney axis” [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113768.
- [43] 高健. JAK/STATs 信号转导通路在阿霉素肾纤维化大鼠模型中的研究及苦参碱对 STAT3 的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [44] 石光, 石岩, 孙晓波, 等. 糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(7): 171-173.
- [45] 权晓娟, 梁春联, 孙明珠, 等. 吡非尼酮对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病大鼠肾纤维化的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(3): 215-218, 224.
- [46] 陈亚坤, 穆霖, 邢玲玲. 大黄酸对糖尿病大鼠肾脏纤维化的作用机制 [J]. 河北医药, 2022, 44(14): 2186-2188.
- [47] 逯凤肖. 二氢杨梅素对糖尿病小鼠降糖作用的研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [48] 扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血瘀证大鼠表征观察与分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(12): 807-810.
- [49] 姜晓西, 王凤, 张会永, 等. 气虚血瘀证动物模型研究现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(11): 68-74.
- [50] 宋燕娟, 陈丽, 梁凤霞, 等. 针刺治疗气虚证作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 133-136.
- [51] 李宗源, 郝莉雨, 孙建辉, 等. 三种气虚证动物模型的比较与评价 [J]. 中医杂志, 2022, 63(18): 1773-1778.
- [52] 陈潇. 健脾清化方干预 CKD3 期脾肾气虚湿热型患者微炎症状态及免疫功能的临床研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [53] 世界中医药学会联合会. 国际血瘀证诊断指南 (2021-12-16) [J]. 世界中医药, 2022, 17(1): 31-36.
- [54] Ran N, Pang Z, Guan X, et al. Therapeutic effect and mechanism study of *Rhodiola wallichiana* var. *cholaensis* injection to acute blood stasis using metabolomics based on UPLC-Q/TOF-MS [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1514845.
- [55] 钟云良, 谢桂权. 原发性肾病综合征湿热证与炎症因子相关性的探讨 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5): 25-26.
- [56] 李春庆, 孙伟, 周栋. 慢性肾病湿热证实验研究进展 [J]. 中医药导报, 2010, 16(11): 117-119.
- [57] 李威莹, 吴威, 孙凡雅, 等. 脾胃湿热证动物模型的构建与评价研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(11): 77-82.
- [58] 陈佳美, 朱青, 朴胜华, 等. 湿热证动物模型造模方法的文献挖掘研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(9): 1399-1404.
- [59] 龚蕾丽. 糖尿病肾病血清炎症因子与中医证型的相关性研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [60] 张萌萌, 张新雪, 郑鹏飞, 等. 阿霉素联合雌二醇诱导慢性肾脏病肾阳虚证大鼠模型的建立与评价及真武汤干预作用研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2021, 23(11): 3866-3877.
- [61] 崔赵丽. 气虚、阳虚体质与慢性原发性肾小球疾病中医证候及 TGF- β 相关性分析 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [62] 庞欣欣, 彭紫凝, 邢玉凤, 等. 基于病证结合探讨血瘀证糖尿病肾病大鼠肾损害与内质网应激的关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 74-81.

[收稿日期] 2022-12-28

唐琛,兰瑞,付雪琴,等. 环状 RNA 在缺血性脑卒中领域的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 100-105.
Tang C, Lan R, Fu XQ, et al. Research progress of circular RNA in the field of ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 100-105.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.013

环状 RNA 在缺血性脑卒中领域的研究进展

唐琛¹, 兰瑞^{2*}, 付雪琴¹, 王伟伟¹, 邹旭欢¹, 王漫漫¹, 李泓宇¹, 刘双¹

(1.河南中医药大学, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 环状 RNA(circRNA)是一种非编码 RNA,其 3' 和 5' 端连接在一起,构成了一种共价闭合的环状结构。缺血性脑卒中后,机体发生了包括氧化应激、线粒体功能障碍、炎症、内质网应激、细胞凋亡和自噬在内的多种病理生理机制。circRNA 主要通过海绵吸附微小 RNA(microRNA),调节缺血性脑卒中相关基因表达水平,参与脑卒中的调控。在缺血性脑卒中发生后,部分 circRNA 对大脑发挥保护作用,而另一些 circRNA 则对大脑有损害作用。研究表明 circRNA 很有潜力在未来为缺血性脑卒中提供新的诊疗方法。本文就 circRNA 在缺血性脑卒中领域的研究进展进行综述,并对 circRNA 的未来应用进行展望。

【关键词】 circRNA; 缺血性脑卒中; microRNA 海绵

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0100-06

Research progress of circular RNA in the field of ischemic stroke

TANG Chen¹, LAN Rui^{2*}, FU Xueqin¹, WANG Weiwei¹, ZOU Xuhuan¹, WANG Manman¹, LI Hongyu¹, LIU Shuang¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.
2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Circular RNA (circRNA) is a type of non-coding RNA, in which 3' and 5' ends are joined together to form a covalently closed circular structure. Following ischemic stroke, the body undergoes various pathophysiological mechanisms, including oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and autophagy. CircRNAs are involved in regulation of stroke by regulating the expression levels of ischemic stroke-related genes, mainly through sponge-adsorbed microRNAs. After ischemic stroke, some circRNAs have a protective effect on the brain, while others have a damaging effect on the brain. Studies suggest that circRNAs have the potential to provide new therapeutic approaches for ischemic stroke in the future. This article reviews the progress of circRNA research in the field of ischemic stroke and provides an outlook on the future applications of circRNAs.

【Keywords】 circRNA; ischemic stroke; microRNA sponge

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

缺血性脑卒中是由于血栓阻塞大脑动脉而出现局部脑组织缺血缺氧的一种血管疾病,已经成为了全球致残和死亡的第二大原因^[1]。急性缺血性卒中会引起不可逆转的脑损伤,最终导致局灶性神经功能障碍^[2]。患者由于神经功能的损伤,失去了

正常工作和学习的能力,给国家与人民带来了沉重的负担。最近有证据表明,非编码 RNA 参与了缺血性脑卒中的细胞和分子过程,触发了特定的生理病理反应,对卒中后的功能恢复造成了较大影响^[3-4]。

近年来,随着检测技术的不断发展,越来越多

【基金项目】 国家自然科学基金(81973618,81503422);河南省中医药科学研究专项课题(2022JDZX090)。
【作者简介】 唐琛(1999—),男,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治脑病。E-mail:17839952748@163.com
【通信作者】 兰瑞(1984—),女,博士研究生,副主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合神经病学相关临床及实验研究。
E-mail:lanrui0312@163.com

非编码 RNA 在不同生物学过程中被发现。环状 RNA 是一种非编码 RNA,其经历了一个环化过程,没有典型末端结构,是一种共价闭合的连续环^[5]。circRNA 能通过调节 microRNAs 来调控基因表达,并作为潜在的生物标志物发挥作用。其对 RNA 外切酶具有抵抗力,能够被 microRNA 转化为线形 RNA,成为内源 RNA 的竞争者。circRNA 能在体内进行翻译,其异常的表达与人体多种疾病都具有联系^[6]。

1 缺血性脑卒中的病理机制

缺血性脑卒中的基本病理因素是血管内的血栓形成,进而造成局灶性神经元缺失和脑组织的坏死。50%的缺血性脑卒中是由动脉粥样硬化及其斑块破裂所引起,20%是心源性的脑卒中,25%是由小血管病变所致的腔隙性脑梗死,5%的缺血性卒中是由一些特殊原因,如颅外动脉夹层等因素导致^[7]。卒中后,机体经历了小胶质细胞的激活,线粒体功能障碍,内质网应激等多个病理过程。当卒中发生后,神经元细胞形态发生变化,程序性死亡通路被激活^[8];损伤的脑细胞释放出鞘氨醇-1-磷酸,趋化因子等多种物质,促使小胶质细胞迅速向病变部位迁移,并使其形态与功能产生巨大变化,对死亡细胞和细胞碎片进行吞噬^[9]。脑组织缺氧后,启动糖酵解进行能量代偿,代偿产生的乳酸使 pH 下降,引发酸中毒和线粒体膜电位的降低。同时能量代谢障碍使 ATP 酶所依赖的离子泵失活,引起细胞内的钙离子超载,对线粒体造成损伤^[10]。在脑组织恢复血供后,“缺血-再灌注损伤”对内质网的稳态造成影响,使得将大量未折叠的错误蛋白在内质网中聚集,激活未折叠蛋白反应,进一步加重脑损伤,甚至引发细胞凋亡^[11]。

2 circRNA 的生物学功能

1976 年,circRNA 首次被人类报道发现^[12]。由于数量较少,circRNA 最初被研究人员认为是一种“类病毒”,是选择性剪接错误产生的副产品,对某些高等植物具有致病性。随着生物信息技术的不断发展,经过大量的转录分析后,越来越多的 circRNA 出现在人类的视野中^[13]。Salzman 等^[14]不仅在人类的细胞中检测出了多种 circRNA,还证明了这是人类细胞基因表达程序的普遍特征。研究发现,组织细胞中 circRNA 的含量比长链信使 RNA

(linear mRNA)更为丰富,有些甚至能够达到 linear mRNA 的 10 倍以上^[15-16]。此外,circRNA 在人体组织中的分布也十分广泛,其存在于各种器官和组织,如大脑、肠道、心脏、肝、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、血管等^[17]。circRNA 可根据结构分为内含子环化、外显子环化以及内含子-外显子共同环化三种类型^[18];与 linear mRNA 相比,其元典型的末端结构,circRNA 的 3' 和 5' 端连接在一起,形成了一个共价闭合的环状结构,因此其更加稳定^[19]。由于 circRNA 的独特结构,使它们能够在样品处理中选择性富集,更适合一些疾病的诊断,其在某些疾病当中的异常表达已得到证实,如神经元素乱、动脉粥样硬化等^[20]。circRNA 有一定的特异性,在不同的时间、不同物种、不同疾病中的表达差异巨大;而且 circRNA 还能模拟竞争性内源 RNA 的角色,改变基因的表达方式^[21]。微小 RNA (microRNAs) 是一种小型非编码 RNA,其参加了细胞增殖、迁移、分化和凋亡在内的多种细胞事件的转录后基因表达调控,在基因调控与生物的正常发育方面扮演着重要角色^[22]。研究表明,部分 circRNA 可以通过调控 microRNAs 的活性,从而在基因表达调控中发挥着关键作用,这一过程被称为 microRNA 海绵^[23]。值得关注的是,尽管 circRNA 在基因表达调控中的机制和其确切作用尚未被完全阐明,但学者普遍认为,circRNA 在未来具有很大潜力成为临床诊断标记物和疾病的新型治疗靶点。

3 circRNA 与缺血性脑卒中的相关性

由于只有一小部分基因能够合成 circRNA,circRNA 的表达水平在所有组织中都较低。然而,在大脑中 circRNA 的含量远高于心脏、肝、肺等其他组织^[24]。在人脑中发现的 circRNA 高达 65 731 种^[25],因此 circRNA 很有可能参与了大脑的功能调节。最近的研究结果显示,circRNA 及其调控网络与神经系统和血管系统关系密切,circRNA 可以抑制神经元凋亡和自噬,增强神经可塑性,促进微血管的生成,减少血脑屏障的损伤^[26]。脑卒中发病机制与神经炎症、能量衰竭、兴奋性毒性、细胞凋亡、氧化应激、铁死亡等相关^[27-28],上调卒中后 miRNAs 水平,如 miR-9、miR-424、let-7c、miR-99a、miR-207、miR-29c、miR-122 和 miR-210 等能够预防上述病理事件。卒中后改变的 circRNAs 被发现包含许多 miRNAs 结合位点,表明它们可能调节 miRNA 介导

翻译过程,从而影响脑卒中的病理过程^[29]。

4 缺血性脑卒中领域 circRNA 的应用

4.1 circRNA 有望成为缺血性脑卒中的治疗靶点

随着高通量测序技术的不断发展, circRNA 在缺血性脑卒中领域的研究也不断深入。大量的临床观察和实验研究证明,多数 circRNA 能够通过海绵吸附 microRNA 或作用于下游调节因子等方式参与缺血性脑卒中的调控。虽然 circRNA 的具体调控机制仍需要进一步的研究,但不少学者认为在缺血性脑卒中领域 circRNA 具有非常良好的应用前景。 circRNA 在临床诊疗上具有重大意义,其对缺血性脑卒中中具有双重调节作用。某些 circRNA 能够减轻急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)的炎症反应、保护星形胶质细胞、增强神经元的可塑性,促进患者卒中后的功能恢复。而另一些 circRNA 则发挥负面作用,如激活脑梗死周围皮质的星形胶质细胞;加剧脑水肿;加重缺血性卒中急性期的脑损伤等。增加具有保护作用 circRNA 的表达,可以促进患者的病情恢复;对负面效果的 circRNA 进行沉默或者基因敲除,同样能够对脑卒中起到治疗作用

(表 1)。

4.1.1 缺血性脑卒中后发挥保护作用的 circRNA

circSCMH1: Yang 等^[30]发现,与常人相比,急性缺血性卒中患者血浆中环状 RNA SCMH1 (circSCMH1)的水平显著降低,在卒中小鼠的血浆和梗死灶周围皮质中 circSCMH1 的水平也明显下降。并且使用细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 技术,将 circSCMH1 输入卒中患者脑内,显著促进了患者卒中后的功能恢复。证明 circSCMH1 的应用增强了神经元的可塑性,抑制了神经胶质细胞的反应和外周免疫细胞的渗透。

circRNA-0025984: Zhou 等^[31]使用荧光素酶报告基因分析,证实了 circRNA-0025984 和 ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (TET1) 分别是 miR-1433p 的海绵和靶标。在模拟缺血条件下培养的星形胶质细胞中, circRNA-0025984 显著减少。 circRNA-0025984 过表达明显减少了星形胶质细胞的自噬和凋亡,这种神经保护作用与 miR-143-3p 的直接海绵作用有关, miR-143-3p 进而直接靶向 TET1。 TET1 通过使其启动子去甲基化而显著诱导 ORP150 表达,从而增加 GRP78 水平。该研究表明

表 1 circRNA 在缺血性脑卒中领域的意义
Table 1 Significance of circRNA in the field of ischaemic stroke

circRNA	对脑卒中后的作用 Effect on post-stroke	临床意义 Clinical significance
circSCMH1	保护 Protection	增强神经元的可塑性,显著促进患者卒中后的功能恢复。 Enhances neuronal plasticity and significantly promotes functional recovery of patients after stroke.
circRNA-0025984	保护 Protection	通过 miR-143-3p/TET1/ORP150 通路减轻缺血性卒中损伤并保护星形胶质细胞。 Attenuation of ischemic stroke injury and protection of astrocytes via the miR-143-3p/TET1/ORP150 pathway.
circ-FoxO3	保护 Protection	通过抑制 mTORC1 来促进自噬,以减少缺血/再灌注时血脑屏障的损伤。 Promoting autophagy by inhibiting mTORC1 to reduce blood-brain barrier damage during ischemia/reperfusion.
circ-DLGAP4	保护 Protection	减轻 AIS 的炎症反应。 Reduces the inflammatory response to AIS.
circCDC14A	损害 Impairment	下调 circCDC14A 表达能减轻脑梗死周围皮质星形胶质细胞的激活,减轻缺血性卒中急性期的脑损伤。 Downregulation of circCDC14A expression attenuates activation of peri-infarct cortical astrocytes and reduces brain injury in the acute phase of ischemic stroke.
circTTC3	损害 Impairment	circTTC3 的缺失可减轻脑梗死、提升神经功能评分和降低脑含水量。 Absence of circTTC3 attenuates cerebral infarction, elevates neurological function scores and reduces brain water content.
circCELF1	损害 Impairment	circCELF1 的基因敲除有助于抑制星形胶质细胞的凋亡和自噬,减少神经功能的损伤。 Knockdown of circCELF1 helps to inhibit apoptosis and autophagy in astrocytes and reduce impairment of neurological function.
circHIPK2	损害 Impairment	沉默 circHIPK2 可以有效促进卒中后的功能恢复,改善脑可塑性。 Silencing circHIPK2 can effectively promote functional recovery after stroke and improve brain plasticity.

circRNA-0025984 可以通过 miR-143-3p/TET1/ORP150 通路减轻缺血性卒中损伤并保护星形胶质细胞。

circ-FoxO3; Yang 等^[32]发现在小鼠大脑中动脉阻塞/再灌注模型中, circ-FoxO3 上调了脑微血管内皮细胞的自噬通量。circ-FoxO3 通过与 mammalian target of rapamycin (mTOR) 和 E2F1 相互作用激活自噬, 从而触发细胞毒性聚集体的自噬降解。自噬能够把受损的细胞器清除, 并将它们转化为营养物质, 从而确保细胞的病理状态下存活^[33]。circ-FoxO3 通过抑制 mTORC1 来促进自噬, 以减少缺血/再灌注时血脑屏障的损伤。

circ-DLGAP4; Zhu 等^[34]采用定量聚合酶链式反应检测了 170 名 AIS 患者外周血单核细胞中 circ-DLGAP4 和 miR-143 的表达。研究显示 AIS 患者外周血单核细胞中 circ-DLGAP4 的表达水平明显下调, 且与 miR-143 的表达水平呈负相关; 而 miR-143 已经被证明是一个促炎基因^[35-36]。circ-DLGAP4 能通过海绵吸附促炎 microRNA, 如 miR-143, 来减轻 AIS 的炎症反应, 且其表达水平与 AIS 病情严重程度呈负相关。

4.1.2 缺血性脑卒中后发挥损害作用的 circRNA

circCDC14A; Zuo 等^[37]发现在急性卒中后, 患者血浆中 circCDC14A 表达明显升高, 证实 circCDC14A 和卒中有关, 并且可作为急性缺血性卒中诊断和预测预后生物标志物^[38]。进一步研究发现, 通过慢病毒干扰卒中小鼠 circCDC14A 表达, 可显著减少再灌注 72 h 的脑死塞体积和 3 d、5 d、7 d 梗死区皮质活化的星形胶质细胞密度。表明下调 circCDC14A 表达能减轻脑梗塞周围皮质星形胶质细胞的激活, 从而减轻缺血性卒中急性期脑损伤。

circTTC3; Toll like receptor 4 (TLR4) 已被证实 在卒中进展过程中参与神经干细胞的调控^[39]。Yang 等^[40]发现脑缺血再灌注损伤小鼠 circTTC3 的表达显著增加, circTTC3 的缺失可减轻脑梗塞、改善神经功能和降低脑含水量。同时, circTTC3 的缺失下调了 TLR4 的表达, miR-372-3p 抑制剂可以逆转这一作用。研究证实, 在脑梗死中, circTTC3 可通过 miR-372-3p/TLR4 轴调控脑缺血再灌注损伤。

circCELF1; Li 等^[41]通过 RT-qPCR 法和 Western blot 法分别检测了 RNA 和蛋白质的表达水平, 从而探究 circCELF1 的表达对星形胶质细胞凋亡和自噬的影响。RT-qPCR 的结果分析表明, 在缺氧-葡萄

糖剥夺/复氧 (OGD/R) 诱导的星形胶质细胞模型中, circCELF1 的表达显著增加, 通过上调 NFAT5 水平, 诱导星形胶质细胞的凋亡和自噬。在 circCELF1 的基因敲除后, 星形胶质细胞的凋亡和自噬受到了抑制。用短暂性大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 小鼠模型进行的体内研究也表明 circCELF1 的基因敲除有助于减轻神经损伤。

circHIPK2; Wang 等^[42]发现, 在神经干细胞中过表达的 circHIPK2 减少了神经元的分化; 而 circHIPK2 的沉默促进了神经元的分化。沉默 circHIPK2 后对神经元具有持续的保护作用。除此之外, 研究还发现精胺氧化酶 (spermine oxidase, Smox) 是 circHIPK2 重要的下游调节因子, 而 Smox 属于多胺氧化酶的一种, 其已经被证明与缺血性脑损伤密切相关^[43]。沉默 circHIPK2 可以有效促进卒中后的功能恢复, 改善脑可塑性; circHIPK2 的沉默有望成为缺血性卒中治疗的有效手段。

4.2 circRNA 有望成为缺血性脑卒中的生物标记物并进行预后评价

生物标记物有助于进行疾病的早期诊断及后期监测, 对了解疾病的病因和发病机制具有很好的辅助作用。长链非编码 RNA (lncRNA) 已经被认为是卒中潜在的生物标记物^[44]。在缺血性脑卒中的发生发展中, circRNA 同样起到了重要作用, 其成为缺血性脑卒中诊断方法和评估患者预后的可能性正在被众多学者关注。

Zu 等^[45]对 200 例 72 h 内 AIS 的患者进行了研究, 发现大动脉粥样硬化性卒中、小动脉闭塞型卒中、心源性栓塞型卒中 3 种 circRNA 水平均显著升高; 在起病 24 h 内入院的患者中, 早期神经功能恶化 (early neurological deterioration, END) 患者的 circFUNC1 水平显著高于无 END 的患者。发病 24 h 内的 circFUNC1 的表达水平与患者的基线及第 7 天 NIHSS 评分呈正相关。研究表明, 在卒中 24 h 之内, 检测外周血中 circFUNC1 水平能够反映神经功能障碍的严重程度, 对于急性卒中的转归和长期存活而言, circFUNC1 可能是一个潜在的预测指标。

Zheng 等^[46]对急性缺血性卒中患者进行了一项病例对照研究, 探究了患者 NIHSS 评分、脑缺血时间与 hsa_circ_0004099 表达水平的相关性, 并构建了接收者操作特性分析 (ROC) 曲线。结果表明, NIHSS 评分、脑缺血时间均与 hsa_circ_0004099 表达水平呈负相关; hsa_circ_0004099 的表达水平在

一定程度上反映了脑缺血的严重程度。ROC 曲线分析显示, hsa_circ_0004099 的表达曲线下面积 (AUC) 是 0.923, 其对 AIS 的发生有良好的预测价值。因此 hsa_circ_0004099 是一种能够诊断 AIS 和判断患者预后的潜在工具, 具有极大的临床价值。

Liu 等^[47]从大脑中动脉闭塞小鼠的缺血半暗带中筛选 circOGDH, 并采用定量聚合酶链式反应检测 AIS 患者血浆中的 circOGDH 含量。结果显示, 大脑中动脉闭塞小鼠的缺血半暗带和 AIS 患者血浆中的 circOGDH 表达显著提升。与无脑血管疾病的对照组相比, circOGDH 的表达增强了 50 倍以上。此外, 在 AIS 患者血浆中 circOGDH 的表达水平与缺血半暗带的大小呈正相关。这些结果表明 circOGDH 可能是检测缺血半暗带的一种敏感的特异性标记物; 在临床中, 检测患者血浆中 circOGDH 的含量将是一种方便、快速、经济的缺血半暗带预测方法。

5 总结和展望

缺血性脑卒中的早诊断, 早治疗是影响患者预后转归的关键所在。现今缺血性脑卒中的诊断主要依靠影像学检查, 如 CT、MRI 等方法, 暂时缺乏能够广泛运用于临床和判断患者预后的生物标志物^[48]。目前的治疗方式以药物治疗、血管治疗以及静脉溶栓等方式为主; 但静脉溶栓治疗存在治疗时间窗口窄、疗效差等缺点。因此, 寻找可靠的生物标志物和新型治疗方法对本病至关重要。近年来, 随着高通量测序技术的不断发展, 人们对非编码 RNA 的研究也逐渐增多。研究发现, 在神经血管单元中, circRNA 扮演了重要角色, 参与了缺血性脑卒中如神经炎症、神经元死亡、血脑屏障损伤、动脉粥样硬化等多个环节, 其可能是缺血性脑卒中诊疗的理想靶点^[49]。尽管 circRNA 与缺血性脑卒中之间的关系研究还处在初级阶段, 但随着众多学者的密切关注, circRNA 已经成为了新的研究热点, circRNA 有望在未来几年内应用于缺血性脑卒中的诊断和治疗。

缺血性脑卒中后, circRNA 出现显著的差异性表达, 大多 circRNA 可通过海绵吸附 microRNA, 引起 microRNA 下游脑卒中相关靶基因的释放, 通过作用于星形胶质细胞、激活细胞自噬、减少炎症反应等过程对缺血性卒中进行调控。动物实验和临床研究结果显示, 沉默或过表达某些 circRNA 能够对缺血性脑卒中起到显著治疗作用; circRNA 的研

究成果为缺血性脑卒中的诊疗提供了新的可能。但由于目前对 circRNA 的机制研究仍较缺乏, circRNA 的应用仍面临许多挑战, 希望在未来能够对 circRNA 的作用进行深入研究, 并将其应用于临床, 成为缺血性脑卒中的新疗法。

参考文献:

- [1] Wu Z, Wu P, Zuo X, et al. LncRNA-N1LR enhances neuroprotection against ischemic stroke probably by inhibiting p53 phosphorylation [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 7670–7685.
- [2] Chavda V, Madhwani K. Coding and non-coding nucleotides': the future of stroke gene therapeutics [J]. *Genomics*, 2021, 113(3): 1291–1307.
- [3] Wang SW, Liu Z, Shi ZS. Non-coding RNA in acute ischemic stroke: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(12): 1763–1777.
- [4] Cai Z, Li S, Yu T, et al. Non-coding RNA regulatory network in ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 820858.
- [5] Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675–691.
- [6] Zhu Y, Huang G, Li S, et al. CircSMARCA5: a key circular RNA in various human diseases [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 921306.
- [7] Zhao Y, Zhang X, Chen X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: from mechanisms to treatment (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(2): 15.
- [8] 马风伟, 邓青芳. 缺血性脑卒中病理生理机制及治疗对策研究进展 [J]. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(6): 116–122.
- [9] Chen W, Zhang Y, Zhai X, et al. Microglial phagocytosis and regulatory mechanisms after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42(9): 1579–1596.
- [10] 穆婷婷, 汪宁, 吴倩. 缺血性脑卒中与线粒体病理机制的相关研究进展 [J]. *华北理工大学学报(医学版)*, 2022, 24(1): 75–79, 84.
- [11] 抗晶晶, 曹翔. 内质网应激在缺血性脑卒中发病机制中的作用研究进展 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2022, 29(5): 423–427.
- [12] Zhou WY, Cai ZR, Liu J, et al. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 172.
- [13] Zhang P, Dai M. CircRNA: a rising star in plant biology [J]. *J Genet Genomics*, 2022, 49(12): 1081–1092.
- [14] Salzman J, Gawad C, Wang PL, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733.
- [15] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141–157.
- [16] Misir S, Wu N, Yang BB. Specific expression and functions of

- circular RNAs [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(3): 481–491.
- [17] Xia S, Feng J, Lei L, et al. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes [J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18(6): 984–992.
- [18] Wang P, Zhang Y, Deng L, et al. The function and regulation network mechanism of circRNA in liver diseases [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 141.
- [19] Chen Z, Song M, Wang T, et al. Role of circRNA in E3 modification under human disease [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1320.
- [20] Greene J, Baird AM, Brady L, et al. Circular RNAs: biogenesis, function and role in human diseases [J]. *Front Mol Biosci*, 2017, 4: 38.
- [21] 胡伟东, 李友, 李胜男, 等. 环状 RNA 在脑血管疾病中的研究进展 [J]. *系统医学*, 2019, 4(11): 196–198.
- [22] 罗雪颜, 杨锡彤, 王光明. miRNAs 在缺血性脑卒中中的相关研究进展 [J]. *海南医学*, 2022, 33(21): 2834–2837.
- [23] Panda AC. Circular RNAs act as miRNA sponges [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1087: 67–79.
- [24] Constantin L. Circular RNAs and neuronal development [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1087: 205–213.
- [25] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, et al. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(5): 870–885.
- [26] 袁莉, 黎军宏, 黄秋霞, 等. 环状 RNA 及其调控网络在缺血性脑卒中中的潜在机制探讨 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(11): 1230–1232.
- [27] Balog J, Mehta SL, Vemuganti R. Mitochondrial fission and fusion in secondary brain damage after CNS insults [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(12): 2022–2033.
- [28] Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(6): 1910–1926.
- [29] Mehta SL, Pandi G, Vemuganti R. Circular RNA expression profiles alter significantly in mouse brain after transient focal ischemia [J]. *Stroke*, 2017, 48(9): 2541–2548.
- [30] Yang L, Han B, Zhang Z, et al. Extracellular vesicle-mediated delivery of circular RNA SCMH1 promotes functional recovery in rodent and nonhuman primate ischemic stroke models [J]. *Circulation*, 2020, 142(6): 556–574.
- [31] Zhou D, Huang Z, Zhu X, et al. Circular RNA 0025984 ameliorates ischemic stroke injury and protects astrocytes through miR-143-3p/TET1/ORP150 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(11): 5937–5953.
- [32] Yang Z, Huang C, Wen X, et al. Circular RNA circ-FoxO3 attenuates blood-brain barrier damage by inducing autophagy during ischemia/reperfusion [J]. *Mol Ther*, 2022, 30(3): 1275–1287.
- [33] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176(1–2): 11–42.
- [34] Zhu X, Ding J, Wang B, et al. Circular RNA DLGAP4 is down-regulated and negatively correlates with severity, inflammatory cytokine expression and pro-inflammatory gene miR-143 expression in acute ischemic stroke patients [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(3): 941–948.
- [35] Yang Z, Wang J, Pan Z, et al. miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3781–3790.
- [36] Yu B, Zhao Y, Zhang H, et al. Inhibition of microRNA-143-3p attenuates myocardial hypertrophy by inhibiting inflammatory response [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(11): 1584–1593.
- [37] Zuo L, Xie J, Liu Y, et al. Down-regulation of circular RNA CDC14A peripherally ameliorates brain injury in acute phase of ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 283.
- [38] Zuo L, Zhang L, Zu J, et al. Circulating circular RNAs as biomarkers for the diagnosis and prediction of outcomes in acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2020, 51(1): 319–323.
- [39] Sun Z, Wu K, Gu L, et al. IGF-1R stimulation alters microglial polarization via TLR4/NF- κ B pathway after cerebral hemorrhage in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164: 221–234.
- [40] Yang B, Zang LE, Cui J, et al. Circular RNA TTC3 regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and neural stem cells by miR-372-3p/TLR4 axis in cerebral infarction [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 125.
- [41] Li W, Teng J. circCELF₁ induces the apoptosis and autophagy of astrocytes in ischemic stroke via upregulating NFAT5 [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2023, 52(3): 306–317.
- [42] Wang G, Han B, Shen L, et al. Silencing of circular RNA HIPK₂ in neural stem cells enhances functional recovery following ischaemic stroke [J]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102660.
- [43] Fan J, Chen M, Wang X, et al. Targeting smox is neuroprotective and ameliorates brain inflammation in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 168(2): 381–393.
- [44] Wang Q, Liu X, Zhu R. Long noncoding RNAs as diagnostic and therapeutic targets for ischemic stroke [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(10): 1115–1121.
- [45] Zu J, Zuo L, Zhang L, et al. Circular RNA FUNDC1 for prediction of acute phase outcome and long-term survival of acute ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 846198.
- [46] Zheng J, Luo S, Long Y. Bioinformatic analysis and clinical diagnostic value of hsa_circ_0004099 in acute ischemic stroke [J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0277832.
- [47] Liu Y, Li Y, Zang J, et al. CircOGDH is a penumbra biomarker and therapeutic target in acute ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2022, 130(6): 907–924.
- [48] 王智, 冯念苹. 长链非编码 RNA 在缺血性脑卒中的研究进展 [J]. *中国临床神经科学*, 2022, 30(6): 707–712.
- [49] Wang Q, Liu X, Zhao J, et al. Circular RNAs: novel diagnostic and therapeutic targets for ischemic stroke [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2020, 20(10): 1039–1049.

李勃深,张宇轩,范容晖,等. 高原对线粒体功能及能量代谢影响研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 106–113.
Li BS, Zhang YX, Fan RH, et al. Research progresses on the effects of high altitude on mitochondrial function and energy metabolism [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 106–113.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.014

高原对线粒体功能及能量代谢影响研究进展

李勃深^{1,2,3,4}, 张宇轩^{1,2,3,4}, 范容晖^{1,2,3,4}, 李茂星^{1,3,4*}, 刘天龙^{1,2,3,4*}

(1.甘肃中医药大学药学院,兰州 730000;2.中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院全军高原医学实验室,兰州 730050;
3.军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所,北京 100850;4.甘肃省高原药学行业技术中心,兰州 730050)

【摘要】

高原是一个低压、低氧、高寒的特殊环境,高原环境将降低能量物质代谢与线粒功能,从而影响高原作业,近年来,线粒体损伤引起了广泛关注,线粒体作为细胞的能量工厂,与机体运动紧密相关。以高原线粒体损伤为研究核心,通过网络数据库检索总结高原对于基础能量物质的代谢影响以及对线粒体生化供能反应关键酶活性和线粒体结构功能的改变,发现蛋白质、糖类与脂质代谢在高原受到负面影响,导致高原作业时易疲劳、高血脂症与机体修复受阻;丙酮酸代谢、三羧酸循环、 β -氧化和氧化磷酸化相关酶活性被抑制,线粒体形态与数目改变,导致线粒体功能受损,影响运动供能。未来高原细胞损伤机制的探明将大力推动高原损伤防治药物的研究。

【关键词】高原缺氧;能量物质代谢;生化供能;线粒体功能;线粒体形态

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 10-0106-08

Research progresses on the effects of high altitude on mitochondrial function and energy metabolism

LI Boshen^{1,2,3,4}, ZHANG Yuxuan^{1,2,3,4}, FAN Ronghui^{1,2,3,4}, LI Maoxing^{1,3,4*}, LIU Tianlong^{1,2,3,4*}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. the PLA

Highland Medical Laboratory, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050. 3. Institute of Radiation Medicine Sciences, Academy of Military Medical, Academy of Military Sciences, Beijing 100850. 4. Gansu Plateau Pharmaceutical Technology Center, Lanzhou 730050)

【Abstract】

A high altitude plateau is a unique environment with low pressure, oxygen, and temperature. The plateau environment reduces the metabolism of energy substances and mitochondrial functions, thereby affecting work on a plateau. In recent years, mitochondrial damage has attracted broad attention. As the energy factory of cells, mitochondria are closely linked to body movement. We focused our attention on mitochondrial damage at high altitude and summarized the effects of high altitude on the metabolism of basic energy substances and changes in important enzyme activities and the mitochondrial structure and function in the mitochondrial biochemical energy supply response. We found that protein, carbohydrate and lipid metabolism was negatively affected at high altitude, resulting in fatigue, hyperlipidemia, and body repair. The activities of enzymes related to pyruvate metabolism, the tricarboxylic acid cycle, β -oxidation, and oxidative

【基金项目】国家自然科学基金项目 (82003982); 后勤科研项目 (CLB21J036); 拔尖培育项目 (2021yxky001); 青年培育项目 (2021yxky060); 甘肃省卫生行业科研计划项目 (GSWSKY2020-41)。

【作者简介】李勃深 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 高原损伤防治药物和中药药理。E-mail: 674600575@qq.com

【通信作者】李茂星 (1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然药物化学和高原损伤药物防治。E-mail: limaox2020@aliyun.com

刘天龙 (1989—), 男, 主管药师, 研究方向: 中药药理学。E-mail: liutl_0318@126.com

* 共同通信作者

phosphorylation were inhibited, and the morphology and number of mitochondria were changed, leading to impaired mitochondrial functions and affecting exercise energy supply. Exploration of the mechanism of cell injury at high altitude may promote research to prevent and treat such injuries.

[Keywords] high altitude hypoxia; energy matter metabolism; biochemical energy supply; mitochondrial function; mitochondrial morphology

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

自 2010 年以来线粒体相关研究的发文量逐年增加^[1],线粒体损伤作为近年来备受关注的研究领域,得到了广泛关注。不同诱因造成的损伤将通过不同机制表达,目前对于高原环境下线粒体损伤的具体机制了解仍不充分。高原对能量代谢和线粒体的负面影响,在机体中可能引发易疲劳、高血脂症、组织修复受阻等问题。此前的研究表明,高原缺氧会降低生化供能反应关键酶活性,导致线粒体功能异常及细胞凋亡等现象。在高原,为适应环境,供能反应关键酶活性与线粒体会发生一系列的适应性改变,这对于高原供能与运动效能存在负面影响^[2]。迄今为止,关于高原环境对能量代谢与线粒体损伤的相关报道相对较少。通过深入研究高原环境对线粒体代谢和功能的影响,我们可以更好地理解高原疾病的发生机制,并为其预防和治疗提供理论依和更多药物防治靶点。本文旨在综述高原能量代谢和线粒体损伤机制,推进高原损伤模型和防治药物的研究。

1 高原对能量来源物质代谢的影响

1.1 高原作业所需大分子能量物质

糖、蛋白质、脂肪是运动所需的三大能量来源。糖作为人体能量的主要来源,运动作业时通过线粒体有氧化产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)为机体供给能量;蛋白质作为能量来源发挥的作用并不大,但在保持运动状态或长时间运动作业间接为身体供给能量有重要作用,如血红蛋白及肌红蛋白具有携带、运输和贮藏氧的能力^[3],蛋白质是保证运动作业的基石;脂肪是体内最丰富的酯类物质,不仅是机体产能最多的营养物质,也是机体最有效的储能形式,在运动过程中脂肪参与糖酵解过程,在进入身体活化之后通过线粒体的 β -氧化过程生成乙酰辅酶 A,从而进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle),释放大能量。

1.2 缺氧与大分子能量物质代谢关系

缺氧环境下,肝、心肌、骨骼肌等脏器中糖类含

量均有降低趋势,以肝糖原、肌糖原的减少尤为明显^[4]。肝、肌糖原减少,人体容易出现疲劳感、无力感及运动能力下降等问题,且体内的蛋白质分解量多于合成量,将出现消化率下降和负氮平衡,同时血红蛋白、肌红蛋白等一系列关键蛋白的合成发生障碍,人体的运动能力和损伤修复受到负面影响^[5-6]。脂肪的消耗需要氧气的直接参与,缺氧导致了体内脂肪酸的含量升高,超过了体内脏器的转运能力,同时缺氧又导致本来脂肪动员下加速生产的磷脂代谢出现障碍,加重了脂肪在脏器内的堆积,并可能引起高血脂症^[7]。

机体运动时,糖原作为人体内糖类成分的储存形式会分解释放产生能量,但高原环境下糖原释放和反应供能受阻。研究表明,在高原环境中开展运动训练会导致肝糖原的含量降低^[8],而肌糖原含量的减少又将无法保证肌肉活动的能量供给,从而影响高原作业。陶文迪等^[9]对 Wistar 大鼠进行模拟急进高原运动,发现与对照组大鼠相比,缺氧组大鼠的肝糖原、肌糖原含量显著降低,游泳力竭时间显著缩短。另有研究称,大鼠在 6000 m 模拟海拔高度下血糖降低,胰岛素水平升高,肝糖原含量增加,肌糖原含量减少,糖脂代谢出现功能紊乱,运动过程中无法维持机体稳态^[10]。倪倩等^[11]发现,在进入高原早期肝糖异生环节的限速酶葡萄糖-6-磷酸酶以及肝糖原含量显著增高,这是机体习服高原环境的机制之一。氧气在合成 ATP 中起着重要作用,在常氧条件下维持蛋白质合成的生产速率。在缺氧状态下,各类生化反应所需的蛋白质合成速率由于 ATP 有限而显著减慢和受损^[12]。在高原缺氧环境下作业消耗大量能量时,糖原含量减少、脂质代谢减慢和蛋白质合成受损将直接导致高原运动效能降低甚至是高原疾病的发生。高原环境从来源上抑制了整个能量代谢途径,通过合理调整饮食结构,增加能量供给和营养物质摄入,有助于缓解代谢异常和提高适应能力。

2 高原缺氧与能量代谢及相关酶

高原缺氧条件对线粒体内关键的生化供能反

应关键酶的抑制作用将导致机体作业的易疲劳、运动效能降低和一系列的代谢性疾病(图 1)。

2.1 丙酮酸代谢过程相关酶

丙酮酸是天然存在于体内的小分子物质,是机体整个生命活动的中间产物,丙酮酸通过生成乙酰辅酶 A 参与三大营养物质代谢过程,起着重要的枢纽作用,为三羧酸循环奠定物质基础,通过保护糖酵解过程改善乳酸堆积,提高机体在缺氧状态下的耐受性并减少自由基形成和缺氧损伤^[13-14]。线粒体中丙酮酸的代谢受多种酶调控,包括线粒体丙酮酸载体酶复合物 (mitochondrial pyruvate carrier, MPC)、丙酮酸脱氢酶复合物 (pyruvate dehydrogenase complex, PDHC) 决定了丙酮酸参与供能的反应速率,间接调节能量供给^[15]。研究称,丙酮酸作为糖酵解的终末产物,慢性缺氧时将导致糖酵解水平提高,线粒体丙酮酸代谢过程受 PDHC 的调节。急性缺氧时人骨骼肌和小鼠胚胎细胞中 PDHC 活性显著降低,激活 PDHC 将有效改善慢性缺氧期间的丙酮酸代谢阻滞^[16]。Wang 等^[17]发现缺氧状态下人脐静脉内皮细胞糖酵解水平升高,乳酸分泌增加,MPC1 和 MPC2 水平降低。高原缺氧

将抑制丙酮酸代谢过程中的关键酶活性,导致代谢过程受阻从而导致运动产物堆积、氧化应激、糖类代谢不完整并影响三羧酸循环及运动效能。

2.2 三羧酸循环相关酶

TCA cycle 是物质氧化而获得能量的最有效方式。高原缺氧将导致 TCA cycle 中有氧呼吸相关酶含量与活性降低,导致高原作业因供能不足而效能下降。长期暴露于缺氧环境可能引起参与 TCA cycle 的柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS)、乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH)、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 和苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH) 活性降低^[18-19]。

研究表明,柠檬酸合酶活性与细胞呼吸能力呈线性关系^[20],缺氧将导致细胞呼吸能力的降低,从而影响线粒体代谢^[21]。Peng 等^[22]发现,缺氧将抑制氧化型共济失调毛细血管扩张突变基因 (ataxia telangiectasia-mutated gene, ATM) 活性,从而降低磷酸果糖激酶和柠檬酸合酶水平,这是两种葡萄糖代谢相关的关键酶。Tsui 等^[23]对缺氧人体前列腺细胞中乌头酸酶的基因表达影响进行实验发现,缺氧

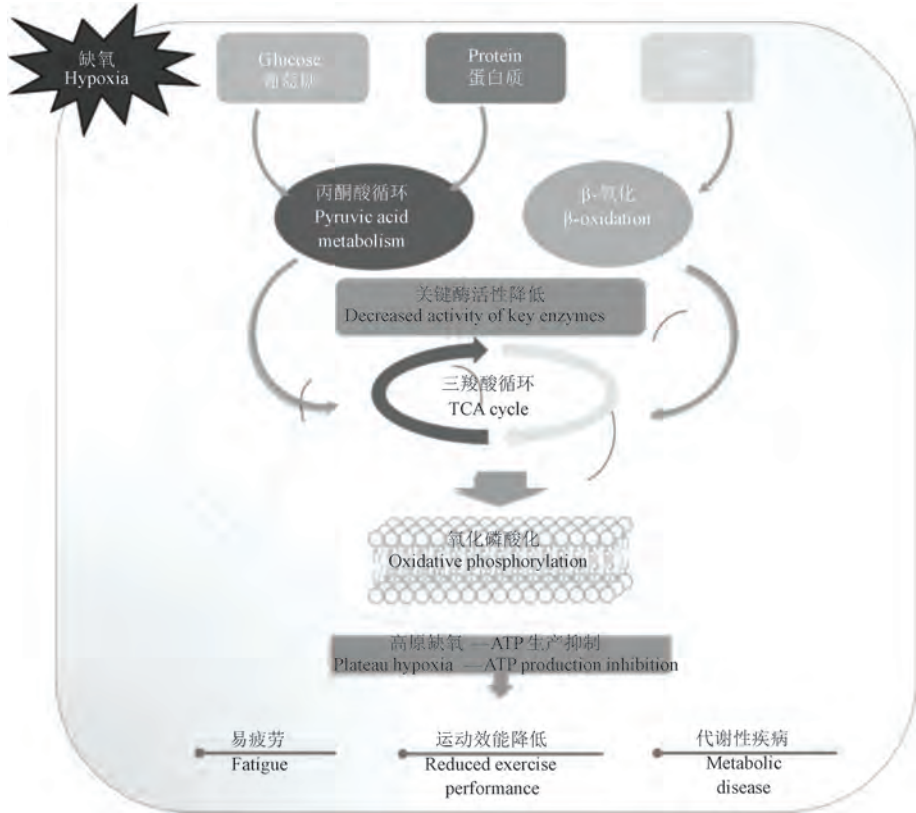


图 1 高原缺氧环境下线粒体内的生化供能反应

Figure 1 Biochemical energy supply responses in mitochondria under hypoxic conditions at altitude

将上调人体前列腺细胞中缺氧诱导因子 1α (hypoxia-inducible factor 1α , HIF- 1α) 的水平而减少乌头酸酶的表达。Carvalho 等^[24]对常氧与慢性缺氧大鼠脑血管和突触体进行氧化状态研究,检测线粒体乌头酸酶活性、过氧化氢和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平等,发现缺氧后大鼠脑血管与突触体中乌头酸酶活性显著降低;过氧化氢水平在脑血管中呈升高,突触体中降低;GSH 水平在脑血管中无显著性差异,在突触体中降低。徐建方等^[25]发现大鼠比目鱼肌中 IDH 因缺氧而表达抑制,但由于时间的延长而有显著缓解; α -酮戊二酸脱氢酶的表达在缺氧运动第一周开始显著下降,然后以较低表达量至实验结束。IDH 在低氧存活的细胞中表达抑制^[26]。在线粒体中,缺氧将导致谷氨酰胺转化 α -酮戊二酸的速率因 IDH 的抑制而降低^[27]。徐玉明等^[28]发现 SD 大鼠在进入模拟海拔 4300 m 后 MDH 水平均显著降低,运动后降低趋势更加明显。李茂星等^[29]发现 balb/c 小鼠在模拟海拔 4000 m 负重游泳后肝、肌肉与血清中 MDH、SDH 活性显著降低。缺氧细胞将依靠有氧氧化通路代偿性升高相关酶活性来补偿缺氧导致的能量供应不足,有报道称,人体肝癌细胞缺氧后出现了 SDH 与 MDH 的活性代偿性升高,但在持续缺氧后活性出现显著下降^[30]。高原缺氧通过抑制关键酶活性降低三羧酸供能效率,直接导致高原疾病或运动效能的降低。

2.3 β -氧化相关酶

β -氧化是脂肪酸在线粒体内由一系列酶催化转化为乙酰辅酶 A 继而为机体供给能量的过程。肉碱脂酰转运酶 (carnitine palmitoyl transferase, CPT) 是 β -氧化过程中的关键酶,在缺氧状况下,脂酰辅酶 A 数量增多,同时 CPT 也被急剧消耗,导致线粒体 β -氧化速率降低^[31]。Kennedy 等^[32]发现 SD 大鼠在模拟海拔 4300 m 处,急、慢性暴露后心脏与指伸肌中 CPT-I 活性以及心脏组织中 β -羟脂酰辅酶 A 脱氢酶 (β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, β -HAD) 活性对比平原对照组显著降低;慢性暴露后心脏组织中 β -HAD 活性显著降低,急性暴露时无显著差异。Dutta 等^[33]发现缺氧和冷缺氧暴露 1 d 会显著降低 SD 大鼠肌肉和肝中 CPT-I 活性,而单纯的冷暴露则显著提高 CPT-I 活性;缺氧和冷缺氧暴露 7 d 会导致肌肉和肝的 CPT-I 活性显著降低,而冷暴露虽显著降低肌肉的 CPT-I 活性,但却显著提高肝的 CPT-I 活性。此外,缺氧、冷暴露和冷缺氧暴

露 1 d 和 7 d 会显著降低肌肉和肝的 β -HAD 活性。

2.4 氧化磷酸化相关酶

氧化磷酸化是一个复杂生物化学过程,氧化磷酸化过程在线粒体中发生,线粒体内膜上的线粒体复合酶是该过程的关键酶,由五个复合物组成:线粒体复合物 I (NADH-CoQ 还原酶或 NADH 脱氢酶)、II (琥珀酸脱氢酶)、III (细胞色素 C 还原酶)、IV (细胞色素 C 氧化酶) 和 V (F_1F_0 -ATP 合成酶) 构成呼吸链,也称电子传递链,其功能是进行电子传递、 H^+ 传递及将 TCA cycle 产生的辅酶通过氧化呼吸链产生 H_2O 和 ATP。研究表明,将 A549 细胞在 5 mmol 葡萄糖、25 mmol 葡萄糖和 10 mmol 半乳糖代谢环境中培养 72 h 后,发现,葡萄糖基细胞在常氧时产生的 ATP 量显著高于低氧培养时;半乳糖基细胞在低氧时能产生更多 ATP^[34]。低氧导致线粒体能量代谢障碍,这与线粒体呼吸链酶活性下降有关。靳婉君等^[35]对雄性 BALB/c 小鼠进行模拟海拔 8000 m 缺氧 72 h 处理后发现,缺氧模型组对比空白对照组线粒体膜电位、线粒体复合物 I、II 出现显著降低。研究表明,在线粒体能量代谢障碍时,出现认知损伤患者的脑组织线粒体复合物 II、III、IV 均有不同程度的下降^[36-37]。另有报道称,对 SD 大鼠进行低氧处理 7 h 后发现,缺氧模型组对比正常组大鼠脑、心、肾组织中线粒体复合物 I、IV 均显著下降^[38]。

F_1F_0 -ATP 合成酶又称线粒体 ATP 合酶,参与催化氧化磷酸化;同时在电子传递链产生的跨膜质子动力势的推动下合成 ATP。有研究称,缺氧将导致 Wistar 大鼠肺组织线粒体 ATP 合酶缺氧 4 周时活性显著下调^[39]。另有研究称,雄性 SD 大鼠于模拟 11.3% 氧浓度 (等效海拔 5000 m) 的环境中持续暴露 4 周发现,与常氧对照组比较,常氧运动组和低氧运动组的 ATP 合酶的活性显著升高,低氧对照组线粒体复合物 I、II、IV 和 ATP 合酶的活性和膜电位显著降低;低氧运动组和对照组比较,线粒体复合物 I、II、IV 和 ATP 合酶的活性和膜电位显著升高^[40]。低氧运动对 ATP 需求更大,更加考验线粒体中各环节生化供能相关酶的活性及协调转运能力。

3 高原环境下线粒体形态结构及数目变化

总的来说,缺氧对于线粒体内、外各生化反应环节都存在抑制作用,这极大程度影响了细胞活力

和正常代谢。除此之外,线粒体数目的减少与超微结构的变化对于线粒体合成 ATP 的效率也有直接影响(图 2)。

3.1 高原使线粒体数目减少

Levett 等^[41]选取 CXE 探险队为实验对象,在平原(海拔 75 m)和尼泊尔珠穆朗玛峰大本营(海拔 5300 m)对所有受试者进行活检取样,通过电镜观察肌肉形态(包括线粒体密度和分布)后发现,在暴露于海拔高度 19 d 后,大本营的人肌肉活检中线粒体密度无显著变化,登山队在暴露于低压缺氧 66 d 后,总线粒体密度降低 21%,线粒体体积变小。肌原纤维间线粒体降低了 14%,而肌膜下线粒体丢失 73%。肌膜下线粒体被认为在为细胞膜上的离子泵提供 ATP 方面很重要。Hoppeler 等^[42]以在 5200 m 大本营停留至少 6 周并部分暴露于海拔超过 8000 m 环境下的人群为研究对象,进行肌肉活检并利用透射电镜进行形态学分析。结果表明,与低海拔相比,暴露于高海拔下的肌肉线粒体体积密度降低了近 20%。此外,该研究还发现,线粒体体积密度的降低主要是由于肌膜下线粒体减少导致的,而纤维间线粒体的降低比例相对较小。

线粒体密度与功能和缺氧暴露时间及海拔直接相关,高原环境将导致活性氧(reactive oxygen species,ROS)加速生成,损害蛋白质、脂质、线粒体 DNA 及 ATP 的合成,从而影响细胞正常功能^[43-44]。有研究称,ROS 的产生伴随着海拔的上升而增加,

在 7000 m 以上将迅速生成^[45],迅速生成的 ROS 将造成缺氧细胞的凋亡和线粒体的主动减少。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的稳定是维持氧化磷酸化过程合成 ATP 的先决条件 MMP 的稳定利于细胞正常生理功能,研究称 MMP 将随缺氧时间的延长出现下降(称 MMP 耗散),MMP 的耗散影响了 ATP 合成且加速了缺氧细胞的凋亡,造成了线粒体密度的降低^[46]。

3.2 高原使线粒体体积与内脊形态改变

Lukyanova 等^[47]选择在极高海拔(11 000 m)存活时间在 2 min 以下的近交系大鼠为低缺氧耐性组(low resistance, LR),存活时间在 6~8 min 为高缺氧耐性组(high resistance, HR),观察不同海拔高度下大鼠大脑皮层线粒体的超微型态变化,以常氧空白组作为对照组,结果发现,常氧时 HR 的小体积、长、超长线粒体(长度:0.14~0.25、0.5~3、>4 μm)和总线粒体数分别为 LR 的 1.15、1.31、3.67 以及 1.18 倍。这种常氧下线粒体的“拉长”是线粒体中 ATP 增加生成、MMP 升高和 ROS 生产减少的典型特征^[48];与此同时,在模拟海拔 5000 m 时,LR 组小体积线粒体数目对比对照组大鼠提高 3.6 倍;同时,长线粒体与超长线粒体数目明显减少,线粒体脊形状与密度无变化;在 HR 中小线粒体数目对比对照组几乎不变,长线粒体与超长线粒体数目明显减少,但线粒体脊排列更加紧密;在模拟海拔 7000 m 时,LR 中小线粒体、长线粒体、超长线粒体对比对照组均显著增加,分别为对照组的 1.8、1.4 和 2.1 倍,线

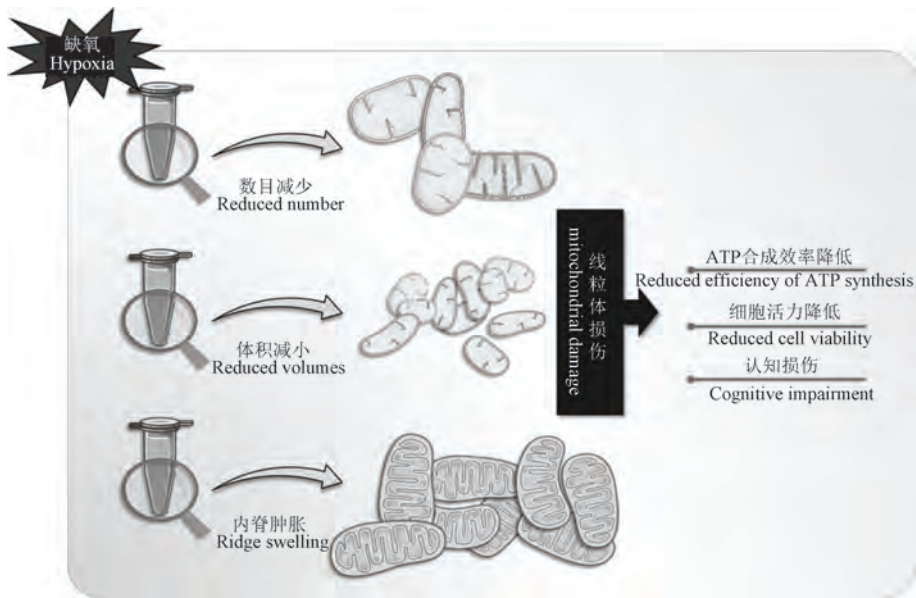


图2 高原缺氧后线粒体形态结构及数目的变化

Figure 2 Changes in the morphological structure and number of mitochondria after hypoxia in the highlands

粒体排列杂乱、基质浓缩、脊肿胀^[47];增多的小线粒体中出现了“球状”特征,这可能是线粒体 MMP 降低、钙代谢紊乱和 ROS 增加的信号^[49]。

蔡明春等^[50]在了一项研究中比较了平原与急、慢性缺氧(模拟海拔 4000 m, 40 d)后 Wistar 大鼠脑线粒体超微结构。结果发现,急性缺氧后大鼠脑线粒体体积增大、膜结构不清、脊紊乱、脊肿胀等病理形态;此外,脑线粒体平均直径和截面积增大,比表面积减小。慢性缺氧后大鼠脑线粒体形态参数与平原大鼠相比无显著差异,说明在 40 d 模拟 4000 m 海拔的低压缺氧暴露后,脑线粒体形态结构已经恢复正常,这可能是对缺氧适应性的表现。低压低氧会导致部分线粒体肿胀和扩张,体现为内部脊结构缺失,线粒体形态与脊的数目决定了线粒体复合物和 F_1F_0 -ATP 合酶的分布区域和活性^[51-52]。

4 小结

缺氧是高原地区能量物质利用与线粒体功能受影响的最直接因素。在高原缺氧时,食欲下降、机体代谢效率降低、内分泌水平失调等现象使得机体出现能量供给不平衡、细胞活力低下,导致细胞凋亡与组织损伤。此外,高原缺氧条件下,线粒体的氧化磷酸化功能减弱,进而对糖代谢产生负面影响。作为重要的能量来源之一,糖需要通过酵解来满足机体在缺氧环境下的能量需求。然而,由于线粒体功能受限,糖酵解效率降低,导致能量供应不足,多脏器组织内糖原加速消耗。缺氧后,机体可能更倾向于利用脂肪作为能量储存形式。然而,受损的线粒体功能与生化过程导致脂肪的氧化代谢能力下降,使其难以有效转化为能量,发生脂类代谢障碍,加重组织与脏器的脂肪堆积。此外,缺氧将增加体内蛋白质分解,以提供必要的氮源,用于新蛋白质的合成。这种失衡状况可能导致肌肉组织的损失和众多生化反应的停滞,从而影响高原作业效能。

线粒体作为细胞的“动力工厂”,是细胞与组织能量代谢和有氧氧化的重要场所。高原环境中,丙酮酸代谢、三羧酸循环、 β -氧化、氧化磷酸化过程等生化反应途径因关键酶的低缺氧耐性受到抑制,这影响了组织的有氧代谢与线粒体 ATP 的合成,与此同时,线粒体超微结构也会根据海拔高度升高而发生改变,高海拔时线粒体总密度、总数目、线粒体内膜脊的形态与线粒体大小等均出现不同程度的负

效应。线粒体呼吸链复合物及 F_1F_0 -ATP 合酶的分布和活性受到影响、MMP 缺氧耗散、ROS 含量激增,线粒体数目减少;与此同时,线粒体的内脊肿胀将影响线粒体内部的物质运输和能量转换效率,这阻碍了 ATP 的合成并加速了缺氧细胞的凋亡。有报道称,低氧线粒体的丢失可能是一种适应性反应,其目的是减少有害的 ROS 的产生,延缓缺氧细胞凋亡速度^[53];也有可能是细胞内有氧代谢水平降低,机体做出的适应性调整,而有高负荷的供能需求时线粒体又能做出“拉长”这样增加供能的形态改变。在进行高原作业时机体易疲劳、易出现运动损伤和高血脂症,可通过增加能量摄入和高碳水化合物配给、药物干预、高原习服训练等方式改善作业效能与机体损伤修复功能。

总之,高原缺氧对于能量代谢、生化供能反应和线粒体超微结构的负效应会导致线粒体损伤甚至是高原作业效能的降低,高原条件下的缺氧、氧化应激、能量代谢紊乱等因素可能共同作用,导致线粒体损伤的发生。然而,相关机制的深入探究仍待开展。不完善的损伤机制意味着在筛选符合机制的防治药物时选择面更为狭窄。因此,对于这种影响机制的深入研究将极大推动多药物、多靶点防治高原损伤的发展。

近年来,线粒体损伤新机制的发现造就了线粒体研究热,如“铁死亡”这一新兴的研究领域;研究称,缺氧会促进铁死亡^[54]。铁死亡是一种新型细胞程序性死亡方式,铁死亡对于线粒体功能及形态特征有直接的调节作用^[55];缺氧细胞中 ROS 和氧化应激水平升高,线粒体体积减小、内脊数目减少,加剧细胞在缺氧状态下的损伤^[54,56]。高原铁死亡还可能导致机体脑损伤与神经行为损伤,出现高原认知障碍,影响精细工作能力^[57-58]。未来,铁死亡的发生水平可能作为高原线粒体损伤或高原细胞损伤的验证标准,对于高原损伤疾病、动物模型和高原损伤防治药物的研究有重大意义^[59]。线粒体损伤机制的完善有助于寻找新的治疗策略和药物靶点,从而提高进入高原人群的适应能力和健康水平。

参考文献:

- [1] Li G, Yin W, Yang Y, et al. Bibliometric insights of global research landscape in mitophagy [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 851966.
- [2] 高迎春, 周珺, 马慧萍, 等. 基于线粒体调节的高原缺氧损伤防治药物靶点 [J]. 生理科学进展, 2020, 51(1): 61-66.

- [3] 孟庆玲. 蛋白质:生命的基石 [J]. 食品安全导刊, 2014, 0(25): 76-77.
- [4] Slivka D, Dumke C, Hailes W, et al. Impact of hypoxic exercise recovery on skeletal muscle glycogen and gene expression [J]. High Alt Med Biol, 2021, 22(3): 300-307.
- [5] 周建伟. 藏羊对青藏高原氮素营养胁迫的适应性研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2015.
- [6] Fernández-Lázaro D, Díaz J, Caballero A, et al. The training of strength-resistance in hypoxia: effect on muscle hypertrophy [J]. Biomedica, 2019, 39(1): 212-220.
- [7] 丰惠, 贾宁阳, 刘燕, 等. 高原驻训官兵肝脏脂肪变性或缺氧等关系探讨 [J]. 东南国防医药, 2016, 18(3): 259-261.
- [8] 秦宁宁, 谢华, 赵安鹏, 等. 高原低氧环境下红景天苷对小鼠运动耐力的影响 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(4): 397-404.
- [9] 陶文迪, 田秀玉, 李茂星, 等. 黄芪水提取物对高原缺氧大鼠运动能力的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(12): 12-18.
- [10] 罗晓红, 周珺, 贾正平, 等. 模拟高原低氧应激环境下大鼠内分泌代谢的变化研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2014, 35(4): 304-308.
- [11] 倪倩, 万凤奇, 董湘玉, 等. 高原环境对大鼠肝脏糖异生的影响 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(9): 1477-1480.
- [12] Chee NT, Lohse I, Brothers SP. mRNA-to-protein translation in hypoxia [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 49.
- [13] 周方强, 刘锐. 丙酮酸钠在危重病液体治疗中的潜在应用 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2017, 12(5): 321-325.
- [14] Borle AB, Stanko RT. Pyruvate reduces anoxic injury and free radical formation in perfused rat hepatocytes [J]. Am J Physiol, 1996, 270(3): G535-G540.
- [15] Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(14): 2577-2604.
- [16] Handzik MK, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, et al. Increasing cardiac pyruvate dehydrogenase flux during chronic hypoxia improves acute hypoxic tolerance [J]. J Physiol, 2018, 596(15): 3357-3369.
- [17] Wang D, Wang Q, Yan G, et al. Hypoxia induces lactate secretion and glycolytic efflux by downregulating mitochondrial pyruvate carrier levels in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 1710-1717.
- [18] Crocker CD, Chapman LJ, Martínez ML. Hypoxia-induced plasticity in the metabolic response of a widespread cichlid [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2013, 166(2): 141-147.
- [19] Oktay Y, Dioum E, Matsuzaki S, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α regulates expression of the mitochondrial aconitase chaperone protein frataxin [J]. J Biol Chem, 2007, 282(16): 11750-11756.
- [20] Nuñez de castro I, Arias de Saavedra JM, Machado A, et al. Regulation of the level of yeasts citrate synthase by oxygen availability [J]. Mol Cell Biochem, 1976, 12(3): 161-169.
- [21] Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9765.
- [22] Peng M, Yang D, Hou Y, et al. Intracellular citrate accumulation by oxidized ATM-mediated metabolism reprogramming via PFKP and CS enhances hypoxic breast cancer cell invasion and metastasis [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 228.
- [23] Tsui KH, Chung LC, Wang SW, et al. Hypoxia upregulates the gene expression of mitochondrial aconitase in prostate carcinoma cells [J]. J Mol Endocrinol, 2013, 51(1): 131-141.
- [24] Carvalho C, Santos MS, Baldeiras I, et al. Chronic hypoxia potentiates age-related oxidative imbalance in brain vessels and synaptosomes [J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7(4): 288-300.
- [25] 徐建方, 冯连世, 路瑛丽, 等. 低氧训练对肥胖大鼠糖有氧代谢关键酶基因表达的影响 [J]. 体育科学, 2012, 32(1): 40-47.
- [26] Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia [J]. Nature, 2011, 481(7381): 380-384.
- [27] Wise DR, Ward PS, Shay JE, et al. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(49): 19611-19616.
- [28] 徐玉明, 李俊平, 王端元. 低氧训练诱导大鼠腓肠肌抗肌营养不良蛋白和代谢酶变化及延长高速力竭运动时间 [J]. 生理学报, 2012, 64(4): 455-462.
- [29] 李茂星, 王先敏, 毛婷, 等. 栀子黄色素对模拟高原缺氧小鼠运动性疲劳的改善作用 [J]. 解放军药科学学报, 2017, 33(1): 28-32.
- [30] 李澎瀛, 张东阳, 吴美玲, 等. 缺氧条件下肝癌细胞和正常肝细胞能量代谢通路的差异 [J]. 复旦学报(医学版), 2016, 43(2): 127-134.
- [31] 张俊飞. 左卡尼汀联合肠外营养对消化道肿瘤根治术后重症患者炎症因子的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [32] Kennedy SL, Stanley WC, Panchal AR, et al. Alterations in enzymes involved in fat metabolism after acute and chronic altitude exposure [J]. J Appl Physiol (1985), 2001, 90(1): 17-22.
- [33] Dutta A, Vats P, Singh VK, et al. Impairment of mitochondrial beta-oxidation in rats under cold-hypoxic environment [J]. Int J Biometeorol, 2009, 53(5): 397-407.
- [34] Öğünç Keçeci Y, İncesu Z. Mitochondrial oxidative phosphorylation became functional under aglycemic hypoxia conditions in A549 cells [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(9): 8219-8228.
- [35] 靳婉君, 郝颖, 樊鹏程, 等. 木香乙醇提取物对缺氧小鼠肝脏保护作用研究 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(4): 14-18.
- [36] Manczak M, Reddy PH. Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial

- dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(23): 5131–5146.
- [37] Swomley AM, Butterfield DA. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(10): 1669–1680.
- [38] 张宇晨. 参知健脑方对缺氧致认知功能下降大鼠线粒体的干预作用及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [39] Li N, Shi Y, Yin J, et al. Impact of ATP synthase/coupling factor 6 in hypoxic pulmonary arterial hypertension: an experimental rat model [J]. *Turk J Med Sci*, 2022, 52(5): 1468–1477.
- [40] 薄海, 李玲, 段富强, 等. 低氧复合运动抑制低氧诱导的骨骼肌线粒体 DNA 氧化损伤 [J]. *生理学报*, 2014, 66(5): 597–604.
- [41] Levett DZ, Radford EJ, Menassa DA, et al. Acclimatization of skeletal muscle mitochondria to high-altitude hypoxia during an ascent of Everest [J]. *FASEB J*, 2012, 26(4): 1431–1441.
- [42] Hoppeler H, Howald H, Cerretelli P. Human muscle structure after exposure to extreme altitude [J]. *Experientia*, 1990, 46(11–12): 1185–1187.
- [43] Horscroft JA, Murray AJ. Skeletal muscle energy metabolism in environmental hypoxia: climbing towards consensus [J]. *Extrem Physiol Med*, 2014, 3(1): 19.
- [44] Murray AJ, Horscroft JA. Mitochondrial function at extreme high altitude [J]. *J Physiol*, 2016, 594(5): 1137–1149.
- [45] Cano I, Selivanov V, Gomez-Cabrero D, et al. Oxygen pathway modeling estimates high reactive oxygen species production above the highest permanent human habitation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111068.
- [46] Jain K, Prasad D, Singh SB, et al. Hypobaric hypoxia imbalances mitochondrial dynamics in rat brain Hippocampus [J]. *Neurol Res Int*, 2015, 2015: 742059.
- [47] Lukyanova L, Germanova E, Khmil N, et al. Signaling role of mitochondrial enzymes and ultrastructure in the formation of molecular mechanisms of adaptation to hypoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8636.
- [48] Baker N, Patel J, Khacho M. Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and super complex formation: how mitochondrial structure can regulate bioenergetics [J]. *Mitochondrion*, 2019, 49: 259–268.
- [49] Ding WX, Li M, Biazik JM, et al. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 42373–42378.
- [50] 蔡明春, 柳君泽. 大鼠缺氧过程中脑线粒体超微结构变化及形态计量学研究 [J]. *高原医学杂志*, 2000, 10(2): 12–14.
- [51] Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain super complexes assembly and respiratory efficiency [J]. *Cell*, 2013, 155(1): 160–171.
- [52] 郑洪南. 松果菊苷对模拟高原低压低氧所致小鼠认知功能损伤的作用及其机制 [D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2019.
- [53] Murray AJ. Metabolic adaptation of skeletal muscle to high altitude hypoxia: how new technologies could resolve the controversies [J]. *Genome Med*, 2009, 1(12): 117.
- [54] Fuhrmann DC, Brüne B. A graphical journey through iron metabolism, microRNAs, and hypoxia in ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102365.
- [55] 刘磊, 贾少晗, 于鹏. 线粒体在铁死亡中的形态特征和作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(6): 769–777.
- [56] Singhal R, Mitta SR, Das NK, et al. HIF-2 α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(12): e143691.
- [57] 张梦雅, 赵名, 江亚群, 等. 慢性高原低氧暴露对小鼠神经行为学的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(4): 28–35.
- [58] 常熙雯, 赵安鹏, 姚菀腾, 等. 铁死亡在缺氧相关脑损伤中的研究进展 [J]. *生理学报*, 2023, 75(2): 255–268.
- [59] 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.

[收稿日期]2023-02-13

把得婷,郝彬彬,李娟. 病证结合 COPD 动物模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 114-120.
Ba DT, Hao BB, Li J. Research progress of disease-syndrome combination models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 114-120.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.015

病证结合 COPD 动物模型研究进展

把得婷¹, 郝彬彬¹, 李娟^{1,2*}

(1.甘肃中医药大学,兰州 730000;2.甘肃中医药大学附属医院,甘肃省中药新产品
创制工程实验室,甘肃省中医方药挖掘与创新转化重点实验室,兰州 730000)

【摘要】 慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是临床常见的呼吸系统疾病,发病率高,死亡率高,已成为当今社会一个重要的卫生问题。中医药在 COPD 的治疗中积累了丰富的历史经验,并且具有独特的临床优势。为深入发掘中医药对本病的治疗效果,制备病证结合的 COPD 动物模型是关键前提。本文归纳总结的病证结合模型包括肺气虚证动物模型、肺脾两虚证动物模型、痰热郁肺证动物模型、痰瘀阻肺证动物模型、寒饮证动物模型五大类。现将近几年常见的病证结合类造模方法进行简单的阐述与梳理,以期为研究人员提供新思路,推动中医药治疗本病的研究进程。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;病证结合;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0114-07

Research progress of disease-syndrome combination models of chronic obstructive pulmonary disease

BA Deting¹, HAO Binbin¹, LI Juan^{1,2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Affiliated Hospital of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Gansu Engineering Laboratory for New Products of Traditional Chinese Medicine, Gansu Key Laboratory of TCM Excavation and Innovative and Transformation, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a common respiratory disease with high morbidity and mortality, and has become a major health issue. Traditional Chinese medicine has accumulated rich historical experience in the treatment of COPD and has unique clinical advantages. To further explore the therapeutic effect of traditional Chinese medicine on this disease, establishment of a COPD animal model combining disease and syndrome is critical to study occurrence and development of the disease. The combined models of disease and syndrome summarized include five types: the animal model of lung qi deficiency, the animal model of lung and spleen deficiency, the animal model of phlegm-heat stagnation of lung, the animal model of phlegm-stasis obstructing lung, and the animal model of cold-fluid syndrome. The common disease and syndrome in recent years combined with the method of class modeling are simply described and combined to provide new ideas for researchers and promote research of traditional Chinese medicine of this disease.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; disease-syndrome combination; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 国家自然科学基金(82160872); 甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目(GSSYLXM-05); 甘肃省中医药研究中心开放课题(zyzx-2020-zx17); 2022 年度中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金(2022-13)。

[作者简介] 把得婷(1995—),女,硕士研究生,研究方向:方剂药效物质基础与作用机理。E-mail:1597607527@qq.com

[通信作者] 李娟(1967—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中医药防治慢性阻塞性肺疾病。E-mail:gansulijuan@sina.com

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), 简称慢阻肺, 是一种常见的可防可治的慢性呼吸系统疾病, 其特征在于持续的呼吸系统炎症和不可逆的气流受限, 通常是由于大量暴露于有毒颗粒或气体引起的^[1], 具有患病率、致残率、病死率均较高的特点^[2]。在我国, 40 岁及以上人群患病率为 13.7%, 有近 1 亿 COPD 患者, 在成年人中高度流行, 位居我国居民死因第三位^[3], 显然已成为当今社会一个重要的卫生问题。西医常规治疗包括控制性氧疗、口服支气管扩张剂、雾化吸入激素、注射抗炎药物等, 虽在一定程度上可以缓解症状, 但依旧具有耐药性及诸多不良反应^[4-6]。中医药在 COPD 的综合治疗中积累了丰富的经验, 在抑制氧化应激反应及炎性细胞因子释放^[7]、抑制气道粘液高分泌及有效改善病理损害^[8-9]、提高患者肺功能及生活质量^[10]等方面发挥了关键作用。为了更好地发现中医药治疗 COPD 的潜在靶点和阐述其治疗机理, 制备病证结合的动物模型必不可少, 其可以辅助我们准确模拟 COPD 的病理生理状态及证候特征, 为辨证施治奠定基础, 推动中医药治疗疾病的发展。

1 中医病因病机

COPD 在中医学中并没有与之相对应的确切病名, 根据患者临床表现, 多将其归属于“肺胀”“哮喘”“喘病”“咳嗽”等范畴, 稳定期表现类似“咳嗽”, 急性加重期多属“肺胀”^[11]。关于“肺胀”论述, 早在《黄帝内经》中就有提及, 《灵枢·胀论》云“夫胀者, 皆在于藏府之外, 排藏府而郭胸胁、胀皮肤, 故命曰: ‘胀’”, 这里首次提出“胀”病^[12]。后代医家也多有补充与发展, 《金匱要略》言, “咳而上气, 此为肺胀, 其人喘, 目如脱状”详细描述其症状, 《丹溪心法》又言“肺胀而咳, 或左或右不得眠, 此痰夹瘀血碍气而病”, 提出痰、瘀与疾病进展密切相关。中医学认为本病发生多因病久肺虚、年老体弱, 外加感受六淫侵袭而引起, 病机为肺体、肺气损伤, 痰瘀阻滞, 肺管气道不利, 张缩无力, 嗽则气还肺间, 加之外邪侵袭而触动伏邪, 致使疾病发生^[13]。

2 COPD 动物模型

临床上, COPD 因其高发病率一直成为研究热点, 经过长期探索与实践, 造模技术已渐趋完善, 研究者在复制 COPD 疾病模型时选用单因素诱导或复

合因素诱导, 常见的单因素诱导包括烟雾暴露 (cigarette smoke, CS)^[14]、气管脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 滴注^[15]、基因敲除^[16], 复合因素诱导有 CS+LPS^[17]、CS 联合病毒^[18]等, 以 Wistar 大鼠、SD 大鼠、C57BL/6 小鼠等为造模对象, 将动物肺组织形态 (肺泡、支气管、肺间质), 肺组织病理评分 (肺组织损伤程度、气道炎症评分、气道黏液分泌评分), 肺组织定量分析 (肺泡损伤程度、气道重塑程度、血管重构程度) 作为评判依据, 去验证造模是否成功^[19]。

3 COPD 病证结合动物模型

“病证结合”动物模型是指在中医药理论、现代医学理论与实验动物学知识的有机结合下, 模拟出的与人类疾病表现和证候特征相同或相似的实验观察动物^[20]。病证结合造模的原理为先根据西医理论复制目标疾病模型, 如慢性支气管炎、哮喘等, 后在该疾病模型基础上, 根据中医证候概念复制出证候模型, 两者结合起来使西医的疾病中呈现出对应的中医证型, 体现了临床辨病与辨证的结合, 是当前用于研究中医药治疗疾病的理想模型^[21-22]。在 COPD 病证结合动物模型中, 实验者多采用“先病后证”的造模方式, 先以“CS+LPS”的方法复制出 COPD 动物模型, 使模型具备与 COPD 相关的病理表现, 进一步根据中医病因病机去模拟证候特征, 换言之, 在西医病理损害的基础上叠加中医病因刺激, 最后制备出 COPD 病证结合模型, 合格且稳定的病证结合模型, 能够更好地为中医药治疗慢阻肺提供模型支撑。

3.1 肺气虚证动物模型

李瑞祥等^[23]采用复合因素造模, 总计 28 d; 在第 1 天、第 14 天气管滴注 LPS (1 mg/mL), 其余时间每天对其烟熏 30 min, 烟熏结束后再次将其置于冷空气刺激 1 h, 以此建立肺气虚证 COPD 大鼠模型, 并利用此模型验证了利金方通过升高肺组织免疫细胞的水平来改善肺气虚证 COPD 的症状。

沈俊希等^[24]于造模第 1 天、第 14 天气管注射 200 μ L LPS 溶液 (浓度: 1 g/L), 第 2~23 天 (除第 14 天) 点燃 7.11 g 烟丝和 50 g 锯末烟熏, 每天 1 次, 每次 30 min, 第 24~30 天将烟熏频次改为每天 3 次, 每次 30 min, 造模时常为 30 d, 并以补肺汤的治疗效果去判定模型的有效性。

肺为华盖, 主气而司呼吸, 主一身之表, 外邪侵

袭首先犯肺,病久而肺气必虚,因此肺气虚证是 COPD 中最常见的证型。临床以咳喘反复发作、咳痰清稀,咳声微弱、语声低怯,面色淡白、自汗恶风,舌淡苔白脉弱为肺气虚常见症状^[25],治以补肺益气平喘。该模型主要通过“CS+LPS”的方法来复制

(表 1),个别造模方法略有变动,但差异不大,在该证型造模的后期通过加大肺部的烟雾暴露次数或进行冷刺激,对肺造成损伤,一定程度上模拟肺气的损伤,使模型具备一定的合理性,但在模型评价方面尚无统一标准。

表 1 常见病证结合动物模型总结
Table 1 Summarization of disease-syndrome combination animal models

证候类型 Syndromes	动物品系 Animal breed	造模方法及周期 Intervention measures and period	模型表现 Model representation	观测指标 Observational indicators
肺气虚 ^[23] Lung qi deficiency	Wistar 大鼠	“烟熏+气管滴注 LPS+ 冷刺激” 28 天	毛色暗淡脱落,体重下降,呼吸频率增高,口鼻分泌物增多,偶可闻及痰鸣音,肺大泡形成,炎症细胞浸润;CD4 ⁺ T 细胞数量降低,Th17 细胞数量上升;IL-6,IL-21 含量升高。 Fur was dull and shed, the body mass is decreased, the respiratory rate is increased, the oral and nasal secretions are increased, the sputum sounds can be heard occasionally, the pulmonary bullae formation, inflammatory cell infiltration. The number of CD4 ⁺ T cells decreased and the number of Th17 cells increased. The levels of IL-6 and IL-21 were increased.	症状体征、肺组织形态;肺组织免疫细胞;血清及 BALF 中炎症细胞。 Symptoms and signs, lung tissue morphology. Lung tissue immune cells. Inflammatory cells in serum and BALF.
	Wistar rat	“Smoking + intratracheal LPS injection + cold stimulation” 28 days		
肺气虚 ^[24] Lung qi deficiency	Wistar 大鼠	“烟熏+气管滴注 LPS” 30 天	蜷伏少动,被毛蓬起无光泽,呼吸急促,闻及咳嗽及痰鸣音,进食减少;肺泡萎缩塌陷,肺实质化,炎症细胞浸润;TNF-α、IL-8 含量升高。 Curl up and moved less, dull coat, shortness of breath, the sounds of cough and sputum were heard, reduced eating. Alveolar collapse, lung parenchyma, inflammatory cell infiltration. The levels of TNF-α and IL-8 increased.	症状体征,肺组织形态;肺组织 TNF-α、IL-8 含量。 Symptoms and signs, lung tissue morphology. The content of TNF-α and IL-8 in lung tissue.
	Wistar rat	“Smoking + intratracheal LPS injection” 30 days		
肺脾两虚 ^[26] Lung and spleen deficiency	Wistar 大鼠	“烟熏+气管滴注 LPS+ 灌服冰冷番泻叶浸液” 42 天	扎堆眯眼,精神倦怠,毛发干枯,体型消瘦,食少便稀;肺大疱形成,支气管腔渗出物出现,炎症细胞浸润;肺功能下降,IL-1、TNF-α 升高。 Squinting eyes gather together, mental fatigue, dry fur, body wasting, little food and loose stool. Pulmonary bullosa formed, exudate appeared in bronchial cavity, inflammatory cell infiltration. Decreased lung function. IL-1 and TNF-α were increased.	症状体征,肺组织形态;肺功能;血清炎症因子。 Symptoms and signs, lung tissue morphology. Pulmonary function. Serum inflammatory factors.
	Wistar rat	“Smoking + intratracheal LPS injection + drink cold senna infusion” 42 days		
肺脾两虚 ^[27] Lung and spleen deficiency	SD 大鼠	“烟熏+气管滴注 LPS+ 大黄液灌胃” 28 天	神倦体弱,咳嗽短气,纳少便溏;气道和肺实质出现炎性病变,气道狭窄;肺功能下降;脾脏指数、胸腺指数低下。 Fatigued and weak, cough and shortness of breath, little food and loose stool. Airway and lung parenchyma inflammatory lesions, airway stenosis. Decreased lung function. The spleen index and thymus index were low.	症状体征,肺组织形态;肺功能;脾指数,胸腺指数。 Symptoms and signs, lung tissue morphology. Pulmonary function. Spleen index, thymus index.
	SD rat	“Smoking + intratracheal LPS injection+rhubarb liquid by gavage” 28 days		
痰热郁肺 ^[28] Phlegm-heat stagnation of lung	Wistar 大鼠	“烟熏+肺炎双球菌滴 鼻” 28 天	咳嗽喘息,鼻部分泌物增多,毛发脱落,面部水肿,舌质紫黯舌苔黄;支气管黏膜坏死、脱落,管壁炎症细胞浸润,肺泡壁断裂;肺功能下降;炎症因子升高。 Cough and wheezing, increased nasal secretions, fur loss, facial edema, dark tongue and yellow tongue coating. Necrosis and exfoliation of bronchial mucosa, inflammatory cell infiltration of bronchial wall and rupture of alveolar wall were observed. Decreased lung function. Inflammatory factors were increased.	症状体征,肺组织形态;肺功能;BALF 中炎症细胞数量及百分比。 Symptoms and signs, lung tissue morphology. Pulmonary function. The number and percentage of inflammatory cells in BALF.
	Wistar rat	“Smoking + <i>Pneumococcus nasal</i> drops” 28 days		

续表1

证候类型 Syndromes	动物品系 Animal breed	造模方法及周期 Intervention measures and period	模型表现 Model representation	观测指标 Observational indicators
痰热郁肺 ^[29] Phlegm-heat stagnation of lung	SD 大鼠 SD Rat	“烟熏+气道滴注 LPS” 28 天 “ Smoking + intratracheal LPS injection” 28 days	急躁多动,毛发暗淡无泽,大便质硬,呼吸道分泌物色黄质稠;支气管壁增厚,肺泡壁断裂,肺大泡形成;肺功能下降;IL-6、STAT1、STAT3 上升。 Irritability, hyperactivity, dull coat, hard stools, respiratory secretions are yellow and sticky. The bronchial wall was thickened, alveolar wall was broken, and pulmonary bullae were formed. Decreased lung function; IL-6, STAT1 and STAT3 increased.	症状体征;肺组织形态;肺功能;肺组织炎性因子及相关蛋白含量。 Symptoms and signs. Lung tissue morphology. Pulmonary function. Contents of inflammatory factors and related proteins in lung tissue.
痰热郁肺 ^[30] Phlegm-heat stagnation of lung	Wistar 大鼠 Wistar Rat	“烟熏+气道滴注 LPS+风热刺激” 37 天 “ Smoking + intratracheal LPS injection+ wind and heat stimulation” 37 days	肺泡融合、间隔破坏,气道黏膜脱落、管腔内有痰液潴留,粘膜下腺体肥大、杯状细胞增生;IL-8、TNF-α 水平上升;MUC5AC、NE 含量显著升高。 Alveolar fusion, septum destruction, airway mucosa exfoliation, sputum retention in the lumen, submucosal gland hypertrophy, goblet cell proliferation. The levels of IL-8 and TNF-α increased. The contents of MUC5AC and NE were significantly increased.	肺组织形态;血清炎性因子及 BALF 中相关蛋白的含量。 Lung tissue morphology. The levels of inflammatory factors in serum and related proteins in BALF were detected.
痰瘀阻肺 ^[31] Phlegm-stasis obstructing lung	SD 大鼠 SD Rat	“强迫游泳+被动吸烟+低氧环境” 30 天 “ Forced swimming + passive smoking + hypoxic environment” 30 days	喜静恶动,毛发发黄,呼吸急促,唇舌爪甲发绀,体质量减轻;肺泡局限性增大,肺泡间隔增厚或损坏,支气管壁黏液腺增生;肺功能下降;IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 升高。 Quiet but not active, hair turns yellow, shortness of breath, cyanosis of lips, tongue and nails, weight loss. Alveolar enlargement, alveolar septum thickening or damage, bronchial wall mucus gland hyperplasia. Decreased lung function. The levels of IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α were increased.	症状体征;肺组织形态;肺功能;血清炎性因子水平。 Symptoms and signs. Lung tissue morphology. Pulmonary function. Serum inflammatory factor levels.
痰瘀阻肺 ^[32] Phlegm-stasis obstructing lung	SD 大鼠 SD Rat	“烟熏+低氧” 28 天 “ Smoking + hypoxic environment” 28 days	肺泡结构破坏、融合,肺血管增厚,管壁炎症细胞浸润,管腔狭窄;Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 增加;VEGF 表达升高。 Alveolar structure was destroyed and fused, the pulmonary blood vessels were thickened, the inflammatory cells infiltrated in the wall, and the lumen was narrowed. The expression of Bax protein decreased and Bcl-2 protein increased. The expression of VEGF increased.	肺组织形态;肺血管组织 Bax、Bcl-2 蛋白水平,血清 VEGF 水平。 Lung tissue morphology. The levels of Bax and Bcl-2 protein in pulmonary vascular tissue and serum VEGF level were detected.
寒饮证 ^[33] Cold-fluid syndrome	Wistar 大鼠 Wistar Rat	“烟熏+气管滴注 LPS+饮冷及寒冷刺激” 56 天 “ Smoking + tracheal instillation of LPS + drinking cold and cold stimulation” 56 days	精神萎靡,呼吸急促,毛发少泽脱落,食少体轻,口鼻分泌物增加;气管、支气管上皮细胞肿胀坏死脱落,支气管管腔炎细胞浸润;肺功能下降。 Listlessness, shortness of breath, the hair color is dark and shedding, less food and body light, mouth and nose secretions increased. The tracheal and bronchial epithelial cells were swollen, necrotic and exfoliated, and the bronchial lumen was infiltrated by inflammatory cells. Lung function decreased.	症状体征;肺组织形态;肺功能。 Symptoms and signs. Lung tissue morphology. Pulmonary function.
寒饮证 ^[34] Cold-fluid syndrome	Wistar 大鼠 Wistar Rat	“烟熏+气管滴注 LPS+饮冷+冷刺激” “ Smoking + tracheal instillation of LPS + drinking cold and cold stimulation” 30 d	形体消瘦,被毛零乱,鼻腔可见淡白色分泌物,饮水量下降;肺功能下降;IL-8、IL-10、IL-13 和 TNF-α 上升,AQP1 含量降低,Muc5ac 蛋白上升。 Body was thin, his fur was messy, nasal secretions were pale white, and water intake was decreased. Decreased lung function; IL-8, IL-10, IL-13 and TNF-α were increased, AQP1 content was decreased, and Muc5ac protein was increased.	症状体征;肺功能;血清中炎性因子含量及肺组织部分蛋白表达。 Symptoms and signs. Pulmonary function. The content of inflammatory factors in serum and the expression of some proteins in lung tissue were detected.

3.2 肺脾两虚证动物模型

张旭辉等^[26]在造模第 1 天、第 14 天气管滴注

LPS,第 2~42 天进行烟雾暴露,每天 2 次,每次 30 min(滴注 LPS 当天不烟熏),同时自造模第 7 天起

在熏烟前 30 min 给予浓度为 1 g/mL 的冰冷番泻叶浸液,连续灌胃至第 42 天,利用苦寒药损伤脾胃的机理建立脾虚证慢阻肺动物模型,研究者使用该动物模型观察到 ghrelin 及 obestatin 与炎症因子的相互作用在 COPD 合并营养不良中起重要作用。

何嘉等^[27]于造模第 1 天、第 14 天气管滴注 0.2 mL LPS,第 2~28 天(气管滴注 LPS 日除外)对其进行烟熏,1 h/d;同时以“二次造模”的方式在造模开始后第 7 天以大黄混悬液灌胃,2 mL/d,共 8 d,第 28 天成功制备 COPD 肺脾两虚证模型,并使用该模型验证了健脾益肺口服液可提高 COPD 患者的免疫功能。

肺气虚证为慢阻肺主要证型,肺虚日久,子盗母气,脾失健运,同时母病及子,又进一步加重肺脏的失常,二者相互影响,终成肺脾两虚之证,该证型也主要集中出现在 COPD 稳定期,主要表现为咳嗽喘息气短,动则加重,或神疲乏力易感冒,或食少纳呆便溏,舌体胖大舌苔腻,脉沉细或细弱,治疗以益气健脾为主^[35]。此类模型先进行 COPD 的复合造模,后期以苦寒药物煎剂灌胃处理模拟中医证候(表 1),体现了疾病发展过程中的动态变化,番泻叶、大黄苦寒攻下,药效峻猛,易伤脾阳,母病及子,因此可致肺脏失养,较为符合肺脾两虚证产生的机理。

3.3 痰热郁肺证动物模型

金朝晖等^[28]点燃 50 g 烟叶、10 g 硫磺对其烟雾暴露,每次 30 min,每天 2 次,两次间隔 4 h 以上,随后鼻腔滴入 0.1 mL 肺炎双球菌菌液(浓度: 6×10^8 CFU/mL,最后两次浓度: 18×10^8 CFU/mL),每周 2 次,共计滴 8 次,造模 28 d 结束,成功制备 COPD 痰热郁肺证模型,作者借此模型证实了清金畅肺饮对 COPD 气道炎症具有抑制作用^[36]。

许光兰等^[29]在实验第 1 天、第 14 天经气管滴注 LPS(浓度:1 g/L)200 μ L,第 2~30 天(除第 14 天)进行烟雾暴露,早晚各 30 min,首先制备 COPD 疾病模型。在此基础上,于造模第 26 天气管多滴注 LPS 1 次,以此模拟痰热郁肺证型,使“病”“证”相结合,并设置清金化痰颗粒治疗作为对照组,以方测证,结果对照组大鼠病理改变有所好转,模型制备成功。

陈锦标等^[30]在实验第 1、8、15 天气道滴入 200 μ L LPS 溶液(浓度:1 mg/mL),第 2~28 天烟雾暴露(LPS 滴注当日除外),每次 30 min,上、下午各一

次。后在第 29~37 天将其置于风箱中(温度(39 ± 1) $^{\circ}$ C,风速 0.7 m/s,相对湿度 50%)进行风热刺激,依旧每次 30 min,每天 2 次,造模时长 37 d,成功制备 COPD 痰热郁肺证模型。

该证型多出现在急性加重期,肺失宣肃,津液失于布散而聚集体内,日久积热化痰,或感受风热之邪侵袭,灼伤津液,炼液成痰,痰热壅结于肺而发病^[37-38]。咳嗽喘息,发热痰黄,口渴喜饮,舌红苔黄为痰热蕴肺证常见症状^[25],治以清热化痰。在痰热郁肺证模型中,研究者在造模后期多将动物置于人为制造的风热环境中进行刺激(表 1),以此模拟风热侵袭,从而使动物产生与风热证相似的症状,值得借鉴。

3.4 痰瘀阻肺证动物模型

朱张求等^[31]将大鼠放入水槽中(恒温: $43 \pm 1^{\circ}$ C)强迫游泳 30 min,后进行烟雾暴露,每天 1 次,每次 0.4 h,最后将其置于通入氮气的低氧箱内(氧浓度: $10.0\% \pm 0.5\%$, CO_2 浓度: 0.03%),每天低氧 7 h,连续造模 1 个月,由此成功建立 COPD 痰瘀阻肺证模型。作者基于此模型明确了芪白平肺胶囊通过降低炎症因子表达来改善肺血管重塑及炎症^[39]。

石孟瑶等^[32]将大鼠置于烟箱内,1 h/d,随后将其置于低氧装置内(氧浓度: $10.0\% \sim 10.5\%$, CO_2 浓度: 0.03% 左右),每天低氧 5 h,每周 6 d,连续造模 4 周,成功复制出目标模型。

肺气亏虚,津液不布,聚为痰浊;气与血相互依存相互为用,气为血之帅,气能行血,亦能摄血,气虚无力助血运行,则血留成瘀,痰瘀共为病理因素,二者相互影响,终成气虚痰瘀之证。临床以咳嗽咳痰气短,神疲乏力自汗,口唇发绀,舌质淡暗,脉沉细或涩为主要表现,治以补肺益气、化痰祛瘀^[40]。研究者多采用复合因素造模(表 1),强迫大鼠在水中游泳,使其劳累损伤肺气,正是利用了“气虚则无力助血运行”这一理念,模型动物症状表现稳定,造模时间短,周期基本一致,均为 1 个月左右。

3.5 寒饮证动物模型

周健美^[33]在造模第 1、14、28 天气管滴注 200 μ L LPS,第 2~56 天(第 14、28 天除外)进行烟雾暴露,每天 2 次,每次 30 min,两次间隔 4 h 左右。后在低温环境下(温度: 0° C 左右)冷冻,1 h/d,同时将其置于冷水游泳,持续 4 周,伴随冰水混合物喂养,总计 56 d,复制出目标模型。

杨淑等^[34]以药测证,选用生姜为治疗药物,在

第 1、14 天鼻腔滴注 200 μ L 脂多糖(浓度:1 mg/mL),第 2~30 天(第 14 天除外)进行烟熏,每天 2 次,每次 30 min,每次间隔 4 h,随后置于低温环境中(温度:0℃左右)刺激 1 h,同时以冰水混合物喂养,12 h/d,持续 30 d。生姜具有解表散寒、温中止呕之药效,实验中给予生姜治疗后大鼠寒症明显减轻,加之造模完成后动物表现出明显寒象,表明寒饮蕴肺模型造模成功。

在寒饮证模型中,研究者遵循中医“苦寒伤阳”的理论,以冰水灌胃伤及脾阳,使得脾胃运化水饮功能失职,加之感受寒邪,内克于肺,肺主通调水道功能紊乱,造成水液内停,终成寒饮内停之证,以“饮冷+寒冷刺激”的方式(表 1)复制寒饮蕴肺中医证型,共建 COPD 寒饮蕴肺证大鼠模型。

4 讨论

病证结合的治疗方法既能对某种疾病有宏观上的把握,又可以了解疾病某一阶段或某一类型的具体本质,做到辨病为先,辨证为主,二者有机结合,从宏观和微观两个层次去认识疾病,从而进行有效治疗,具有事半功倍的效果。总结发现,不同类型的 COPD 病证结合动物模型均具有造模周期适中(大部分为 28 d),可操作性强以及花费成本低的特点,可以作为用于研究中医药治疗 COPD 的模型基础,同时研究者多选用大鼠为造模对象,因其具有繁殖周期短、饲养方便易成活等优点。验证目标模型是否成功时,研究者将动物的行为学表现与病理形态改变相结合,同时会辅助一些相关的实验室指标,如炎症因子等,综合去判定,使动物模型更具说服力。

4.1 存在问题

病证结合动物模型虽在一定程度上可以模拟目标疾病及中医证候,展示干预手段对动物产生的影响,支持中医药防治疾病的研究进展。但依旧存在以下问题:(1)所选动物种类及品系不统一,由于它们存在个体差异性,势必会产生实验数据的不一致;(2)在此类造模方式下,对动物模型证候的评价多依赖实验者的主观判断,并没有明确规范的评价标准,制定科学的模型评价标准依旧是 COPD 病证结合模型领域的难点;(3)众所周知,中医认识疾病讲求整体观念,某种疾病或证型的形成并不是通过单纯的一种外在干预方式就可以蹴就的,同时在疾病发展过程中,伴随诸多并发症,研究人员单纯以

一种致病因素对实验动物进行干预会使模型具有片面性,另一方面,疾病与证候同时存在,实验者以“先病后证”的造模方式割裂了二者原先相辅相成的关系;(4)关于病证结合 COPD 动物模型的研究及相关文献数量较少,供研究人员参考的方法较为缺乏;(5)中医辨证注重四诊合参,重视对舌象和脉象的观察与鉴别,由于采集动物的舌象、脉象比较困难且不能将动物与人体的生理表现混为一谈,因此在目前所报道的诸多文献中,均缺乏描述;(6)COPD 患者以中老年男性为主要患病人群,但大多数研究者在选用模型动物时经常忽略动物性别及年龄这一细节,使实验结果出现偏差。

4.2 发展思路

病证结合动物模型是将实验研究与临床治疗相衔接的桥梁,复制一个恰当准确、切合临床的病证结合动物模型,对开发新型制剂及研究量效关系具有极高价值,但目前病证结合动物模型的建立依旧处于探索阶段,针对在造模过程中存在的诸多问题,研究者需统一动物品系与年龄性别,完善证候评价标准,设计合理的实验计划,利用好现代医学检测手段,探寻规范采集动物四诊信息的技术,从诸多方面去规避造模过程中的不足,从而建立一个符合中西医发病机制的高质量动物模型,推动中医药防治疾病的发展,为人类的健康做出贡献。

参考文献:

- [1] 陈亚红. 2022 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗、管理及预防全球策略更新要点解读 [J]. 中国全科医学, 2022, 25(11): 1294-1304, 1308.
- [2] 李建生, 余学庆. 慢性阻塞性肺疾病中医分期分级防治策略 [J]. 中医杂志, 2019, 60(22): 1895-1899.
- [3] Wang C, Xu J, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health[CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [4] 王凤燕, 张冬莹, 梁振宇, 等. 面向全科医生的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2021 年修订版)》解读 [J]. 中国全科医学, 2021, 24(29): 3660-3663, 3677.
- [5] 郑锋. 吸入糖皮质激素和支气管扩张剂对 COPD 患者肺功能的影响及副作用对比 [J]. 泰山医学院学报, 2018, 39(7): 782-784.
- [6] 于海洋, 陈云志, 朱星, 等. 基于网络药理学探讨潜阳封髓丹治疗慢性阻塞性肺疾病的潜在分子机制 [J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2021, 38(1): 1-6.
- [7] Qian Y, Yan L, Wei M, et al. Seeds of Ginkgo biloba L. inhibit oxidative stress and inflammation induced by cigarette smoke in COPD rats through the Nrf2 pathway [J]. J Ethnopharmacol,

- 2023, 301: 115758.
- [8] 梅晓峰, 吴婉柳, 肖振亚, 等. 补肺益肾方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌及肺组织 Notch3, HES1 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 68-75.
- [9] 李亚, 王洋, 毛静, 等. 补肺益肾方调控 NF- κ B 信号通路对 COPD 大鼠炎症反应的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3171-3175.
- [10] 凌小艳, 韩平, 崔晓华. 桃红四物汤合二陈汤加减治疗老年慢性阻塞性肺疾病的临床分析 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(7): 1678-1681.
- [11] 刘成龙, 耿立梅, 马蕴蕾, 等. 中医药治疗慢性阻塞性肺疾病的研究进展 [J]. 西部中医药, 2022, 35(2): 153-156.
- [12] 刘更生校注. 灵枢经 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2006.
- [13] 张伯礼, 吴勉华. 中医内科学 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2017.
- [14] Xiao C, Cheng S, Lin H, et al. Isforskolin, an adenylyl cyclase activator, attenuates cigarette smoke-induced COPD in rats [J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153701.
- [15] Zhou Y, Fang H, Lin S, et al. Qiliqiangxin protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via activation of the mTOR pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(2): 454-464.
- [16] Richmond BW, Brucker RM, Han W, et al. Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11240.
- [17] Peng Z, Zhang W, Qiao J, et al. Melatonin attenuates airway inflammation via SIRT1 dependent inhibition of NLRP3 inflammasome and IL-1 β in rats with COPD [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 23-28.
- [18] Shu J, Lu W, Yang K, et al. Establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease model by chronic exposure to motor vehicle exhaust combined with lipopolysaccharide instillation [J]. Exp Physiol, 2018, 103(11): 1532-1542.
- [19] 田燕歌, 刘学芳, 陈锴, 等. 慢性阻塞性肺疾病动物模型肺组织病理评价方法研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(6): 1495-1498.
- [20] 殷惠军, 黄烨. 病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1): 8-10.
- [21] 杜全宇, 王飞. 肺气虚证动物模型造模方法评析 [J]. 山西中医, 2015, 31(9): 56-58.
- [22] 李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104-110.
- [23] 李瑞祥, 陈斯宁, 黎展华, 等. 利金方对肺气虚证 COPD 大鼠 CD4 $^{+}$ T 细胞向 Th17 细胞分化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1032-1034.
- [24] 沈俊希, 朱星, 陈云志, 等. 补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠肺-肠轴的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 47-56.
- [25] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗慢性阻塞性肺疾病临床应用指南 (2021 年) [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(8): 901-914.
- [26] 张旭辉, 孙杰, 桑凯, 等. 肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病大鼠血清 Ghrelin、Obestatin 的动态表达 [J]. 西部中医药, 2020, 33(3): 21-25.
- [27] 何嘉, 郭建辉, 梁栋, 等. 健脾益肺口服液对慢阻肺“肺脾气虚证”大鼠脾脏指数和胸腺指数的影响 [J]. 海南医学, 2014, 25(10): 1412-1414.
- [28] 金朝晖, 彭芝配, 滕久祥, 等. 慢性阻塞性肺疾病痰热郁肺证大鼠模型建立的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(4): 17-19.
- [29] 许光兰, 赵媚, 钟云青, 等. 清金化痰颗粒对 COPD 急性期 (痰热郁肺型) 大鼠肺组织 STAT1, STAT3 的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 91-97.
- [30] 陈锦标, 王慧贤, 卢杰伦, 等. 清金化痰汤通过 P38 MAPK 信号通路对 COPD 痰热证大鼠气道炎症反应及黏液高分泌的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(4): 970-974.
- [31] 朱张求, 石孟瑶, 方莉, 等. 芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病痰瘀阻肺证大鼠肺部炎症和肺功能的影响 [J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(6): 52-57.
- [32] 石孟瑶, 朱洁, 方莉, 等. 芪白平肺胶囊对 COPD 痰瘀阻肺证大鼠肺血管 Bax、Bcl-2 表达的影响 [J]. 中医药学报, 2022, 50(4): 23-27.
- [33] 周健美. 小青龙汤对慢性阻塞性肺疾病寒饮蕴肺证外周血及血清 EPO、TPO 表达影响的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [34] 杨淑, 李玲玲, 温瀑, 等. 生姜对 COPD 寒饮蕴肺证大鼠的干预作用研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 803-807.
- [35] 周游, 张伟, 刘小虹, 等. 综合评估慢性阻塞性肺疾病稳定期中医证型与疾病程度及预后的相关性 [J]. 江西中医药大学学报, 2020, 32(3): 51-54.
- [36] 金朝晖, 彭芝配, 滕久祥, 等. 清金畅肺饮对慢性阻塞性肺疾病痰热郁肺证大鼠模型气道炎症的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 680-682.
- [37] 卢秀英, 程新欣, 李玉琦. 痰热清注射液联合左氧氟沙星治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作合并肺炎效果及对肺炎严重程度、IL-6、PCT、SAA 水平的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 51-54.
- [38] 王爱琳, 吴红彦, 马春林. 苓桂三子汤治疗痰瘀互结型慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1651-1653.
- [39] 朱张求. 慢阻肺合并肺动脉高压中医证型及芪白平肺胶囊对其炎症干预研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [40] 山萌, 黄刚, 李猛, 等. 益肺化痰活血颗粒治疗慢阻肺稳定期气虚痰瘀互结型的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(23): 2527-2530, 2544.

黄孔丽,苏世杰,王玉婷,等. 模式生物斑马鱼在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 121-131.

Huang KL, Su SJ, Wang YT, et al. Research progress on the model organism zebrafish in neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 121-131.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.016

模式生物斑马鱼在神经退行性疾病中的研究进展

黄孔丽¹, 苏世杰¹, 王玉婷¹, 刘壮壮¹, 曹丹丹^{1,2}, 汪 沛¹, 陈冠林^{1,3}, 王 奇^{1*}

(1.广州中医药大学科技创新中心,广州 510405;2.广州中医药大学针灸康复临床医学院,广州 510006;
3.广州中医药大学第三附属医院,广州 510378)

【摘要】 神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)是一类慢性、进行性发展的神经疾病,以特异性神经元的大量丢失为主要特征,主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)及肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等。虽然不同类型神经退行性疾病的病变部位和病因各不相同,但大脑特定区域的迟发性神经细胞退行性病变、神经元或突触丢失是它们的共同特征,因此统称为神经退行性疾病。由于神经退行性疾病的复杂性、多基因调控性,导致其病因和发病机制尚不明确,因此这类疾病的治疗举步维艰。近年来,斑马鱼(zebrafish)作为一种新型的模式生物,因其神经传导系统、神经元和神经胶质细胞类型及疾病相关基因同源性与人类都十分相似,受到越来越多的关注。目前,斑马鱼已广泛应用于神经退行性疾病的研究,并在此领域研究中已取得一定的成果,提高了我们对神经退行性疾病的认识。本文通过查阅近几年国内外相关文献,综述斑马鱼作为模式生物近年来在神经退行性疾病研究中的研究进展。

【关键词】 斑马鱼;神经退行性疾病;模式生物;疾病模型;研究进展

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0121-11

Research progress on the model organism zebrafish in neurodegenerative diseases

HUANG Kongli¹, SU Shijie¹, WANG Yuting¹, LIU Zhuangzhuang¹, CAO Dandan^{1,2}, WANG Pei¹, CHEN Guanlin^{1,3}, WANG Qi^{1*}

(1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China.
2. Medical College of Acupuncture Moxibustion and Rehabilitation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006.
3. the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378)

【Abstract】 Neurodegenerative diseases are chronic and progressive neurological diseases characterized by loss of a large number of specific neurons. They mainly include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Although the lesions and etiologies of various types of neurodegenerative diseases are different, delayed neurodegenerative lesions and cell loss in specific brain areas are common characteristics. For this reason, they are collectively referred to as neurodegenerative diseases. In recent years, zebrafish have attracted increasing

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82274616);广东省普通高校重点实验室项目(2019KSYS005);广东省科技计划国际科技合作项目(2020A0505100052)。

【作者简介】 黄孔丽(1995—),女,硕士,研究方向:中医药防治老年脑病。E-mail:20201110981@stu.gzucm.edu.cn

【通信作者】 王奇(1963—),男,教授,研究方向:中医药防治老年脑病。E-mail:Wangqi@gzucm.edu.cn

attention as a new type of model organism. Although some differences exist between zebrafish and human central nervous systems, zebrafish neural conduction systems, neuronal and glial cell types, and disease-related gene homology are very similar to those of humans. Zebrafish has been widely used to study neurodegenerative diseases, and some achievements have been made in this field to improve our understanding of these diseases. However, because of the complexity, multiple factors, and multi-gene regulation of neurodegenerative diseases, the etiology and pathogenesis of zebrafish are unclear. Therefore, treatment of this kind of disease has been difficult. By consulting the relevant literature from home and abroad in recent years, this article reviews recent advances in neurodegenerative diseases using zebrafish as a model organism.

[Keywords] zebrafish; neurodegenerative diseases; model organism; disease model; research progress

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

斑马鱼,因体侧有像斑马一样纵向的蓝色与银色相间的条纹而得名。斑马鱼作为一种脊椎动物模型,具有物种稳定、个体差异小、发育周期短、繁殖能力强、神经系统发育迅速等特点。大约 82% 的人类疾病基因在斑马鱼中有同源基因^[1],基因组信号调控也与人类有很高的相似性,可应用于高通量筛选^[2]。斑马鱼的大脑拥有哺乳动物大脑中的所有主要结构,斑马鱼的主要神经递质系统,包括去甲肾上腺素能、5-羟色胺能、多巴胺能和组胺能系统,显示出与哺乳动物系统的许多相似性^[3]。此外,斑马鱼具有与人类相似的血脑屏障功能^[4]。这些都说明了斑马鱼与人类具有高度保守的大脑组织,可用于研究神经退行性疾病,这使得斑马鱼在神经退行性疾病研究中有独特的优势,是理想的模

式动物(图 1),应用前景广阔,弥补了啮齿动物的不足(表 1)。

1 斑马鱼在神经退行性疾病中的研究进展

1.1 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)

AD 是一种慢性进行性神经退化性疾病,以进行性记忆减退、认知障碍、人格改变为主要临床特征,是痴呆最常见的类型^[5]。随着社会老龄化的加剧,AD 的发病率也迅速增长。大脑神经细胞外不溶性淀粉样蛋白 β 斑块(amyloid-beta, $A\beta$)、细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化所致神经纤维缠结形成(neurofibrillary tangles, NFTs)^[6]以及突触和神经元丢失是 AD 的主要病理特征^[5]。AD 的发病机制复杂,至今尚无完全明确,关于其致病假说主要有 $A\beta$

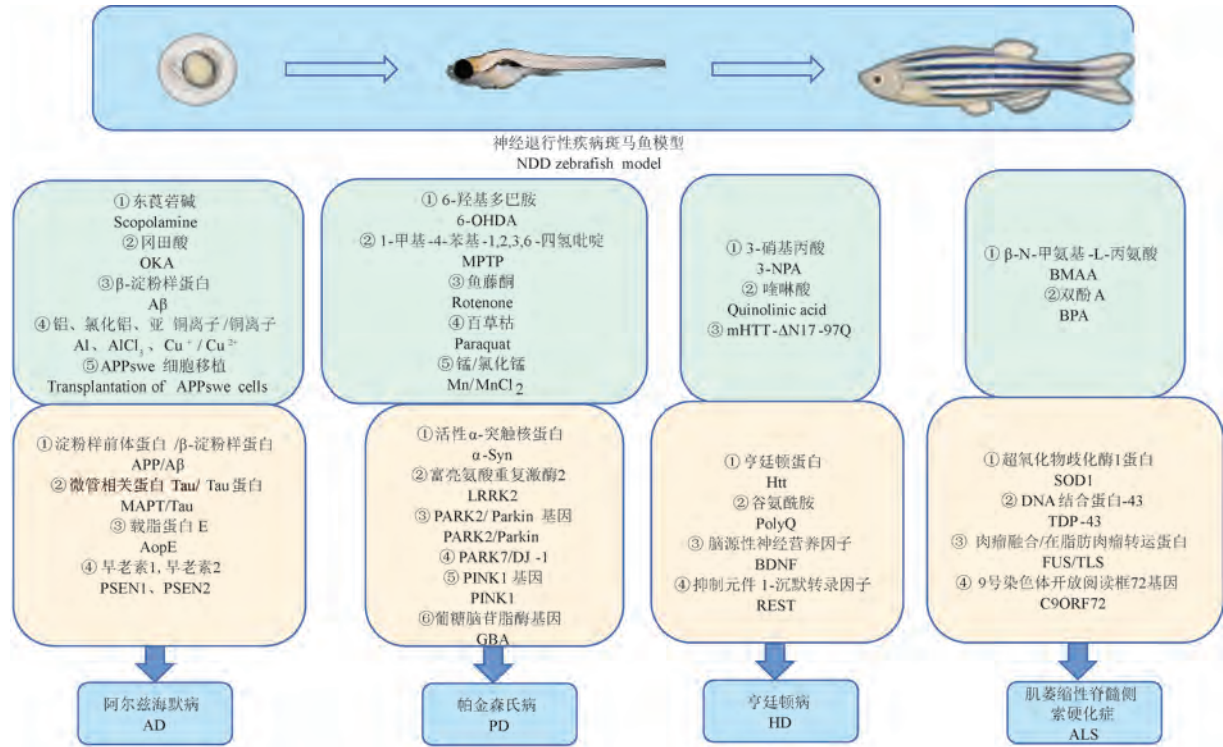


图 1 斑马鱼构建神经退行性疾病模型

Figure 1 Neurodegenerative disease models of zebrafish

表 1 模式生物斑马鱼与啮齿动物实验优势比较

Table 1 Comparison of experimental advantages between model zebrafish and rodents

比较项目 Compared items	啮齿动物 Rodent	斑马鱼 Zebrafish
实验周期短和繁殖力强 Short experiment period and strong fecundity	×	✓
试验费用低 Low test cost	×	✓
受试物用量少 Amount of subject matter is small	×	✓
体外受精和体外发育 <i>In vitro</i> fertilization and <i>in vitro</i> development	×	✓
产卵量大,胚胎透明 Egg production is large and the embryo is transparent	×	✓
高通量筛选药物 High throughput screening drugs.	×	✓
研究多器官 Study multiple organs	✓	✓
评价代谢物的活性 Evaluate the activity of metabolites	✓	✓
评价药效和药动学 Pharmacodynamics and pharmacokinetics were evaluated	✓	✓
准确判断对药物的吸收和利用率 Accurately determine the absorption and utilization of drugs	✓	×
高级认知功能 Higher cognitive function	✓	×
行为丰富,三维运动方式,有典型社交行为 Rich behavior, three-dimensional movement, typical social behavior	×	✓
难做或无法做的疾病模型或毒性评价模型 Difficult or impossible disease models or toxicity evaluation models	×	✓
操作简单,模型稳定,影响因素较少 Operation is simple, the model is stable and the influencing factors are few	×	✓

毒性学说,微管相关蛋白 Tau(microtubule-associated protein Tau, MAPT)异常学说等^[7]。

研究表明,应用于研究 AD 的斑马鱼模型包括突变型 APP^{swe}、突变型 PSEN1 或 PSEN2、Tau-P301L-Tg 斑马鱼,东莨菪碱、蛋白磷酸酶 2A 抑制剂冈田酸(okadaic acid, OKA)、Aβ₁₋₄₂、铝(Al)、氯化铝(AlCl₃)和氯化铜(CuCl₂)等物质诱导的 AD 模型等。研究者们基于此类模型探究了部分物质抗 AD 的药理作用。

通过斑马鱼细胞移植技术构建可调控突变型 APP^{swe} 表达的 AD 动物模型,探究 Aβ 沉积对脑血管系统的损伤及动物行为学的影响,为研究 AD 的治疗构建一个具有时空可控性的动物模型,这项研究建立的 APP^{swe} 斑马鱼表现为脑内神经元数量减少^[8]。编码基因 PSEN1 和 PSEN2 的突变在早发型家族性 AD 患者中被发现,突变型 PSEN1 或 PSEN2 已被证实可增加大脑中长时间的高纤维原性 Aβ 形成,从而诱发 AD 的发生^[9]。斑马鱼 PSEN1 剪接干扰可诱导早发性 AD 表型,如认知障碍、Aβ₁₋₄₂ 聚集和突触减少^[10]。人类 Tau-P301 L 突变体已被广泛用于建立转基因动物模型^[11-12],此类模型因仿效了 AD 患者 Tau 蛋白异常修饰而被广泛应用^[13]。Tau-

P301 L 过表达会导致成年斑马鱼脑内 Tau 过度磷酸化^[14]。Alavi Naini 等^[15]在 Tau-P301 L-Tg 斑马鱼中使用硫酸肝素拮抗剂和草酰硫酸肝素拮抗剂可以减少 p-Tau、减轻神经元丢失。Barbereau 等^[14]利用 Tau-P301 L-Tg 斑马鱼研究了早期 Tau 诱导的神经毒性如何改变脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)信号,结果表明 Tau 神经毒性引起 BDNF 系统的改变。

东莨菪碱为胆碱能拮抗剂,腹腔注射后可出现胆碱功能障碍和氧化应激,此模型可以造成动物学习记忆障碍。Capatina 等^[16]用东莨菪碱诱导的斑马鱼记忆损伤模型探讨百里香精油对胆碱能神经元的作用,证实了百里香精油可以降低 AChE 活性和大脑抗氧化能力。Boiangiu 等^[17]等用可替宁和 6-羟基-1-尼古丁治疗东莨菪碱诱导的 AD 斑马鱼模型,发现二者均能减弱东莨菪碱诱导的焦虑样行为和记忆障碍,并降低斑马鱼大脑中的 ROS 水平和 AChE 活性。研究报道,OKA 作为斑马鱼 AD 疾病模型的诱导物,可以诱导斑马鱼氧化应激、胶质细胞激活、神经炎症、胆碱功能障碍、谷氨酸兴奋性毒性和线粒体功能障碍^[18-19],表现出 AD 的大部分症状^[20]。Koehler 等^[21]利用 OKA 建立了斑马鱼 AD

模型,研究 4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮(TDZD-8)对 AD 模型 GSK3 β 的抑制作用,发现注射 OKA 后能够重现与 AD 相关的大部分神经病理,降低 p-Tau、Pp2A 和 GSK-3 β 活性/失活比。研究发现,AD 患者脑组织内 A β 明显增多,并形成大量的老年斑^[5]。人体内 A β 最常见的亚型是 A β ₁₋₄₀ 和 A β ₁₋₄₂。其中 A β ₁₋₄₂ 更容易聚集且更强的毒性,从而形成 A β 沉淀的核心,引发神经毒性作用^[5]。Reinhardt 等^[22]选用 A β ₁₋₄₂ 来诱导斑马鱼 AD 模型,发现细胞周期蛋白依赖性激酶 5(CDK5)抑制剂 LDC8 在斑马鱼 AD 模型中起到保护神经元的作用。Sang 等^[23]研究发现阿魏酸衍生物 TM-10 对 A β ₁₋₄₂ 诱导的斑马鱼血管损伤具有有效的神经保护作用,可以抑制人类丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BuChE)、单胺氧化酶(monoamineoxidase, MAO)活性,减少 A β 聚集。Al 是一种已知会导致大脑神经毒性的金属,它会促进神经退化,影响记忆和认知能力,诱发 AD 的发病^[24]。Gao 等^[25]通过建立 Al 诱导的斑马鱼 AD 模型探讨其特异性坏死抑制剂 Necrostatin-1 是否能有效缓解斑马鱼 AD 模型的学习记忆障碍,结果表明 Necrostatin-1 可以逆转 Al 诱导的学习记忆损伤、提高 Ach 水平和神经细胞数量。钟绮媚等^[26]用 Al 诱导的斑马鱼 AD 模型来研究不同 ω -3 多不饱和脂肪酸二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)对斑马鱼 AD 模型记忆损伤和神经病理学变化影响,结果显示 Al 显著激活斑马鱼幼鱼脑内的小胶质细胞;EPA、DPA 和 DHA 均显著降低 A β 蛋白浓度和 GFAP 的 mRNA 表达。AlCl₃ 是一种用于诱导啮齿类 AD 模型的标准化学品^[27]。Kaur 等^[27]用 AlCl₃ 处理斑马鱼,发现斑马鱼体内还原型谷胱甘肽和超氧化物歧化酶水平显著降低,而丙二醛水平升高。汪雪雁等^[28]利用 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 *ucp2* 基因,研究 *ucp2* 基因在 AlCl₃ 致斑马鱼痴呆中的作用,研究发现鱼体内 ROS 水平显著升高;*psen1*、*psen2*、*tnf- α* 和 *il-1 β* mRNA 转录水平显著上调。夏乐旋^[29]用选用 AlCl₃ 诱导 AD 斑马鱼模型,研究生慧汤抗 AD 的作用机制,结果显示生慧汤能改善 AD 斑马鱼模型的学习记忆能力和认知功能障碍、减少 AD 斑马鱼模型脑部异常 A β 的积累,抑制 A β 的毒性损伤,促进神经元的修复和再生。用 AlCl₃ 诱导 6 月龄斑

鱼,发现补肾益智方^[30]能有效改善 AD 斑马鱼的学习记忆能力,减少 A β 生成,减轻 ROS。黄连解毒汤^[31]、钩藤碱^[32]以及黄精多糖^[33]作用于 AlCl₃ 诱导的 AD 斑马鱼模型可以通过下调 p-P38/P38 的比值,上调 Ncadherin 蛋白水平,进而改善 AD 模型斑马鱼的学习记忆能力。Cu⁺/Cu²⁺ 离子是人体必需的,严重的神经和代谢紊乱与 Cu⁺/Cu²⁺ 稳态的异常相关,如 AD。Rakshit 等^[34]使用 CuCl₂ 处理斑马鱼模型来评估化合物 2c 和 3c 在体内的功效,实验表明,用 CuCl₂ 处理的野生型斑马鱼幼鱼表现出氧化应激增强。表 2 总结了近几年使用斑马鱼来构建 AD 模型的建立方式、治疗药物及其作用机制。

1.2 帕金森病(Parkinson's disease, PD)

PD 是一种伴有为震颤、肌强直、进行性运动迟缓及姿势异常等典型症状的神经退行性疾病。病理特征主要表现为中脑黑质纹状体多巴胺能(dopaminergic, DA)神经元变性缺失和 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -Syn)组成的路易小体(Lewy bodies, LBs)形成^[35]。PD 的确切病因至今未明。神经毒物和遗传因素均可能参与 PD 中 DA 神经元的变性死亡过程。斑马鱼具有腹侧间脑,这与哺乳动物的黑质是同源的^[36]。一些神经毒素如 6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、1-甲基-4-苄基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)、百草枯(Paraquat)和鱼藤酮(Rotenone)是现今常被用于复制 PD 的斑马鱼模型,均会不同程度地影响斑马鱼模型的多巴胺神经系统并出现 PD 的主要症状^[37]。

6-OHDA 暴露于斑马鱼会导致 DA 神经元的丧失和运动活动的降低^[36]。Abidar 等^[38]探究长角豆叶水提取物对 6-OHDA 诱导的斑马鱼 PD 模型的认知影响和抗氧化活性,结果表明,长角豆叶水提取物具有抗氧化和抗乙酰胆碱酯酶活性。Wu 等^[39]采用 6-OHDA 诱导的斑马鱼 PD 模型评价岩藻黄质的神经保护作用,发现岩藻黄质预处理显著增加了斑马鱼幼虫的总游动距离,改善了脑组织损伤。Kesh 等^[40-41]检测柚皮素和橙皮苷对 6-OHDA 毒性的神经保护作用,发现二者均降低了 ROS 水平,改善斑马鱼幼虫的运动能力。MPTP 是一种能够引起动物类 PD 症状和病理的神经毒素,可用作构建 PD 模型^[42]。Selvaraj 等^[43]利用 MPTP 构建了斑马鱼的 PD 模型,发现其体内 DA 神经元及转运体显著减少,并表现出焦虑、运动迟缓、运动范围受限的症

状。Ren 等^[44]用 MPTP 诱导斑马鱼幼鱼做 PD 模型评价甘草酸素对斑马鱼 PD 的治疗效果,结果证明甘草酸素可以缓解细胞凋亡和自噬,抑制炎症反应。Zhao 等^[45]探讨迷迭香酸对 MPTP 诱导的斑马鱼胚胎多巴胺能神经毒性的影响,发现迷迭香酸具有神经保护作用。Duan 等^[46]研究苦茶碱在 MPTP

诱导的斑马鱼 PD 模型中的作用,苦茶碱被证明可以恢复 DA 神经元的损失和行为表现的损害。牟蕾等^[47]用 MPTP 诱导斑马鱼 PD 模型,发现 MPTP 造模组的斑马鱼 DA 神经元出现不同程度的损伤,出现运动迟缓、焦虑、与 PD 相关的基因表达异常等。百草枯是一种能引起多巴胺能神经元死亡并影响

表 2 AD 模型斑马鱼建立方式、治疗药物及其作用机制
Table 2 AD model zebrafish established, therapeutic drugs and their mechanism of action

建立方式 Mode of establishment	抗 AD 药物 Drugs against Alzheimer's disease	作用机制 Mechanism of action
瑞典突变型 APP APP _{swe} 突变 APP _{swe} mutation	/	损伤脑血管系统的、影响动物行为学 ^[8] Impairing the cerebrovascular system and affecting animal behavior
早老素 1、早老素 2 突变 PSEN1 and PSEN2 mutations	/	Aβ 形成、认知障碍、Aβ42 聚集和突触减少 ^[9-10] Aβ formation, cognitive impairment, Aβ42 aggregation, and synaptic reduction
P301L 突变 Tau 转基因 Tau-P301L-Tg	硫酸肝素拮抗剂和草酰硫酸肝素拮抗剂 Heparan sulfate antagonist and oxalyl heparin sulfate antagonist	减少 p-Tau、减轻神经元缺陷 ^[15] Reduce p-Tau and reduce neuronal defects
东莨菪碱 Scopolamine	① 百里香精油 ①Thymus vulgaris Essential Oil ②可替宁和 6-羟基-1-尼古丁 ②Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine	① 降低 AChE 活性和大脑抗氧化能力 ^[16] ①Decreased AChE activity and brain antioxidant capacity ②减弱焦虑样行为和记忆障碍,降低 ROS 和 AChE 活性 ^[17] ②Reduce anxiety-like behavior and memory impairment, decreased ROS and AChE activity
冈田酸 OKA	4-苄基-2-甲基-1,2,4-噻二唑烷-3,5-二酮 TDZD-8	降低 p-Tau、Pp2A 和 GSK-3β 活性 ^[21] Decreased p-Tau, Pp2A and GSK-3β activity
β-淀粉样肽(1-42) Aβ ₁₋₄₂	① 化合物 LDC8 ①Compound LDC8 ②阿魏酸衍生物 TM-10 ②Ferulic acid derivative TM-10	① 减少 p-Tau;抑制 Gsk3β 和 CDK5 ^[22] ①Reduce p-Tau; Gsk3β and CDK5 were inhibited ②抑制 BuChE、MAO 活性;减少 Aβ 聚集 ^[23] ②Inhibit the activity of BuChE and MAO
铝 Al	① 坏死抑素-1 ①Necrostatin-1 ②不同 ω-3 多不饱和脂肪酸(二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸、二十二 碳六烯酸) ②Different fomega (ω)-3 polyunsaturated fatty acids (EPA, DPA, DHA)	①抑制 Aβ ₄₂ 积聚,逆转 BuChE 活性,抑制 MAOB 活性 ^[25] ①Inhibition of A beta 42 accumulation, reverse BuChE activity, inhibit MAOB activity ②降低 Aβ、GFAP 的 mRNA 表达。降低 p-Tau、AChE 和 IL-1β、抑制 Hexb、上调 BDNF ^[26] ②mRNA expression of Aβ and GFAP was decreased. It decreased p-Tau, AChE and IL-1β, inhibited Hexb, and upregulated BDN
氯化铝 AlCl ₃	① 生慧汤 ①Shenghui decoction ②补肾益智方 ②Bushen Yizhi Formula ③黄连解毒汤 ③HuangLian Jiedu Decocti ④钩藤碱 ④Rhynchophylline ⑤黄精多糖 ⑤Polygonatum polysaccharide	①改善学习记忆能力和认知功能障碍、减少 Aβ 聚集,抑制 Aβ 的毒性损伤,促进神经元的修复和再生 ^[29] ①Improve learning and memory ability and cognitive impairment, reduce the aggregation of Aβ, inhibit the toxic damage of Aβ, and promote the repair and regeneration of neurons ②改善学习记忆能力,减少 Aβ 生成,减轻 ROS ^[30] ② Improve learning and memory ability, reduce Aβ production, reduce ROS ③④⑤上调 Ncadherin,阻碍 p38 磷酸化,改善学习记忆能力 ^[33] ③④⑤ Up-regulating Ncadherin, blocking p38 phosphorylation and improving learning and memory ability
铜离子 Cu ²⁺	化合物 2c/3c Compound 2c/3c	显著降低氧化应激水平 ^[34] Significantly reduce oxidative stress level

多巴胺生物合成的农药^[48]。斑马鱼幼鱼暴露于百草枯会引起 DA 神经元的氧化损伤,导致行为障碍^[49]。Mohamad Najib 等^[50]研究人金属硫蛋白 2 肽(human metallothionein 2 peptide, hMT2)在百草枯诱导的斑马鱼脑损伤中的作用,结果发现百草枯处理导致 DA 神经元减少,而 hMT2 处理后 DA 神经元数量增加。鱼藤酮诱导斑马鱼可以产生 PD 症状,经过鱼藤酮处理的斑马鱼,表现出运动能力下降、焦虑、抑郁、记忆力下降等症状^[51]。Santo 等^[52]用鱼藤酮诱导的斑马鱼 PD 模型为实验模型,评价正己烷提取物对 PD 的神经保护作用。Yurtsever 等^[53]评价利福平在鱼藤酮诱导斑马鱼 PD 实验模型中的作用,将成年斑马鱼暴露鱼藤酮和利福平 3 周,研究结果表明利福平有效地减轻神经炎症。氰戊菊酯是一种广谱、高效的杀虫剂,具有干扰人类神经功能的潜力。Zhu 等^[54]利用氰戊菊酯(fenvalerate, FEN)来诱导斑马鱼 PD 模型,结果产生了典型的 PD 症状,并伴有泛素和路易体相关基因的增加,产生 PD 相关症状。斑马鱼也成为评估金属离子、纳米材料和污染物等对 PD 发病机制影响的比较流行的动物模型。过多接触锰(Mn)会损害精神,认知和运动功能。有报道称成年斑马鱼慢性暴露于氯化锰($MnCl_2$) 21 d 会产生 PD 样症状,表现出运动功能的缺陷^[55]。将斑马鱼胚胎暴露于石墨烯家族纳米材料中可诱导神经毒性并改变 PD 相关基因的表达^[56]。用氧化锌纳米材料破坏斑马鱼的运动活动,可诱导细胞凋亡和神经元损失^[57]。长期接触来自广泛污染物的杂环胺,会增加患 PD 的潜在风险^[58]。

近年来,基于 PD 相关基因的斑马鱼 Tg 模型也得到了广泛的应用。研究表明,PD 的发病与 α -Syn、Parkin、DJ-1、PINK-1、LRRK2 等基因突变有关^[59],而 PD 的相关致病基因在斑马鱼中均有直系同源。对上述转基因或基因敲减斑马鱼模型的研究揭示了这些基因在 DA 神经元的发育和存活过程中具有保守功能^[60]。 α -Syn 的积累和聚集是 PD 的一个重要特征,表达人类野生型或 A53T 突变体 α -Syn 的模型可用于研究 α -Syn 聚集动力学,研究控制可溶 α -Syn 和聚集 α -Syn 清除的机制和潜在的新靶点^[61]。与人类 Parkin 相似,斑马鱼中 Parkin 活性降低会导致多巴胺能神经元数量显著减少, Parkin 活性增加可以保护转基因斑马鱼免受蛋白质毒性应激引起的细胞死亡^[62]。DJ-1 由 Park7 编码,在保

护神经元免受氧化应激方面具有多重作用,斑马鱼敲除 Park7 会产生 PD 表型^[63]。Pink1 是与早发性 PD 相关的线粒体相关基因,单独敲除 Pink1 会导致斑马鱼的 DA 神经元减少。LRRK2 基因突变与家族性和散发性 PD 病例有关, LRRK2-g2019 s 突变是最常见的^[64]。斑马鱼中 LRRK2 的破坏会导致严重的发育缺陷和神经元丢失^[65]。PARLA 基因的功能缺失使主要位于嗅球的 DA 神经元减少^[66]。Vps41 基因敲除会导致溶酶体异常以及小胶质细胞和小脑功能障碍^[67]。Nus1 基因的变异可能是 PD 发病机制的诱因。斑马鱼敲除 Nus1 基因会表现出运动障碍^[68]。表 3 总结了化学诱导和基因编辑方式建立的 PD 斑马鱼模型。

1.3 亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)

HD 是一种病变累及纹状体、大脑皮层为主的中枢神经系统退行性变性疾病,呈常染色体显性遗传,是由致病蛋白的异常积聚和细胞自身清除异常蛋白能力失调造成的^[77]。HD 的发病机制主要是亨廷顿蛋白(huntingtin, HTT)上的多谷氨酰胺(PolyQ)束上的 CAG 三联体异常扩增^[78]。有研究发现抑制元件 1-沉默转录因子(repressor element-1-silencing transcription factor, REST)是 HTT 调节 BDNF 表达的分子靶点,并且 HTT mRNA 和蛋白的可溶性突变形式是导致细胞死亡的有毒成分^[79]。病理学上,HD 患者主要在纹状体和大脑皮层内出现大量神经元死亡,大脑皮层萎缩,脑室系统扩大。

化学物质 3-硝基丙酸(3-nitropropionic acid, 3-NPA)、喹啉酸(quinolinic acid)和 mHTT- Δ N17-97Q 过表达实验模型被用来探索 HD 确切的致病机制和寻找新的药物靶点,以开发新的治疗方法^[78]。

3-NPA 是一种毒素,斑马鱼幼鱼暴露于 3-NPA 会导致形态和心率发生改变,对成年斑马鱼进行 3-NPA 腹腔注射,其体重、运动和攻击行为均有所下降,表现出长期厌恶记忆受损^[80]。Kumar 等^[81]用 3-NPA 处理成年斑马鱼,发现斑马鱼体重、认知和运动活动显著降低,并伴有渐进性神经元损伤。喹啉酸是一种兴奋毒素,已被用于诱发啮齿类动物的脑损伤,以建立 HD 模型。Skaggs 等^[82]用喹啉酸损伤成年斑马鱼的端脑来研究神经修复过程。HTTN 末端 17 个氨基酸(N17)结构域在大脑纹状体区高度表达。Kumar 等^[83]认为 HD 中的 N17 结构域可能是开发治疗亨廷顿病的新治疗策略的潜在治疗靶点。mHtt- Δ N17-97Q 转基因斑马鱼是第一个概括

表 3 化学诱导和基因编辑方式建立斑马鱼 PD 模型
Table 3 Establishment of zebrafish PD model by chemical induction and gene editing

化学诱导方式 Chemical induction way	对表型的影响或分子机制 Effects on phenotype or molecular mechanism	基因编辑方式 Methods of gene editing	对表型的影响或分子机制 Effects on phenotype or molecular mechanism
6-羟基多巴胺 6-OHDA	①抗氧化和抗乙酰胆碱酯酶活性 ^[38] ①Antioxidant and resist acetyl cholinesterase activity ②降低 ROS 水平 ^[39] ②Reduce ROS levels ③调节 PD 基因的表达 ^[40] ③Regulate the expression of PD gene ④改善运动能力;下调 PD 基因的表达 ^[41] ④Improve athletic ability; Down-regulated the expression of PD gene	α-突触核蛋白 α-Synuclein PTEN 诱导激酶 1 PINK-1 帕金森病蛋白 2 Park2	运动减退和多巴胺水平降低 ^[69] Movement and dopamine levels drop 调节多种线粒体功能 ^[70,71] Regulate a variety of mitochondrial function 控制线粒体功能和吞噬有丝分裂,维持能量生 成和减少,障碍线粒体的氧化损伤 ^[72] Control mitochondrial function and phagocytosis mitosis, maintain energy production and reduce, hinder oxidative damage of mitochondria
1-甲基-4-苯 基-1,2,3,6- 四氢吡啶 MPTP	①缓解细胞凋亡和自噬,并抑制炎症反应 ^[44] ①Relieve cell apoptosis and autophagy, and inhibiting the inflammatory response ②抑制 ROS 的增加 ^[45] ②Inhibit the increase of ROS ③恢复 DA 神经元的损失和行为表现的损害 ^[46] ③Recovery of loss of DA neurons and impairment of behavioral performance ④损伤 DA 神经元,出现运动迟缓、焦虑、PD 相 关的基因表达异常 ^[47] ④DA neurons were damaged, and the expression of genes related to bradykinesia, anxiety and PD was abnormal	帕金森病蛋白 7 Park7 (DJ-1)	参与线粒体质量的调节,并在氧化应激反应中 发挥保护作用 ^[63,73-75] It is involved in the regulation of mitochondrial mass and plays a protective role in the oxidative stress response
百草枯 Paraquat	①行为障碍 ^[49] ①Behavior disorder ②减少 DA 神经元 ^[50,76] ②Reduce the DA neurons	富亮氨酸重复激酶 2 Lrrk2	与许多细胞过程有关,包括细胞骨架动力学、 轴突生长、囊泡运输、蛋白质翻译和自噬 ^[64,65] It is associated with a number of cellular processes, including cytoskeleton dynamics, axon growth, vesicle trafficking, protein translation, and autophagy.
鱼藤酮 Rotenone	①防止氧化应激 ^[52] ①Preventing oxidative stress ②抗炎 ^[53] ②Anti-inflammatory	液泡蛋白分选相关 蛋白 41 Vps41	溶酶体异常以及小胶质细胞和小脑功能 障碍 ^[67] Lysosomal abnormalities and microglia and cerebellar dysfunction
氰戊菊酯 FEN	激活自噬系统导致 TH 和 DA 水平下降,促 使路易体生成 ^[54] Activation of the autophagic system leads to TH and DA levels drop, promote To produce Lewy bodies	NUS1 基因 Nus1	运动障碍 ^[68] Dyskinesia
锰/氯化锰 Mn/MnCl ₂	运动活动减少,运动功能的缺陷;表现出焦虑和 抑郁样行为 ^[55] Sports activity decreases, functional defects; They showed anxiety and depression-like behaviors	/	/

HD 病理特征之一的转基因斑马鱼^[84],其显示出快速进展的运动障碍^[79]。

1.4 肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)

ALS 是一种在脊髓、脑干和运动皮层中运动神

经元选择性丢失的神经退行性疾病。ALS 的病理学特征是运动神经损伤,但运动神经元缺失的机制尚不清楚。β - N - 甲 氨 基 - L - 丙 氨 酸 (β-N-methylamino-L-alanine, BMAA) 和 双 酚 A (bisphenol A, BPA) 等环境因素已被证实与 ALS 的病因有

关^[85-87]。但绝大多数家族性 ALS 病例与基因改变有关,基因改变主要与 SOD1、TDP-43、FUS 和 C9ORF72 有关^[87],通过研究 ALS 相关致病基因,构建了 ALS 斑马鱼模型,研究疾病发生的分子机制,并最终开发出具有治疗前景的方案。

ALS 疾病多是由 SOD1 突变引起的,Soll 等^[88]使用 SOD1-G93R 突变斑马鱼 ALS 模型来评估 1-Fe 是否在体内显示治疗优点,结果表明 1-Fe 通过特异性靶向 SOD1 ALS 机制提高了幼鱼的运动能力。在斑马鱼中敲除 TDP43 直系同源物 TDP-43 会导致运动表型的早期缺陷和 NMJ 的分解,降低 AChE 的表达^[89]。FUS 是 FUS 相关的 ALS 和额颞叶痴呆的标志,Salam 等^[90]证明了过表达突变 FUS 改变了原始神经元和斑马鱼模型的突触数量和神经元复杂性。C9orf72 基因内的六核苷酸重复扩张是 ALS 最常见的遗传原因。Fortier 等^[91]总结了斑马鱼模型已被用于研究 C9orf72 相关 ALS 的病理,探讨它们在提供机制方面的价值和它们在药物发现方面的潜在用途。

1.5 其他神经退行性病

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是一种慢性自身免疫性疾病,其组织学特征是中枢神经系统中出现脱髓鞘和再髓鞘斑块。Neely 等^[92]为了确定成熟少突胶质细胞是否参与髓鞘再生,利用转基因品系 Tg(mbp:TRPV1-tagRFPt)和成年斑马鱼的视神经髓鞘再生模型,通过在成年斑马鱼中的实时体内成像研究了成熟少突胶质细胞增殖。

脊髓性肌萎缩症(spinal Musclar Atrophy, SMA)是儿童最常见的遗传性疾病,由生存运动神经元(survival Motor Neuron, SMN)蛋白缺失导致运动神经元丢失。Koh 等^[93]在转基因 hb9:mCherry-linker-Smn 斑马鱼胚胎中使用了一种体内荧光相关光谱方法来评估 SMN 在运动神经元细胞体和轴突中的细胞动力学。

2 斑马鱼作为神经退行性疾病模型的局限性

动物模型与人类神经退行性疾病症状相似,但目前尚没有一种模型能够完全模拟人类神经退行性疾病的发病机制。尽管斑马鱼的神经传导系统、神经元和神经胶质细胞类型及疾病相关基因同源性与人类都十分相似,但斑马鱼对人类来说仍然是一种不同的脊椎动物,所以斑马鱼神经退行性疾病模型存在一些局限性:第一,目前对斑马鱼脑组

织的研究报道甚少^[94]。斑马鱼的端脑区功能与人类动物的海马区功能相似,与学习记忆等行为有关,但由于斑马鱼体形较小,取材定位和制样较困难。此外,星形胶质细胞的一些生理、细胞和分子方面可能在斑马鱼和人类之间有所不同^[95]。第二,斑马鱼模型需要克服的重要的问题之一是控制和量化药物暴露的挑战,很难预测药物吸收率^[96]。第三,作为模式动物,斑马鱼缺乏详细的解剖和组织学参考。斑马鱼除了能提供无特定病原体动物外,与机体重要组织脏器相关的形态标准亟需建立,斑马鱼的神经系统及其组织形态结构特征与人类相比,组织细胞学数据的匮乏,阻滞了斑马鱼作为模式动物的进一步应用^[97]。

3 总结与展望

神经退行性疾病大部分是不可治愈的疾病,这给全世界造成了巨大的健康和社会负担。基于该现状,在世界范围内的掌握神经退行性疾病的发病机制及治疗方法迫在眉睫。近年来在神经退行性病变研究领域,斑马鱼的关注度越来越高,斑马鱼模型虽然与人类中枢神经系统有区别,但是斑马鱼在基本的神经传导系统、神经元和神经胶质细胞类型以及与疾病相关基因同源性上与人类都很相似,所以目前斑马鱼模型在神经退行性疾病生理、病理以及相关药物的研究中发挥着重要作用,并且选用斑马鱼可进行多方面的实验,包括活体检测、多靶点研究、药物的代谢过程、药物前期检测、高通量筛选、行为检测等,这些优点都可以为人类深入研究神经退行性疾病提供一个极具研究意义的方向。随着未来科技的不断发展,相信其不足之处将被人类妥善解决,并能发挥更为重要的作用。

参考文献:

- [1] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.
- [2] 许大平, 张在军, 李铭源. 斑马鱼: 构建神经退行性疾病模型的新型模式生物 [J]. 四川生理科学杂志, 2012, 34(3): 119-123.
- [3] Pitchai A, Rajaretinam RK, Freeman JL. Zebrafish as an emerging model for bioassay-guided natural product drug discovery for neurological disorders [J]. Medicines, 2019, 6(2): 61.
- [4] Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, et al. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology [J]. Biomedicines,

- 2019, 7(1): 23.
- [5] 2022 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(4): 700-789.
- [6] Hanseeuw BJ, Betensky RA, Jacobs HIL, et al. Association of amyloid and tau with cognition in preclinical alzheimer disease; a longitudinal study [J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(8): 915-924.
- [7] Uddin MS, Kabir MT, Rahman MS, et al. Revisiting the amyloid cascade hypothesis: from anti-a β therapeutics to auspicious new ways for Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16): 5858.
- [8] 郭双磊, 张悠然, 董军成, 等. 利用斑马鱼细胞移植技术构建可调控突变型 APP_{swe} 表达的阿尔茨海默病动物模型 [J]. *河南大学学报(医学版)*, 2020, 39(2): 102-107.
- [9] Kabir MT, Uddin MS, Setu JR, et al. Exploring the role of PSEN mutations in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res*, 2020, 38(4): 833-849.
- [10] Nery LR, Silva NE, Fonseca R, et al. Presenilin-1 targeted morpholino induces cognitive deficits, increased brain A β ₁₋₄₂ and decreased synaptic marker PSD-95 in zebrafish larvae [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(10): 2959-2967.
- [11] Bai Q, Burton EA. Zebrafish models of tauopathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(3): 353-363.
- [12] Götz J, Lim YA, Ke YD, et al. Dissecting toxicity of tau and β -amyloid [J]. *Neurodegener Dis*, 2010, 7(1-3): 10-12.
- [13] 李少创, 韩诚, 秦亚莉, 等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 131-145.
- [14] Barbereau C, Yehya A, Silhol M, et al. Neuroprotective brain-derived neurotrophic factor signaling in the TAU-P301L tauopathy zebrafish model [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104865.
- [15] Alavi Naini SM, Yanicostas C, Hassan-Abdi R, et al. Surfen and oxalyl surfen decrease tau hyperphosphorylation and mitigate neuron deficits *in vivo* in a zebrafish model of tauopathy [J]. *Transl Neurodegener*, 2018, 7: 6.
- [16] Capatina L, Todirascu-Ciornea E, Napoli EM, et al. *Thymus vulgaris* essential oil protects zebrafish against cognitive dysfunction by regulating cholinergic and antioxidants systems [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(11): 1083.
- [17] Boiangiu RS, Mihasan M, Gorgan DL, et al. Anxiolytic, promnesic, anti-acetylcholinesterase and antioxidant effects of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine in scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer's disease [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2): 212.
- [18] Kamat PK, Rai S, Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology [J]. *Neurotoxicology*, 2013, 37: 163-172.
- [19] Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, et al. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(3): 852-865.
- [20] Thawkar BS, Kaur G. Zebrafish as a promising tool for modeling neurotoxin-induced Alzheimer's disease [J]. *Neurotox Res*, 2021, 39(3): 949-965.
- [21] Koehler D, Shah ZA, Williams FE. The GSK3 β inhibitor, TDZD-8, rescues cognition in a zebrafish model of okadaic acid-induced Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2019, 122: 31-37.
- [22] Reinhardt L, Kordes S, Reinhardt P, et al. Dual inhibition of GSK3 β and CDK5 protects the cytoskeleton of neurons from neuroinflammatory-mediated degeneration *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cell Rep*, 2019, 12(3): 502-517.
- [23] Sang Z, Wang K, Han X, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel ferulic acid derivatives as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2): 1008-1024.
- [24] Wang L, Yin YL, Liu XZ, et al. Current understanding of metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9: 10.
- [25] Gao X, Zhang P, Chen J, et al. Necrostatin-1 relieves learning and memory deficits in a zebrafish model of Alzheimer's disease induced by aluminum [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(1): 198-214.
- [26] 钟绮媚, 张晶晶, 杨志友, 等. 不同 ω -3 多不饱和脂肪酸对斑马鱼阿尔茨海默病模型记忆损伤和神经病理学变化影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2022, 42(4): 118-128.
- [27] Kaur K, Narang RK, Singh S. AlCl₃ induced learning and memory deficit in zebrafish [J]. *Neurotoxicology*, 2022, 92: 67-76.
- [28] 汪雪雁, 谈勇, 张芳, 等. ucp2 基因敲除斑马鱼的模型建立及其铝暴露神经毒性相关研究 [J]. *安徽农业大学学报*, 2021, 48(3): 397-402.
- [29] 夏乐旋. 安神益智法对 AD 斑马鱼模型行为学和 A β 表达的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2022.
- [30] 顾晓群, 余黎, 武相, 等. 补肾益智方治疗阿尔茨海默病斑马鱼模型的作用及机制研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(1): 56-62.
- [31] 黄瑶, 刘凯菲, 美国凯, 等. 黄连解毒汤对阿尔茨海默病模型斑马鱼认知功能障碍的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 786.
- [32] 刘凯菲, 吴世敏, 李讯怡, 等. 钩藤碱对阿尔茨海默病模型斑马鱼 p38 MAPK/N-cadherin 的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 789.
- [33] 陈毅飞, 刘凯菲, 吴世敏, 等. 黄精多糖对阿尔茨海默病模型斑马鱼 p38MAPK/N-cadherin 的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(9): 659-660.
- [34] Rakshit A, Khatua K, Shanbhag V, et al. Cu²⁺ selective chelators relieve copper-induced oxidative stress *in vivo* [J]. *Chem Sci*, 2018, 9(41): 7916-7930.
- [35] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of parkinson disease: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323(6): 548-560.
- [36] Najib NHM, Nies YH, Abd Halim SAS, et al. Modeling Parkinson's disease in zebrafish [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2020, 19(5): 386-399.
- [37] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of

- Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2464.
- [38] Abidar S, Boiangiu RS, Dumitru G, et al. The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: understanding the underlying mechanism [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(4): 304.
- [39] Wu W, Han H, Liu J, et al. Fucoxanthin prevents 6-OHDA-induced neurotoxicity by targeting Keap1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6688708.
- [40] Kesh S, Kannan RR, Balakrishnan A. Naringenin alleviates 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in SHSY₅Y cells and zebrafish model [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 239: 108893.
- [41] Kesh S, Kannan RR, Sivaji K, et al. Hesperidin downregulates kinases Irfk2 and gsk3 β in a 6-OHDA induced Parkinson's disease model [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 740: 135426.
- [42] Nonnekes J, Post B, Tetrud JW, et al. MPTP-induced Parkinsonism: an historical case series [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(4): 300–301.
- [43] Selvaraj V, Venkatasubramanian H, Ilango K, et al. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish [J]. *J Neurosci Methods*, 2019, 320: 16–25.
- [44] Ren Q, Jiang X, Paudel YN, et al. Co-treatment with natural HMGB1 inhibitor Glycyrrhizin exerts neuroprotection and reverses Parkinson's disease like pathology in Zebrafish [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 292: 115234.
- [45] Zhao Y, Han Y, Wang Z, et al. Rosmarinic acid protects against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in zebrafish embryos [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 65: 104823.
- [46] Duan WJ, Liang L, Pan MH, et al. Theacrine, a purine alkaloid from kucha, protects against Parkinson's disease through SIRT3 activation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 77: 153281.
- [47] 牟蕾, 高代丽, 王利振, 等. 小檗碱衍生物 9-OH 小檗碱的抗帕金森病活性和作用机制研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(9): 884–888.
- [48] Boyd WA, Blain RB, Skuce CR, et al. Research report on the scoping review of paraquat dichloride exposure and Parkinson's disease; research report 16 [R]. NTP, 2020.
- [49] Kim SS, Hwang KS, Kan H, et al. Neurotoxicological profiling of paraquat in zebrafish model [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(8): 2294–2306.
- [50] Mohamad Najib NH, Yahaya MF, Das S, et al. The effects of metallothionein in paraquat-induced Parkinson disease model of zebrafish [J]. *Int J Neurosci*, 2023, 133(8): 822–833.
- [51] Lv DJ, Li LX, Chen J, et al. Sleep deprivation caused a memory defects and emotional changes in a rotenone-based zebrafish model of Parkinson's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 372: 112031.
- [52] Santo GD, de Veras BO, Rico E, et al. Hexane extract from *SpoSndias mombin* L. (*Anacardiaceae*) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 241: 108953.
- [53] Yurtsever İ, Üstündağ ÜV, Ünal İ, et al. Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(4): 1544–1551.
- [54] Zhu J, Xia R, Liu Z, et al. Fenvalerate triggers Parkinson-like symptom during zebrafish development through initiation of autophagy and p38 MAPK/mTOR signaling pathway [J]. *Chemosphere*, 2020, 243: 125336.
- [55] Nadig APR, Huwaimel B, Alobaida A, et al. Manganese chloride (MnCl₂) induced novel model of Parkinson's disease in adult Zebrafish; Involvement of oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113697.
- [56] Cao Z, Su M, Wang H, et al. Carboxyl graphene oxide nanoparticles induce neurodevelopmental defects and locomotor disorders in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2021, 270: 128611.
- [57] Jin M, Li N, Sheng W, et al. Toxicity of different zinc oxide nanomaterials and dose-dependent onset and development of Parkinson's disease-like symptoms induced by zinc oxide nanorods [J]. *Environ Int*, 2021, 146: 106179.
- [58] Li Z, Cao P, Meng H, et al. Long-term exposure to 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-*f*]quinoline can trigger a potential risk of Parkinson's disease [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 412: 125230.
- [59] Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10291): 2284–2303.
- [60] 袁亦娇, 陈实. 动物模型在神经退行性疾病中的应用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(9): 1612–1620.
- [61] Lopez A, Gorb A, Palha N, et al. A new zebrafish model to measure neuronal α -synuclein clearance *in vivo* [J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(5): 868.
- [62] Fett ME, Pilsel A, Paquet D, et al. Parkin is protective against proteotoxic stress in a transgenic zebrafish model [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11783.
- [63] Hughes GL, Lones MA, Bedder M, et al. Machine learning discriminates a movement disorder in a zebrafish model of Parkinson's disease [J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(10): dmm045815.
- [64] Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(2): 170–178.
- [65] Prabhudesai S, Bensabeur FZ, Abdullah R, et al. LRRK2 knockdown in zebrafish causes developmental defects, neuronal loss, and synuclein aggregation [J]. *J Neurosci Res*, 2016, 94(8): 717–735.
- [66] Merhi R, Kalyn M, Zhu-Pawlowsky A, et al. Loss of *parla* function results in inactivity, olfactory impairment, and dopamine neuron loss in zebrafish [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(2): 205.
- [67] Sanderson LE, Lanko K, Alsagob M, et al. Bi-allelic variants in HOPS complex subunit VPS41 cause cerebellar ataxia and

- abnormal membrane trafficking [J]. *Brain*, 2021, 144(3): 769–780.
- [68] Yu SH, Wang T, Wiggins K, et al. Lysosomal cholesterol accumulation contributes to the movement phenotypes associated with NUS₁ haploinsufficiency [J]. *Genet Med*, 2021, 23(7): 1305–1314.
- [69] Milanese C, Sager JJ, Bai Q, et al. Hypokinesia and reduced dopamine levels in zebrafish lacking β - and γ -synucleins [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(5): 2971–2983.
- [70] Pinto M, Nissanka N, Moraes C. Lack of parkin anticipates the phenotype and affects mitochondrial morphology and mtDNA levels in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(4): 1042–1053.
- [71] Noda S, Sato S, Fukuda T, et al. Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 136: 104717.
- [72] Maynard ME, Redell JB, Kobori N, et al. Loss of PTEN-induced kinase 1 (Pink1) reduces hippocampal tyrosine hydroxylase and impairs learning and memory [J]. *Exp Neurol*, 2020, 323: 113081.
- [73] Dolgacheva LP, Berezhnov AV, Fedotova EI, et al. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2019, 51(3): 175–188.
- [74] Pham TT, Giesert F, Röthig A, et al. DJ-1-deficient mice show less TH-positive neurons in the ventral tegmental area and exhibit non-motoric behavioural impairments [J]. *Genes Brain Behav*, 2010, 9(3): 305–317.
- [75] Giangrasso DM, Furlong TM, Keefe KA. Characterization of striatum-mediated behavior and neurochemistry in the DJ-1 knock-out rat model of Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2020, 134: 104673.
- [76] Kalyn M, Hua K, Mohd Noor S, et al. Comprehensive analysis of neurotoxin-induced ablation of dopaminergic neurons in zebrafish larvae [J]. *Biomedicines*, 2019, 8(1): 1.
- [77] Montoya A, Price BH, Menear M, et al. Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2006, 31(1): 21–29.
- [78] Kumar V, Singh C, Singh A. Zebrafish an experimental model of Huntington's disease: molecular aspects, therapeutic targets and current challenges [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(12): 8181–8194.
- [79] Chia K, Klingseisen A, Sieger D, et al. Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 940484.
- [80] Wiprich MT, Zanandrea R, Altenhofen S, et al. Influence of 3-nitropropionic acid on physiological and behavioral responses in zebrafish larvae and adults [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2020, 234: 108772.
- [81] Kumar V, Singh C, Singh A. Neuroprotective potential of hydroalcoholic extract of *Centella asiatica* against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's like symptoms in adult zebrafish [J]. *Rejuvenation Res*, 2022, 25(6): 260–274.
- [82] Skaggs K, Goldman D, Parent JM. Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates neurogenesis and long-distance neuronal integration [J]. *Glia*, 2014, 62(12): 2061–2079.
- [83] Kumar V, Singh A. Targeting N17 domain as a potential therapeutic target for the treatment of Huntington disease: an opinion [J]. *EXCLI J*, 2021, 20: 1086–1090.
- [84] Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: a systematic review [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 347.
- [85] Wang X, Zhang JB, He KJ, et al. Advances of zebrafish in neurodegenerative disease: from models to drug discovery [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 713963.
- [86] Cairns NJ, Perrin RJ, Schmidt RE, et al. TDP-43 proteinopathy in familial motor neurone disease with TARDBP A315T mutation: a case report [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 36(7): 673–679.
- [87] Gois AM, Mendonça DMF, Freire MAM, et al. *In vitro* and *in vivo* models of amyotrophic lateral sclerosis: an updated overview [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 159: 32–43.
- [88] Soll M, Goldshtein H, Rotkopf R, et al. A synthetic SOD/catalase mimic compound for the treatment of ALS [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 827.
- [89] Campanari ML, Marian A, Ciura S, et al. TDP-43 regulation of AChE expression can mediate ALS-like phenotype in zebrafish [J]. *Cells*, 2021, 10(2): 221.
- [90] Salam S, Tacconelli S, Smith BN, et al. Identification of a novel interaction of FUS and syntaphilin may explain synaptic and mitochondrial abnormalities caused by ALS mutations [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13613.
- [91] Fortier G, Butti Z, Patten SA. Modelling C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis in zebrafish [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(10): 440.
- [92] Neely SA, Williamson JM, Klingseisen A, et al. New oligodendrocytes exhibit more abundant and accurate myelin regeneration than those that survive demyelination [J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(4): 415–420.
- [93] Koh A, Sarusie MV, Ohmer J, et al. Fluorescence correlation spectroscopy reveals survival motor neuron oligomerization but No active transport in motor axons of a zebrafish model for spinal muscular atrophy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 639904.
- [94] 陈微. 斑马鱼脑组织结构特性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [95] Jurisch-Yaksi N, Yaksi E, Kizil C. Radial glia in the zebrafish brain; functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia [J]. *Glia*, 2020, 68(12): 2451–2470.
- [96] MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(10): 721–731.
- [97] 陈微, 章琳俐, 杨平, 等. 斑马鱼端脑的微细形态与结构 [J]. *水产学报*, 2015, 39(3): 371–380.

陈祥和,仇啸,刘驰,等. 自噬:运动改善神经退行性疾病的关键机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 132-139.

Chen XH, Qiu X, Liu C, et al. Autophagy: the critical mechanism of exercise in improving neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 132-139.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.017

自噬:运动改善神经退行性疾病的关键机制

陈祥和*,仇 啸,刘 驰,沈梓铭,周香香

(扬州大学体育学院,江苏 扬州 225127)

【摘要】 自噬调控神经类疾病是当前神经科学领域的研究焦点。自噬紊乱导致 A β 、Tau、 α -syn 等蛋白表达、沉积和功能失调,引发阿尔茨海默症、帕金森病、亨廷顿病等神经退行性疾病。运动是改善神经退行性疾病的重要手段,这与 AdipoR1/AMPK/TFEB、AMPK/mTOR 等途径被激活后上调 LC3、Beclin-1、Lamp1 等自噬因子表达密切相关,较高的自噬水平可清除脑中沉积的 A β 、Tau、 α -syn 等蛋白,改善神经退行性疾病引起的神经元变性、突触结构和功能紊乱等。本研究综述分析了自噬在运动改善神经退行性疾病中的作用机制,将为运动改善神经退行性疾病研究提供坚实的理论依据和新的研究思路。

【关键词】 自噬;运动;神经退行性疾病;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0132-08

Autophagy: the critical mechanism of exercise in improving neurodegenerative diseases

CHEN Xianghe*, QIU Xiao, LIU Chi, SHEN Ziming, ZHOU Xiangxiang
(College of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

【Abstract】 Autophagy regulation of neurological diseases is the focus of current research in the field of neuroscience. Autophagy disorder leads to expression, deposition, and dysfunction of proteins such as A β , Tau, α -syn, and causes neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease. Exercise is important to improve neurodegenerative diseases, which is closely related to upregulated expression of LC3, Beclin-1, Lamp1 and other autophagic factors after activation of AdipoR1/AMPK/TFEB, AMPK/mTOR, and other pathways. A high autophagy level removes deposition of A β , Tau, α -syn and other proteins in the brain and improves neurodegeneration and synaptic structure and function disorder caused by neurodegenerative diseases. This article reviewed and analyzed the mechanism of autophagy in the improvement of neurodegenerative diseases by exercise, which provides a solid theoretical basis and new research ideas to improve neurodegenerative diseases by exercise.

【Keywords】 autophagy; exercise; neurodegenerative diseases; mechanism

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

神经退行性疾病是指神经元变性、缺失和/或其髓鞘丧失导致的慢性、进行性神经系统疾病的总称,临床常见有阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD)、肌萎缩性侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 等。特定蛋白的错误折叠及其在细胞内堆积是神经退行性疾病发生的重要机制,研究发现,脑内 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 和 Tau 蛋白沉积引发 AD, α -突触蛋白 (α -synuclein, α -syn) 在脑内的大量聚集导致 PD,而皮层下区域病变导致 HD^[1]。然而,自噬作为高度

【基金项目】 江苏省社会科学基金 (20TYC001); 中国博士后科学基金特别资助 (2021T140580); 中国博士后科学基金面上资助 (2019M661957); 扬州大学“高端人才支持计划”; 扬州大学“青蓝工程”培养对象资助。

【作者简介】 陈祥和 (1986—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 运动改善神经系统疾病的机制研究。E-mail: huashixh@163.com

保守的代谢途径,钙离子途径(如钙通道调节分子(calcium release-activated calcium modulator 1, Orail)、瞬时受体电位通道(canonical transient receptor potential channels, TRPC)等通过自噬调控 AD 等神经退行性疾病发生^[2]。而自噬关键因子 p62 过表达会竞争性抑制 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)与核因子 E2 相关因子 2-ETGE (nuclear factor E2-related factor 2-ETGE, Nrf2-ETGE)谷氨酸残基的 351 位丝氨酸残基(S351)结合,清除海马等脑区沉积的 A β 、 α -syn 并抑制 Tau 蛋白过磷酸化,从而改善 AD、PD 等神经退行性疾病^[3]。目前,有关神经退行性疾病的相关研究中,AD 和 PD 的研究较多,HD、ALS、MS 等的研究较少且自噬是否在此过程中发挥关键调节作用还存在一点争议。

运动激活自噬,甚至有研究还将运动新定义为自噬诱导剂。8 周跑台训练后,淀粉样前体蛋白/早老蛋白 1 (amyloid precursor protein/Presenilin-1, APP/PS1)转基因小鼠(AD 小鼠)海马中自噬关键因子 p62 和溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosome-associated membrane protein 1, Lamp1)表达下调会激活其自噬-溶酶体活性^[4],亦可激活 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠脑中脂联素受体 1 (adiponectin receptor 1, AdipoR1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/外源性转录因子 EB(transcription factor EB, TFEB)信号通路,增强溶酶体吞噬、分解功能并减轻异常自噬,从而减少海马等脑区的 A β 沉积进而改善 AD 样异常^[5]。有关 PD 研究中,耐力训练激活 PD 小鼠黑质神经细胞中 AMPK/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)途径从而上调微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated-protein light-chain-3-II, LC3-II)表达,改善其异常自噬及 PD 样行为^[6]。目前,有关运动通过自噬来改善神经退行性疾病的研究较少且集中在 AD、PD 上,缺少较为全面的综述、分析,并且有关 HD、ALS 和 MS 的相关研究尚鲜有报道。基于此,本研究将综述、分析自噬在神经退行性疾病发生及运动改善神经退行性疾病中的作用机制,以期为该领域研究提供一定的理论依据和新思路。

1 自噬在神经退行性疾病发生中的作用机制

1.1 自噬调控 AD

AD 神经元中清除受损线粒体的自噬-溶酶体

途径 (autophagy-lysosome pathway, ALP) 被抑制,导致功能障碍线粒体的大量积聚^[7]。氧化损伤和细胞能量的缺乏引起线粒体自噬损伤增加,导致 A β 和 Tau 蛋白异常积累,造成突触功能丧失和认知功能障碍,损害线粒体自噬^[8]。其机制有:A β 聚集形成神经元细胞外淀粉样斑块沉积;高度磷酸化的微管相关蛋白 Tau 沉积导致神经元内神经纤维缠结^[9]。自噬是调控 AD 的关键因素,AD 患者脑内因神经营养因子缺乏出现神经突触肿胀、变性甚至坏死,自噬囊泡内出现 A β 异常积累,使得自噬小体成熟受损、自噬小体在营养不良神经突触中显著积聚等导致神经变性,引起神经元、神经胶质细胞等数量减少^[10]。自噬小体的积聚是由自噬诱导增加或溶酶体清除率降低或两者联合所致,引起自噬体 AD 样堆积和轴突营养不良^[11]。LC3 是自噬体形成过程中与磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE)结合的泛素化蛋白,而作为自噬关键因子的自噬效应蛋白 Beclin-1 在 AD 脑细胞中表达下调会降低海马神经元中微管相关蛋白 1 轻链 3 阳性 (LC3 阳性)小泡数量及皮层裂解物中 LC3-II/LC3-I 比率^[12]。并且,敲除 Beclin-1 后发现 APP+Becn1^{+/-}小鼠细胞外 A β 免疫反应性沉积物、球状硫黄素 S 阳性斑块数量和神经元内 A β 水平显著增加^[13]。此外,敲除 Beclin-1 后溶酶体异常更为明显,A β 沉积增加导致敲除小鼠神经突触和树突变性^[14]。Beclin-1 还可通过内胚体/溶酶体途径来影响神经细胞隔室中 A β 表达及其在细胞外的沉积^[15]。而 p62 具有调节自噬和凋亡的双重作用,其 UBA 结构域与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8)泛素化蛋白作用调控神经细胞凋亡,并且其 C 端 LIR 结构域与自噬相关基因 8 (autophagy-related gene 8, ATG8)/LC3 结合,上调 ATG 5 表达后加速 AD 脑中沉积 A β 的清除和增加神经元突触、树突数量^[16]。再者,ATG5 与 ATG12 在 ATG7 的调节下结合形成自噬蛋白复合体,促进自噬体与神经元细胞的内胚体/多泡体融合,使得 AD 受损的神经轴突及神经元、神经胶质细胞等增多^[17]。而 AD 脑中 A β 自噬清除失败与丝氨酸/苏氨酸激酶 11 (serine/threonine kinase 11, STK11)/肝激酶基因 B1 (liver kinase B1, LKB1)失活后抑制 AMPK 途径介导的自噬密切相关,这可显著降低海马区中 A β 清除率^[18]。但另有研究发现,AMPK mRNA 表达上调不会通过增强神经细胞自噬来促进沉积 A β 清除,而抑制 mTORC1

却可增强海马神经元自噬来加快 A β 清除^[19]。以上研究存在的差异与 AMPK 的磷酸化水平有关,当 AMPK 磷酸化时能够下调下游的 mTOR 蛋白表达,而且 AMPK 促自噬作用是其 485/491 号位的丝氨酸磷酸化后促进丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/mTOR 途径激活来诱导自噬关键因子 LC3-II、Beclin-1 和 ATGs 表达后发挥作用^[20]。有研究发现,PTEN 诱导假定激酶 1 (phosphatase and tensin homolog induced kinase 1, PINK1) 是清除受损线粒体的线粒体自噬关键因子,其表达上调通过激活自噬受体 (OPTN 蛋白 (optineurin, OPTN) 和核点蛋白 52 (nuclear dot protein 52, NDP52)) 后增强线粒体自噬,促进受损线粒体清除并减少 A β 沉积^[21]。

除 A β 外,超磷酸化微管相关 Tau 蛋白在细胞内聚集到神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 中来调节微管动力学、轴突运输和神经突起生长,Tau 蛋白突变 A152 T 导致其编码 Tau 蛋白重复结构域和负责微管 (microtubule, MT) 结合的侧翼区域与小胶质细胞、星型胶质细胞的微管结合减少,导致突触丧失和神经元死亡;而 NFT 形成程度与 AD 认知功能障碍发生的关系显著大于 A β 斑块的作用^[22]。在 AD 脑中,NFT 形成始于内嗅皮层,接着到海马区,随后至皮层区域,这与 AD 的认知缺陷发生相关^[23]。而 Tau 蛋白积累和聚集被认为是 AD 等神经退行性疾病发生的主因^[24]。激活自噬会抑制 Tau 蛋白聚集并可消除其细胞毒性,p62 的 UBA 结构域结合泛素化蛋白会促进 Tau 蛋白清除^[25]。而 p62 缺失通过自向性过程导致神经病理损伤、高磷酸化 Tau 蛋白聚集、突触缺损和 Tau 淀粉样结构形成,这与 AD 的神经保护作用相一致^[26]。并且,p62 高表达亦可通过减少 Tau 蛋白表达和斑块聚集来改善 APP/PS1 小鼠的认知缺陷^[27]。另外,AD 神经元中 FK506 结合蛋白 (FK506-binding proteins, FKBP) 表达下调抑制背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3) 表达,降低自噬溶酶体系统功能,导致 Tau 蛋白异常沉积进而引发 AD^[28]。近来一项研究中,AD 脑细胞中聚集的 Tau 蛋白呈现朊病毒样特性^[29]。Tau 蛋白会被泛素化蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 和 ALP 降解,而 Beclin-1 对其翻译后修饰、聚集水平、突变变体及其

与伴侣蛋白会作用于大脑神经元数量和突触可塑性^[30-31]。综上,自噬和/或线粒体自噬激活会促进 A β 和 Tau 蛋白清除来改善 AD。

1.2 自噬调控 PD

黑质多巴胺 (dopamine, DA) 神经元变性坏死,且多脑区以 α -syn 聚集形成的路易小体以及多巴胺神经递质减少是 PD 运动系统功能紊乱的病理表征^[32]。 α -syn 与脑神经元中热休克蛋白 70 (heat shock proteins 70, HSP70) 的 HSP 氨基酸序列结合,激活分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA) 途径与伴侣蛋白自噬-溶酶体相关的 2A 型膜蛋白受体 (lysosomal associated membrane protein 2A, LAMP-2A) 结合后会清除 α -syn 蛋白,降低其对神经元的毒性^[33]。自噬是调控 PD 的重要机制,脑细胞自噬水平下降导致 α -syn 异常堆积,而其可被泛素化蛋白酶体系统和 ALP 降解^[34]。另外, α -syn 突变体 A30P 和 A53T 优先与自噬溶酶体相关 2A 型膜蛋白受体结合,阻断自噬小体形成^[35]。研究发现,PD 脑中的两关键自噬因子—ATG7 和 Rapa 激活后上调微 RNA-7 (microRNA-7, miRNA-7) 介导的 mTOR 途径来清除沉积的 α -syn,进而改善 PD^[36]。研究表明,自噬途径清除 α -syn 可改善 PD。长链非编码 RNA 核富集转录本 1 (long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1, LncRNA NEAT1) 通过负向调节 miR132-3p 来激活磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/苏氨酸激酶 (threonine kinase, AKT) 途径减少脑细胞中 α -syn 沉积,改善 PD 损伤的神经细胞并发挥神经保护作用^[37]。而 miR-214-3p 可靶向作用于 Atg12 的 3' 非翻译区来下调 Atg12 表达,从而抑制自噬水平并减轻 PD 海马神经元凋亡。这与 miR-214-3p 下调组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB) 蛋白表达后通过 ALP 清除聚集的 α -syn 密切相关。小胶质细胞中 p62 与 ATG8/LC3 结合后上调 ATG5 表达,可改善 PD 小鼠多巴胺神经元损伤,这与 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 与 Caspase-1 结合形成炎性小体进而抑制白细胞介素-1 β (interleukin-1, IL-1 β) 和 IL-18 表达密切相关^[38]。自噬还可通过吡嗪衍生物 (mitochondrial acid 5, MA-5) 激活 AMPK 途径,Apelin-36、过氧化物酶体增殖激活受体 γ 辅助激活因子 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator- α , PGC-1 α) 等来调控 PD^[39]。

线粒体自噬亦是调节 PD 的重要因素^[40], 神经元细胞中 α -syn 异常沉积形成的路易小体抑制线粒体自噬体形成^[41]。而线粒体自噬水平较低或过高均可通过促进神经元死亡来诱发 PD, PINK1/帕金森蛋白(Parkin)途径、DJ-1 蛋白及核蛋白 AS 是调控线粒体自噬紊乱的重要途径^[42]。PINK1 在线粒体外膜(outer mitochondrial membrane, OMM)上表达, 将 Parkin 从胞质中招募到 OMM, 其 E3 活性通过线粒体蛋白泛素化促进线粒体自噬, 导致线粒体降解^[43]。并且, PINK1 和 Parkin 突变还会以级联方式调节线粒体完整性, 抑制受损线粒体堆积, 提高损伤线粒体自噬, 进而改善 PD 等神经元退行性病变^[44]。Parkin 非依赖性线粒体自噬也可分为两种类型: 受体介导自噬和泛素连接酶介导自噬。在受体介导的自噬中, 多种受体蛋白如 Nip 样蛋白(Nip-like protein X, NIX)、Bcl-2-腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3(Bcl-2-adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3, BNIP3)、FUN14 结构域蛋白 1(FUN14 domain containing 1, FUNDC1)的 C-末端位于线粒体外膜, 其 N-末端具有 LC3 相互作用域(LC3 interacting region, LIR), 被招募后会诱导线粒体自噬^[45]。Beclin-1 调节的自噬激活分子(activating molecule in Beclin1-regulated autophagy, AMBRA1)是自噬的上游调节因子, LC3 与 LIR 结合形成复合体后诱导线粒体自噬, 而 AMBRA1 同时诱导 Parkin 依赖或独立的自噬途径^[46]。在线粒体自噬中, 磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, PTEN)诱导的 PINK1 招募 Parkin 与 RBR 型 E3 泛素蛋白连接酶进而发生蛋白泛素化, 促进受损线粒体降解和内膜微细结构、功能改善, 从而招募 LC3 自噬小体诱导线粒体自噬^[47]。然而, DJ-1 激活能代偿 PINK1 功能缺失进而抑制线粒体自噬, 导致受损线粒体堆积, 诱发 PD^[48]。但是 AS 可特异性与线粒体外膜受体结合, 抑制线粒体融合并引起线粒体断裂; AS 激活会减少自噬泡形成从而抑制线粒体自噬, 导致 AS 激活和自噬异常的恶性循环, 氧化应激反应和毒性物质增多引起易感神经元死亡进而引发 PD^[49]。

1.3 自噬调控其他神经退行性疾病

除 AD 和 PD 外, 自噬在其他神经退行性疾病中也具有重要调控作用。HD 表现为舞蹈性运动和痴呆, 亨廷顿蛋白(mutant huntingtin, mHTT)突变发生在胞浆中的沉积造成神经毒性, 使得神经元变性及

功能受损^[50]。PI3K/AKT/mTOR 作为经典自噬途径, mHTT 表达增加会将其激活进而抑制自噬, 加重 HD 症状; 另外, 抑制纹状体中 mTOR 表达, 使脱磷酸化依赖 Unc-51 样激酶 1(Unc-51 like kinase activating kinase 1, ULK1)、ULK2 活化及其介导的 ATG13、200 kDa 的家族相互作用蛋白(family interacting protein of 200 kDa, FIP200)和 ULK1 磷酸化, 激活自噬进而通过泛素-蛋白酶体系统来减少 HD 神经元内质网中 mHTT 表达及沉积, 改善 HD 病变^[51]。研究证实, 同源域结合蛋白激酶 3(homeodomain interacting protein kinase 3, HIPK3)和 MAPK11 作为 mHTT 阳性调节因子, 将其敲除可显著降低 mHTT 表达及聚集^[52]; mHTT 表达下调导致线粒体代谢能力、电子传递链、钙离子通道、超微结构等受损, 而线粒体自噬水平提高会显著清除沉积 mHTT 进而改善 HD 脑细胞线粒体功能^[53]。ULK1 和 III 型磷脂酰肌醇激酶 34(vacuolar protein sorting 34, Vps34)作为关键自噬因子, 其功能发挥依赖于 mTOR 依赖方式在丝氨酸 29 位点磷酸化 ATG, 通过上调 TFEB 表达来激活 LAMP-2A、LC3-II、Beclin-1 等表达, 减少 mHTT 沉积来改善 HD^[54]。目前, 自噬调控 ALS 和 MS 的研究较少, ALS 神经元中 LC3-II 和磷酸化 mTOR 标记的阳性运动神经元数量显著减少, 而自噬体和自噬蛋白增加导致 ALS 神经元死亡。并且, ALS 中超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)突变引起微管轴突运动受损导致线粒体分裂、融合以及自噬清除功能紊乱^[55]。神经元自噬水平升高导致髓鞘轴突功能障碍引发 MS, 研究证实脱髓鞘轴突比有髓鞘轴突线粒体功能、结构更易受损, 这与 Na-K-ATP 酶缺乏或功能障碍轴突导致 Na^+ 外流调节的静息膜电位紊乱密切相关^[56]。

2 运动调控自噬改善神经退行性疾病的作用机制

2.1 运动调控自噬改善 AD 的作用机制

运动可显著改善 AD 患者或 AD 动物模型的病理表征及认知功能^[57-58]。众多研究将 $\text{A}\beta$ 和 Tau 蛋白作为运动干预靶点, 发现跑台运动可显著降低 AD 小鼠海马组织中 $\text{A}\beta$ 和 Tau 蛋白水平, 减轻 AD 认知功能障碍^[59]。这与跑台运动显著提高 AD 小鼠脑组织自噬水平进而清除脑细胞中沉积的 $\text{A}\beta$ 密切相关, 而减少的 $\text{A}\beta$ 对神经元毒性及损伤显著下降。Beclin-1 是调控自噬的关键因子, 8 周自由跑

轮、游泳和跑台运动后,AD 小鼠海马中 Beclin-1 表达上调,细胞自噬被启动^[60];而在细胞自噬形成阶段,4 周跑台训练可显著增加 AD 小鼠基底节区自噬体,同时上调 LC3-II 和 LC3-I 表达且 LC3-II/LC3-I 比值升高^[61]。p62 可与 LC3 作用而退化为自噬异质基质,运动干预后 FUNDC1 表达上调的同时,线粒体自噬标志蛋白 LC3-II/LC3-I 比值增高会抑制 p62 表达,加快自噬体形成从而改善 AD 病理表征。自噬激活介导运动改善 AD,还与脂联素(adiponectin, APN)表达上调后,APP/PS1 小鼠(AD 小鼠)海马神经元膜上 AdipoR1 结合从而激活 AMPK/TFEB 途径来提高自噬进而减少 A β 沉积密切相关^[62]。综上,运动可通过激活神经细胞自噬和加速自噬体形成,促进神经细胞自噬来清除沉积的 A β 进而改善 AD。

Tau 蛋白过度磷酸化形成的 NFT 引发 AD,长时间运动激活 Tau 蛋白调节激酶,抑制 AD 小鼠高磷酸化 Tau 蛋白表达^[63]。并且,与 A β 一样,Tau 蛋白磷酸化亦是运动干预 AD 的作用靶点,运动诱导自噬水平升高促进 Tau 蛋白寡聚体和不可溶性聚集体形成,使得自噬水平显著提高^[64]。并且,Tau 蛋白过度磷酸化亦会诱导自噬功能紊乱,而自噬介导的 AD 神经元中 Tau 蛋白清除受 mTOR 靶向调节^[65],运动激活 PI3K 后产生的磷酸肌醇结合蛋白(phosphoinositide-binding protein 3, PIP3)与含有 PH 结构域的 AKT 和磷酸肌醇依赖性激酶 1(phosphoinositide dependent kinase-1, PDK1)结合,使得 PDK1 在 Akt 的 Ser473 位点上将其磷酸化,进而抑制 mTOR 磷酸化从而减少 Tau 蛋白沉积^[66-67]。说明,PI3K/AKT 途径介导 mTOR 激活是运动改善 AD 的分子机制。并且,mTOR 是运动通过细胞自噬来减少 Tau 蛋白过度磷酸化和聚集来达到防治 AD 的关键因子。当利用运动对 AD 小鼠进行干预后,脑细胞自噬被启动可显著改善 AD,这与 AMPK/PINK1/Parkin 途径被运动激活从而上调脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)来激活线粒体自噬以及激活 AdipoR1/AMPK/TFEB 途径来增强溶酶体并降低异常升高的自噬水平,减少 Tau 蛋白沉积密切相关^[68-69]。以上研究表明,运动提高自噬可显著清除沉积的 Tau 蛋白,进而改善 AD。

2.2 运动调控自噬改善 PD 的作用机制

PD 脑内 α -syn 异常堆积,而 α -syn 可被泛素化

蛋白酶体系统介导的自噬溶酶体或线粒体自噬途径降解^[70]。运动可通过提高自噬来改善 PD,耐力训练干预后 PD 小鼠黑质神经细胞自噬水平显著升高;并且,运动亦可通过上调自噬因子(Beclin-1、ATG12、ATG5、LC3 等)表达来改善 PD^[71]。PINK1/Parkin 途径亦是调控 PD 线粒体自噬的关键途径,p-PINK1 使 Parkin 的 Ubl 与 RING1 和 YY1 结合蛋白(ring finger protein 1, RING1)发生解离并在 Ubl 位点发生磷酸化修饰、活化,进而上调 p62、LC3 等表达,使得受损线粒体被自噬小体包裹、清除^[72]。并且,PINK1 作为力学刺激敏感因子,6 周自主跑轮运动后 PD 小鼠海马中 Parkin 及其调控的 Beclin-1、ATG5 等自噬因子表达增加,减少沉积 α -syn^[73]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的 PD 小鼠脑中 PINK1 和 Parkin 表达下降,而 8 周跑台训练通过激活 PD 小鼠海马中 PINK1/Parkin 途径可显著上调 p62、LC3 等表达,减少沉积的 α -syn^[74];另外,6 周跑台运动激活 PD 小鼠中脑自噬水平来改善线粒体内膜受损微结构及能量代谢,对抗 MPTP 的神经毒性^[75]。此外,有学者对跑台运动在 PD 建模前后(先运动后注射 MPTP 造模和先注射 MPTP 造模后进行运动的对比研究)的改善作用进行对比,发现 MPTP 神经毒性均会破坏线粒体自噬,而造模后运动可显著上调 PINK1 表达,改善 MPTP 造成的线粒体自噬水平下降^[76]。分析其机制,发现运动在 Thr222 位点上将 PD 脑中 AMPK 磷酸化,而 p-AMPK 上调 TFEB 表达后激活自噬途径 ATG1/ULK1,改善 PD 海马神经元变性^[77]。再者与运动上调 mTOR、TFEB 等关键因子表达密切相关,以上因子可显著激活 PD 脑中自噬途径,促进沉积 α -syn 清除^[78]。以上研究表明,运动激活 PINK1/Parkin 途径后自噬水平提高可改善 PD,受限于当前研究较少,其他作用机制尚待揭示。

3 小结与展望

本研究发现,自噬调控神经退行性疾病,而运动可通过激活 AdipoR1/AMPK/TFEB、AMPK/PINK1/Parkin 等途径来提高自噬水平进而清除沉积 A β 、Tau 蛋白和 α -syn 等,改善 AD、PD 等神经退行性疾病受损的神经元突触、结构和功能(见图 1)。但尚存一些问题待研究揭示,具体如下:

(1)加强自噬调控神经退行性疾病的作用机制

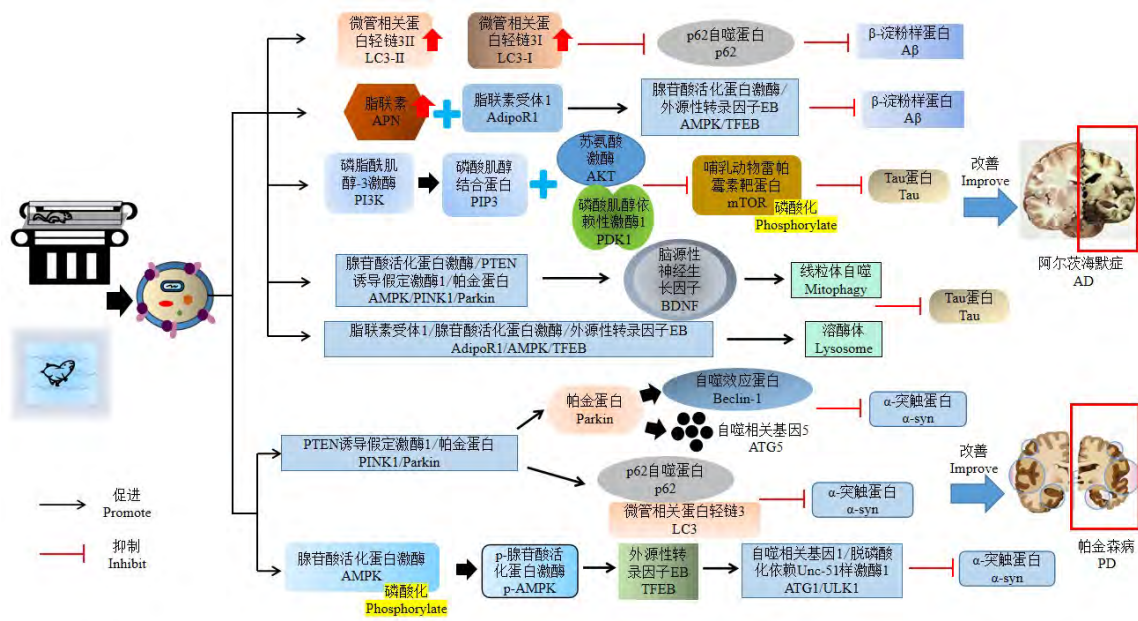


图 1 自噬介导运动改善神经退行性疾病的可能机制

Figure 1 Possible mechanism of autophagy-mediated exercise in improving neurodegenerative diseases

研究,利用基因测序、CRISPERCase-9、免疫共沉淀等技术揭示各自噬因子的作用机制、相互之间的作用机制网络以及自噬调控 HD、ALS、MS 等。

(2)探究不同运动方式、强度、频率、时间等在改善神经退行性疾病上的作用,并利用扩增阻滞突变系统(ARMS)-PCR 法、Sanger 测序法、荧光原位杂交等揭示其分子机制,为神经退行性疾病的运动干预研究提供科学有效的运动处方策略和扎实的理论依据。

(3)加强运动改善神经退行性疾病的应用研究:针对不同神经退行性疾病患者的患病程度、不同人群、不同性别等进行运动干预,揭示其作用机制,为运动有效改善神经退行性疾病提供坚实的理论依据并促进其推广应用。

参考文献:

[1] 徐宏睿, 曾常茜. 自噬在神经退行性疾病中的调控作用 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(9): 2074-2078.

[2] 张志潇, 刘晓芳, 王荔. 钙调控自噬在神经退行性疾病中的研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2022, 21(1): 81-86.

[3] Hensley K, Harris-White ME. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration [J]. Neurobiol Dis, 2015, 84: 50-59.

[4] Zhao N, Zhang X, Song C, et al. The effects of treadmill exercise on autophagy in hippocampus of APP/PS1 transgenic mice [J]. Neuroreport, 2018, 29(10): 819-825.

[5] Jian Y, Yuan S, Yang J, et al. Aerobic exercise alleviates abnormal autophagy in brain cells of APP/PS1 mice by

upregulating AdipoR1 levels [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 9921.

[6] 周丽娜, 王洪新, 田红军, 等. 耐力训练对帕金森病模型小鼠黑质神经细胞自噬和血浆外泌体分泌的影响 [J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2022, 31(4): 306-313.

[7] Nourbakhsh F, Read MI, Barreto GE, et al. Boosting the autophagy-lysosomal pathway by phytochemicals: a potential therapeutic strategy against Alzheimer's disease [J]. IUBMB Life, 2020, 72(11): 2360-2281.

[8] Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(3): 151-166.

[9] 徐颖. 可溶性 TREM2 在阿尔茨海默症病理特征中的作用研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2019.

[10] 金贺, 王蓉. 阿尔茨海默病: 自噬与 β 淀粉样肽关系的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(8): 68-71, 75.

[11] Lorincz P, Juhász G. Autophagosome-lysosome fusion [J]. J Mol Biol, 2020, 432(8): 2462-2482.

[12] Kaur S, Changotra H. The beclin 1 interactome: modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders [J]. Biochimie, 2020, 175: 34-49.

[13] Wang H, Jiang T, Li W, et al. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. Toxicol Lett, 2018, 282: 100-108.

[14] Luo R, Su LY, Li G, et al. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model [J]. Autophagy, 2020, 16(1): 52-69.

[15] Wang L, Xu XB, You WW, et al. The cytoplasmic nuclear shuttling of Beclin 1 in neurons with Alzheimer's disease-like injury [J]. Neurosci Lett, 2017, 661: 63-70.

- [16] Marshall RS, Hua Z, Mali S, et al. ATG8-binding UIM proteins define a new class of autophagy adaptors and receptors [J]. Cell, 2022, 185(6): 1101–1102.
- [17] Sarkar C, Jones JW, Hegdekar N, et al. PLA2G4A/cPLA2-mediated lysosomal membrane damage leads to inhibition of autophagy and neurodegeneration after brain trauma [J]. Autophagy, 2020, 16(3): 466–485.
- [18] Wani A, Al Rihani SB, Sharma A, et al. Crocetin promotes clearance of amyloid- β by inducing autophagy via the STK11/LKB1-mediated AMPK pathway [J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3813–3832.
- [19] Benito-Cuesta I, Ordóñez-Gutiérrez L, Wandosell F. AMPK activation does not enhance autophagy in neurons in contrast to MTORC1 inhibition; different impact on β -amyloid clearance [J]. Autophagy, 2021, 17(3): 656–671.
- [20] He Y, Liu B, Yao P, et al. Adiponectin inhibits cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation-induced apoptosis in brain by increasing autophagy involved in AdipoR1-AMPK signaling [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(2): 870–878.
- [21] Reddy PH, Oliver DM. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease [J]. Cells, 2019, 8(5): 488.
- [22] Pinheiro L, Faustino C. Therapeutic strategies targeting amyloid- β in Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2019, 16(5): 418–452.
- [23] Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, et al. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function [J]. Arch Neurol, 2004, 61(3): 378–384.
- [24] Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, et al. Synergy and antagonism of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in a cell model of pathological tau aggregation [J]. Autophagy, 2010, 6(1): 182–183.
- [25] You Z, Jiang WX, Qin LY, et al. Requirement for p62 acetylation in the aggregation of ubiquitylated proteins under nutrient stress [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5792.
- [26] Blaudin de Thé FX, Lassus B, Schaler AW, et al. P62 accumulates through neuroanatomical circuits in response to tauopathy propagation [J]. Acta Neuropathol Commun, 2021, 9(1): 177.
- [27] Li J, Zou B, Cheng XY, et al. Therapeutic effects of total saikosaponins from *Radix bupleuri* against Alzheimer's disease [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 940999.
- [28] Chambraud B, Daguinot C, Guillemeau K, et al. Decrease of neuronal FKBP4/FKBP52 modulates perinuclear lysosomal positioning and MAPT/Tau behavior during MAPT/Tau-induced proteotoxic stress [J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3491–3510.
- [29] Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 909–913.
- [30] Caballero B, Wang Y, Diaz A, et al. Interplay of pathogenic forms of human tau with different autophagic pathways [J]. Aging Cell, 2018, 17(1): e12692.
- [31] Dujardin S, Lécolle K, Cailliez R, et al. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies [J]. Acta Neuropathol Commun, 2014, 2: 14.
- [32] 杨东明, 杨利峰, 赵德明, 等. 帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 397–404.
- [33] Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and alpha-synuclein: relevance to Parkinson's disease and related synucleinopathies [J]. Mov Disord, 2016, 31(2): 178–192.
- [34] Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, et al. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy [J]. Science, 2004, 305(5688): 1292–1295.
- [35] Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, et al. Genetic variability in the SNCA gene influences α -synuclein levels in the blood and brain [J]. FASEB J, 2008, 22(5): 1327–1334.
- [36] 陈苗苗. “ α -synuclein-miR-7”通路在帕金森病中的作用及机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2021.
- [37] 姚伟超. LncRNA NEAT1 通过 miR132-3p 调控 MPP⁺ 诱导的 SH-SY₅Y 自噬轴及其机制探讨 [D]. 青岛: 青岛大学, 2020.
- [38] 张慧. miR-214-3p 调节 α -synuclein 蛋白聚集影响帕金森病发展的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [39] 秦越. 小胶质细胞自噬功能障碍在帕金森病中的作用 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [40] Huang D, Liu M, Jiang Y. Mitochondrial acid-5 attenuates TNF- α -mediated neuronal inflammation via activating Parkin-related mitophagy and augmenting the AMPK-Sirt3 pathways [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 22172–22182.
- [41] Guo YL, Duan WJ, Lu DH, et al. Autophagy-dependent removal of α -synuclein: a novel mechanism of GM1 ganglioside neuroprotection against Parkinson's disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(4): 518–528.
- [42] Villa E, Proïcs E, Rubio-Patiño C, et al. Parkin-independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells [J]. Cell Rep, 2017, 20(12): 2846–2859.
- [43] 李瑞萌, 赵进, 刘岩. PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(10): 1072–1079.
- [44] Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, et al. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 189.
- [45] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. Essays Biochem, 2017, 61(6): 609–624.
- [46] 李真, 韦庆军. 自噬调节因子 Ambra1 在肿瘤中的研究进展 [J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(3): 267–270.
- [47] Baechler BL, Bloemberg D, Quadrilatero J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. Autophagy, 2019, 15(9): 1606–1619.
- [48] der Vlag Marc V, Robbert H, Heckman Pim RA. The contribution of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes to selective

- neuronal degeneration in Parkinson's disease [J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 52(4): 3256–3268.
- [49] Sun K, Jing X, Guo J, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2082–2092.
- [50] 唐文洁, 黄艳, 王力峰, 等. 亨廷顿氏病的神经兴奋和线粒体毒性发病机理与动物模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 553–562.
- [51] Tabrizi SJ, Flower MD, Ross CA, et al. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(10): 529–546.
- [52] Yu M, Fu Y, Liang Y, et al. Suppression of MAPK11 or HIPK3 reduces mutant Huntingtin levels in Huntington's disease models [J]. *Cell Res*, 2017, 27(12): 1441–1465.
- [53] Wertz MH, Mitchem MR, Pineda SS, et al. Genome-wide InVivo CNS screening identifies genes that modify CNS neuronal survival and mHTT toxicity [J]. *Neuron*, 2020, 106(1): 76–89.
- [54] Filfan M, Sandu RE, Zavaleanu AD, et al. Autophagy in aging and disease [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58: 27–31.
- [55] Okamoto K, Fujita Y, Mizuno Y. Pathology of protein synthesis and degradation systems in ALS [J]. *Neuropathology*, 2010, 30(2): 189–193.
- [56] Shi P, Ström AL, Gal J, et al. Effects of ALS-related SOD1 mutants on dynein- and KIF5-mediated retrograde and anterograde axonal transport [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(9): 707–716.
- [57] Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, et al. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions [J]. *Brain*, 2008, 131(7): 1722–1735.
- [58] Mu L, Cai J, Gu B, et al. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in 3 × tg-AD mice through enhancement of structural synaptic plasticity of the hippocampus and prefrontal cortex [J]. *Cells*, 2022, 11(2): 244.
- [59] Cho J, Shin MK, Kim D, et al. Treadmill running reverses cognitive declines due to Alzheimer's disease [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2015, 47(9): 1814–1824.
- [60] 贾绍辉, 刘君, 寇现娟, 等. 运动诱导的细胞自噬对小鼠心肌的保护作用 [J]. *武汉体育学院学报*, 2014, 48(10): 53–56.
- [61] Lira VA, Okutsu M, Zhang M, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance [J]. *FASEB J*, 2013, 27(10): 4184–4193.
- [62] 王祯, 于亮. 不同强度运动诱导 FUNDC1 对大鼠骨骼肌线粒体自噬的影响 [A]. 2017 年中国生理学会运动生理学专业委员会会议暨“学生体质健康与运动生理学”学术研讨会论文集[C]; 2017.
- [63] Liu HL, Zhao G, Zhang H, et al. Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice [J]. *Behav Brain Res*. 2013, 256: 261–272.
- [64] Leem YH, Lim HJ, Shim SB, et al. Repression of tau hyperphosphorylation by chronic endurance exercise in aged transgenic mouse model of tauopathies [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(11): 2561–2570.
- [65] Congdon EE, Wu JW, Myeku N, et al. Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy *in vitro* and *in vivo* [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 609–622.
- [66] Pei JJ, Björkdahl C, Zhang H, et al. p70 S6 kinase and tau in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 14(4): 385–392.
- [67] Kang EB, Cho JY. Effect of treadmill exercise on PI3K/AKT/mTOR, autophagy, and Tau hyperphosphorylation in the cerebral cortex of NSE/htau23 transgenic mice [J]. *J Exerc Nutrition Biochem*, 2015, 19(3): 199–209.
- [68] 张子怡, 康伟民, 张晟, 等. 高强度间歇运动训练上调 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病小鼠海马线粒体自噬的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(6): 670–675.
- [69] Morais GP, de Sousa Neto IV, Marafon BB, et al. The dual and emerging role of physical exercise-induced TFEB activation in the protection against Alzheimer's disease [J]. *J Cell Physiol*, 2023, 238(5): 954–965.
- [70] Sala G, Marinig D, Riva C, et al. Rotenone down-regulates HSPA8/hsc70 chaperone protein *in vitro*: a new possible toxic mechanism contributing to Parkinson's disease [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 54: 161–169.
- [71] Feng YS, Yang SD, Tan ZX, et al. The benefits and mechanisms of exercise training for Parkinson's disease [J]. *Life Sci*, 2020, 245: 117345.
- [72] Gong G, Song M, Csordas G, et al. Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350(6265): aad2459.
- [73] Vainshtein A, Tryon LD, Pauly M, et al. Role of PGC-1α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(9): C710–C719.
- [74] 樊申元, 靳二辉. 耐力训练对帕金森模型小鼠中脑线粒体自噬相关基因表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(5): 437–442.
- [75] 姜宁, 曹玮, 宋超, 等. 早期运动训练对帕金森小鼠中脑和纹状体的影响: 自噬与线粒体动力学关系的研究 [J]. *中国运动医学杂志*, 2012, 31(2): 134–139.
- [76] 范保柱. 有氧运动通过突触核蛋白通路改善帕金森小鼠行为学机能的机理研究 [D]. 郑州: 河南大学, 2020.
- [77] Zou L, Liao M, Zhen Y, et al. Autophagy and beyond: Unraveling the complexity of UNC-51-like kinase 1 (ULK1) from biological functions to therapeutic implications [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(10): 3743–3782.
- [78] Perera ND, Sheean RK, Lau CL, et al. Rilmenidine promotes MTOR-independent autophagy in the mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis without slowing disease progression [J]. *Autophagy*, 2018, 14(3): 534–551.

张俊峰,郝丽亚,高红艳,等. 外泌体 miRNA 在早期筛查与治疗阿尔茨海默病的相关研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 140-145.

Zhang JF, Hao LY, Gao HY, et al. Research progress of exosomal miRNA in early screening and treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 140-145.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.018

外泌体 miRNA 在早期筛查与治疗阿尔茨海默病的相关研究进展

张俊峰*, 郝丽亚, 高红艳, 刘光甫, 张祖源, 郭永刚

(平顶山学院医学院基础医学系, 河南 平顶山 467000)

【摘要】 外泌体作为一种能被不同细胞分泌的小分子细胞外囊泡,通过运输 miRNA 等多种生物活性物质在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的病理过程中发挥重要作用。研究表明,外泌体 miRNA 的表达在 AD 患者早期阶段发生变化,并且通过外源性注射间充质干细胞来源的外泌体 miRNA 可以改善 AD 动物模型的学习记忆能力。本文就该领域对外泌体在早期筛查和治疗 AD 的研究情况进行综述。

【关键词】 外泌体;微小 RNA;阿尔茨海默病;间充质干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0140-06

Research progress of exosomal miRNA in early screening and treatment of Alzheimer's disease

ZHANG Junfeng*, HAO Liya, GAO Hongyan, LIU Guangfu, ZHANG Zuyuan, GUO Yonggang
(Department of Basic Medicine, Medical College, Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China)

【Abstract】 Exosomes are small molecule extracellular vesicles secreted by various cells and play a major role in the pathological process of Alzheimer's disease by transporting various bioactive substances such as miRNAs. Expression of exosomal miRNA changes in the early stages of AD, and exogenous injection of mesenchymal stem cell-derived exosomal miRNA improves learning and memory of AD animal models. This article reviews the research progress of exosomes in early screening and treatment of Alzheimer's disease.

【Keywords】 exosomes; miRNA; Alzheimer's disease; mesenchymal stem cell

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是临床常见的一种神经退行性疾病,神经病理学特征是大脑内老年斑形成以及神经纤维缠结,主要临床表现为认知功能下降和记忆能力减退。随着全球人口的老龄化,AD 的发病率也呈现逐年上升趋势。然而由于 AD 的病理机制复杂且尚未明确,目前仍然没有发现高效灵敏的 AD 早期诊断生物标记物,

同时临床常用药物治疗 AD 的效果也差强人意,这些都给社会 and 患者家庭带来了巨大的医疗经济负担。近年研究发现,外泌体(exosomes)是一种携带多种生物活性物质的细胞外囊泡,在 AD、帕金森症(Parkinson's disease, PD)和亨廷顿病(Huntington's disease, HD)等神经退行性疾病中发挥重要作用^[1]。在中枢神经系统中,外泌体微小 RNA(microRNA,

【基金项目】 河南省高等学校重点科研项目计划(21B310005)。

【作者简介】 张俊峰(1981—),男,本科,讲师,研究方向:神经病学临床治疗及人体解剖学教学研究。E-mail:1161050450@qq.com

miRNA)可以由神经元和胶质细胞等各种细胞分泌而来,在不同细胞之间的通讯发挥重要作用并且通过观察表达含量变化间接反映大脑病变损伤程度,可以作为 AD 早期筛查的生物标志物^[2]。最重要的是外泌体可以通过血脑屏障从而到达病变脑区域发挥疗效,具有治疗神经退行性疾病的潜在价值^[3]。本文就外泌体 miRNA 在 AD 中的诊断意义及治疗前景进行综述,以期为临床早期筛查和治疗预防 AD 提供思路参考。

1 外泌体 miRNA 概述

外泌体是由内泌体衍生而来直径为 30~150 nm 的脂质层包膜囊泡,Trams 等^[4]于 1981 年首次在羊网织红细胞发现。随后的研究陆续发现,外泌体可以由神经元、神经胶质细胞、免疫细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)等多种类型细胞产生并释放到血清、血浆、尿液、唾液、脑脊液和羊水中^[2]。外泌体发挥生物学效应的主要活性物质由蛋白质、脂质、miRNA 等多种成分组成,供体细胞合成释放外泌体后,通过与靶细胞间接结合信号受体或直接与质膜融合将外泌体中活性成分输送至细胞质中,从而介导细胞之间的信息传递发挥生物学作用^[5]。作为外泌体的重要组成部分之一,miRNA 是一类由 22~25 个核苷酸组成的小的非编码 RNA,通过与靶基因的 3' 未翻译区(3'-Untranslated region, 3'-UTR)结合从而抑制转录或阻滞翻译^[6]。越来越多的研究证明 miRNA 与 AD 的病理过程密切相关。miRNA 可以调节 α -secretase 和 β -secretase 等淀粉前体蛋白代谢相关酶蛋白的表达,还可以下调载脂蛋白 E4 (apolipoprotein E, apoE4) 和 2 型髓样细胞触发受体(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)的表达介导 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)的清除,同时 miRNAs 的表达水平与 Tau 蛋白磷酸化水平密切相关;miRNA 还参与了其他与 AD 发病相关的机制,比如氧化应激、线粒体自噬、神经炎症、突触可塑性和神经递质释放与清除异常^[7]。

2 外泌体 miRNA 参与阿尔茨海默病的病变过程

近年来已经有很多研究证实海马神经发生抑制、突触可塑性损伤、神经炎症等多种因素是 AD 发生的重要病理机制^[8-9]。Abdullah 等^[10]使用 A β 刺激星形胶质细胞后发现, c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun

N-terminal kinase, JNK)磷酸化增加从而减少外泌体的生成。同时另外一项研究指出炎症因子白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)刺激星形胶质细胞后发现多个外泌体 miRNA 的表达发生了改变^[11]。这提示外泌体 miRNA 可能参与 AD 的病变过程。神经元来源的外泌体 miR-124 通过间接调控星形胶质细胞中谷氨酸转运体 1 (glutamate transporter-1, GLT-1) 的蛋白表达,从而介导突触可塑性变化^[12]。反复轻度颅脑外伤(repetitive mild traumatic brain injury, rmTBI)也被认为是 AD 的重要风险因素。Ge 等^[13]在 rmTBI 小鼠模型的海马和皮质损伤区域中发现有十个小胶质细胞来源外泌体 miRNA 的表达发生改变,其中变化最明显的是 miR-124-3p。有趣的是 AD 不同病程阶段的同个小胶质细胞源性外泌体 miRNA 变化也大相径庭,这提示外泌体 miRNA 在 AD 不同时期的作用可能有差异,因此需要在 AD 的不同时期确定特异性改变外泌体 miRNA 从而明确其具体作用机制。随后通过体内外实验证实随着外泌体 miR-124 的表达增加,可以直接调节 RelA/ApoE 信号通路活性使脑源性营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达增加且淀粉前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)和 A β 的生成减少,改善海马神经元损伤从而恢复小鼠的学习记忆能力^[13]。此外, Micci 等^[14]发现海马神经干细胞来源的外泌体 miR-17、miR-322 和 miR-485 的表达比成熟海马神经元来源的外泌体高,并且在 AD 小鼠模型中通过脑室注射海马神经干细胞来源的外泌体后,海马 Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II, CaMKII) 的磷酸化水平上升,神经元轴突上 A β 表达减少,从而使兴奋性突触后电位幅度增加,AD 小鼠的学习记忆能力得到改善;然而脑室注射成熟海马神经元来源的外泌体并没有得到上述治疗效果,说明不同细胞来源的外泌体对 AD 的治疗效果具有一定差异性,未来研究还需要注意比较不同细胞来源的同种外泌体 miRNA 的表达是否有差别。综上所述,外泌体 miRNA 参与了 AD 病理生理过程,然而多种外泌体 miRNA 联合运用是否具有协同或拮抗调控作用值得后续深入分析研究。

3 外泌体 miRNA 作为阿尔茨海默病患者早期筛查生物标记物的应用

AD 患者在表现认知和记忆功能减退等症状之前,海马和前额叶皮层等脑区就已经出现 β 淀粉样

蛋白沉积形成细胞外斑块和 Tau 蛋白过度磷酸化形成细胞内神经纤维缠结等病理改变^[15]。因此早期筛查 AD 的生物标记物使用对疾病的预防治疗具有重要意义。Xing 等^[16]通过 meta 分析发现,外泌体 miRNA 生物标志物在 AD 尤其是轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 患者的早期筛查中具有潜在诊断价值。最新研究还发现,外泌体 miRNA 可以作为有效早期筛查生物标志物在 MCI 出现前 5~7 年检测出 AD 高患病率人群^[17]。外泌体在中枢神经系统中由神经元和胶质细胞合成释放后可以通过血脑屏障进入脑脊液或外周血液中,同时由于外泌体的双层磷脂酶层结构,可以使 miRNA 不被循环系统中的核糖核酸酶所降解^[18]。因此可以在 AD 患者的外周血液以及脑脊液中检测到外泌体 miRNA 的表达变化,对 AD 患者进行早期筛查从而达到预防治疗效果。

目前关于对临床常见样本的外泌体分离技术已逐渐成熟,主要分离方法有超速离心法、密度梯度分离法、尺寸排除色谱法、聚合物沉淀和免疫亲和力捕获法等^[19-20]。然而直接检测外泌体中的 miRNA 比较困难,并且在生物体液中,大多数体液循环的 miRNA 通常与蛋白质结合或被捕获在外泌体中^[18]。因此,需要特定的技术工具释放这些低分子量 RNA 分子才能对其进行分析和检测,这也是影响 AD 早期临床诊断效率的重要原因之一。但是随着生物技术和纳米医学的兴起,已经有多种新型检测方法被陆续研发使用,如电化学生物传感器、荧光生物传感器、表面等离子体共振生物传感器、DNA 纳米技术等^[21-23]。

3.1 外泌体 miRNA 在阿尔茨海默病患者血清和血浆的变化

血液外泌体是由活细胞分泌到循环血液中的细胞外囊泡,被认为是一种相对无创的监测脑生理和疾病状态的新型工具^[24]。越来越多的研究发现血液外泌体 miRNA 可能作为检测 AD 的重要生物标志物之一,Nie 等^[25]通过测序技术发现 AD 患者血浆中外泌体 miRNA 有 22 个表达上调和 21 个表达下调。此外,Lugli 等^[26]也检测到 AD 患者血浆外泌体 miRNA 有 20 个的表达发生变化。这两项研究数据中都显示外泌体 miR-34-3p 在 AD 患者血浆中表达下调,说明血浆外泌体 miR-342-3p 的表达变化与 AD 的病理过程密切相关。值得注意的是不同种族人群的 AD 患者外泌体 miRNA 表达谱变化还是

具有差异性,这也提示未来的研究还需要进一步精细不同种族人群 AD 患者的血液外泌体 miRNA 的诊断变化标准^[27]。同时,Cha 等^[28]利用 L1 细胞粘附分子 (L1 cell adhesion molecule, L1CAM) 抗体结合磁珠的方法捕获神经元来源的外泌体并发现 miR-212 和 miR-132 水平下调;Li 等^[29-30]神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecule, NCAM) / amphipysin 1 双标记方法检测 AD 患者血浆中外泌体 miR-29c 和 miR-384 的表达上升,并且与 A β 42、A β 42/40、Tau 和 P-T181-Tau 的表达呈正相关,这提示可以根据对不同细胞来源的血浆外泌体 miRNA 进行表达分析可能会使诊断结果更精准化。还有研究对 AD 患者血清中外泌体 miRNA 变化进行分析并发现 miR-135a 和 miR-384 表达上调,而 miR-193b 表达下调;同时,AD 患者血清外泌体 miR-384 的表达水平明显高于血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 和帕金森病伴痴呆 (Parkinson's disease with dementia, PDD) 患者^[31]。这说明多种血清外泌体 miRNA 的同时检测有可能会使 AD 的早期诊断方面更加具体化。另外,Wei 等^[32]发现 AD 患者血清外泌体 miR-223 表达降低,且与简易精神状态检查量表 (mini-mental state examination, MMSE) 评分、临床痴呆分级量表 (clinical dementia rating, CDR) 评分以及血清中炎症因子 IL-1 β , IL-6 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 表达水平呈负相关性。以上均提示血清外泌体 miRNA 也是一种具有潜在诊断价值的 AD 生物标记物。值得注意的是外周血外泌体中 miRNAs 的水平是否受性别、种族、年龄、受教育程度等因素的影响还亟待进一步研究。

3.2 外泌体 miRNA 在阿尔茨海默病患者脑脊液的变化

脑脊液含有一定的细胞及化学成分,病理情况下这些物质成分会发生改变,可以通过对脑脊液检测分析从而进行疾病的初步诊断^[33]。Gui 等^[34]通过提取 AD 患者脑脊液中的外泌体进行 miRNA 表达谱变化检测发现 AD 患者脑脊液中外泌体 miRNA 的表达与健康人群相比有 6 个 miRNA (miR-29c、miR-136-3p、miR-16-2、miR-331-5p、miR-132-5p 和 miR-485-5p) 表达水平发生改变。但是,Liu 等^[35]发现 AD 患者脑脊液中外泌体 miR-193b 的表达下降。而 McKeever 等^[36]在 AD 患者脑脊液中检测到外泌体 miR-605-5p、miR-451a、miR-125b-5p 和 miR-16-5p

的变化都发生了不同变化。造成这些研究结果出现差异性的原因,可能是由于不同样品中 miRNA 的稳定性和浓度差异以及分析方法使用多样性等因素造成,这些因素也阻碍了外泌体 miRNA 作为 AD 患者早期筛查的生物标志物在临床实践中的推广。

在临床诊断标准中将小于 65 岁的 AD 患者归类为早发型 AD (young-onset Alzheimer's disease, YOAD),而将大于 65 岁的 AD 患者归类为晚发型 AD (late-onset Alzheimer's disease, LOAD)。在 YOAD 患者脑脊液中外泌体 miR-16-5p 的表达下降,而在 LOAD 中没有发现这种变化^[36]。Schneider 等^[37]发现脑脊液外泌体 miR-204-5p 和 miR-632 可能是遗传性额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia, FTD) 的诊断生物标志物,而 miR-632 可能是散发性 FTD 的诊断生物标志物。以上提示不同病程阶段或不同类型的 AD 可以使用多种特异性外泌体 miRNA 作为生物标记物进行早期筛查。此外, Riancho 等^[38]发现 AD 患者脑脊液外泌体中 miR-9 和 miR-598 的含量明显高于无外泌体的脑脊液中 miR-9 和 miR-598 的含量,提示这两种 miRNA 可能被选择性包裹在外泌体中。虽然这些研究发现了 AD 患者脑脊液中外泌体 miRNA 的差异表达变化,为 AD 早期筛查方法提供新的参考。但目前临床抽取脑脊液需要进行有创操作,具有一定的难度和风险,因此在早期筛查中具有局限性,选择外周血液外泌体 miRNA 作为 AD 的特异性标记物比脑脊液外泌体 miRNA 更具优势。与此同时,尿常规也是临床检测中常用手段, Song 等^[39]在 5x FAD 小鼠模型尿液中发现 48 种外泌体 miRNA 表达发生变化,并且周颖等^[40]已经在 AD 患者的尿液中成功提取出外泌体。未来可以对 AD 患者尿液中外泌体 miRNA 表达是否发生变化展开进一步研究工作。

4 间充质干细胞来源外泌体 miRNA 作为阿尔茨海默病潜在治疗方法的研究前景

改善 AD 治疗有效性的主要困难之一就是缺乏有效转运载体来运输药物穿过血脑屏障进入中枢神经系统发挥治疗功效。作为纳米载体的外泌体具有免疫原性低和天然稳定性好的特点,同时不会被单核巨噬细胞系统所吞噬且运输效率高并能穿过血脑屏障^[41]。近年研究报告,通过转染技术使 MSC 内的 miRNA 表达升高或降低,随后提取的外泌体都检测到 miRNA 发生相应的变化并将其通过不同的方式注射到 AD 大鼠体内可以改善其学习记

忆功能^[42]。将 MSC 来源的外泌体注射到 AD 大鼠海马 CA1 区,观察到过表达 miR-29b 的外泌体可以降低 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1) 和 Bcl-2 相互作用细胞凋亡介导因子 (Bcl-2 interacting mediator of cell death, BIM) 的表达,减少 A β 的形成和神经元丢失从而改善空间学习记忆能力^[43]。Ma 等^[44]通过尾静脉注射过表达 miR-132-3p 的外泌体后发现靶基因 Ras p21 蛋白活化子 1 (Ras p21 protein activator 1, RASA1) 在 VD 小鼠海马和皮质区域的表达减少, Ras/Akt/GSK-3 β 信号通路激活,导致海马和皮质区域的树突分支和树突棘数量增加且神经元凋亡率降低,从而减轻学习记忆能力下降症状。Nakano 等^[45]将过表达 miR-146a 的骨髓 MSC (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSC) 注射到 APP/PS1 小鼠的侧脑室脉络丛中,突触数量恢复正常,提高学习记忆能力的同时也可以检测在脑脊液中检测到外泌体中的 miR-146a 表达也增加;随后在体外实验中观察到, BM-MSC 分泌的外泌体 miR-146a 作用于星形胶质细胞,导致靶基因肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 的表达下降,核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 生成减少从而减轻神经炎症反应;值得注意的是 A β 的生成和神经元丢失的病变情况并没有得到改善,可能的原因是不同的外泌体 miRNA 改善 AD 症状的机制不相同或者使用不同类型的 AD 动物模型所导致。然而 AD 的病理机制复杂,目前常用实验动物模型并不能很好地模拟 AD 患者的所有临床分期的特点和病理特征。例如 Wenger 等^[46]使用基于定性和定量质谱的蛋白质组学方法对两种常用的 AD 小鼠模型 (Thy1-hTau. P301 S 和 rTg (tauP301 L) 4510) 进行深入分析发现这两种 AD 小鼠模型在疾病期间都会积累不溶性 Tau 种类,这反映了人类 AD 早期阶段携带 P301 L Tau 突变的病理学特征。然而,对于人类 AD 晚期阶段很重要的 Tau 泛素化和乙酰化在小鼠模型中没有表现出来^[46]。因此外泌体 miRNA 是否可以作为 AD 的一种临床治疗手段还需要在临床试验中进一步验证。

虽然外泌体是 miRNA 的一种理想转运载体,但在实际应用上 miRNA 的装载效率并不高,并且静脉注射的方式会使经过循环系统传递后的外泌体被肝、肾和脾等其他器官所摄取^[47]。因此如何提高外

泌体的装载效率以及精准靶向且高效运输至病变脑区是需要未来不断完善解决的技术问题。近年有研究报告,外界条件干预可以影响外泌体内 miRNA 的含量^[48]。与正常氧处理组相比,低氧预处理 MSC 可以使分泌的外泌体内 miR-21 的表达增加,并且能更好恢复 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力。此外,利用基因工程方法在外泌体表面添加生物分子可以改变其靶向能力。使用狂犬病病毒糖蛋白(rabies viral glycoprotein, RVG)多肽修饰 MSC 来源的外泌体可以提高静脉注射后靶向 APP/PS1 小鼠海马和皮质区域的数量,更有效地抑制星形胶质细胞活化和减少 A β 沉积^[49]。

5 总结与展望

综上所述,在 AD 患者的早期阶段,脑脊液和外周血液中的外泌体 miRNA 表达发生变化,可以作为早期诊断 AD 的有效生物标记物;并且作为小分子物质的外泌体能穿过血脑屏障,可以将装载 miRNA 的外泌体作为一种小分子治疗药物靶向输送至受损脑区,从而为临床诊治 AD 提供一种新的方案。但外泌体 miRNA 作为一种基因治疗方法在临床的应用仍然存在一些疑问。例如 miRNA 通常可以同时调节许多下游靶基因,然而不同靶基因之间的相互作用是否可以影响治疗效果知之甚少。同时由于这种生物特性,外泌体 miRNA 的治疗方法是否还存在副作用也需要在未来动物实验和临床试验中留意。

参考文献:

- [1] Hill AF. Extracellular vesicles and neurodegenerative diseases [J]. J Neurosci, 2019, 39(47): 9269-9273.
- [2] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [3] Dong X. Current strategies for brain drug delivery [J]. Theranostics, 2018, 8(6): 1481-1493.
- [4] Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 645(1): 63-70.
- [5] Li C, Ni YQ, Xu H, et al. Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 383.
- [6] He M, Zhang HN, Tang ZC, et al. Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases [J]. Neural Plast, 2021, 2021: 8884642.
- [7] Wang X, Zhou Y, Gao Q, et al. The role of exosomal

- microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3232869.
- [8] Babcock KR, Page JS, Fallon JR, et al. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(4): 681-693.
- [9] Sung PS, Lin PY, Liu CH, et al. Neuroinflammation and neurogenesis in Alzheimer's disease and potential therapeutic approaches [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 701.
- [10] Abdullah M, Takase H, Nunome M, et al. Amyloid- β reduces exosome Release from Astrocytes by enhancing JNK phosphorylation [J]. J Alzheimers Dis, 2016, 53(4): 1433-1441.
- [11] Gayen M, Bhomia M, Balakathiresan N, et al. Exosomal microRNAs released by activated astrocytes as potential neuroinflammatory biomarkers [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2312.
- [12] Morel L, Regan M, Higashimori H, et al. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1 [J]. J Biol Chem, 2013, 288(10): 7105-7116.
- [13] Ge X, Guo M, Hu T, et al. Increased microglial exosomal miR-124-3p alleviates neurodegeneration and improves cognitive outcome after mTBI [J]. Mol Ther, 2020, 28(2): 503-522.
- [14] Micci MA, Krishnan B, Bishop E, et al. Hippocampal stem cells promotes synaptic resistance to the dysfunctional impact of amyloid beta oligomers via secreted exosomes [J]. Mol Neurodegener, 2019, 14(1): 25.
- [15] Reiman EM, Quiroz YT, Fleisher AS, et al. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study [J]. Lancet Neurol, 2012, 11(12): 1048-1056.
- [16] Xing W, Gao W, Lv X, et al. The diagnostic value of exosome-derived biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 637218.
- [17] Jia L, Zhu M, Yang J, et al. Exosomal microRNA-based predictive model for preclinical Alzheimer's disease: a multicenter study [J]. Biol Psychiatry, 2022, 92(1): 44-53.
- [18] Pishbin E, Sadri F, Dehghan A, et al. Recent advances in isolation and detection of exosomal microRNAs related to Alzheimer's disease [J]. Environ Res, 2023, 227: 115705.
- [19] Manna I, De Benedittis S, Quattrone A, et al. Exosomal miRNAs as potential diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2020, 13(9): 243.
- [20] Wang J, Yue BL, Huang YZ, et al. Exosomal RNAs: novel potential biomarkers for diseases-a review [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2461.
- [21] Song S, Lee JU, Jeon MJ, et al. Detection of multiplex exosomal miRNAs for clinically accurate diagnosis of Alzheimer's disease using label-free plasmonic biosensor based on DNA-Assembled advanced plasmonic architecture [J]. Biosens Bioelectron,

- 2022, 199; 113864.
- [22] Song S, Lee JU, Jeon MJ, et al. Precise profiling of exosomal biomarkers via programmable curved plasmonic nanoarchitecture-based biosensor for clinical diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 230; 115269.
- [23] Zhou J, Sun Y, Zhang J, et al. Dumbbell aptamer sensor based on dual biomarkers for early detection of Alzheimer's disease [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15 (13): 16394–16407.
- [24] Dong Z, Gu H, Guo Q, et al. Profiling of serum exosome MiRNA reveals the potential of a MiRNA panel as diagnostic biomarker for Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(7): 3084–3094.
- [25] Nie C, Sun Y, Zhen H, et al. Differential expression of plasma exo-miRNA in neurodegenerative diseases by next-generation sequencing [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 438.
- [26] Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, et al. Plasma exosomal miRNAs in persons with and without Alzheimer disease; altered expression and prospects for biomarkers [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139233.
- [27] Wang L, Zhen H, Sun Y, et al. Plasma exo-miRNAs correlated with AD-related factors of Chinese individuals involved in A β accumulation and cognition decline [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(11): 6790–6804.
- [28] Cha DJ, Mengel D, Mustapic M, et al. miR-212 and miR-132 are downregulated in neurally derived plasma exosomes of Alzheimer's patients [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1208.
- [29] Li Y, Xia M, Meng S, et al. microRNA-29c-3p in dual-labeled exosome is a potential diagnostic marker of subjective cognitive decline [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 171: 105800.
- [30] Li Y, Meng S, Di W, et al. Amyloid- β protein and microRNA-384 in NCAM-Labeled exosomes from peripheral blood are potential diagnostic markers for Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(7): 1093–1107.
- [31] Yang TT, Liu CG, Gao SC, et al. The serum exosome derived microRNA-135a, -193b, and-384 were potential Alzheimer's disease biomarkers [J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(2): 87–96.
- [32] Wei H, Xu Y, Xu W, et al. Serum exosomal miR-223 serves as a potential diagnostic and prognostic biomarker for dementia [J]. *Neuroscience*, 2018, 379: 167–176.
- [33] Riancho J, Santurtun A, Sánchez-Juan P. Characterization of Alzheimer's disease micro-RNA profile in exosome-enriched CSF samples [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2044: 343–352.
- [34] Gui Y, Liu H, Zhang L, et al. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37043–37053.
- [35] Liu CG, Song J, Zhang YQ, et al. microRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10 (5): 2395–2400.
- [36] McKeever PM, Schneider R, Taghdiri F, et al. microRNA expression levels are altered in the cerebrospinal fluid of patients with young-onset Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(12): 8826–8841.
- [37] Schneider R, McKeever P, Kim T, et al. Downregulation of exosomal miR-204-5p and miR-632 as a biomarker for FTD: a GENFI study [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2018, 89 (8): 851–858.
- [38] Riancho J, Vázquez-Higuera JL, Pozueta A, et al. microRNA profile in patients with Alzheimer's disease; analysis of miR-9-5p and miR-598 in raw and exosome enriched cerebrospinal fluid samples [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(2): 483–491.
- [39] Song Z, Qu Y, Xu Y, et al. Microarray microRNA profiling of urinary exosomes in a 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(3): 233–242.
- [40] 周颖, 王周凡, 朱焰, 等. 阿尔茨海默病患者血清及尿液中外泌体的提取鉴定 [J]. *山东医药*, 2018, 58(35): 58–60.
- [41] Kim J, Lee Y, Lee S, et al. Mesenchymal stem cell therapy and Alzheimer's disease: current status and future perspectives [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 77(1): 1–14.
- [42] Nakano M, Fujimiya M. Potential effects of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles and exosomal miRNAs in neurological disorders [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12): 2359–2366.
- [43] Jahangard Y, Monfared H, Moradi A, et al. Therapeutic effects of transplanted exosomes containing miR-29b to a rat model of Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 564.
- [44] Ma X, Wang Y, Shi Y, et al. Exosomal miR-132-3p from mesenchymal stromal cells improves synaptic dysfunction and cognitive decline in vascular dementia [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 315.
- [45] Nakano M, Kubota K, Kobayashi E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by increasing the expression of microRNA-146a in hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 10772.
- [46] Wenger K, Viode A, Schlaffner CN, et al. Common mouse models of tauopathy reflect early but not late human disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2023, 18(1): 10.
- [47] Lai CP, Mardini O, Ericsson M, et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles *in vivo* using a multimodal imaging reporter [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(1): 483–494.
- [48] Cui GH, Wu J, Mou FF, et al. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice [J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 654–668.
- [49] Cui GH, Guo HD, Li H, et al. RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Immun Ageing*, 2019, 16: 10.

苏黑艳·帕尔哈提,张姣姣,马壮,等. 肠道微生物菌群与肥胖相关代谢性疾病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (10): 146-154.

Suheian P, Zhang JJ, Ma Z, et al. Research progress on gut microbiota and obesity-related metabolic diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 146-154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.019

肠道微生物菌群与肥胖相关代谢性疾病的研究进展

苏黑艳·帕尔哈提¹,张姣姣¹,马 壮²,王俊人¹,李艳红^{1*}

(1.新疆特殊环境物种多样性应用与调控实验室,新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室,
新疆师范大学生命科学学院,乌鲁木齐 830054;2.新疆师范大学体育学院运动人体科学重点实验室,乌鲁木齐 830054)

【摘要】 以肥胖为中心的糖尿病、高血压和癌症等代谢性疾病在全球范围内正以惊人的速度增长,已成为全球公共健康问题。肥胖及相关代谢性疾病的治疗逐渐成为了研究热点。目前,越来越多的研究证明肠道微生物菌群可调节能量平衡和糖脂代谢,并调节肥胖及相关代谢性疾病的发生和发展。肠道微生物菌群很有可能是治疗和防控代谢性疾病的潜在新靶标。本文总结了肠道微生物菌群在肥胖相关代谢性疾病发生发展中的研究进展,并分析了肠道微生物菌群在代谢性疾病中的作用。

【关键词】 肠道微生物菌群;肥胖;代谢性疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0146-09

Research progress on gut microbiota and obesity-related metabolic diseases

SUHEIYAN Perhat¹, ZHANG Jiaojiao¹, MA Zhuang², WANG Junren¹, LI Yanhong^{1*}

(1. Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, Xinjiang Key Laboratory of Special Conservation and Regulatory Biology, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China.
2. Key Laboratory of Sports Human Sciences, Institute of Physical Education, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054)

【Abstract】 Obesity-centered metabolic diseases, such as diabetes, hypertension, and cancer, are increasing at an alarming rate worldwide and have become global public health concerns. The treatment of obesity and related metabolic diseases has gradually become a research hotspot. Currently, an increasing number of studies have shown that gut microbiota regulates energy balance, glycolipid metabolism, and the occurrence and development of obesity and related metabolic diseases. It is very likely that the gut microbiota is a potential new target for the prevention and treatment of metabolic diseases. In this article, we summarize the research progress of gut microbiota in the development and progression of obesity-associated metabolic diseases and analyze the role of gut microbiota in metabolic diseases.

【Keywords】 gut microbiota; obesity; metabolic diseases

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肥胖作为一种代谢性疾病,主要特征是能量平衡动态被破坏,能量摄入超过能量消耗^[1]。据报道,全世界大约有 13%的成年人患有肥胖症^[2]。我国超重/肥胖的患病率逐年增长。2020 年我国成年人超重/肥胖率超过 50%^[3]。另外,肥胖还是导致 2 型糖尿病、高血压、癌症等代谢性疾病风险增加的元凶之一。2019 年中国因代谢性疾病死亡人数占总死亡人数的 88.5%^[3]。代谢性疾病已成为威胁

[基金项目]新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2022D01A100);新疆自治区高校科研计划项目(XJEDU2023J031);新疆师范大学 2022 年硕士研究生科研创新项目(XSY202201008)。

[作者简介]苏黑艳·帕尔哈提(1999—),女,硕士,研究方向:应用生物化学。E-mail:3434990738@qq.com

[通信作者]李艳红(1981—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:应用生物化学。E-mail:496917835@qq.com

生命和健康的主要疾病。

近年来,诸多研究表明,肠道微生物菌群及其代谢物(特别是短链脂肪酸和胆汁酸)在肥胖及相关代谢性疾病的发生和发展中发挥着重要的作用^[4-6]。因此,充分了解肠道微生物菌群与代谢相关疾病的联系,有助于对代谢性疾病的预防、诊断和治疗。本文梳理了肠道微生物菌群在肥胖相关代谢性疾病发生发展中的作用及机制研究。

1 肠道微生物的概念、组成及功能

肠道微生物(gut microbes, GM)指人类胃肠道内存在的所有微生物的遗传组成,包括细菌、病毒、酵母、原生动物、真菌和古菌^[7]。胃肠道(gastrointestinal tract, GIT)内的细菌细胞是宿主细胞的 10 倍,而且在 GIT 内的细菌基因组是宿主基因组的 100 倍以上^[8]。Eckburg 等^[9]对健康成年人的粪便进行分析发现,肠道微生物组在系统发育地位上基本分为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微球菌门和梭杆菌门六大门,以厚壁菌门和拟杆菌门为主,占据了肠道微生物的 80%~90%。厚壁菌门和拟杆菌门对人体的健康尤为重要,如厚壁菌门具有许多发酵膳食纤维的基因,并且还可以与肠粘膜相互作用,从而有助于体内平衡^[10]。杆菌门都具有多糖利用能力,可以为其他细菌提供营养,同时拟杆菌可加速肠粘膜中的血管生成,提高宿主免疫力,并维持肠道微生态平衡^[11]。

GM 是宿主与微生物长期协同进化中相互选择和适应的结果。正常情况下,GM 与宿主机体处于共生关系,GM 参与机体的各种代谢,帮助人体将不可消化的食物成分发酵成可吸收的代谢物、合成必需维生素、去除有毒化合物、抵抗病原体、加强肠道屏障和刺激以及调节免疫系统^[12-14]。肠道微生物代谢产物短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)、胆汁酸(bile acids, BA)、吲哚衍生物等在维持宿主健康方面也发挥着重要作用。SCFA 是由肠道微生物群发酵不溶性膳食纤维和难消化多糖产生的具有少于 6 个碳原子数的代谢物,主要包括乙酸盐、丙酸盐、丁酸盐、戊酸盐、丙二酸盐等^[15]。其中,乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐是三种主要 SCFA,占肠道微生物产生 SCFA 的 90%左右^[16]。丁酸盐主要由厚壁菌门产生,是结肠细胞的重要能量来源并维持肠道中的厌氧环境;丙酸盐和乙酸盐分别由黏蛋白-阿克曼菌、醋杆菌、葡糖杆菌等产生,在肠内稳态中也

起重要作用,还增强肠屏障功能并有助于防御病原体^[15,17]。胆汁酸等其他代谢产物在调节炎症反应,提高免疫力等方面发挥着作用。因此,GM 失调会引起肠道微生物代谢产物的变化,进而导致各种代谢性疾病^[18]。

2 肠道微生物与肥胖及相关代谢性疾病

代谢性疾病以肥胖为中心,会引发或加剧全身代谢稳态有关的组织和器官的炎症反应,当炎症持续存在时,导致局部脂肪沉积,降低胰岛素敏感和增强全身性代谢异常,从而发展成代谢性疾病^[19]。在多种代谢性疾病研究中发现,其肠道微生物菌群发生变化,参与代谢性疾病的发生和发展(表 1)。

2.1 肠道微生物与肥胖

肥胖已成为世界范围内主要公共健康问题,是脂肪堆积过多导致的疾病,会提高患代谢性疾病的风险,如高血压、癌症等^[29]。越来越多的研究表明,肥胖与肠道微生物失调有关。Rasmussen 等^[30]发现,分别将正常小鼠和运动小鼠的 GM 移植到高脂喂养的肥胖小鼠中,能有效降低肥胖小鼠的体重和脂肪含量。Kulecka 等^[20]发现,将正常小鼠的 GM 移植到肥胖小鼠后,肥胖小鼠体重明显下降,并且肠道菌群的丰富度也上升。Ley 等^[31]对肥胖 ob/ob 小鼠、瘦 ob/+小鼠和野生型同胞小鼠的盲肠微生物进行 16 S rRNA 基因序列分析,发现肥胖小鼠的拟杆菌门丰度减少了 50%,而厚壁菌门则成比例增加,认为厚壁菌门/拟杆菌门的增加可能导致肥胖。

2.2 肠道微生物与 2 型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)

肥胖状态下,因机体的脂肪含量增多,容易导致胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗是发展成为 T2DM 的主要因素。最近研究表明,肠道微生物群在 T2DM 发病机制中发挥重要作用^[21]。Almugadam 等^[32]研究发现,T2DM 患者的肠道微生物群的丰富度(粪杆菌属、梭杆菌属、小类杆菌属等)和多样性与健康人相比均显著下降。最近一项研究显示,T2DM 患者中丰富的变形杆菌(*Proteobacteria*)、厚壁菌/拟杆菌(*Firmicutes/Bacteroidetes*, F/B)之比均高于健康受试者^[33]。另有研究表明,T2DM 患者肠道内产生丁酸的罗氏菌属(*Roseburia*)丰度下降,而乳杆菌属(*Lactobacillus*)富集,与血糖增量呈正相关^[22]。

2.3 肠道微生物与高血压(hypertension, HTN)

基于人群及动物模型的研究表明,HTN 与肠道

表 1 肥胖及相关代谢性疾病中肠道微生物变化
Table 1 Gut microbial changes in obesity and related metabolic diseases

代谢性疾病 Metabolic diseases	肥胖 ^[2, 20] Obesity	二型糖尿病 ^[21-22] Type 2 diabetes	高血压 ^[23] Hypertension	脂肪肝 ^[24-25] Fatty liver	高血脂 ^[26] Hyperlipidemia	癌症 ^[27-28] Cancer
肠道微生物 Gut microbes						
<i>p_ Firmicutes</i>	↑	↑	↑	↑	↓	↓
<i>p_ Bacteroidota</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↑
<i>p_ Proteobacteria</i>	/	↑	/	/	↑	↑
<i>p_ Actinobacteriota</i>	↓	↑	↓	/	/	↓
<i>g_ Erysipelotrichaceae</i>	↑	/	/	/	/	/
<i>g_ Clostridiaceae</i>	↑	/	/	/	/	/
<i>g_ Verrucomicrobiaceae</i>	↓	/	/	↑	/	/
<i>g_ Bifidobacterium</i>	↑	↑	↓	/	/	/
<i>g_ Coprococcus</i>	/	↑	↓	/	/	/
<i>g_ Roseburia</i>	/	↓	/	↑	/	/
<i>g_ Lactobacillus</i>	/	↑	/	↓	/	/
<i>g_ Pseudobutyrvibrio</i>	/	/	↓	/	↑	/
<i>g_ Alloprerotella</i>	/	/	/	↑	↑	/

注：“↑”表示微生物被显著富集；“↓”表示微生物被显著减少。
Note. “↑” indicates that the microorganism is significantly enriched. “↓” indicates that the microorganism is significantly reduced.

菌群组成、丰富度、多样性及代谢产物短链脂肪酸密切相关。研究表明,短链脂肪酸(SCFA)影响宿主代谢和炎症反应,同时 SCFA 可以抑制血管扩张,从而降低 HTN^[34]。另一项研究发现,自发性高血压大鼠的肠道微生物丰富度,多样性降低,F/B 比值有所提高产生乙酸盐和丁酸盐的细菌(放线菌和双歧杆菌)减少,而产生乳酸的细菌增多^[23]。一项类似的研究表明,补充丙酸盐可以有效地减少 HTN,炎症反应和心脏损伤^[35]。

2.4 肠道微生物与非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

许多动物模型实验表明肠道微生物群及其代谢物在 NAFLD 的发病中也起着重要的作用。Le Roy 等^[24]发现,将 NAFLD 小鼠的粪便微生物群移植到野生型小鼠体内会导致 NAFLD。另一项研究发现,患有脂肪肝的肥胖小鼠粪便移植到无菌小鼠后,肝甘油三酯(triglyceride, TG)水平升高且与脂肪生成相关基因表达上调。最近一项研究发现,脂肪肝变性小鼠盲肠内容物厚壁菌门(*Firmicutes*)和疣微菌(*Verrucomicrobia*)增加,导致结合型胆汁酸(Conjugated bile acids, CBA)的增加,从而发展为脂肪肝变性^[25]。已有研究表明,肠道微生物与 NAFLD 密切相关,但哪种菌属会引起 NAFLD 还需进一步研究。

2.5 肠道微生物与高血脂

高血脂是代谢紊乱的常见症状,通常伴随肥胖、高血压、2 型糖尿病和非酒精性疾病。高血脂是动脉粥样硬化性心血管疾病的主要因素。研究指出,高脂肪和高胆固醇饮食以各种方式改变肠道微生物菌群,如降低厚壁菌门(*Firmicutes*)与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的比例、减少 α 多样性、抑制产 SCFA 的细菌等。推断肠道微生物与高血脂有关。Yan 等^[26]研究发现,对高脂血症小鼠灌胃益生菌发酵米荞麦,能降低厚壁菌门(*Firmicutes*)与拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的比例,增加产 SCFA 的细菌,抑制肝胆固醇合成和脂肪生成并促进脂肪分解,从而改善高血脂。An 等^[36]研究表明,豆豉通过调节肠道菌群来调节脂质代谢,降低血清炎症因子水平起到抗高血脂的作用。

2.6 肠道微生物与癌症

癌症是一种异常细胞无限增生的疾病,是全世界各种代谢性疾病中死亡率最高的疾病之一。多项研究表明,胃癌、大肠癌等多种癌症的发生、发展与肠道微生物菌群相关。研究发现,幽门螺杆菌通过细胞毒素影响胃癌的进展^[27]。结直肠癌患者体内产生 SCFA 的有益菌水平较低。小鼠模型中膳食纤维以微生物和丁酸盐依赖的方式预防结直肠肿瘤^[28]。最近一项研究显示,与健康人相比,肺癌患

者肠道中普拉梭菌、普雷沃氏菌、罗氏菌、罕见小球菌等产 SCFA 和抗炎细菌的数量减少,而一些致病菌则更为富集^[37]。

3 肠道微生物影响代谢性疾病的机制分析

3.1 影响能量平衡

影响能量平衡的机制主要包括以下几个方面(图 1)。

3.1.1 影响能量摄入

SCFA 被认为通过刺激肠道激素的释放来调节食欲。研究表明,中枢神经系统中的 SCFA 对能量稳态有直接影响。在中枢神经系统中,下丘脑的弓状核(arcuate nucleus,ARC)是调节食欲信号的关键核,ARC 中有 2 个神经元群体接收营养状态信号:阿片促黑色素原和可卡因-安他非明转录调节肽(pro-opiomelanocortin/cocaine and amphetamine regulated transcript,POMC/CART)和刺鼠相关蛋白和神经肽 Y(agouti related peptide/neuropeptide Y,AgRP/NPY)的神经元。在下游的二级神经元中,POMC/CART 和 AgRP/NPY 神经元释放信号分子与相应的受体竞争性结合,从而调节食欲来影响能量摄入^[38-40]。

SCFA 是 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors,GPCRs)的配体,在肠道内 L 分泌细胞中表达。有研究表明,SCFA 与结肠细胞中的特异性 G 蛋白偶联受体 GPR-41、GPR-43 结合,刺激肠激素释放胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)和肽 YY(peptide YY,PYY),GLP-1 和 PYY 穿过血脑屏障与中枢神经系统中的受体结合并调节

POMC/CART 或 AgRP/NPY 神经元状态,从而作用于肠-脑轴来促进肠蠕动和营养吸收^[38,41]。另一项研究表明,SCFA 也可以通过迷走神经影响能量摄入。SCFA 增加 $[Ca^{2+}]_i$,钙水平升高影响肌醇 1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor,IP3R)和兰尼碱受体(ryanodine receptor,RyR),产生钙波,将信号传递到中枢神经系统并促进神经递质的释放,从而影响能量摄入^[38,42]。最近的一项研究表明,调节肠道菌群及代谢产物能激活肠道 AMPK $\alpha 1$,从而促进棕色脂肪组织的产热^[43]。

3.1.2 影响能量消耗

当机体内能量摄入超过能量消耗时促进各种代谢性疾病的发展。研究表明,肠道微生物代谢产物 SCFA 和 BA 具有调节能量消耗的作用。研究发现,BA 能够通过法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor,FXR)和 G 蛋白偶联胆汁酸受体 1(G protein-coupled bile acid receptor,GPBAR1,又称 TGR5)调节脂质的积累^[34,44]。BA 与 TGR5 结合导致 cAMP 积累,cAMP 激活蛋白激酶 A(protein kinase A,PKA),从而调节能量消耗^[34]。Parsús 等^[44]研究发现,肠道微生物菌群以 FXR 依赖的方式促进体重增加和肝脂肪变性。

此外,研究发现,从肠道吸收的 SCFA 进入静脉并转到肝,激活 AMPK 途径,降低过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ ,PPAR γ)活性和增加过氧化物酶体增殖物激活受体- α (peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha,PPAR α)活性,导致解偶联蛋白 2(uncoupling protein,UCP2)的上调表达,从而增加能



图 1 肠道微生物及其代谢产物影响能量平衡

Figure 1 Gut microbes and their metabolites affect energy balance

量消耗^[45]。Luo 等^[46]发现,高脂饮食诱导的 NAFLD 小鼠灌胃阿魏酸能通过激活 PPAR α ,增加能量消耗并减少肝中 TG 的积累来有效预防 NAFLD。说明,肠道微生物代谢产物 SCFA 和 BA 在维持机体能量平衡中发挥着重要作用。

3.2 影响葡萄糖稳态

肠道微生物衍生的 SCFA 和 BA 以多种方式影响葡萄糖稳态,见图 2。研究表明,SCFA 可作为底物前体参与糖异生。例如:肝中,丙酸盐可通过生物素转化为琥珀酰辅酶 a 参与 TCA 循环,增加草酰乙酸,从而促进糖异生^[38]。研究发现,SCFA 可激活游离脂肪酸受体 3(free fatty acid receptor 3,FFAR3)刺激内分泌细胞释放肠激素 PYY,增强肌肉和脂肪组织对葡萄糖的吸收^[47]。Barrera 等^[48]研究发现,SCFA 能够激活游离脂肪酸受体 2(free fatty acid receptor 2,FFAR2),促进其分泌 GLP-1,增加胰岛素的释放。最近研究表明,膳食补充丁酸盐或丙酸盐可改善饮食诱导肥胖小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性^[49]。另一项研究发现,在遗传性肥胖糖尿病 db/db 小鼠中补充丁酸盐并没有改善 HFD 诱导的体重增加,但改善了血糖和胰岛素^[50]。此外,葡萄糖稳态与 AMPK 的激活有关。Hardie 等^[51]指出在骨骼肌中 AMPK 激活,抑制糖原和蛋白质合成,促

进葡萄糖转运和脂肪酸氧化。Sakakibara 等^[52]发现在肝中,AMPK 激活降低了葡萄糖 6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase,G6Pase)和磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK)基因表达。

此外,研究证明,BA 能够通过激活 TGR5 增加 GLP-1 的合成,从而增加棕色脂肪和肌肉组织能量消耗,增加胰高血糖素样肽来调节葡萄糖稳态^[53]。繁殖或喂食高脂肪饮食的遗传性肥胖小鼠中 FXR 缺陷可以预防,并改善葡萄糖平衡^[44],表明 FXR 能够抑制 GLP-1 合成^[53]。因此,目前研究表明 TGR 5 和 FXR 对 GLP-1 信号传导具有相反作用。

3.3 增强肠道屏障功能

肠道微生物失调导致肠道屏障损坏和通透性增加。研究表明,zonulin 家族作为调节肠道通透性的蛋白质,与多种自身免疫性和代谢性疾病相关^[54]。研究发现,产生丁酸盐的肠道细菌能够通过降低 zonulin 水平和炎症来改善肠道通透性^[55]。丁酸盐能够通过上调 ZO1 和 claudin-1 的表达改善肠膜的完整性^[56]。鞭毛蛋白、脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)和肽聚糖能够通过 与肠细胞上的 Toll 样受体(toll-like receptors,TLR)结合并诱导抗菌蛋白的产生,进而加强肠道屏障^[57]。

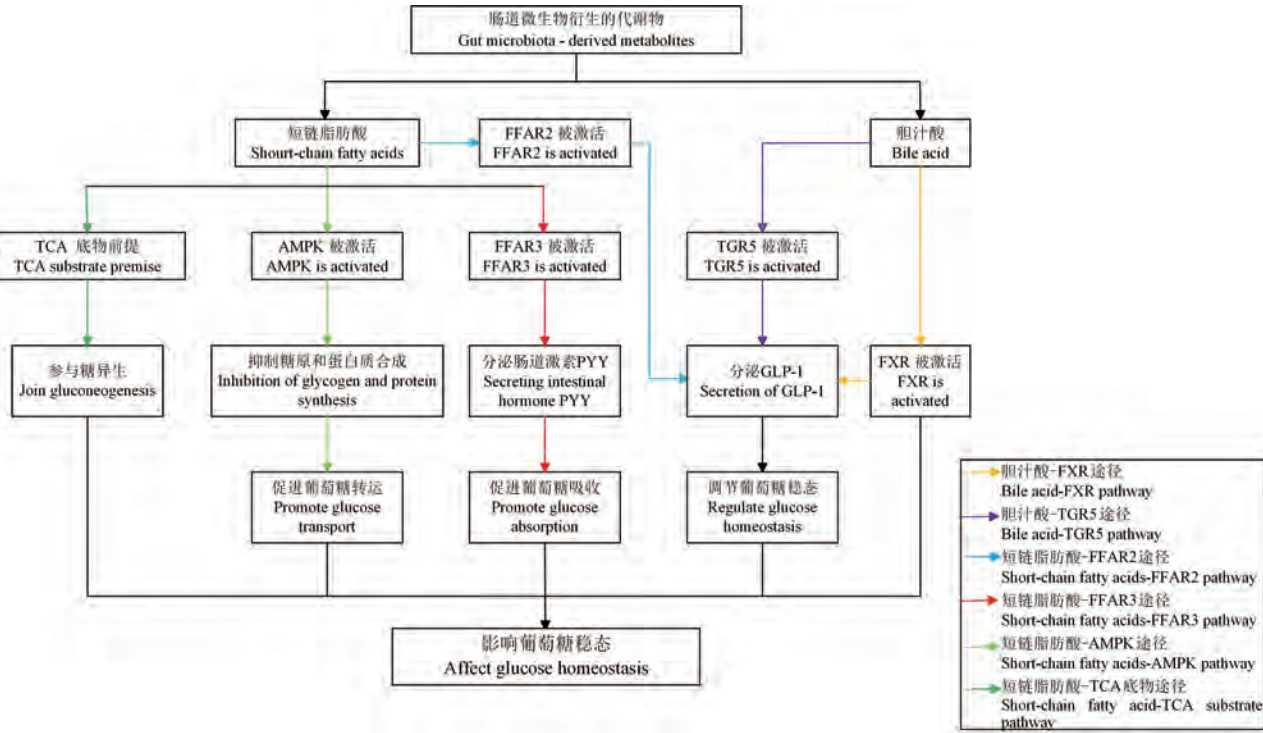


图 2 肠道微生物及其代谢物影响葡萄糖稳态的方式

Figure 2 Ways in which gut microbes and their metabolites influence glucose homeostasis

SCFA 能够抑制 LPS 诱导的 NLRP3 炎性体的激活和自噬来保护肠道屏障功能^[58]。最近研究表明,肠道微生物代谢产物吲哚-3-丙酸(3-Indolepropionic acid, IPA)能够通过激活异生素传感器孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)调节肠屏障功能,进一步抑制 TLR 4 信号通路^[59]。因此,肠道微生物及其代谢产物可以通过 zonulin 家族或调节相关信号通路来改善肠道屏障通透性。

3.4 调节炎症反应

慢性炎症是引发各种代谢性疾病的关键因素。研究表明肠道微生物代谢产物 SCFA、BA、IPA、吲哚-3 甲醛(indole-3-carboxaldehyde, I3A)等具有抗炎作用。SCFA 可以通过游离脂肪酸受体(free fatty acid receptor, FFAR)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDAC)抑制 LPS 诱导的炎症。Masui 等^[60]研究发现醋酸盐能够通过激活 FFAR 受体抑制 LPS 诱导的小鼠和人类单核细胞分泌 TNF-α。丁酸盐和丙酸盐抑制 TNF-α 的分泌和 NF-κB 的活性。同时 HDAC 能够抑制因 LPS 激活而上调的单核细胞和中性粒细胞中抗炎因子 IL-10 的表达^[47]。Biagioli 等^[61]研究发现 ACE2 以 GPBAR1(也称为 TGR5)依赖的方式调节肠道炎症,这种调节是由 GPBAR1-GLP-1 轴介导的。肝细胞在脂质负荷下, I3A 能够依赖芳香烃受体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)的方式减弱炎症反应,同时降低脂肪酸合酶和固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol

regulatory element binding protein 1 c, SREBP-1c)的表达^[62]。此外,Zhao 等^[63]研究发现 IPA 能够抑制 NF-κB 信号传导,降低促炎细胞因子 TNFα、IL-1β 和 IL-6 的含量,从而抑制肝炎症和肝损伤。

3.5 对免疫系统的影响

3.5.1 对 Treg 和 Th17 细胞的影响

正常情况下,宿主免疫反应与健康的肠道菌群保持平衡的稳态关系^[64]。肠道菌群的变化可导致慢性免疫应答和多种代谢疾病。肠道微生物通过促进 CD4⁺T 细胞不同亚群的生成(Th17 和 Treg 细胞等),参与癌症、2 型糖尿病及全身慢性炎症等多种疾病的发病^[64]。研究发现,炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者的发炎肠粘膜和外周血 CD4⁺T 细胞中 G 蛋白偶联受体 65(G protein-coupled receptor 65, GPR65)的表达增加,会显著促进 CD4⁺T 细胞分化为 Th1 和 Th17 细胞,并提高 Th17 的致病性并诱导 T 细胞凋亡^[65]。此外,在肥胖人群和 T2DM 患者的脂肪组织中观察到 Th17 细胞富集和 Treg 细胞减少^[66],Th17 细胞通过分泌 IL-17、IL-22、IL-6 等细胞因子,介导促炎作用,而 Treg 细胞具有抗炎作用,可以下调不同 Th 细胞的激活和发展^[66-67]。因此,肠道中异常微生物的定植可以使不同类型的 T 细胞之间产生不平衡,随之发生免疫失调,促进各种疾病的发生和发展。

3.5.2 对分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, SIgA)的影响

如图 3 所示,SIgA 是肠道粘膜表面的重要防御

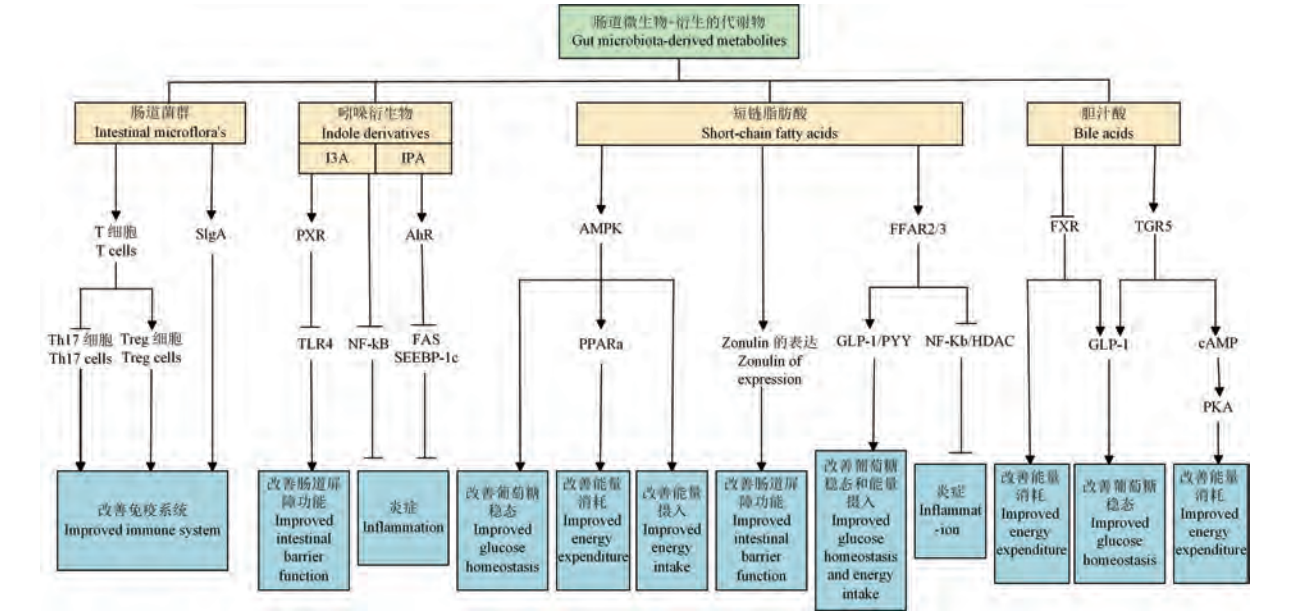


图 3 肠道微生物参与代谢性疾病的发展

Figure 3 Gut microbes are involved in the development of metabolic diseases

线,对肠毒素和外源入侵的病原微生物等都有抵抗作用^[68]。肠道微生物群、肠道细胞因子、营养素等多种因素参与肠道中 SIgA 的产生^[67]。在小鼠和人类中,以 SIgA 为靶标能共价靶向塑造肠道微生物群组成,调节细菌行为,并增强宿主-微生物稳态,从而影响疾病的发展^[69]。Zhou 等^[70]研究发现四柱头多糖通过增加回肠分泌的 SIgA 和盲肠 SCFA 的含量,改善微生物群落多样性,同时恢复了肿瘤引起的肠道菌群紊乱。

综上所述,肠道微生物群组成的变化改变了其代谢产物的特征,并最终导致肥胖相关代谢性疾病的发生和发展。变化的肠道菌群以及代谢产物直接或间接与免疫细胞、肠上皮细胞、肝细胞等中的宿主信号分子相互作用,以调节炎症、能量平衡、糖代谢、免疫系统以及增强肠道屏障功能。

4 总结与展望

肠道微生物菌群被称为“特殊的人体器官”,在肥胖、高血压、2 型糖尿病、癌症等多种代谢性疾病中发挥着至关重要的作用。一方面,肠道微生物及其代谢产物在个体内失衡会导致肥胖及相关代谢性疾病的发生;另一方面,肠道微生物及其代谢产物能够通过调节慢性炎症、改善肠道通透性、影响能量平衡、葡萄糖稳态和免疫系统等多种机制来发挥对代谢性疾病的调节作用。因此,研究肠道微生物及其代谢产物与机体健康之间的关系可以为代谢性疾病的治疗提供重要方向。目前,虽然有大量动物实验证明肠道微生物群在疾病发生发展中发挥着重要作用,但肠道微生物与各种代谢性疾病之间的因果关系仍需进一步进行大量临床试验来证明。此外,各菌属对宿主的具体作用机制尚不明确,还需进一步研究各菌属在疾病中的各种代谢机制。

参考文献:

[1] Li X, Shimizu Y, Kimura I. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity [J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2017, 36(4): 135-140.

[2] Kang Y, Kang X, Yang H, et al. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106020.

[3] 刘月姣.《中国居民营养与慢性病状况报告(2020 年)》发布 [J]. *中国食物与营养*, 2020, 26(12): 封 2.

[4] Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of insulin

resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: a microbiome-wide analysis from population studies [J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(7): e2118811.

[5] Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, et al. Gut microbiota and obesity: a role for probiotics [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2690.

[6] Wu Z, Huang S, Li T, et al. Gut microbiota from green tea polyphenol-dosed mice improves intestinal epithelial homeostasis and ameliorates experimental colitis [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 184.

[7] Lee KA, Luong MK, Shaw H, et al. The gut microbiome: what the oncologist ought to know [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(9): 1197-1209.

[8] Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease [J]. *Integr Med*, 2014, 13(6): 17-22.

[9] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. *Science*, 2005, 308(5728): 1635-1638.

[10] Sun Y, Zhang S, Nie Q, et al. Gut firmicutes: relationship with dietary fiber and role in host homeostasis [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022: 1-16.

[11] Cheng JB, Hu JL, Geng F, et al. *Bacteroides* utilization for dietary polysaccharides and their beneficial effects on gut health [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2022, 11(5): 1101-1110.

[12] Karasov WH, Martínez del Río C, Caviedes-Vidal E. Ecological physiology of diet and digestive systems [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 69-93.

[13] LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(2): 160-168.

[14] Claus SP, Guillou H, Ellero-Simatos S. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2016, 2: 16003.

[15] Fujisaka S, Watanabe Y, Tobe K. The gut microbiome: a core regulator of metabolism [J]. *J Endocrinol*, 2023, 256(3): e220111.

[16] Chen XF, Chen X, Tang X. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134(6): 657-676.

[17] Xiong RG, Zhou DD, Wu SX, et al. Health benefits and side effects of short-chain fatty acids [J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2863.

[18] Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(24): 2369-2379.

[19] Botchlett R, Woo SL, Liu M, et al. Nutritional approaches for managing obesity-associated metabolic diseases [J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(3): R145-R171.

[20] Kulecka M, Paziewska A, Zeber-Lubecka N, et al. Prolonged transfer of feces from the lean mice modulates gut microbiota in obese mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13(1): 57.

[21] Massey W, Brown JM. The gut microbial endocrine organ in type

- 2 diabetes [J]. *Endocrinology*, 2021, 162(2): bqaa235.
- [22] Gou W, Ling CW, He Y, et al. Interpretable machine learning framework reveals robust gut microbiome features associated with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(2): 358–366.
- [23] Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension [J]. *Hypertension*, 2015, 65(6): 1331–1340.
- [24] Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Gut*, 2013, 62(12): 1787–1794.
- [25] Miao RR, Zhan S, Cui SX, et al. Intestinal aberrant sphingolipid metabolism shaped-gut microbiome and bile acids metabolome in the development of hepatic steatosis [J]. *FASEB J*, 2022, 36(8): e22398.
- [26] Yan J, Xue Q, Chen W, et al. Probiotic-fermented rice buckwheat alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia in mice by suppressing lipid accumulation and modulating gut microbiota [J]. *Food Res Int*, 2022, 155: 111125.
- [27] Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 28–37.
- [28] Donohoe DR, Holley D, Collins LB, et al. A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(12): 1387–1397.
- [29] Zhang X, Diao P, Yokoyama H, et al. Acidic activated charcoal prevents obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed mice [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 852767.
- [30] Rasmussen TS, Mentzel CMJ, Kot W, et al. Faecal virome transplantation decreases symptoms of type 2 diabetes and obesity in a murine model [J]. *Gut*, 2020, 69(12): 2122–2130.
- [31] Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(31): 11070–11075.
- [32] Almugadam BS, Liu Y, Chen SM, et al. Alterations of gut microbiota in type 2 diabetes individuals and the confounding effect of antidiabetic agents [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 7253978.
- [33] Zhao L, Lou H, Peng Y, et al. Comprehensive relationships between gut microbiome and faecal metabolome in individuals with type 2 diabetes and its complications [J]. *Endocrine*, 2019, 66(3): 526–537.
- [34] Yang F, Chen H, Gao Y, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and hypertension: mechanism and treatment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110503.
- [35] Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, et al. Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage [J]. *Circulation*, 2019, 139(11): 1407–1421.
- [36] An MQ, Xu YN, Xiao N, et al. Douchi ameliorates high - fat diet - induced hyperlipidaemia by regulation of intestinal microflora in rats [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2022, 57(5): 2756–2769.
- [37] Qin X, Bi L, Yang W, et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with histopathology of lung cancer [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 918823.
- [38] Luo P, Lednovich K, Xu K, et al. Central and peripheral regulations mediated by short-chain fatty acids on energy homeostasis [J]. *Transl Res*, 2022, 248: 128–150.
- [39] Lau J, Farzi A, Qi Y, et al. CART neurons in the arcuate nucleus and lateral hypothalamic area exert differential controls on energy homeostasis [J]. *Mol Metab*, 2018, 7: 102–118.
- [40] Timper K, Brüning JC. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis; pathways to obesity [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(6): 679–689.
- [41] Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease [J]. *Genome Med*, 2016, 8(1): 42.
- [42] Goswami C, Iwasaki Y, Yada T. Short-chain fatty acids suppress food intake by activating vagal afferent neurons [J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 57: 130–135.
- [43] Zhang E, Jin L, Wang Y, et al. Intestinal AMPK modulation of microbiota mediates crosstalk with brown fat to control thermogenesis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1135.
- [44] Parséus A, Sommer N, Sommer F, et al. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor [J]. *Gut*, 2017, 66(3): 429–437.
- [45] Watanabe M, Houten SM, Matak C, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation [J]. *Nature*, 2006, 439(7075): 484–489.
- [46] Luo Z, Li M, Yang Q, et al. Ferulic acid prevents nonalcoholic fatty liver disease by promoting fatty acid oxidation and energy expenditure in C57BL/6 mice fed a high-fat diet [J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2530.
- [47] He J, Zhang P, Shen L, et al. Short-chain fatty acids and their association with signalling pathways in inflammation, glucose and lipid metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6356.
- [48] Barrera JG, Sandoval DA, D’Alessio DA, et al. GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 7(9): 507–516.
- [49] Howard EJ, Lam TKT, Duca FA. The gut microbiome: connecting diet, glucose homeostasis, and disease [J]. *Annu Rev Med*, 2022, 73: 469–481.
- [50] Xu YH, Gao CL, Guo HL, et al. Sodium butyrate supplementation ameliorates diabetic inflammation in db/db mice [J]. *J Endocrinol*, 2018, 238(3): 231–244.
- [51] Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept [J]. *J Physiol*, 2006, 574(1): 7–15.
- [52] Sakakibara S, Yamauchi T, Oshima Y, et al. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(2): 597–604.
- [53] Molinaro A, Wahlström A, Marschall HU. Role of bile acids in metabolic control [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(1):

- 31–41.
- [54] Fasano A. All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases [J]. *F1000Res*, 2020, 9: F1000 Faculty Rev-69.
- [55] Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, et al. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women [J]. *Eur J Nutr*, 2018, 57(8): 2985–2997.
- [56] Gonzalez A, Krieg R, Massey HD, et al. Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019, 34(5): 783–794.
- [57] Allaire JM, Crowley SM, Law HT, et al. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity [J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(9): 677–696.
- [58] Feng Y, Wang Y, Wang P, et al. Short-chain fatty acids manifest stimulative and protective effects on intestinal barrier function through the inhibition of NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 190–205.
- [59] Park E, Jeong JJ, Won SM, et al. Gut microbiota-related cellular and molecular mechanisms in the progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2634.
- [60] Masui R, Sasaki M, Funaki Y, et al. G protein-coupled receptor 43 moderates gut inflammation through cytokine regulation from mononuclear cells [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(13): 2848–2856.
- [61] Biagioli M, Marchianò S, Roselli R, et al. GLP-1 mediates regulation of colonic ACE2 expression by the bile acid receptor GPBAR1 in inflammation [J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1187.
- [62] Krishnan S, Ding Y, Saeidi N, et al. Gut microbiota-derived tryptophan metabolites modulate inflammatory response in hepatocytes and macrophages [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(12): 3285.
- [63] Zhao ZH, Xin FZ, Xue Y, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 1–14.
- [64] Hathaway-Schrader JD, Novince CM. GPR65, a novel regulator of helper T-cell polarization in inflammatory bowel disease [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(6): e857.
- [65] Lin R, Wu W, Chen H, et al. GPR65 promotes intestinal mucosal Th1 and Th17 cell differentiation and gut inflammation through downregulating NIAK2 [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3): e771.
- [66] Wang M, Chen F, Wang J, et al. Th17 and Treg lymphocytes in obesity and Type 2 diabetic patients [J]. *Clin Immunol*, 2018, 197: 77–85.
- [67] León ED, Francino MP. Roles of secretory immunoglobulin A in host-microbiota interactions in the gut ecosystem [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 880484.
- [68] Ren W, Wang K, Yin J, et al. Glutamine-induced secretion of intestinal secretory immunoglobulin A: a mechanistic perspective [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 503.
- [69] Yang Y, Palm NW. Immunoglobulin A and the microbiome [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2020, 56: 89–96.
- [70] Zhou F, Lu Y, Sun T, et al. Antitumor effects of polysaccharides from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg via regulation of intestinal flora and enhancing immunomodulatory effects *in vivo* [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1009530.

[收稿日期]2023-02-21