

何苗, 李佳航, 刘鑫, 等. 中等强度和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 1-9.

He M, Li JH, Liu X, et al. Effects of moderate- and high-intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 1-9.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.001

中等强度和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响

何苗¹, 李佳航¹, 刘鑫¹, 杨威¹, 吴良文¹, 范晶晶^{1,2*}

(1. 武汉体育学院运动医学院, 武汉 430079; 2. 武汉体育学院运动训练监控湖北省重点实验室, 武汉 430079)

【摘要】 目的 探讨中等有氧运动和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响及可能机制。**方法** 将 40 只 3 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为普通饲养组 (Chow 组, $n=10$) 和高脂饲养组 (HFD 组, $n=30$)。第 18 周, 将 HFD 组体重超过普通饮食组 20%~30% (包含 20%) 者判定为肥胖小鼠 ($n=26$), 通过随机抽选 2 只小鼠做肝油红 O 染色, 确定 NAFLD 小鼠模型建立成功。随机筛选出 16 只 NAFLD 小鼠分成中等强度有氧运动组 (MICT 组) 和高强度间歇有氧运动组 (HIIT 组), 每组 8 只, 分别对两组进行 8 周的运动训练, 干预结束后称重取材。Masson 染色观察心肌纤维化情况; 透射电镜观察心肌细胞超微结构; Western blot 检测心肌中线粒体自噬和线粒体生物发生等相关蛋白表达。**结果** (1) 与 Control 组相比, Model 组体重显著增加、心指数明显下降; 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组体重明显增加、MICT 组心指数上升。(2) Masson 结果显示, 与 Control 组相比, Model 组心肌内胶原纤维含量显著增加, 且电镜下心肌纤维排列杂乱、断裂, 心肌形态杂乱不堪, 线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清并夹杂多个脂滴; 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌内胶原纤维含量显著性减少, 透射电镜下心肌纤维排列略有恢复, z 线清晰可见, 线粒体变性程度略有改善, 且脂滴也略有减少, 其中, MICT 组对心脏组织结构改善效果优于 HIIT 组。(3) Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, Model 组心肌组织中 PINK1 和 Beclin1 表达水平无明显变化, Parkin、LAMP1 和 PGC-1 α 表达显著下降 ($P<0.01$), 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值显著升高 ($P<0.05, P<0.01$); 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组 PINK1 和 Beclin1 表达水平无明显变化, PGC-1 α 表达呈上调趋势, 其中 MICT 组 Parkin、LAMP1 表达显著升高 ($P<0.05$), p62 蛋白表达和 LC3-II/LC3-I 比值明显降低 ($P<0.05, P<0.01$), HIIT 组 Parkin、LAMP1 表达水平具有上调趋势, LC3-II/LC3-I 比值和 p62 蛋白表达明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。**结论** 不同方式有氧运动均能有效改善 NAFLD 小鼠心肌结构和功能损伤, 其作用途径可能是通过刺激心肌细胞内线粒体自噬通量, 激活自噬, 恢复细胞正常自噬功能, 从而改善心肌细胞损害, 且中等连续有氧运动改善效果更佳。

【关键词】 中等连续有氧运动; 高强度间歇运动; NAFLD 心肌病; 线粒体自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0001-09

Effects of moderate- and high-intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease

HE Miao¹, LI Jiahang¹, LIU Xin¹, YANG Wei¹, WU Liangwen¹, FAN Jingjing^{1,2*}

(1. Wuhan University of Physical Education, College of Sports Medicine, Wuhan 430079, China.

2. Wuhan University of Physical Education, Hubei Key Laboratory of Sports Training Monitoring, Wuhan 430079)

【基金项目】 国家自然科学基金 (81701391); 湖北省自然科学基金计划项目 (2023AFB700); 武汉体育学院中青年科研团队项目 (21KT08)。

【作者简介】 何苗 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 运动干预对慢性疾病的预防与康复。E-mail: HM2670116194@163.com

【通信作者】 范晶晶 (1984—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 运动与营养干预慢性疾病。E-mail: jie_jing_1@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of moderate aerobic exercise and high intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease and its possible mechanism. **Methods** Forty 3-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into a normal feeding group (Chow group, $n=10$) and high fat-fed group (HFD group, $n=30$). At week 18, mice in the HFD group with a body weight exceeding 20%~30% of the ordinary diet group were considered obese mice ($n=26$). Two mice were randomly selected for liver oil red O staining to confirm successful establishment of the NAFLD mouse model. Sixteen NAFLD mice were randomly selected and divided into a moderate intensity aerobic exercise group (MICT group) and high intensity intermittent aerobic exercise group (HIIT group) with eight mice in each group. The two groups were subjected to exercise training for 8 weeks, and samples were weighed after treatment. Masson staining was used to observe myocardial fibrosis. The ultrastructure of myocardial cells was observed by transmission electron microscopy. Mitophagy and mitochondrial biogenesis were assessed by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the body weight and heart index in the Model group were significantly increased and decreased, respectively. Compared with the Model group, the body weight of MICT and HIIT groups was increased significantly, and the heart index of the MICT group was increased. Masson staining showed that, compared with the Control group, collagen fiber content in the myocardium in the Model group was significantly increased, and the myocardial fibers were disorganized and broken in electron microscopy. The myocardial morphology was disorganized, mitochondria were swollen, cristae were broken and blurred, and lipid droplets were observed. Compared with the Model group, the myocardial collagen fiber content in MICT and HIIT groups was significantly reduced, the myocardial fiber arrangement had slightly recovered in transmission electron microscopy, the z-line was clearly visible, the degree of mitochondrial degeneration was slightly improved, and lipid droplets were slightly reduced. The improvement in the cardiac tissue structure in the MICT group was better than that in the HIIT group. Western blot showed that, compared with the Control group, PINK1 and Beclin1 expression levels in myocardial tissue of the Model group underwent no significant changes, while Parkin, LAMP1, and PGC-1 α expression was significantly decreased ($P<0.01$). p62 protein expression and the LC3-II/LC3-I ratio were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the Model group, PINK1 and Beclin1 expression levels in MICT and HIIT groups were not significantly changed, while PGC-1 α expression was upregulated, and Parkin and LAMP1 expression in the MICT group was significantly increased ($P<0.05$). p62 protein expression and the LC3-II/LC3-I ratio were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), Parkin and LAMP1 expression levels were upregulated, and the LC3-II/LC3-I ratio and p62 protein expression were significantly decreased in the HIIT group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusions** Different forms of aerobic exercise effectively ameliorate myocardial structural and functional injury in NAFLD mice, which may be mediated through stimulating autophagy flux of mitochondria in cardiomyocytes, activating autophagy, and restoring the normal autophagy function of cells to ameliorate myocardial cell damage, and moderate continuous aerobic exercise has a better improving effect.

[Keywords] moderate continuous aerobic exercise; high-intensity intermittent exercise; NAFLD cardiomyopathy; mitophagy

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

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是指在排除过量饮酒及其他引起肝损害的因素下,以肝细胞内脂肪堆积出现弥散性气球样病变为主要特征的慢性疾病,也被认为是在肝中表现出的代谢综合征 (metabolic syndrome, MS)^[1]。研究表明,NAFLD 不仅导致肝的损伤,也会增加肥胖、2 型糖尿病和心血管疾病等并发症的风险,其中心血管疾病是造成 NAFLD 患者最常见的死亡原因之一^[2]。自噬是一个动态变化的自我降解过程,通过清除异常蛋白质和受损细胞器而保护各种细胞和器官的功能损伤^[3]。线粒体自噬作为一种线粒体质量控制机制,通过消除受损或多余的

线粒体,早期可应对各种心脏压力和心脏病状况,但其功能发生障碍会导致异常线粒体聚集、氧化应激增强、活性氧增多、ATP 减少,而引起心肌结构和功能损害^[4]。其中,线粒体自噬标记蛋白 PINK1 通过激活 Parkin 的 E3 泛素连接酶活性,使线粒体被 p62 等自噬受体识别并降解,从而维持线粒体数量平衡。

运动作为一种非药物的干预手段,可有效调节人体的生理平衡,达到治病和预防的效果。Cuthbertson 等^[5]研究表示,运动干预不仅可以降低肝脂肪含量,还可以改善胰岛素抵抗及外周组织胰岛素敏感性。例如,适当的运动干预可明显改善心

脏收缩和舒张功能,显著增加左心室舒张末期血容量,是改善 NAFLD 患者心功能不全的有效策略^[6]。相关研究表明,运动可通过提高线粒体质量、改善代谢异常从而对心血管疾病等并发症产生良性影响^[7-8]。但最有效的运动方式和强度尚无共识。一项研究表示,与不运动小鼠相比,中等强度有氧运动和高强度间歇运动均能改善全身代谢参数来减少 NASH 的进展,但高强度间歇运动在改善葡萄糖和胰岛素耐量,减少肝脂肪变性和纤维化方面优于中等强度有氧运动^[9]。此外,一项随机对照研究比较了能量匹配的中等强度有氧运动和高强度间歇运动对 NAFLD 患者的影响,但这些患者在规律运动 4 周后未能检测到肝内脂质含量的差异^[10]。运动的强度和方式是否会影响运动在减轻 NAFLD 及心肌损伤进展方面的功效,以及这种有益作用的潜在机制尚不清楚。因此,本实验研究通过长期高脂饮食建立 NAFLD 小鼠模型,并对其分别进行 8 周的中等强度有氧运动和高强度间歇有氧运动干预,观察不同有氧运动形式对 NAFLD 小鼠心肌组织结构和线粒体自噬相关蛋白的影响,进一步揭示运动改善代谢性心肌病的机制提供理论依据,为临床对 NAFLD 患者制定运动处方提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,3 周龄,体重为 17~18 g,购自三峡大学实验动物中心[SCXK(鄂)2022-0012],动物合格证编号:42010200005795。饲养于武汉体育学院实验动物实验室[SYXK(鄂)2021-0087],适应性喂养 1 周后进行实验,保证干净充足的饮食和饮水,其中高脂饲养少量多次,每周彻底更换 1 次饲料,期间动物房室温维持在 22~25℃,相对湿度控制在 55%~65%,保持 12 h/12 h 昼夜节律。本实验经由武汉体育学院实验动物管理伦理委员会 IACUC 批准(S0087-20210712-01),所有实验过程严格遵守动物实验福利伦理 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

电镜固定液(型号:G1102)购自 Servicebio 公司;PMSF(型号:BL507A)购自 Biosharp 公司;油红 O 染色套装及 Masson 试剂盒购自四维加科技有限公司;PINK1 兔抗(型号:#6946)、Parkin 兔抗(型号:#32833)、Beclin1 兔抗(型号:#3738)、LC3A/B

兔抗(型号:#4108)购自 Cell Signaling Technology 公司;LAMP1 兔抗(型号:ab208943)、PGC-1 α 兔抗(型号:ab72230)、GAPDH 兔抗(型号:ab8245)购自 Abcam 公司;p62 鼠抗(型号:EM0704)购自中能华安科技有限公司;HPR 标记的山羊抗兔二抗(型号:ab8245)购自启动子生物有限公司;HPR 标记的山羊抗小鼠二抗(型号:ab8245)购自 Servicebio 公司。

病理切片机(型号:RM20116)购自上海徕卡仪器有限公司;超声波细胞粉碎机(型号:Scientz-IID)购自宁波新芝生物科技股份有限公司;高速冷冻离心机(型号:HC-2518R)购自安徽中科中佳仪器有限公司;垂直电泳仪(型号:DYY-6C)购自北京六一仪器厂;脱色摇床(型号:TSY-B)购自 Servicebio 公司;超敏荧光化学发光成像仪(型号:6300)购自上海勤翔科学仪器有限公司;透射电子显微镜(型号:HT770)购自日本东京日立集团;小动物跑步机(动物实验跑台,型号:ZS-PT-III)购自北京众实迪创科技发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型建立及分组

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为普通饲养组(Chow 组, $n=10$)和高脂饲养(能量配比为蛋白质 20%,碳水化合物 20%,脂肪 60%)组(HFD 组, $n=30$)。实验第 18 周,根据体重超过 Chow 组小鼠 20%的 26 只 HFD 组小鼠进行模型鉴定检测,两组随机抽取 2 只小鼠处死,做肝病理切片,对比观察其肝脂肪变性情况,确定 NAFLD 模型建立成功。剩余 Chow 组小鼠继续编为标准对照组(Control 组),将 HFD 组小鼠随机分为模型组(Model 组),中等强度有氧运动组(MICT 组)和高强度间歇有氧运动组(HIIT 组),每组 8 只,所有小鼠维持原有饲养条件并根据不同运动方案对运动组小鼠施加运动干预。

1.3.2 运动干预方案

所有运动组小鼠在正式运动干预前进行 1 周的跑台适应性训练,在最后 1 d 进行最大摄氧量检测,之后实行正式运动干预,每周 5 d,连续 8 周。运动方式包括中等强度有氧训练以及高强度间歇训练,运动方案均在相关参考文献基础上改进。MICT 组^[11]:第 1 周运动速度 12 m/min,时间由 40 min 递增至 60 min,第 2 周速度增加至 15 m/min(50%~75% VO_{2max}),每天 60 min,保持此运动强度至实验结束;HIIT 组^[12]:第 1 周以 18 m/min(90%~95%

$VO_{2\max}$) 的速度在跑步机上跑 2 min, 然后以 5 m/min (30% ~ 40% $VO_{2\max}$) 休息 2 min, 总共 40 min, 最大跑速每周增加 1 m/min, 在最后 1 周获得 25 m/min 的最终速度。训练时驱赶不跑步小鼠, 保证充足的运动量。实验期间, 密切观察每只小鼠体重变化、摄食量及精神状态。

1.3.3 实验取材

在最后一次运动干预结束 48 h 后, 所有小鼠称重后断颈处死, 迅速取心肌组织并称重。根据体重和心脏重量计算心脏指数: 心脏指数 = (心脏重量(g)/体重(g)) × 100%。每组随机取 3 只小鼠左心室心肌样本部分置于 40% 多聚甲醛固定后分别用油红 O 染色和 Masson 染色观察, 部分心肌样本放置于 4% 戊二醛电镜固定液中储存供后续电镜检测, 其余组织置于冻存管中于 -80℃ 冰箱储存待用。

1.3.4 油红 O 染色

小鼠肝组织固定好后, 由不同浓度梯度酒精进行脱水, 置于二甲苯中透明, 浸蜡、包埋和切片, 将石蜡切片脱蜡至水, 有稀释后的油红 O 储存液染色 10 min, 而后脱色、复染, 中性树脂封片, 置于显微镜下镜检, 获得不同区域视野图像, 接着拍照保存。图像中, 脂滴呈现红色, 细胞核呈现蓝色。

1.3.5 Masson 染色

将多聚甲醛固定的左心室石蜡包埋和切片。石蜡切片经二甲苯脱蜡两次, 无水乙醇梯度脱水后先后用苏木素和丽春红溶液染色, 再通过苯胺蓝复染 5 min, 后用 1% 冰醋酸处理 1 min, 将切片依次放入浓度为 50%、70%、90%、100% 乙醇中各冲洗 5 min, 使用二甲苯脱水透明后用中性树胶封片。在 200 倍镜显微镜下观察拍摄, 每只小鼠随机选取 3 个切片, 在显微镜下选取最具代表的视野进行拍摄, 利用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件, 计算各区域心肌胶原沉积所占比例, 即胶原容积分数 (CVF) = 胶原面积/组织总面积 × 100%。

1.3.6 透射电镜

将心肌组织切成 1 mm³ 大小的组织块, 迅速将样品放入 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定 24 h, 之后使用不同浓度梯度无水乙醇各脱水 15 min, 再用 90% 和 100% 丙酮各脱水 15 min, 用纯丙酮/包埋液混合液处理过夜后在包埋板上包埋, 室温下处理 3 h 后在烘箱内固化, 通过超薄切片机切片 70 nm 左右, 最后使用 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染切片, 使用 HT 7800 透射电镜检查心肌线粒体形态和组织纤维化。

1.3.7 Western blot 实验

每只小鼠称取 0.04 g 心脏组织置于 2 mL 的匀浆管中, 加入 600 μL 蛋白酶抑制剂和 6 μL RIPA 裂解液并混匀, 于匀浆机内机械匀浆, 匀浆液在 4℃、10 000 r/min 条件下, 离心 5 min, 取上清液, 在参数设置工作 2 s, 间歇 2 s, 超声 5 min, 取上清液, BCA 法测蛋白浓度。2× 的蛋白上样缓冲液, 按照 1 : 1 与上清液样品充分混匀, 再放置 100℃ 煮样机中 10 min, 待冷却后放入 -20℃ 冰箱中保存, 即为蛋白样品。取等体积蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳条件为 45 V, 40~60 min, 85 V, 1 h。此后以湿转法恒流 330 mA 转膜 60~120 min, 转膜结束后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中常温封闭 2 h, 之后与一抗 4℃ 孵育摇床过夜 (一抗稀释比例: PINK1, 1 : 1000; Parkin, 1 : 1000; PGC-1α, 1 : 1000; Beclin1, 1 : 1000; LC3A/B, 1 : 1000; LAMP1, 1 : 1000; p62, 1 : 500), 次日使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 室温下与二抗孵育 1.5 h (二抗稀释比例: 1 : 5000)。再次用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。使用化学发光成像仪扫描条带, 滴加发光剂显色成像, 并保存。

1.4 统计学方法

图像由 Image J 软件和 Adobe Photoshop 2022 软件分析处理, 所有统计数据由 Graph Pad Prism 8.0.0 软件 (La Jolla, CA, USA) 进行统计分析并进行图像化处理, 结果采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示, 组间比较均采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示结果具有显著性差异。

2 结果

2.1 NAFLD 小鼠模型建立

小鼠基础体重为 (17.30 ± 0.60) g, 分别对 Chow 组和 HFD 组进行普通饲料和高脂饲料喂养。喂养 2 周后, Chow 组小鼠体重为 (21.15 ± 0.76) g, HFD 组小鼠体重为 (22.41 ± 0.85) g; 喂养 6 周后, Chow 组小鼠体重为 (25.19 ± 1.11) g, HFD 组小鼠体重为 (27.88 ± 1.76) g; 喂养 10 周后, Chow 组小鼠体重为 (27.53 ± 1.31) g, HFD 组小鼠体重为 (30.96 ± 2.33) g; 喂养 14 周后, Chow 组小鼠体重为 (28.73 ± 1.29) g, HFD 组小鼠体重为 (34.16 ± 3.13) g; 喂养 18 周后, Chow 组小鼠体重为 (28.54 ± 1.30) g, HFD 组小鼠体重为 (38.58 ± 3.99) g (图 1)。18 周建模结束后, HFD 组

体重比 Chow 组高 35.18% (>20%); 随后每组随机选取 2 只小鼠做肝油红 O 染色观察肝脂肪变性情况, 如图 2 显示, Chow 组肝无明显脂质沉积, HFD 组肝细胞内发生明显脂质沉积, 存在大量空泡样变, 表明 NAFLD 模型建立成功。

2.2 有氧运动改善 NAFLD 小鼠体重及心脏指数

8 周运动干预结束后, 与 Control 组相比, Model 组的终末体重极显著升高 (图 3, $P<0.001$), 且与干预前体重相比, 体重也显著性增长 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, 经过中强度和高强度有氧训练后, 高脂喂养小鼠体重极显著降低 ($P<0.001$)。除体重增加外, Model 组小鼠心脏指数显著低于 Control 组 ($P<0.01$), 经过运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组小鼠心脏指数明显上升 ($P<0.05$), HIIT 组小鼠心脏指数呈上升趋势, 但无统计学意义 ($P>0.05$)。这表明 8 周的有氧运动和高脂饮食分别对体重和心脏指数的影响具有统计学意义。

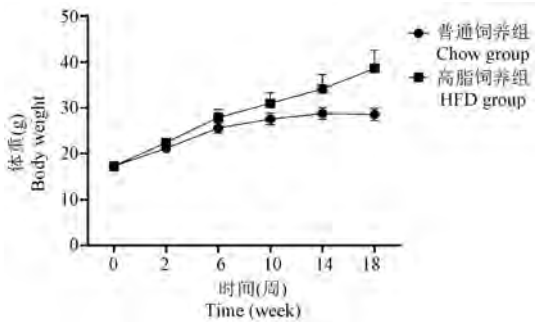


图 1 NAFLD 模型建立过程中体重的变化
Figure 1 Change of body weight during the establishment of NAFLD model

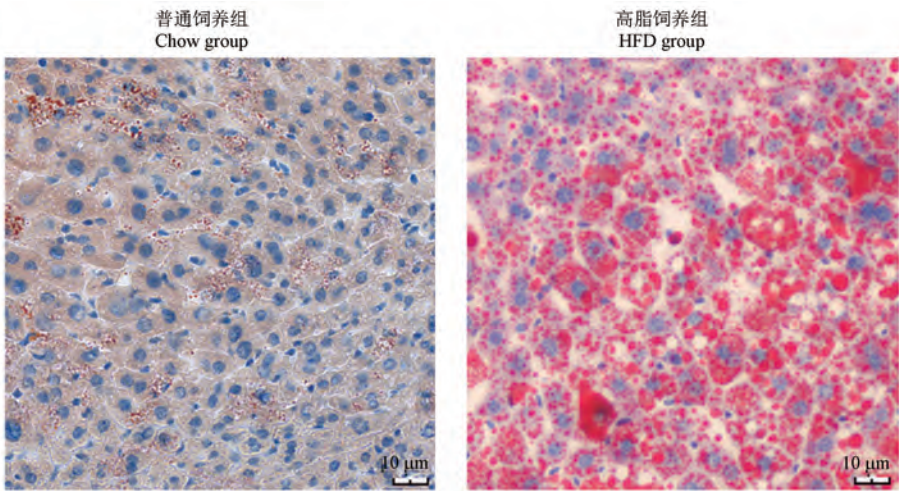


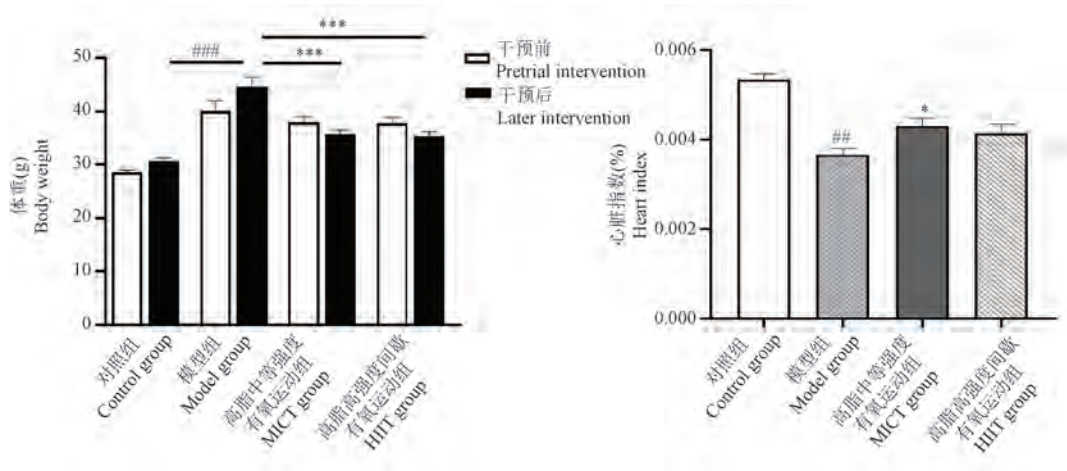
图 2 各组小鼠肝油红 O 染色 (18 周)
Figure 2 Liver oil red O staining of mice in each group (18 weeks)

2.3 有氧运动对 NAFLD 小鼠心肌形态结构和功能影响

通过观察小鼠心肌 Masson 染色及计算心肌细胞胶原容积分数 (图 4) 发现, Control 组心肌内有少量胶原纤维分布。与 Control 组相比, Model 组小鼠心肌内胶原纤维含量极显著增加 ($P<0.01$); 经过 8 周运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌内胶原纤维含量显著减少 ($P<0.05$)。进一步通过透射电镜观察小鼠心肌细胞内结构 (图 4) 发现, Control 组心肌结构较清晰, 肌纤维排列整齐, 肌小节明暗带分布均匀, z 线连续清晰 (黑色箭头), 线粒体结构完整 (红色箭头), 少见或不见脂滴 (黄色箭头); 与 Control 组相比, Model 组心肌肌纤维排列杂乱、断裂, 明暗带模糊、甚至消失, 心肌形态杂乱不堪, 线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清, 其中夹杂多个脂滴。经过 8 周运动干预后, 与 Model 组相比, MICT 组和 HIIT 组心肌肌纤维排列略有恢复, 明暗带、z 线清晰可见, 线粒体水肿、变性程度略有改善, 心肌形态较好恢复, 脂滴也略有减少, 其中, MICT 组改善效果优于 HIIT 组。以上结果表明, 长期高脂饮食可导致心肌大量胶原纤维沉积, 使心肌发生纤维化病理改变, 且可引起心肌细胞内肌纤维排列紊乱, 线粒体结构受损, 但经不同运动干预后, 均可有效减少心肌胶原沉积, 减少心肌纤维化, 并且可有效改善心肌肌纤维排列紊乱、恢复线粒体结构和功能。

2.4 有氧运动上调 NAFLD 小鼠心肌线粒体自噬

与 Control 组相比, Model 组小鼠心肌细胞内 PINK1 表达无明显变化 ($P>0.05$), 但 Parkin 表达水

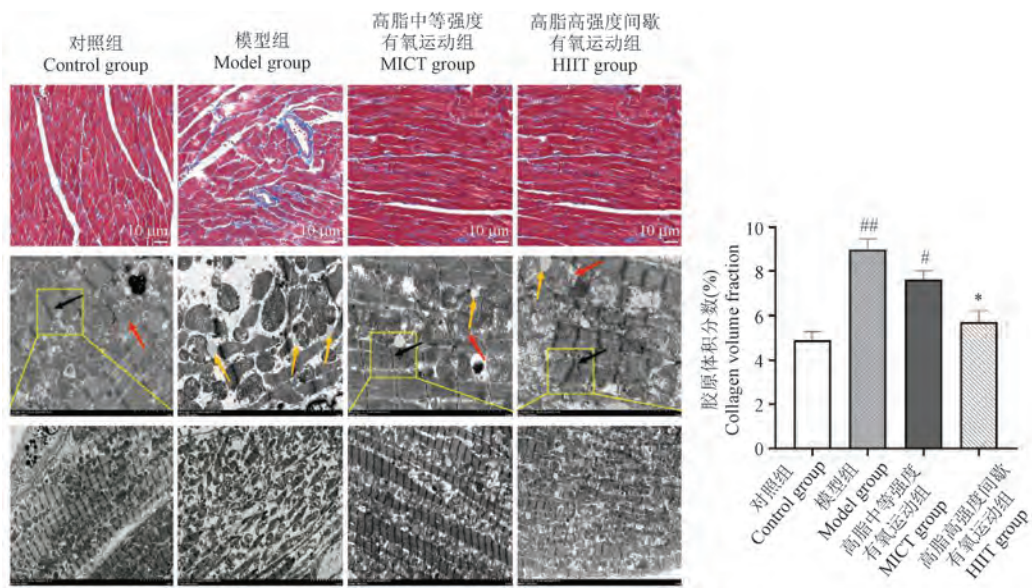


注:与 Control 组相比, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ 。

图 3 各组体重、心脏指数比较

Note. Compared with Control group, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$.

Figure 3 Comparison of body weight and heart index in each group



注:黑色箭头代表肌节,红色箭头代表线粒体,黄色箭头代表脂滴。与 Control 组相比, $^{*}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$ 。

图 4 各组小鼠左心室 Masson 染色、透射电镜及心肌胶原体积统计分数

Note. Black arrows represent sarcomere, red arrows represent mitochondria and yellow arrows represent lipid droplets. Compared with Control group, $^{*}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$.

Figure 4 Masson staining, transmission electron microscopy and myocardial collagen volume statistical fraction in left atrial tissue of mice in each group

平极显著下调(图 5, $P<0.01$)。通过 8 周运动干预后,与 Model 组相比较,两个运动组心肌细胞 PINK1 表达水平均无显著性差异($P>0.05$),而在 MICT 组心肌细胞内 Parkin 活性被显著激活($P<0.05$),HIIT 组 Parkin 表达水平具有上调趋势,但无统计学意义。以上结果表明,长期高脂饮食可抑制小鼠心肌

内 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,导致功能障碍的线粒体积聚和心肌病的发展,而不同强度有氧运动均可恢复由 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬,改善线粒体功能。

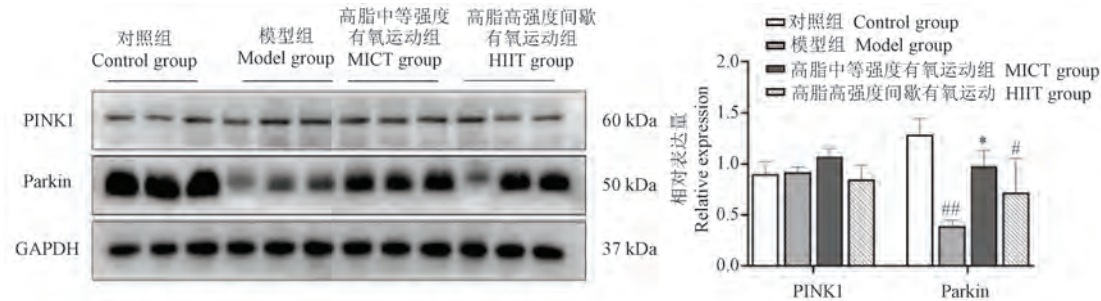
2.5 有氧运动促进对 NAFLD 小鼠心肌自噬

由于线粒体可通过一般自噬途径被清除,因此

我们进一步检测一般自噬及溶酶体相关指标 Beclin1、LC3、p62 和 LAMP1。如图 6 结果显示,与 Control 组相比,Model 组心肌细胞内 Beclin1 表达水平无明显变化($P>0.05$);而 LC3-II/LC3-I 比值和 p62 蛋白表达水平都显著上调($P<0.01$ 、 $P<0.05$),但 LAMP1 表达水平显著下降($P<0.01$),这些结果表明,长期高脂喂养小鼠,导致心肌细胞内自噬通量受阻,可能是由于阻断了溶酶体对内容物的降解,而不是自噬的启动。经过 8 周运动干预后,与 Model 组相比,两个运动组心肌细胞 Beclin1 表达无显著性差异($P>0.05$);MICT 组 p62 表达水平及 LC3-II/LC3-I 比值显著降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$),LAMP1 活性被显著激活($P<0.05$);HIIT 组 LC3-II/LC3-I 比值显著下降($P<0.05$)、p62 蛋白表达水平极显著下调($P<0.01$)、LAMP1 蛋白表达水平

具有上升趋势,但无显著性差异($P>0.05$)。以上结果表明,运动可增加高脂条件下心肌细胞中总的自噬通量,此外,还可显著增加高脂条件下 LAMP1 蛋白表达,促进自噬溶酶体降解。

由于线粒体平衡依赖于新线粒体的生成或受损线粒体的清除,因此我们又进一步检测线粒体生物发生相关蛋白 PGC-1 α 表达水平。与 Control 组相比,Model 组心肌细胞内 PGC-1 α 蛋白表达极显著下降($P<0.01$)。通过运动干预后,与 Model 组相比,两个运动组内 PGC-1 α 蛋白表达呈现上调趋势,但无统计学意义($P>0.05$)。综上所述,本实验推测高脂喂养的小鼠心脏中可能存在功能障碍的线粒体体积聚,其原因可能是由于心肌细胞清除线粒体的能力受损,而运动可以改善并恢复线粒体自噬正常水平。

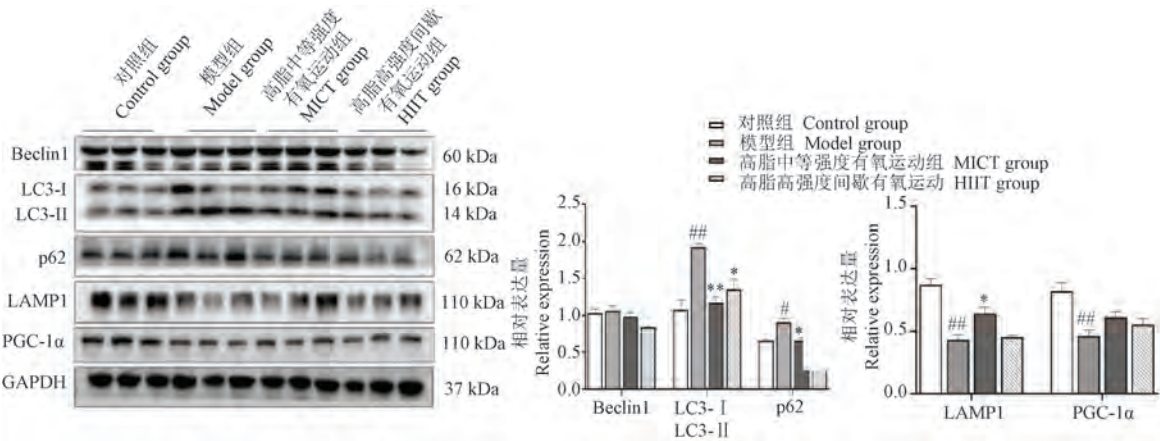


注:与 Control 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$ 。

图 5 Western blot 检测各组小鼠心肌内 PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平

Note. Compared with Control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$.

Figure 5 Western blot detection of PINK1 and Parkin protein expression levels in mice myocardium of each group



注:与 Control 组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与 Model 组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 6 Western blot 检测各组小鼠心肌内自噬相关蛋白表达水平

Note. Compared with Control group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with Model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 6 Western blot detection of related autophagy protein expression levels in mice myocardium of each group

3 讨论

NAFLD 作为一种代谢性慢性疾病,长期高热量饮食可显著增加心血管疾病,造成心肌组织结构和功能的损害。Gonçalves 等^[13]研究证实 6 周高糖膳食饲养可诱导 Wistar 大鼠左右心室心肌肥大和心肌纤维化,表现为心肌僵硬增加和心脏舒张功能障碍;Wang 等^[14]研究同样发现进行 11 个月高脂膳食后小鼠呈现出明显的心肌肥大和心肌纤维化。本实验中,18 周高脂饮食可以引起 NAFLD 小鼠心脏指数显著增加,Masson 染色和透射电镜结果显示高脂组心肌内胶原纤维含量相比于对照组明显增加,且心肌纤维排列杂乱、断裂,明暗带模糊、甚至消失,心肌形态杂乱不堪,线粒体肿胀、嵴发生断裂且模糊不清,夹杂多个脂滴,说明经过 18 周高脂膳食饲养成的 NAFLD 小鼠呈现出明显的心肌结构的损害。研究表明,运动是改善 NAFLD 进展的重要方式,可延缓甚至逆转高脂环境下的心肌损伤^[15]。张磊等^[16]研究发现,在对肥胖 SD 大鼠进行 8 周跑台有氧运动可明显降低肥胖小鼠的心肌胶原沉积,改善心肌纤维化。另一项研究表明,8 周高脂饲养诱导的小鼠呈现心肌纤维化,但经过 8 周自主运动后,不仅心肌炎症受到抑制,心肌纤维化也因运动而减轻,心肌功能显著改善^[17]。该研究结果与上述研究结论一致,经过 8 周中强度和高强度间歇有氧运动后,两个运动组体重和心脏指数明显下降,心肌细胞胶原沉积减少,心肌纤维排列略有恢复,明暗带、Z 线清晰可见,线粒体水肿、变性程度略有改善,心肌形态较好恢复,脂滴也略有减少,并且中等强度有氧运动改善效果更为显著。以上结果表明,长期高脂饮食可导致心肌大量胶原纤维沉积,使心肌发生纤维化病理改变,且可引起心肌细胞内肌纤维排列紊乱,线粒体结构受损,但经有氧运动干预后,均可有效减少心肌胶原沉积,减少心肌纤维化,并且可有效改善心肌纤维排列紊乱、恢复线粒体结构和功能。

线粒体自噬是一种选择性自噬过程,可有效去除功能障碍或多余的线粒体^[18],并与自噬途径共享其核心分子机制。因为受损的线粒体导致活性氧的过量产生和细胞死亡^[19-20],通过线粒体吞噬选择性去除功能障碍的线粒体是维持线粒体稳态和保持细胞活力的重要机制。然而自噬的改变在代谢性心脏病中的功能作用仍有争议,或被抑制^[21-22],

或被激活^[23-24]。最近一项研究表明,进行 2 个月的高脂喂养可以激活小鼠心肌自噬,但这些小鼠却表现出心脏肥大、舒张功能障碍和脂质积聚^[25]。本研究发现高脂诱导的 NAFLD 小鼠心肌细胞表现出 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬下降,Beclin1 表达水平无变化,LC3-II/LC3-I 的比值、p62 表达水平的增加,LAMP1 蛋白水平的显著降低,提示小鼠心肌细胞中线粒体自噬受抑制,且自噬流受阻。这种自噬受损状态可能是由于高脂状态下心肌溶酶体对内容物的降解被阻断。因此,推断出 HFD 喂养的小鼠心脏中可能存在功能障碍的线粒体积累。但与此同时,本实验的另一结果表示高脂条件下线粒体生物发生相关蛋白 PGC-1 α 表达却显著减少,这个结果与 Mu 等^[26]研究结果一致,这说明高脂喂养的小鼠心肌线粒体的积累主要由于心肌细胞清除线粒体的能力受损。

目前有多项研究证实,运动训练在预防和改善心血管疾病方面发挥重要作用。Gonçalves 等^[27]研究表明,对 NAFLD 小鼠进行自由活动和耐力有氧训练干预,可有效恢复正常线粒体自噬及增加线粒体生物发生,且耐力训练优于自由训练。运动过程中自噬的调节是一个双向过程,合适的运动可刺激线粒体自噬通量,恢复细胞正常自噬功能,有效预防心功能受损,延缓代谢性心脏病的发展^[15]。在本研究中发现,经过 8 周有氧运动干预后,两个运动组均可增加高脂条件下心肌细胞中的自噬通量,上调新生心肌细胞中线粒体自噬、线粒体生物发生和溶酶体功能相关蛋白的表达,可有效维持非酒精性脂肪肝小鼠心肌中内环境稳态。

目前运动是治疗 NAFLD 便捷且安全的有效策略,但不同的运动形式可能会引起不同的效果。首先,本实验的研究结果提供了证据支持运动对 NAFLD 小鼠其他代谢器官有益,并发现长期高脂饮食可造成心肌结构损伤,抑制心肌自噬流量,损伤细胞清除线粒体的能力。其次,本研究认为两种运动方式均能恢复因长期高脂饮食造成的心肌细胞内自噬受损,促进心肌线粒体自噬,改善心肌纤维化,其中中等强度有氧运动改善效果更佳。这些结果为运动改善代谢性心脏病提供了新思路和实践基础。但本实验缺乏超声心动图直接评估实验中小鼠心脏功能,未能直接观察到不同运动方案改善心脏功能的情况,后续实验应继续补充完善。

参考文献:

[1] Gadiparthi C, Spatz M, Greenberg S, et al. NAFLD

- epidemiology, emerging pharmacotherapy, liver transplantation implications and the trends in the United States [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2020, 8(2): 215–221.
- [2] Mantovani A, Scorletti E, Mosca A, et al. Complications, morbidity and mortality of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Metabolism*, 2020, 111: 154170.
 - [3] Meng T, Lin S, Zhuang H, et al. Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases [J]. *Cell Stress*, 2019, 3(5): 141–161.
 - [4] Kubli DA, Gustafsson ÅB. Mitochondria and mitophagy: the Yin and Yang of cell death control [J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1208–1221.
 - [5] Cuthbertson DJ, Shojaaee-Moradie F, Sprung VS, et al. Dissociation between exercise-induced reduction in liver fat and changes in hepatic and peripheral glucose homeostasis in obese patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(2): 93–104.
 - [6] Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(1): 56–66.
 - [7] Luan X, Tian X, Zhang H, et al. Exercise as a prescription for patients with various diseases [J]. *J Sport Health Sci*, 2019, 8(5): 422–441.
 - [8] Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, et al. Understanding key mechanisms of exercise-induced cardiac protection to mitigate disease: current knowledge and emerging concepts [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 419–475.
 - [9] Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, et al. Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH [J]. *Mol Metab*, 2021, 53: 101270.
 - [10] Winn NC, Liu Y, Rector RS, et al. Energy-matched moderate and high intensity exercise training improves nonalcoholic fatty liver disease risk independent of changes in body mass or abdominal adiposity-A randomized trial [J]. *Metabolism*, 2018, 78: 128–140.
 - [11] 李娣, 陈锐, 陈嘉勤, 等. 有氧运动与黑狗黄酮干预酒精性肝损伤模型小鼠炎症因子的变化 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(32): 5197–5202.
 - [12] Marcinko K, Sikkema SR, Samaan MC, et al. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity [J]. *Mol Metab*, 2015, 4(12): 903–915.
 - [13] Gonçalves N, Silva AF, Rodrigues PG, et al. Early cardiac changes induced by a hypercaloric Western-type diet in “subclinical” obesity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(6): H655–H666.
 - [14] Wang Z, Li L, Zhao H, et al. Chronic high fat diet induces cardiac hypertrophy and fibrosis in mice [J]. *Metabolism*, 2015, 64(8): 917–925.
 - [15] Wu NN, Tian H, Chen P, et al. Physical exercise and selective autophagy: benefit and risk on cardiovascular health [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1436.
 - [16] 张磊, 严玉, 刘崑, 等. 8 周有氧运动改善肥胖诱导心肌纤维化过程中核因子 E2 相关因子 2 通路的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(17): 2650–2656.
 - [17] Zhang H, Meng J, Yu H. Trimethylamine N-oxide supplementation abolishes the cardioprotective effects of voluntary exercise in mice fed a western diet [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 944.
 - [18] Kubli DA, Gustafsson ÅB. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(17): 1527–1544.
 - [19] Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2–3): 131–141.
 - [20] Marchi S, Giorgi C, Suski JM, et al. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 2012: 329635.
 - [21] Kanamori H, Takemura G, Goto K, et al. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes [J]. *Autophagy*, 2015, 11(7): 1146–1160.
 - [22] Sciarretta S, Zhai P, Shao D, et al. Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome [J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1134–1146.
 - [23] Mellor KM, Bell JR, Young MJ, et al. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(6): 1035–1043.
 - [24] Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 202: 13–20.
 - [25] Tong M, Saito T, Zhai P, et al. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2019, 124(9): 1360–1371.
 - [26] Mu J, Zhang D, Tian Y, et al. BRD4 inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy *in vivo* [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 149: 1–14.
 - [27] Gonçalves IO, Passos E, Diogo CV, et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Physiol Appliquee Nutr Metab*, 2016, 41(3): 298–306.

龚晓红,李松伟,李恒,等. 基于 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路探讨高尿酸血症合并非酒精性脂肪肝机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 10-16.

Gong XH, Li SW, Li H, et al. Mechanism of hyperuricemia combined with nonalcoholic fatty liver based on the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 10-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.002

基于 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路探讨高尿酸血症合并非酒精性脂肪肝机制

龚晓红^{1,3}, 李松伟^{2,3}, 李 恒^{1,3*}, 武上雯³, 陆超群², 陈一鸣⁴

(1.河南中医药大学,郑州 450046;2.河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院),郑州 450002;
3.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000;4.江苏省泗阳康达医院,江苏 宿迁 223798)

【摘要】 目的 基于 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路研究高尿酸血症合并非酒精性脂肪肝(HUA-NAFLD)的发病机制。**方法** 64 只 SD 大鼠,随机分为空白组、高尿酸血症(HUA)组、非酒精性脂肪肝(NAFLD)组、HUA-NAFLD 组,每组 16 只,分别于 8、12 周末取材,对大鼠血清生化指标进行检测;苏木素-伊红(HE)和油红 O 染色法观察肝组织病理变化和脂质沉积情况;蛋白免疫印迹(Western blot)法对肝组织 PI3K/Akt 和 NF-κB 信号通路中相关蛋白进行检测。**结果** 与其余三组比较,HUA-NAFLD 组大鼠肝指数明显升高($P<0.05$),肝细胞出现大量脂肪空泡,肝索结构模糊,肝组织病变更重。与空白组比较,NAFLD 组高密度脂蛋白(HDL)水平降低,HUA 组尿酸(UA)、低密度脂蛋白(LDL)水平升高,HUA-NAFLD 组 HDL 水平降低,总胆固醇(TC)、UA、LDL 甘油三酯(TG)水平升高($P<0.05$);与 HUA 组比较,NAFLD 组肌酐(UREA)水平降低($P<0.05$);与 HUA-NAFLD 组比较,HUA 组 TC、TG、LDL 水平降低,NAFLD 组 UA、TG、LDL 降低($P<0.05$)。Western blot 结果显示,与空白组比较,NAFLD 组 AKT、p65 磷酸化水平显著升高,HUA-NAFLD 组 AKT、PI3K、p65、IκkB 磷酸化水平显著升高($P<0.05$);与 HUA-NAFLD 组比较,HUA、NAFLD 组 AKT、p65 磷酸化水平显著下降,HUA 组 IκkB 磷酸化水平显著下降($P<0.05$);与 HUA 组比较,NAFLD 组 p65 磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。**结论** HUA-NAFLD 组较单个疾病组生化指标异常更加明显,肝病变程度更重,PI3K/Akt/NF-κB 信号通路可能在 HUA、NAFLD,以及 HUA-NAFLD 发病过程中发挥重要作用。

【关键词】 高尿酸血症;非酒精性脂肪肝;PI3K/Akt 信号通路;NF-κB 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0010-07

Mechanism of hyperuricemia combined with nonalcoholic fatty liver based on the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway

GONG Xiaohong^{1,3}, LI Songwei^{2,3}, LI Huan^{1,3*}, WU Shangwen³, LU Chaoqun², CHEN Yiming⁴

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan Provincial Hospital of Chinese Medicine (the Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine), Zhengzhou 450002.
3. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000.
4. Jiangsu Province Siyang Kangda Hospital, Suqian 223798)

【Abstract】 Objective To study the pathogenesis of hyperuricemia combined with nonalcoholic fatty liver disease

【基金项目】 国家自然科学基金 (81874465); 河南省自然科学基金 (222300420228); 中医药科学研究专项课题 (20-21ZYZD16, 2022ZY1015, 2021JDZY010); 河南中医药大学科研创新项目 (2021KYCX003); 河南省科技攻关项目 (222102310392); 河南省科技计划联合基金项目 (222301420089); 河南省中医药拔尖人才项目 (2022ZYBJ10)。

【作者简介】 龚晓红 (1991—), 女, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治风湿免疫疾病。E-mail: 984051513@ qq. com

【通信作者】 李恒 (1986—), 博士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治风湿免疫疾病。E-mail: 442059122@ qq. com

(HUA-NAFLD) based on the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Sixty-four SD rats were randomly divided into blank, HUA, NAFLD and HUA-NAFLD groups with 16 rats in each group. Samples were collected at weeks 8 and 12. Serum biochemical indexes were measured. Pathological changes and lipid deposition in liver tissue were observed by hematoxylin-eosin staining and oil red O staining. Relevant proteins in PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways in liver tissues were measured by Western blot. **Results** Compared with the other three groups, the liver index of rats in the HUA-NAFLD group was increased significantly ($P<0.05$) with a large number of fat vacuoles in hepatocytes, a blurred structure of the hepatic cord, and more severe liver histopathology. Compared with the blank group, UA and LDL levels in the HUA group were increased, HDL levels in the NAFLD group were decreased, UA, TC, TG and LDL levels in the HUA-NAFLD group were increased, and HDL levels were decreased ($P<0.05$). Compared with the HUA-NAFLD group, TC, TG, and LDL levels were decreased in the HUA group, and UA, TG, and LDL levels in the NAFLD group were decreased ($P<0.05$). Compared with the blank group, AKT and p65 phosphorylation levels in the NAFLD group were increased significantly, AKT, PI3K, p65 and I κ B phosphorylation levels in the HUA-NAFLD group were increased significantly. Compared with the HUA-NAFLD group, AKT and p65 phosphorylation levels in the HUA-NAFLD group were decreased significantly ($P<0.05$). The I κ B phosphorylation level was decreased significantly in the HUA group. Compared with the HUA group, the p65 phosphorylation level in the NAFLD group was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** Compared with the single disease group, the HUA-NAFLD group had more abnormal biochemical indexes and more severe liver lesions. The PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway might play a major role in the pathogenesis of HUA, NAFLD and HUA-NAFLD.

[Keywords] hyperuricemia; nonalcoholic fatty liver disease; PI3K/Akt signaling pathway; NF- κ B signaling pathway

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

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是以血液中尿酸水平增高为特征的一种代谢性疾病, 是嘌呤代谢异常所致的代谢紊乱, 严重者可发展为痛风^[1]。非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是肝组织脂肪堆积导致的病理改变, 可表现为肝细胞脂肪变性和脂肪性肝炎, 疾病发展后期会形成肝硬化, 有的发展为肝癌^[2-3]。近年来, 我国人民生活水平不断得到提高, 研究发现 NAFLD 和 HUA 患病率都呈现增高的趋势^[1, 4]。研究发现二者不仅与血脂紊乱、肥胖、高血压、2 型糖尿病等疾病相关, 而且还是心血管等疾病的重要危险因素^[5]。HUA 与 NAFLD 二者之间关系紧密^[6]。研究发现 HUA 人群中 NAFLD 的患病率显著高于非 HUA 人群, NAFLD 的病变程度也与血尿酸水平密切相关^[7-8]。

PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路在免疫和炎症反应中发挥着重要作用^[9-10]。研究发现该信号通路分别与 HUA 和 NAFLD 发病密切相关^[11-15], 但尚无基于该通路探索高尿酸血症合并非酒精性脂肪肝 (hyperuricemia with nonalcoholic fatty liver disease, HUA-NAFLD) 机制的相关研究。本实验通过 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路探讨 HUA、NAFLD 及 HUA-NAFLD 之间关系, 探讨其发病机制, 为未来研究该病药物治疗靶点提供一定理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 72 只, 体重 (200 $\pm$ 10)g, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [SCXK (鲁) 2019-0003]。在河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 中心实验室 IVC 系统动物室 [SYXK (豫) 2016-0009] 饲养。光照为昼夜各 12 h, 自由饮食, 湿度 60%~70%, 温度 20~25℃。本实验通过河南省中医院实验动物伦理委员会审批 (AF/SC-21/01.0), 遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

氧嗪酸钾 (美国 sigma 公司, 批号 STBJ5376); 高酵母高脂饲料: 48.5% 的基础饲料 + 10% 糖、脂肪、酵母提取物, 10.4% 蛋白质, 2% 胆固醇和 5% 蛋黄粉等; 高脂饲料: 58.5% 基础饲料 + 10% 糖、脂肪, 10.4% 蛋白质, 2% 胆固醇和 5% 蛋黄粉等 (江苏省协同医药生物工程有限公司提供); 羧甲基纤维素钠 (郑州派尼化学试剂厂, 批号 20191107); 油红 O 染液、苏木素染液、分化液、返蓝液 (Servicebio 公司); HE 试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号 G1076); 兔抗大鼠 GAPDH 抗体 (CST 公司, 货号 4970S); 一抗兔抗大鼠 PI3K (p85)、AKT、p-PI3K (p-p85)、p-Akt、p65、p-p65、I κ B、p-I κ B 抗体

(Immunoway 公司, 货号 YM3503、YT0185、YP0765、YP0006、YT3108、YP0191、YT2303、YP0637); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司, 货号 PG113); RIPA 组织裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 货号 R0010); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECLPlus 超敏发光液、蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司, 货号 PC0020、PE0010、P1040); PVDF 膜(德国 Millipore 公司, 货号 IPVH00010)。脱水机、包埋机、病理切片机、组织摊片机(湖北惠达仪器有限公司); 冰冻切片机(Thermo 公司); 正置光学显微镜成像系统(日本尼康)。

1.3 实验方法

1.3.1 HUA-NAFLD 模型制备、分组及给药

将 72 只 SD 大鼠随机分为空白组(Blank group)、HUA 组、NAFLD 组、HUA-NAFLD 组, 每组 16 只。参照文献^[16-17]对 3 个模型组进行造模: 空白组予普通饲料喂养; NAFLD 组予高脂饲料喂养; HUA 组予氧嗪酸钾乳悬液 100 mg/(kg·d) 皮下注射; HUA-NAFLD 组予高酵母高脂饲料喂养+氧嗪酸钾乳悬液 100 mg/(kg·d) 皮下注射; 空白组和 NAFLD 组皮下注射等量生理盐水。所有大鼠均自由饮水、进食, 记录其精神状态、体重、饮食情况。于第 6 周末每组随机处死 2 只进行检测, 模型成功后继续原饲料喂养, 并分别于第 8 周和第 12 周末取材(每组 8 只)。

1.3.2 大鼠体重、肝指数计算

大鼠麻醉后, 对肝组织进行分离, 生理盐水漂洗 2 遍, 滤纸吸干后称重, 记录重量并计算肝指数。大鼠肝指数(%) = 肝重量/体重×100%。

1.3.3 生化指标检测

半自动生化分析仪检测血清中尿酸(uric acid, UA)、肌酐(creatinine, CREA)、尿素氮(urea, UREA)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)数值。

1.3.4 HE 和油红 O 染色法观察肝组织病理变化

取 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小的肝组织, 固定液固定 24 h, 石蜡包埋, 切约 4 μm 厚的切片。HE 染色后, 每张切片选取 3 个视野在光学显微镜下观

察肝病理学改变。制作肝冰冻切片, 入油红染 O 液浸染 8~10 min, 60% 异丙醇分化, 苏木素复染, 返蓝液返蓝, 然后封片, 显微镜下镜检。

1.3.5 Western blot 检测肝组织 PI3K/Akt 和 NF-κB 信号通路中相关蛋白

取肝组织 100 mg, 加入匀浆珠和裂解液进行匀浆和裂解。裂解完全后收集上清, 检测蛋白浓度。加入 5×蛋白上样缓冲液, 沸水浴 15 min 变性。经凝胶电泳分离蛋白, 转膜, 封闭液封闭, 加入一抗 AKT、p-Akt、PI3K、p-PI3K、p65、p-p65、IκB、p-IκB 均按照 1:1 000 进行稀释, 4℃ 孵育过夜, PBST 洗膜 10 min 3 次, 加入二抗(1:10 000), 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 10 min 3 次, 洗去二抗。加入 ECL 溶液充分反应, 暗室曝光, 显影。目标条带的灰度值采用 Image J 软件进行分析。

1.4 统计学方法

采用 Graph prism 8.0.2 软件进行统计分析, 以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示计量资料, 若符合正态分布, 则采用单因素方差进行组间比较, 采用 LSD 检验进行组内比较, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

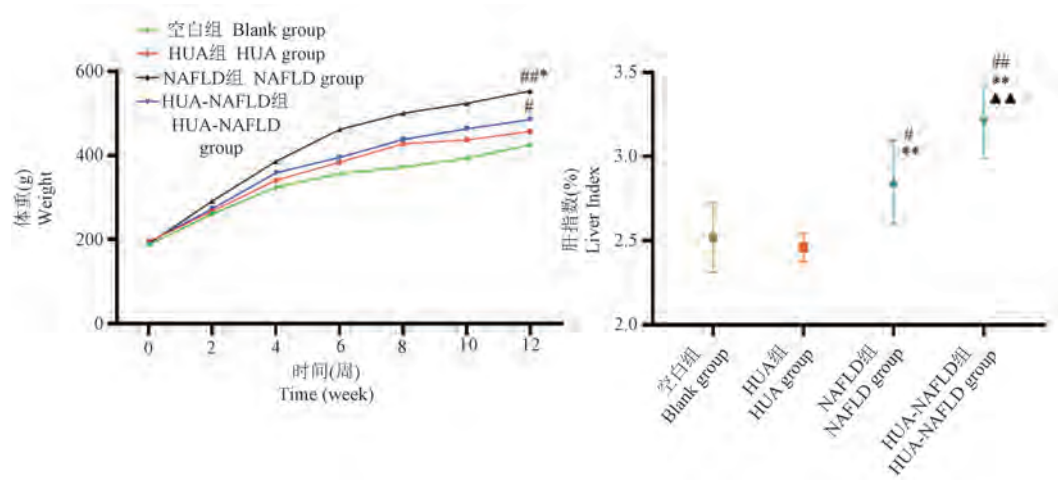
2 结果

2.1 大鼠体重及肝指数变化

由图 1 可知, 各组大鼠体重均随时间推移而增加; 在第 12 周末, 与空白组比较, NAFLD、HUA-NAFLD 组大鼠体重升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 HUA 组比较, HUA-NAFLD 组大鼠体重升高($P < 0.05$)。与空白组比较, NAFLD、HUA-NAFLD 组大鼠肝指数升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 HUA 组比较, NAFLD、HUA-NAFLD 组大鼠肝指数升高($P < 0.01$); 与 NAFLD 组比较, HUA-NAFLD 组大鼠肝指数升高($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠血清生化指标比较

由图 2 可知, HDL 随时间推移而下降, 其余指标随时间推移均升高。由表 1 可知, 在第 12 周末, 与空白组比较, HUA 组 UA、LDL 水平升高, NAFLD 组 HDL 水平降低, HUA-NAFLD 组 UA、TC、TG、LDL 水平升高, HDL 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 HUA 组比较, NAFLD 组 UREA 水平降低($P < 0.05$); 与 HUA-NAFLD 组比较, HUA 组 TC、TG、LDL 水平降低, NAFLD 组 UA、TG、LDL 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



注:第 12 周末,与空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与 HUA 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 NAFLD 组比较, ▲▲ $P<0.01$ 。

图 1 体重和肝指数比较

Note. At the end of 12 weekends, compared with the Blank group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the HUA group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the NAFLD group, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 1 Comparison of body weight and liver index

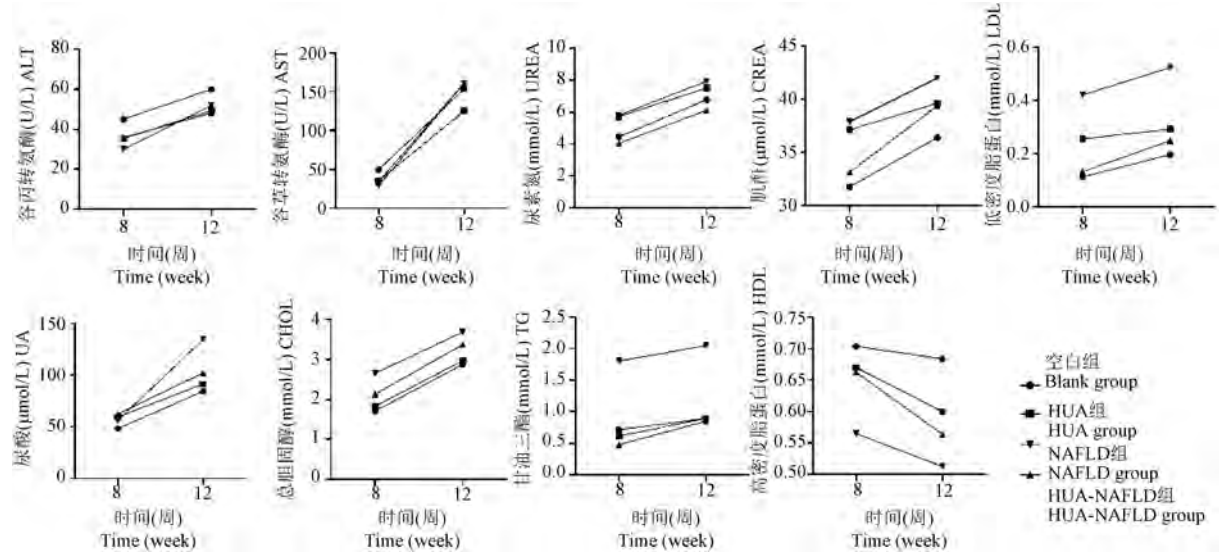


图 2 生化指标比较

Figure 2 Comparison of biochemical indexes

表 1 各组生化指标比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of biochemical indexes in each group

组别 Groups	UREA (mmol/L)	UA (μmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
空白组 Blank group	6.79±0.27	84.38±8.50	2.88±0.14	0.90±0.034	0.68±0.038	0.20±0.02
HUA 组 HUA group	7.53±0.25	133.80±6.00##	2.97±0.18*	0.89±0.061**	0.6±0.03036	0.29±0.02* **
NAFLD 组 NAFLD group	6.13±0.28▲**	106.00±11.31**	3.38±0.16	0.85±0.053**	0.56±0.022#	0.25±0.01**
HUA-NAFLD 组 HUA-NAFLD group	7.95±0.41	153.60±9.48##	3.69±0.14##	2.05±0.18##	0.51±0.02##	0.53±0.03##

注:与空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与 HUA-NAFLD 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 HUA 组比较, ▲ $P<0.05$ 。

Note. Compared with the Blank group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the HUA-NAFLD group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the HUA group, ▲ $P<0.05$.

2.3 肝组织病理变化

HE 染色显示,空白组大鼠肝细胞分布均匀,排列整齐,大小匀称,肝窦正常,无细胞核偏移和脂肪变性;HUA-NAFLD 组大鼠肝细胞出现大量脂肪空泡,呈明显气球样变,大量脂肪空泡将细胞核挤向一侧,肝索结构模糊;NAFLD 组肝细胞细胞质中出现广泛脂肪空泡,但较 HUA-NAFLD 组明显减少,细胞核未发生偏移;HUA 组肝细胞细胞质中可见少量脂肪空泡,肝索结构尚清楚(见图 3)。油红 O 染色显示,空白组肝油红 O 切片中未观察到红色脂滴;HUA 组第 12 周末肝油红 O 切片中可观察到微小的红色脂粒;NAFLD 组肝组织可见弥漫红色脂滴,红色脂滴较 HUA-NAFLD 组偏小;HUA-NAFLD 组可

见明显增多的较大的红色脂滴,呈颗粒状和弥漫性(见图 4)。

2.4 肝组织 PI3K/Akt 和 NF-κB 信号通路中相关蛋白的表达水平

Western blot 结果显示:与空白组比较,NAFLD 组 p-Akt/Akt、p-p65/p65 水平显著升高, HUA-NAFLD 组 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K、p-p65/p65、p-IκkB/IκkB 水平显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与 HUA-NAFLD 组比较,HUA、NAFLD 组 p-Akt/Akt、p-p65/p65 水平显著下降, HUA 组 p-IκkB/IκkB 水平显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$);与 HUA 组比较, NAFLD 组 p-p65/p65 水平显著升高 ($P<0.05$) (见图 5)。

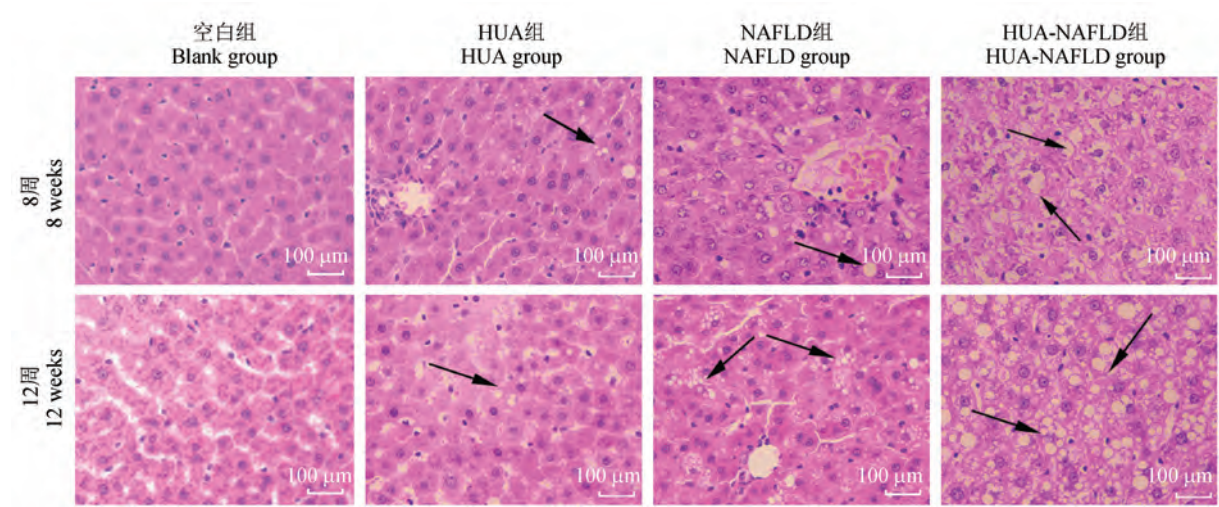


图 3 肝组织 HE 染色
Figure 3 HE staining of liver tissue

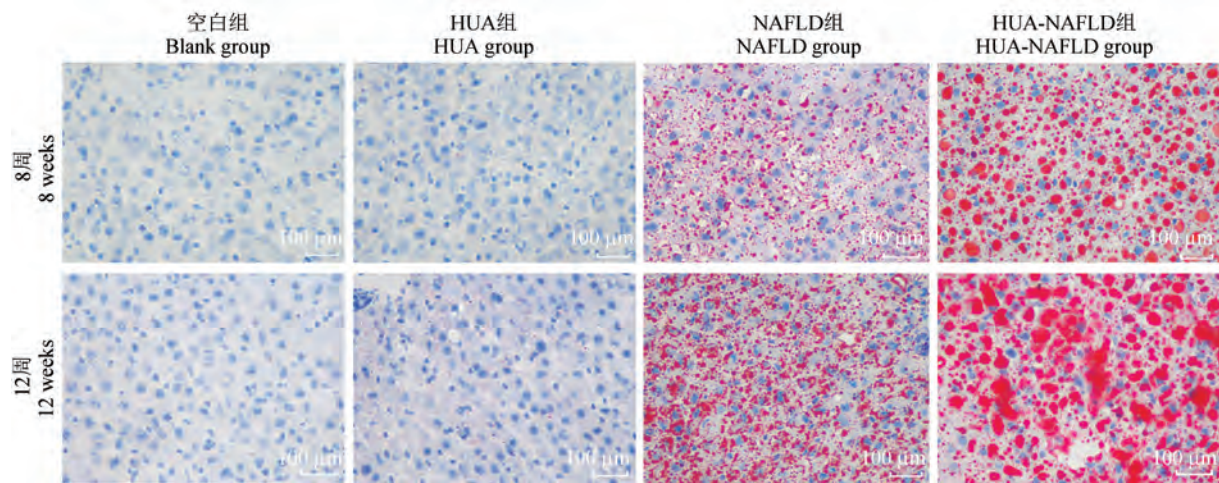
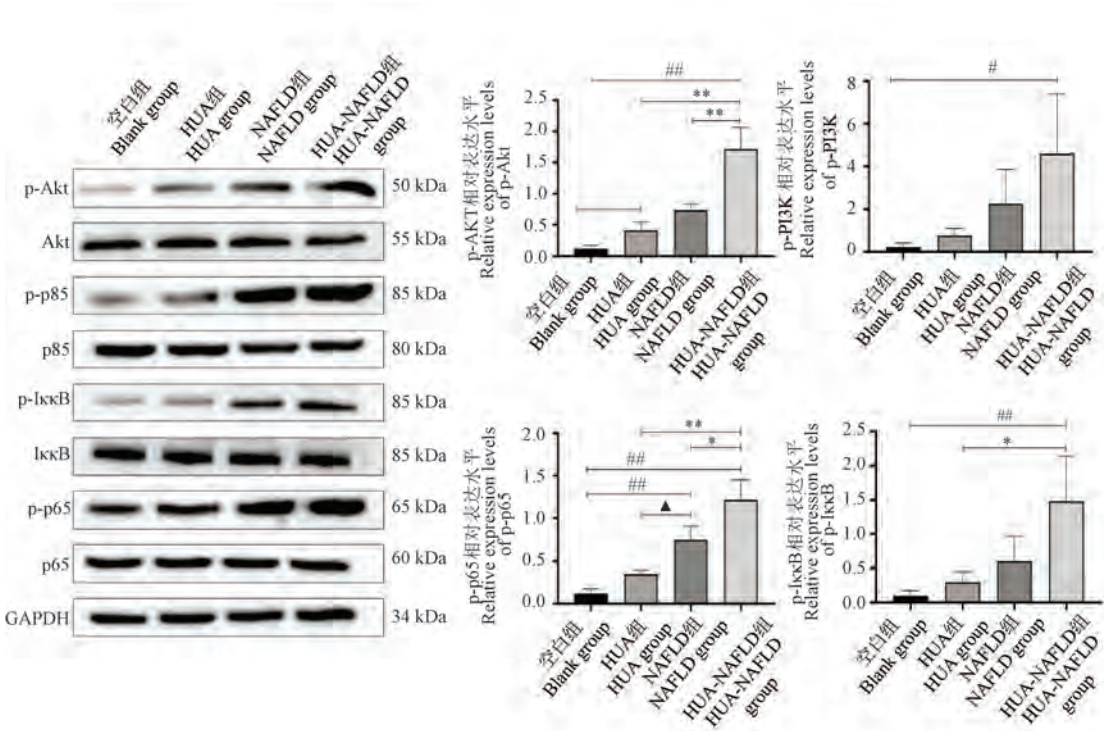


图 4 肝组织油红 O 染色
Figure 4 Oil red O staining of liver tissue



注:与空白组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与HUA-NAFLD组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与HUA组比较, ▲ $P<0.05$ 。

图 5 肝组织 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路中相关蛋白的表达水平

Note. Compared with the Blank group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the HUA-NAFLD group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the HUA group, ▲ $P<0.05$.

Figure 5 Expression levels of related proteins in PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways in liver tissue

3 讨论

HUA 和 NAFLD 都属于代谢性疾病范畴,目前临床上主要应用降尿酸与降脂保肝等药物联合来治疗 HUA-NAFLD^[1]。由于西药作用单一,副作用明显,使得患者依从性降低,特别是无症状 HUA 患者,给临床用药增加了难度^[8]。HUA 与 NAFLD 在临床中常相伴发生,但二者在疾病的发生和发展中是否互相影响,目前在其作用机制方面研究尚浅,应当加深其研究程度。高尿酸血症是脂肪性肝病和其他代谢并发症患者的常见疾病,目前被认为是代谢功能障碍的生物标志物。已有研究表明,高脂饮食会导致血浆甘油三酯和胆固醇显著升高,同时增加尿酸浓度^[18],精确阐明尿酸升高在 NAFLD 发生的具体机制可能有助于将降尿酸治疗作为预防 NAFLD 的新靶点。另一方面,若尿酸的升高其实是机体对 NAFLD 所产生疾病效应的一种自我保护,对 NAFLD 患者进行外源性补充尿酸也许可以变成治疗 NAFLD 的一种新思路。

在 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路中,AKT 作为一

种丝氨酸氨酸激酶,是 PI3K/Akt 信号传导通路下游的重要靶激酶,经过 PI3K 磷酸化激活后可进一步使其下游信号传导细胞因子 I κ ks 磷酸化^[10,19]。I κ k 属于丝/苏氨酸蛋白激酶复合体,一般情况下,NF- κ B 与 I κ B 结合存在于胞质中,磷酸化后的 I κ k 可通过泛素化或磷酸化激活 I κ B,使之与 NF- κ B 解离,从而使 NF- κ B 发生核转位^[20]。NF- κ B 是一种转录因子,在炎症进展过程中发挥核心作用,其激活后可诱发机体产生 C 反应蛋白、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子,诱发炎症反应^[9,21]。大量研究显示,PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路与 HUA 和 NAFLD 的发生有密切联系。谢婷妃^[14]研究发现高尿酸环境可使 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达水平上调,引发炎症细胞因子水平升高,导致人肾小管上皮细胞损伤。抑制 PI3K/Akt 和 NF- κ B 信号通路可降低 HUA 模型鼠 UA、CREA、UREA,改善大鼠肾组织病理形态学改变,保护 HUA 模型鼠肾损伤^[13,22]。抑制该通路还可以降低肝中 TC、TG 含量,改善肝细胞脂肪变性和炎细胞浸润,从而减轻 NAFLD 产生的效应^[12,15,21]。因此,PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的

激活可能使肝肾功生化指标改变,加重肝肾组织病理改变,从而发挥其疾病效应。

本研究结果发现,与 HUA-NAFLD 组比较,HUA 组 TC、TG、LDL 水平降低,NAFLD 组 UA、TG、LDL 降低。HE 结果显示,HUA-NAFLD 组大鼠肝细胞出现大量脂肪空泡,呈明显气球样变,大量脂肪空泡将细胞核挤向一侧,肝索结构模糊;油红 O 染色显示,HUA-NAFLD 组可见明显更多的大红色脂滴,呈颗粒状和弥漫性,病变程度较 NAFLD 组和 HUA 组更加严重。Western blot 结果显示,与空白组比较,NAFLD 组、HUA-NAFLD 组 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路中相关蛋白的磷酸化水平显著升高;与 HUA 组比较,NAFLD 组 p65 磷酸化水平显著升高;与 HUA、NAFLD 组比较,HUA-NAFLD 组 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关蛋白磷酸化水平也显著升高。

综上所述,通过对空白组、HUA、NAFLD 以及 HUA-NAFLD 模型鼠的生化指标、肝病理及 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路进行探究,本研究发现 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路可能在 HUA、NAFLD 以及 HUA-NAFLD 发病过程中发挥重要作用,对该病的发病机制及治疗靶点可提供实验依据。

参考文献:

- [1] 中华医学会内分泌学分会. 中国高尿酸血症与痛风诊疗指南 (2019) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2020, 36(1): 1-13.
- [2] Diehl AM, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. N Engl J Med, 2017, 377(21): 2063-2072.
- [3] Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review [J]. JAMA, 2015, 313(22): 2263-2273.
- [4] 范建高, 曾静. 非酒精性脂肪性肝病的流行现状与危害 [J]. 中华消化杂志, 2020, 40(9): 577-580.
- [5] 梅丽萍, 孙星达, 李彬. 高尿酸血症与非酒精性脂肪性肝病的相关性研究进展 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2018, 26(8): 620-623.
- [6] 厉有名. 非酒精性脂肪性肝病与高尿酸血症相互关系的研究现状及展望 [J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(2): 89-91.
- [7] Li Y, Xu C, Yu C, et al. Association of serum uric acid level with non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study [J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 1029-1034.
- [8] Sandra S, Lesmana CRA, Purnamasari D, et al. Hyperuricemia as an independent risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) progression evaluated using controlled attenuation parameter-transient elastography: lesson learnt from tertiary

referral center [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(1): 424-428.

- [9] Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10): 725-734.
- [10] Martini M, de Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372-383.
- [11] 丁云录, 欧喜燕, 李驰坤, 等. 清肝降浊方基于 TLR4/NF- κ B 信号通路治疗非酒精性脂肪肝病作用机制研究 [J]. 吉林中医药, 2021, 41(11): 1489-1492.
- [12] 衣朝雷, 陈威. 调肝祛脂方介导 PI3K/Akt-mTOR 通路干预非酒精性脂肪肝的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2013, 20(2): 119-121, 104.
- [13] 撒利建. 乌索酸对高尿酸血症大鼠 ICAM-1、CRP、NF- κ B 表达的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [14] 谢婷妃. 尿酸诱导 HK-2 细胞炎症损伤中 PI3K/AKT/NF- κ B 表达的影响 [D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [15] 熊建团, 顾铃毓, 王青青, 等. TLR4/NF- κ B 信号通路对 CBS^{+/+} 小鼠非酒精性脂肪性肝病的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7): 1227-1232.
- [16] Xu K, Liu S, Zhao X, et al. Treating hyperuricemia related non-alcoholic fatty liver disease in rats with resveratrol [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 110: 844-849.
- [17] 蔡兆斌, 赵旭, 赵鹏杰, 等. 不同方法建立高尿酸合并非酒精性脂肪肝模型的对比研究 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1234-1238.
- [18] Elseweidy MM, Elesawy AE, Sobh MS, et al. Ellagic acid ameliorates high fructose-induced hyperuricemia and non-alcoholic fatty liver in Wistar rats: focusing on the role of C1q/tumor necrosis factor-related protein-3 and ATP citrate lyase [J]. Life Sci, 2022, 305: 120751.
- [19] Zha L, Chen J, Sun S, et al. Soyasaponins can blunt inflammation by inhibiting the reactive oxygen species-mediated activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107655.
- [20] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B [J]. Nat Med, 2005, 11(2): 183-190.
- [21] 张新, 陈文娜, 宋因, 等. 基于分子互作网络探讨丹菱片干预 PI3K/AKT/NF- κ B/TNF 通路防治非酒精性脂肪肝病的机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(11): 1324-1332.
- [22] 杜彭, 陈明, 兰颖, 等. 微 RNA-181 靶向磷酸酶张力蛋白基因调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶信号通路在高尿酸血症大鼠肾损伤中的作用 [J]. 中华风湿病学杂志, 2020, 24(8): 530-535, C8.

[收稿日期] 2023-03-13

陈星, 娄翔宇, 尚艺婉, 等. 六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 17-24.

Chen X, Lou XY, Shang YW, et al. Mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction in the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 17-24.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.003

六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究

陈 星¹, 娄翔宇¹, 尚艺婉¹, 周哲旭¹, 刘 洋¹, 刘娅茹¹, 胡啸博¹, 陈玉龙^{2*}

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.河南省中医方证信号传导重点实验室, 郑州 450046)

【摘要】 目的 探索六君子汤乙酸乙酯提取物(EAELD)对癌相关成纤维细胞(CAFs)条件培养基下食管癌 EC9706 细胞能量代谢影响的分子机制。**方法** 噻唑蓝(MTT)法检测 EAELD 对 EC9706 增殖活性的影响; 比色法检测 EAELD 对 CAFs 条件培养基(CAFM)下 EC9706 细胞上清中乳酸及葡萄糖含量的影响; Seahorse 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响; 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 EAELD 对能量代谢相关分子 mRNA 及蛋白表达的影响。**结果** 与 DMEM 相比, 除 10 μg/mL 组外, EAELD 对 EC9706 细胞增殖活性均有明显抑制作用($P<0.05$), 选取抑制浓度(IC_{50}) 25 μg/mL, 半抑制浓度(IC_{50}) 40 μg/mL, 作为低、高剂量组进行后续实验。在 CAFM 培养的 EC9706 细胞各组中, EAELD 低、高剂量组都能显著降低非线粒体耗氧、基础呼吸值、最大呼吸值、合成 ATP 耗氧量、备用呼吸能力、基础糖酵解、补偿糖酵解、糖酵解潜能($P<0.01$), 减少 EC9706 细胞上清乳酸含量($P<0.01$), 下调 GLUT1 的 mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$), 下调 p-PKM2、HK2、PKM2、MCT1 蛋白表达($P<0.01$); EAELD 高剂量组能够下调 EC9706 细胞的线粒体耗氧与基础糖酵解比值($P<0.05$), 减少 EC9706 细胞葡萄糖摄取($P<0.05$), 下调 p-PKM2、GLUT1 的蛋白表达($P<0.01$, $P<0.05$); EAELD 低剂量组能够下调 MCT1 的 mRNA 表达($P<0.05$)。**结论** 六君子汤乙酸乙酯提取物能够干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢, 其机制可能与 EAELD 调控 HK2、PKM2、GLUT1、MCT1、MCT4 的 mRNA 和蛋白表达相关。

【关键词】 癌相关成纤维细胞; 条件培养基; 六君子汤乙酸乙酯提取物; 能量代谢; 食管癌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0017-08

Mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction in the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium

CHEN Xing¹, LOU Xiangyu¹, SHANG Yiwan¹, ZHOU Zhexu¹, LIU Yang¹, LIU Yaru¹, HU Xiaobo¹, CHEN Yulong^{2*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Henan Provincial Key Laboratory of Prescription and Syndrome Signal Transduction, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Objective To explore the molecular mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction (EAELD) on energy metabolism in esophageal cancer EC9706 cells in conditioned medium from cancer-associated fibroblasts (CAFs). **Methods** Methyl thiazol tetrazolium assays were used to assess the effect of EAELD on EC9706 cell proliferation. The effects of EAELD on lactate and glucose in the culture supernatant of EC9706 cells in CAF-conditioned medium were assessed by colorimetry. A seahorse system for energy metabolism analysis was used to assess the effect of EAELD on energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium. Real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to measure mRNA and protein expression of energy metabolism-related molecules. **Results**

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82074313)。

【作者简介】 陈星(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤的病机与防治。E-mail: 1183761889@qq.com

【通信作者】 陈玉龙(1972—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治肿瘤机制。E-mail: cyl72621@163.com

Compared with DMEM, except for the 10 $\mu\text{g/mL}$ group, EAELD had a significant inhibitory effect on EC9706 cell proliferation ($P<0.05$). The 30% inhibitory concentration (IC_{30}) of 25 $\mu\text{g/mL}$ and half inhibitory concentration (IC_{50}) of 40 $\mu\text{g/mL}$ were selected as low and high doses for subsequent experiments. In EC9706 cells cultured in CAFM, both low and high dose EAELD groups had significantly reduced non-mitochondrial oxygen consumption, basal respiration, maximum respiration, oxygen consumption of ATP synthesis, spare respiration capacity, basal glycolysis, compensative glycolysis, and glycolysis potential ($P<0.01$). Lactate content of EC9706 cells was decreased ($P<0.01$), mRNA expression of GLUT1 ($P<0.05$, $P<0.01$) was downregulated, and protein expression of p-PKM2, HK2, PKM2 and MCT1 was downregulated ($P<0.01$). The high dose EAELD group had downregulated mitochondrial oxygen consumption and basal respiration. The glycolytic ratio of ($P<0.05$) and glucose uptake of EC9706 cells were reduced ($P<0.05$) and protein expression of p-PKM2 and GLUT1 was downregulated ($P<0.01$, $P<0.05$). The low dose group of EAELD had downregulated mRNA expression of MCT1 ($P<0.05$). **Conclusions** EAELD interferes with the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium, and its mechanism may be related to regulation of HK2, PKM2, GLUT1, MCT1 and MCT4 mRNA and protein expression.

【Keywords】 cancer-associated fibroblasts; conditioned medium; ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction; energy metabolism; esophageal cancer

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

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,根据 2020 年中国癌症调查报告显示,食管癌是发病率排名第六位的恶性肿瘤^[1]。尽管随着医疗水平的发展和进步,食管癌的五年生存率有了一定提升,但仅仅维持在 18%左右^[2-4]。

肿瘤细胞的生长与肿瘤微环境中存在的癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)关系密切。在肿瘤微环境中,CAFs 是肿瘤微环境中含量最丰富的细胞,可为肿瘤细胞提供各种能量物质,促进肿瘤细胞生长、增殖^[5-7]。因此,CAFs 对肿瘤细胞的能量代谢有着重要作用。

前期研究发现六君子汤乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction, EAELD)可以通过调节 AMPK/mTOR 通路影响 EC9706 细胞的能量代谢,抑制该细胞的活性,并增强化疗药顺铂对 EC9706 细胞的疗效^[8],且 70%~80%细胞融合度的 CAFM,含量为 60%时能够明显促进 EC9706 细胞的能量代谢,因此,本研究拟通过 CAFs 与 EC9706 细胞体外间接共培养,探讨 EAELD 是否通过干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢,进而影响肿瘤细胞的增殖,为六君子汤的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人食管鳞癌 EC9706 细胞,由河南中医药大学分子生物中心提供,本实验室传代培养。人癌相关成纤维细胞(CAFs),由课题组分离并鉴定。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基(货号:12100)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(货号:T1300)、噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 货号:M8180)(Solarbio 公司);胎牛血清(Lonsera 公司,货号:A97E00G);二甲基亚砜(DMSO, Amresco 公司,货号:D8370);乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所,货号:A019-2-1);葡萄糖比色法测试盒(Elabscience 公司,货号:E-BC-K234-M);XF 糖酵解速率测定试剂盒(货号:10334-100);水化液(货号:08418001)、XF96 孔细胞培养板(货号:101085-004)、基础检测培养基(货号:23217002)、XFp 细胞线粒体压力测试试剂盒(货号:103101-100, Agilent 公司);兔抗人 M2 型丙酮酸激酶抗体(Pyruvate kinase isozyme type M2, PKM2, 货号:4053s);兔抗人 p-PKM2 抗体(货号:3827s)、兔抗人己糖激酶 2 抗体(Hexokinase 2, HK2, 货号:2867s)、兔抗人 α -微管蛋白抗体(α -Tubulin, 货号:2125s)(CST 公司)、兔抗人葡萄糖转运蛋白 1 抗体(Glucose transporter 1, GLUT1, 货号:YN4056)、兔抗人单羧酸转运体-1 抗体(monocarboxylic acid transporter 1, MCT1, 货号:ab179832)、兔抗人 MCT4 抗体(Monocarboxylic acid transporter 4, 货号:ab234728)(Immunoway 公司);反转录试剂盒(Toyobo 公司,货号:117000);2 $\times$ SYBR[®] Green (武汉 ABclonal 公司,货号:RM21203)。

酶标仪(BIO-TEK 公司,型号:ELx-800);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司,型号:371);超净工作台

(苏净集团安泰公司,型号 37997);能量代谢分析系统(美国 Agilent 公司,型号:Seahorse XFe96);倒置显微镜(德国 Laica 公司,型号:DFC450C);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号:QuantStudio™ 6 Flex);荧光分光光度计(美国 Thermo 公司,型号:NanoDrop One);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:PowerPac Basic);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:Universal Hood II)。

1.3 实验方法

1.3.1 六君子汤乙酸乙酯部位提取

六君子汤组成参照《医学正传》,按照人参:白术:茯苓:甘草:陈皮:半夏=1:1.5:1:1:1:1.5 打成粗粉混匀,以 M(药物重量):V(70%乙醇体积)=1:8 比例混匀于圆底烧瓶内,设置加热温度为 50℃,煮沸 1.5 h 后,8 层纱布过滤药渣,重复两次。将药液静置过夜后进行浓缩,浓缩体积大约与生药总重量相当,浓缩液与乙酸乙酯体积比为 2:1 进行萃取,萃取 6 次,合并萃取液,过滤,旋转蒸发仪回收乙酸乙酯后,水浴锅浓缩,低温真空干燥,称重,为 EAELD。经质谱分析鉴定其共有 663 种物质,主要成分以 2-羟基肉桂酸、4-二羟基苯甲酸、5-羟基酸橙黄酮、草黄素-8-C-葡萄糖苷(金雀花素)、高车前素-8-C-葡萄糖苷等酚酸类、黄酮类为主。

1.3.2 细胞的传代与培养

EC9706 细胞与 CAFs 均采用由 10% 的胎牛血清和 90% DMEM 含双抗的高糖培养基配制成的完全培养基进行培养,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中,待细胞融合度达 80%~90% 进行 1:3~1:5 传代。

1.3.3 条件培养基的制备

取对数生长期的 CAFs 细胞,根据实验所需的细胞数,用 8 mL 完全培养基重悬,放入 CO₂ 培养箱中,培养 24 h 后,使细胞融合度达 70%~80%,1 mL PBS 洗涤后,依次加入 10 mL 不含胎牛血清的 DMEM 含双抗高糖培养基,继续培养 48 h 后,收集培养基为 CAFM, -20℃ 保存 1 周, -80℃ 长期保存。

1.3.4 MTT 法检测 EAELD 对 EC9706 细胞增殖的影响

取对数生长期的 EC9706 细胞,每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板里,置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h,用不含胎牛血清的 DMEM 含双抗高糖培养基,将 EAELD 工作液配制为不同浓度(0、10、20、40、60、80 μg/mL),置于 CO₂ 培养箱继续培养 48 h。按照

DMEM:5 mg/mL MTT=9:1,每孔 100 μL 加入 MTT 工作液,4 h 后,每孔加入 150 μL 的 DMSO,酶标仪检测 570 nm 波长下各孔吸光值,计算各组药物抑制率,选取 IC₃₀、IC₅₀ 为后续实验用药,实验重复 3 次。药物抑制率=(空白对照组 OD 值-用药组 OD 值)/空白对照组 OD 值×100%

1.3.5 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响

取对数生长期的 EC9706 细胞,接种于 Seahorse 96 孔板中,每孔细胞悬液 80 μL,每孔 8000 个细胞,每组 3 个复孔。置于 CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,根据 1.3.4 中 MTT 检测结果加药,选取浓度为 25 μg/mL 作为低剂量组、40 μg/mL 作为高剂量组,用条件培养基配制 EAELD 工作液,分别处理细胞,继续培养 48 h。不添加 EAELD 的计作 CAFM 组。按照说明书,检测各组细胞能量代谢情况。实验结果由 Wave 软件分析。

1.3.6 比色法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞上清乳酸含量及葡萄糖摄取量

取对数生长期的 EC9706 细胞,按照一定数量接种于 6 孔板中,培养 24 h 后加药(分组同 1.3.5),继续培养 48 h 后,收集细胞上清,1500 r/min,5 min 离心,PBS 稀释 3~5 倍。按说明书要求进行检测,并测定条件培养基中乳酸、葡萄糖的浓度,计算加药培养后培养基中乳酸、葡萄糖含量的变化。

1.3.7 RT-qPCR 法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响

细胞分组同(1.3.5),用 TRIzol 提取总 RNA,超微量分光光度计测定总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处 A 值,计算 RNA 浓度,以 10 μL 体系进行反转录,再以 10 μL 体系对 c-DNA 进行扩增,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各个样品中目的 mRNA 相对表达量。引物由郑州点睛公司设计合成,序列见表 1。

1.3.8 Western blot 法检测 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子蛋白表达的影响

细胞分组同(1.3.5),以 RIPA 裂解液:蛋白磷酸酶抑制剂:蛋白酶抑制剂=100:1:1 的比例,配制细胞裂解液混合物,每孔加入 100 μL 裂解细胞,按 BCA 试剂盒说明测定蛋白浓度,98℃ 变性 8 min,取 20 μg 蛋白上样,用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜 75 min,5% 脱脂牛奶室温封闭 4 h,一抗 HK2、PKM2、p-PKM2、GLUT1、MCT1、α-

Tubulin 按照 1 : 1000 比例稀释, MCT4 按照 1 : 3000 比例稀释, 孵育 4℃ 过夜, TBST 漂洗 3 次, 二抗按照 1 : 1000 比例稀释, 室温孵育 1 h, 再次漂洗 3 次, 配制 ECL 发光显影液, 上机检测, 显影拍照。以 α -Tubulin 为内参, 使用“Image Lab”分析每组条带的光密度值, 以目的条带光密度值/内参条带光密度值, 计算各组蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

每组实验重复 3 次, 数据采用 IBM SPSS 21.0 软件进行分析, 结果采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行描述。若结果符合正态分布且方差齐, 两组之间对比采用独立样本 t 检验; 多组之间比较则采用单因素方差分析, 两两对比以 LSD 为统计依据。若符合正态分布, 方差不齐, 以 Dunnett T_3 为统计依据。若不符合正态分布, 则选择非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EAELD 对食管癌 EC9706 细胞增殖的影响

与 DMEM 组相比, 除 10 $\mu\text{g/mL}$ 组外, 不同浓度

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	序列 Sequence
hGLUT1-F	5'-ATTGGCTCCGGTATCGTCAAC-3'
hGLUT1-R	5'-GCTCAGATAGGACATCCAGGGTA-3'
hHK2-F	5'-GGCACAGACATCATTATGGGTC-3'
hHK2-R	5'-GATGCAGACTTGTCGCTGG-3'
hPKM2-F	5'-ATGTGGAAGCCCCATAGTGAA-3'
hPKM2-R	5'-TGGGTGGTGAATCAATGTCCA-3'
h β -Actin-F	5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
h β -Actin-R	5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'
hMCT1-F	5'-GGTGGAGGTCTATACGACAGT-3'
hMCT1-R	5'-CAGAAAGAAGCTGCAATCAAGC-3'
hMCT4-F	5'-AGGTATCCTTGAGACGGTCAG-3'
hMCT4-R	5'-CAAGCAGTTAGTGATGCCG-3'

表 2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞线粒体能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

线粒体压力指标 (pmol/min) Mitochondrial pressure index	EAELD ($\mu\text{g/mL}$)		
	0	25	40
非线粒体耗氧 Non-mitochondrial oxygen consumption	77.80 $\pm$ 10.44	40.80 $\pm$ 4.84 **	17.00 $\pm$ 3.03 **
基础呼吸值 Basal respiration value	115.40 $\pm$ 6.89	61.00 $\pm$ 10.85 **	24.72 $\pm$ 1.68 **
最大呼吸值 Maximum respiration value	162.26 $\pm$ 9.81	79.94 $\pm$ 10.44 **	34.69 $\pm$ 3.28 **
合成 ATP 耗氧量 Oxygen consumption of ATP synthesis	11.16 $\pm$ 2.15	5.41 $\pm$ 2.3 **	1.59 $\pm$ 2.15 **
备用呼吸能力 Spare respiration capacity	46.86 $\pm$ 9.23	18.94 $\pm$ 3.27 **	9.97 $\pm$ 3.33 **

注:与 CAFM 组相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CAFM group, ** $P<0.01$.

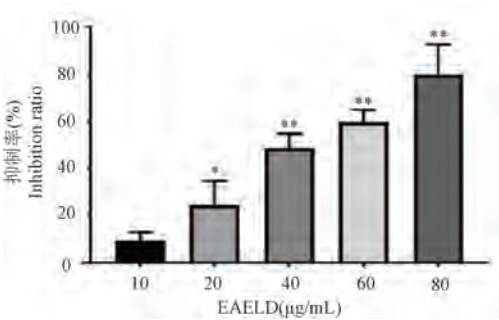
的 EAELD 对 EC9706 细胞的增殖均有抑制作用($P<0.05$), 抑制率随 EAELD 浓度的升高而升高, 选取 25 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 分别为低浓度组、高浓度组。见图 1。

2.2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢的影响

与 CAFM 组相比, EAELD 低剂量组和高剂量组都能够显著降低非线粒体耗氧、基础呼吸值、最大呼吸值、合成 ATP 耗氧量、备用呼吸能力、基础糖酵解、补偿糖酵解、糖酵解潜能($P<0.01$), EAELD 高剂量组能够下调 EC9706 细胞的线粒体耗氧与基础糖酵解比值($P<0.05$)。见表 2、表 3, 图 2。

2.3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞上清乳酸含量及葡萄糖摄取量的影响

与 CAFM 组相比, EAELD 高剂量组能够减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞葡萄糖摄取($P<0.05$), EAELD 低剂量组和高剂量组均能减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞上清乳酸含量($P<0.01$)。见图 3。



注:与 DMEM 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 1 EAELD 对 EC9706 细胞增殖的影响($n=3$)

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

Figure 1 Effects of EAELD on EC9706 cell proliferation

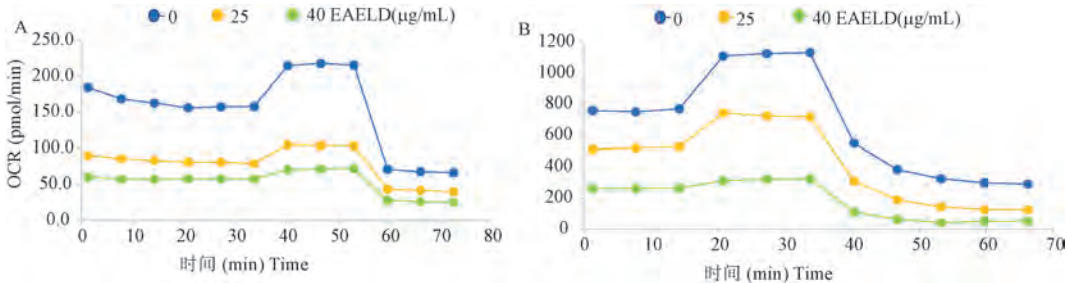
2.4 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响

与 CAFM 组相比,EAELD 的低剂量组和高剂量组都能够下调 GLUT1 的 mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$);EAELD 低剂量组能够下调 MCT1 的 mRNA 表达 ($P<0.05$)。见表 4。

表 3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞糖酵解能力的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 3 Effects of EAELD on the glycolytic capacity of EC9706 cells under CAFM

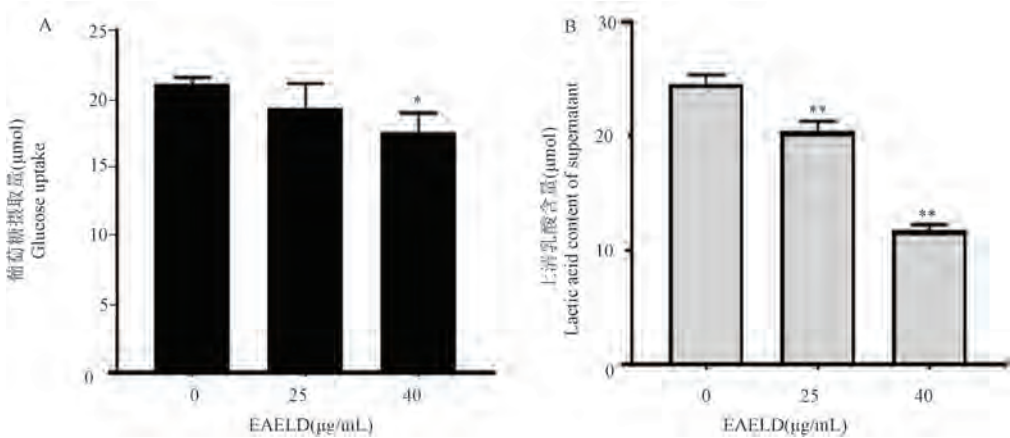
糖酵解指标 (pmol/min) Indicators of glycolysis	EAELD (μg/mL)		
	0	25	40
基础糖酵解 Basal glycolysis	789.72±146.04	410.18±148.77**	311.11±75.93**
补偿糖酵解 Compensative glycolysis	1274.88±197.67	678.48±169.42**	424.26±129.51**
线粒体耗氧与基础;糖酵解比值 [△] Mitochondrial oxygen consumption and basal use; glycolytic ratio [△]	0.14±0.02	0.15±0.05	0.08±0.02**
糖酵解潜能 Glycolytic potential	378.41±73.27	210.1±44.33**	88.03±44.38**

注: [△]表示该比值无单位。与 CAFM 组相比, ** $P<0.01$ 。
Note. [△] indicates the ratio has no unit. Compared with CAFM group, ** $P<0.01$.



注: A: 线粒体呼吸能力; B: 糖酵解速率。
图 2 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞线粒体呼吸能力和糖酵解速率影响的“海马”曲线
Note. A, Mitochondrial respiratory capacity. B, Glycolysis rate.

Figure 2 “Hippocampus” curve of the effect of EAELD on mitochondrial respiratory capacity and glycolysis rate of EC9706 cells under CAFM



注: A: 葡萄糖摄取量; B: 上清乳酸含量。与 CAFM 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 3 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞代谢物质的影响 ($n=3$)
Note. A, Glucose uptake. B, Lactic acid content of supernatant. Compared with CAFM group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effects of EAELD on the metabolism of EC9706 cells under CAFM

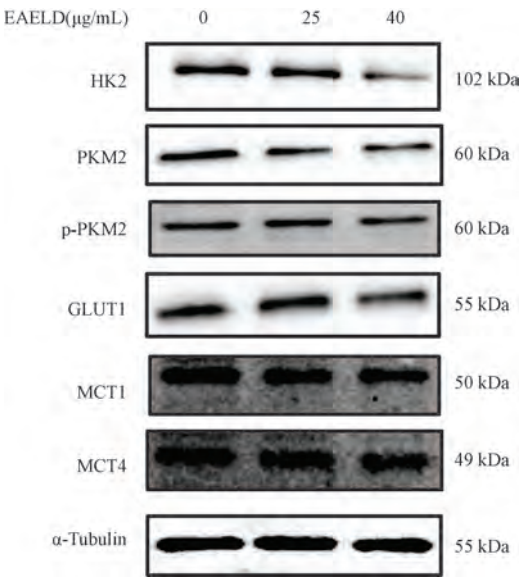


图 4 EAELD 对 CAFM 中 EC9706 能量代谢相关分子蛋白的影响

Figure 4 Effects of EAELD on molecular proteins related to EC9706 energy metabolism in CAFM

表 4 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of EAELD on mRNA expression related to energy metabolism in EC9706 cells under CAFM

mRNA 名称 mRNA name	EAELD($\mu\text{g/mL}$)		
	0	25	40
HK2	1	0.85 $\pm$ 0.06	1.45 $\pm$ 0.4
PKM2	1	0.82 $\pm$ 0.21	0.9 $\pm$ 0.18
GLUT1	1	0.71 $\pm$ 0.15 *	0.64 $\pm$ 0.07 **
MCT1	1	0.72 $\pm$ 0.16 *	0.99 $\pm$ 0.14
MCT4	1	1.04 $\pm$ 0.28	0.96 $\pm$ 0.27

注:与 CAFM 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CAFM group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

表 5 EAELD 对 CAFM 下 EC9706 细胞能量代谢相关分子蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effects of EAELD on molecular protein expression related to energy metabolism in EC9706 cells under CAFM

蛋白名称 Protein name	EAELD($\mu\text{g/mL}$)		
	0	25	40
p-PKM2	0.31 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.03 **
HK2	1.74 $\pm$ 0.52	0.86 $\pm$ 0.17 **	0.8 $\pm$ 0.33 **
PKM2	1.42 $\pm$ 0.29	0.71 $\pm$ 0.25 **	0.42 $\pm$ 0.2 **
GLUT1	0.65 $\pm$ 0.12	0.51 $\pm$ 0.1	0.39 $\pm$ 0.13 *
MCT1	0.47 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.06 **	0.23 $\pm$ 0.08 **
MCT4	0.1 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.04

注:与 CAFM 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with CAFM group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

食管癌属于中医学“噎膈”病的范畴。食管癌的发生与脾胃功能异常有着密切联系,正如《灵枢·四时气》曰:“饮食不下,膈塞不通,邪在胃脘”^[9]。脾胃失调是其主要病机,健脾和胃法是治疗“脾胃失调”这一病机的常用方法,也是食管癌的常用治法之一,其代表方为六君子汤,该方出自《医学正传》,由人参、白术、茯苓、甘草、陈皮、半夏,六味药物组成,全方共奏益气健脾、燥湿化痰之效,是治疗食管癌的常用方药,临床应用发现六君子汤具有抗肿瘤、对放化疗增效减毒、调节恶性肿瘤患者免疫功能等作用^[10]。

肿瘤细胞与 CAFs 细胞的能量交互,是在单羧酸转运蛋白(MCTs)的作用下,肿瘤细胞与 CAFs 之间实现了乳酸、丙酮酸的高效利用^[11-13],前期研究发现随着 EAELD 浓度的增加,对 EC9706 的抑制率也随之增加,并且调节 AMPK/mTOR 通路影响 EC9706 细胞的能量代谢^[8],其次发现 70%~80%细胞融合度的 CAFs 条件培养基在 60%的浓度时对 EC9706 的增殖作用最明显,基于此,本研究以 CAFs 条件培养基培养的 EC9706 细胞为对象,研究 EAELD 能否干预其能量代谢。

首先采用 Seahorse 能量代谢分析系统检测 EAELD 对 CAFs 条件培养基下的 EC9706 细胞能量代谢的影响。结果显示 EAELD 的低剂量组和高剂量组均可以明显抑制在 CAFM 中的 EC9706 细胞糖酵解能力和线粒体呼吸能力。由于糖酵解利用 1 分子葡萄糖可生成 2 分子的三磷酸腺苷(ATP),因此癌细胞需要增加葡萄糖的摄取来维持高水平的糖酵解,而 EAELD 可以减少 CAFM 培养的 EC9706 细胞的葡萄糖的摄取与上清中乳酸的含量。

GLUT1 是转运葡萄糖的关键蛋白,GLUT1 顺浓度梯度将葡萄糖转运至细胞内,为肿瘤细胞提供代谢原料^[14]。HK2、PKM2 作为糖酵解限速酶,HK2 能够与线粒体外膜的电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 1(VDAC1)相互作用并结合,促进 ATP 合成相关酶的激活,增强 ATP 的产生、促进糖酵解、抑制细胞凋亡,为肿瘤细胞提供合成大分子的碳源^[15-17]。PKM2 是糖酵解过程的最后一个限速酶,可将磷酸烯醇式丙酮酸快速转化为丙酮酸、加快糖酵解速率、产生更多的 ATP^[18-21]。PKM2 的翻译后修饰影响着 PKM2 的活性,PKM2 的酪氨酸残基 105

(Y105)被磷酸化后,能够促进 PKM2 二聚体的形成,抑制四聚体活性,增加肿瘤细胞的生物合成,以促进肿瘤细胞的增殖^[22-23]。MCTs 能够催化 L-乳酸、丙酮酸等单羧酸盐和酮体跨质膜的质子连接转运,在肿瘤代谢中起着至关重要的作用^[24-25],其中 MCT1 根据细胞内外的主要底物浓度以及跨质膜的 pH 梯度,进行 L-乳酸在质膜上的转运,而 MCT4 在糖酵解活跃的组织中表达更多,主要作用是从细胞中排出乳酸^[24,26],CAFs 与肿瘤细胞之间可通过 MCT1、MCT4 实现乳酸的高效利用,促进糖酵解与氧化磷酸化能力的增强,促进肿瘤细胞的代谢与增殖^[27-28]。研究结果显示,EAELD 能够下调 GLUT1、MCT1 的 mRNA 表达,降低 GLUT1、HK2、PKM2、MCT1、p-PKM2 蛋白的表达,因此 EAELD 能够通过调控 GLUT1、HK2、PKM2、MCT1 分子,抑制 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞的能量代谢。

此外,研究中发现 MCT1、HK2、PKM2 mRNA 的水平随着 EAELD 浓度的浓度升高而升高,其原因可能是 MCT1 对乳酸亲和力高于 MCT4,MCT4 在低氧条件下更为活跃,在缺少 MCT4 的细胞中,MCT1 根据细胞内外乳酸水平,决定乳酸进出细胞^[29-30],由此推测在常氧环境中,EC9706 细胞主要由 MCT1 实现乳酸的转运。由于肿瘤细胞的代谢途径会随环境变化而变化,有研究表明:血清饥饿后,人胶质瘤细胞 U251 的氧化磷酸化水平会增加,糖酵解能力被抑制^[31],因此推测肿瘤细胞在血清饥饿与 EAELD 的干预下,其代谢方式主要为糖酵解,MCT1 的表达升高用于转运乳酸。而 HK2、PKM2 虽然有升高趋势,但是并无统计学差异,其次从 mRNA 到蛋白,中间受较多因素的调控,其中翻译效率、蛋白质的降解都会影响最终蛋白的表达,具体机制尚不明确,将进行进一步验证。

综上所述,EAELD 能够干预 CAFM 下 EC9706 细胞的能量代谢的影响,其机制与其能够调控 HK2、PKM2、GLUT1、MCT1、MCT4 的 mRNA 和蛋白表达相关。然而 EAELD 调控能量代谢相关通路的机制有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. Int J Cancer, 2019, 144(8): 1941-1953.

[2] GBD Oesophageal Cancer Collaborators. The global, regional,

and national burden of oesophageal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990~2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(6): 582-597.

[3] Li T, Chen S, Zhang Z, et al. Chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy in patients with small cell carcinoma of the esophagus: a SEER database analysis [J]. Cancer Control, 2021, 28: 1073274821989321.

[4] Tay SW, Li JW, Fock KM. Diet and cancer of the esophagus and stomach [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2021, 37(2): 158-163.

[5] Roy A, Bera S. CAF cellular glycolysis: linking cancer cells with the microenvironment [J]. Tumour Biol, 2016, 37(7): 8503-8514.

[6] Higashino N, Koma YI, Hosono M, et al. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Lab Invest, 2019, 99(6): 777-792.

[7] Tian B, Chen X, Zhang H, et al. Urokinase plasminogen activator secreted by cancer-associated fibroblasts induces tumor progression via PI3K/AKT and ERK signaling in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(26): 42300-42313.

[8] 尚艺婉. 基于 AMPK/mTOR 研究健脾和胃法及代表方六君子汤增加顺铂对食管癌细胞 EC9706 疗效机制 [D]. 郑州: 河南中医药大学, 2019.

[9] 佚名(战国). 黄帝内经灵枢 [M]. 太原: 山西科学技术出版社; 2019.

[10] 孟丹华, 李晨旭, 尚艺婉, 等. 六君子汤治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 172-174.

[11] Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments [J]. Dis Model Mech, 2011, 4(6): 727-732.

[12] Wanandi SI, Ningsih SS, Asikin H, et al. Metabolic interplay between tumour cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) under hypoxia versus normoxia [J]. Malays J Med Sci, 2018, 25(3): 7-16.

[13] Lin RY, Vera JC, Chaganti RS, et al. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter [J]. J Biol Chem, 1998, 273(44): 28959-28965.

[14] Deng Y, Zou J, Deng T, et al. Clinicopathological and prognostic significance of GLUT1 in breast cancer: a meta-analysis [J]. Medicine, 2018, 97(48): e12961.

[15] Xu S, Herschman HR. A tumor agnostic therapeutic strategy for hexokinase 1-null/hexokinase 2-positive cancers [J]. Cancer Res, 2019, 79(23): 5907-5914.

[16] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the Warburg Effect and a pivotal target for effective therapy [J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(1): 17-24.

[17] Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers'

most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i. e., elevated glycolysis in the presence of oxygen [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(3): 211-222.

[18] Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ, et al. Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8(10): 839-847.

[19] Azoitei N, Becher A, Steinestel K, et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation [J]. Mol Cancer, 2016, 15: 3.

[20] van Niekerk G, Engelbrecht AM. Role of PKM2 in directing the metabolic fate of glucose in cancer: a potential therapeutic target [J]. Cell Oncol, 2018, 41(4): 343-351.

[21] Wong N, Ojo D, Yan J, et al. PKM2 contributes to cancer metabolism [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt A): 184-191.

[22] Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, et al. Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth [J]. Sci Signal, 2009, 2(97): ra73.

[23] Wang P, Sun C, Zhu T, et al. Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2 [J]. Protein Cell, 2015, 6(4): 275-287.

[24] Halestrap AP. The monocarboxylate transporter family-structure and functional characterization [J]. IUBMB Life, 2012, 64(1): 1-9.

[25] 白日兰, 白玲, 李薇, 等. 乳酸及其转运蛋白对肿瘤和免疫的影响及相关治疗进展 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2021, 8(3): 245-250.

[26] Sáenz-de-Santa-María I, Bernardo-Castiñeira C, Secades P, et al. Clinically relevant HIF-1 α -dependent metabolic reprogramming in oropharyngeal squamous cell carcinomas includes coordinated activation of CAIX and the miR-210/ISCU signaling axis, but not MCT1 and MCT4 upregulation [J]. Oncotarget, 2017, 8(8): 13730-13746.

[27] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 3930-3942.

[28] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate [J]. Nature, 2017, 551(7678): 115-118.

[29] Halestrap AP. Monocarboxylic acid transport [J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1611-1643.

[30] 王先知, 张配, 崇殿龙, 等. MCT1 抑制剂 AZD3965 增强肝癌细胞对表柔比星敏感性的作用 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49(10): 1170-1174.

[31] Liu Z, Sun Y, Tan S, et al. Nutrient deprivation-related OXPHOS/glycolysis interconversion via HIF-1 α /C-MYC pathway in U251 cells [J]. Tumour Biol, 2016, 37(5): 6661-6671.

[收稿日期]2022-11-25

“实验动物伦理与福利”专题征稿启事

生命科学研究的飞速发展、与国内外合作交流的日益频繁,使得实验动物福利伦理的重要性日益凸显。为进一步学习、发展我国对实验动物伦理与福利相关内容的建设,《中国比较医学杂志》特组织专题、发起征稿,从不同角度对“实验动物伦理与福利”进行深入研究与探讨。诚挚欢迎国内外专家学者投稿。

一、征稿主题

实验动物伦理与福利

二、稿件形式

综述、专家观点

三、投稿须知

投稿请访问《中国比较医学杂志》网站(<http://zgswdw.cnjournals.com/zgbjyxzz/home>),遵循正常稿件提交程序,并在备注栏中填写“实验动物伦理与福利专题”。基于作者研究工作的严谨科学报告,稿件将按照常规论文要求进行同行评审。

本专题来稿一律走绿色通道,快审、快编校、快数字出版。发表周期一般控制在 2~3 个月。

如果您有其它问题,请与编辑部联系 010-67779337。

张永婷,周荣易,马丙祥,等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型 SHR 大鼠核心症状影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 25-32, 149.

Zhang YT, Zhou RY, Ma BX, et al. Effect of baicalein on core symptoms in an SHR model of attention deficit hyperactivity disorder [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 25-32, 149.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.004

黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型 SHR 大鼠 核心症状影响研究

张永婷¹, 周荣易^{1,2*}, 马丙祥^{2*}, 吴晨蕾¹, 谢新月¹, 丁雪颖¹

(1.河南中医药大学儿科医学院, 郑州 450000; 2.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 目的 通过旷场和 Morris 水迷宫实验,探究黄芩苷调控注意缺陷多动障碍动物模型核心临床症状的疗效及其潜在机制。**方法** 将 30 只 SHR 大鼠随机分为模型组、盐酸哌甲酯(MPH)组、黄芩苷组、黄芩苷+丁苯那嗪组和 MPH+丁苯那嗪组,每组 6 只,另设 6 只 WKY 大鼠为对照组。MPH 组(1.5 mg/kg)、黄芩苷组(150 mg/kg)按体重(1 mL/100 g)灌胃给药,空白组、模型组给等量生理盐水,MPH+丁苯那嗪组、黄芩苷+丁苯那嗪组在灌胃给药同时,按体重(0.5 mL/100 g)腹腔注射丁苯那嗪(3 mg/kg)。连续给药 4 周。在规定时间内进行旷场和水迷宫实验,记录并分析实验结果。**结果** MPH 组和黄芩苷组在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著减小($P<0.05$),在水迷宫实验中潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$)、在目标象限运动距离和停留时间占比及穿越平台次数较模型组显著增加($P<0.05$),且这两组间无明显差异;黄芩苷+丁苯那嗪组在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著减小($P<0.05$),较黄芩苷组明显增大,在水迷宫实验中潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$),较黄芩苷组显著延长($P<0.05$)、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组明显增加,较黄芩苷组显著减少($P<0.05$)。**结论** 黄芩苷能够改善 SHR 大鼠多动、冲动、注意力不集中等核心症状,其疗效的发挥可能与调控 DA 囊泡转运相关。

【关键词】 注意缺陷多动障碍;自发性高血压大鼠;黄芩苷;行为学实验;核心症状

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0025-08

Effect of baicalein on core symptoms in an SHR model of attention deficit hyperactivity disorder

ZHANG Yongting¹, ZHOU Rongyi^{1,2*}, MA Bingxiang^{2*}, WU Chenlei¹, XIE Xinyue¹, DING Xueying¹

(1. Pediatric Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.

2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Objective To explore the efficacy and potential mechanism of baicalin in regulating the core clinical symptoms of ADHD by Morris water maze and open field tests. **Methods** Thirty SHRs were randomly divided into five groups: model, methylphenidate hydrochloride (MPH), baicalin, baicalin+tetrabenazine, and MPH+tetrabenazine groups with six rats in each group. Another six WKY rats were used as the normal control group. Rats in the MPH group (1.5

【基金项目】国家自然科学基金青年基金(82104928);中国博士后科学基金面上项目(2021M701123);河南省特色骨干学科课题(STG-ZYX06-202150);河南中医药大学仲景青年学者科研启动项目(CZ0168-04)。

【作者简介】张永婷(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:1179866610@qq.com

【通信作者】周荣易(1990—),男,副教授,研究生导师,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:zhourongyitem@sina.com

马丙祥(1963—),男,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治儿童神经内科疾病。E-mail:mbx1963@126.com

* 共同通信作者

mg/kg) and baicalin group (150 mg/kg) were administered the corresponding drugs (1 mL/100 g) by gavage, and those in normal control and model groups were administered an equal volume of normal saline by gavage. In addition to the corresponding drug gavage, rats in MPH+tetrabenazine and baicalin+tetrabenazine groups were subjected to intraperitoneal injection of tetrabenazine (3 mg/kg) in accordance with body weight (0.5 mL/100 g). The course was 4 weeks for all groups. Open field and Morris water maze experiments were conducted at predefined time points to record and analyze the result. **Results** In the open field test, the total distance and average speed of rats in the MPH and baicalin groups were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$). In the Morris water maze test, the latency of rats in the MPH and baicalin groups was significantly shorter than that of the model group ($P<0.05$), and the proportion of movement distance and residence time in the target quadrant and the number of times crossing the platform in the MPH and baicalin groups were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$), and there is no significant difference between the two groups. The total distance and average speed in the baicalin+tetrabenazine group were significantly lower than those in the model group ($P<0.05$) and larger than those in baicalin group in the open field test. The latency in the baicalin+tetrabenazine group was significantly shorter than that in the model group ($P<0.05$) and was significantly longer than that in baicalin group ($P<0.05$) in the Morris water maze test. The movement distance and residence time in the target quadrant in the baicalin+tetrabenazine group were higher than model group and significantly lower than those in the baicalin group ($P<0.05$). **Conclusions** Baicalin controls the core symptoms of hyperactivity, impulse, and inattention in the ADHD model, and its curative effect may be related to regulation of dopamine vesicle transport.

【Keywords】 attention deficit hyperactivity disorder; SHR; baicalin; behavioral experiment; core symptoms
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

注意缺陷多动障碍 (attention deficit/hyperactivity disorder, ADHD) 是儿童时期常见的神经发育障碍性疾病,全球范围研究显示,ADHD 患病率约为 7.2%,并呈上升趋势^[1]。ADHD 临床以注意力不集中、多动、冲动为核心症状^[2],常共患品行障碍、抽动障碍、行为障碍及对立违抗性障碍^[3-5],约有 50%在儿童或青少年时期被诊断为 ADHD 的个体成年后仍会持续多动症症状^[6],这导致患者社会适应能力下降,对其生活、学习和社交造成极大困扰,给家庭带来极大压力。目前 ADHD 临床上以药物治疗为主,精神兴奋剂 MPH 为一线治疗药物,临床疗效显著,但存在长期应用成瘾性、影响发育、体重等不良反应,导致患者依从性差^[7]。黄芩苷是课题组早期在临床治疗 ADHD 疗效显著的中药复方研究过程中发现的单体成分^[8]。前期研究显示,黄芩苷控制 ADHD 核心症状疗效显著,且未发现明显副作用^[9]。截止目前,ADHD 的发病机制尚不明确,围绕多巴胺 (dopamine, DA) 系统的研究成为当前全球范围内 ADHD 发病机制的研究热点,受国际社会广泛关注^[10]。课题组前期基础研究表明,黄芩苷对 DA 系统具有特殊亲和力^[11-12],不同剂量的黄芩苷均能控制 ADHD 核心症状,且在 150 mg/kg 剂量下疗效最为稳定^[9]。深入机制研究表明,这一疗效或许与黄芩苷调控前额叶皮质、纹状体内 DA 囊泡转运环节中囊泡单胺转运体 II 型 (VMAT2) 的表

达有关^[8]。囊泡转运是 DA 囊泡循环过程中极为关键的环节,对脑内 DA 正常释放、维持脑内 DA 正常水平意义重大;VMAT2 作为主要表达于中枢神经系统多巴胺能神经末梢的关键蛋白^[13],在 DA 转运和释放中发挥关键作用。研究显示,ADHD 患者及其动物模型 SHR 大鼠均存在脑内 VMAT2 表达下调现象,导致 DA 转运速度降低和释放减少,形成脑内 DA 缺陷^[8,14-15]。研究显示,VMAT2 功能异常导致大鼠脑内 DA 含量显著降低而表现出 ADHD 核心症状^[16]。基于课题组前期研究和以上理论基础,作者推测 VMAT2 可能作为黄芩苷发挥药效的潜在作用靶点。为验证黄芩苷是否通过作用于 DA 囊泡循环中 VMAT2 这一靶点达到控制 ADHD 核心症状的疗效,进而探究其潜在疗效机制。本研究在前期研究基础上,应用 VMAT2 抑制剂丁苯那嗪继续开展研究工作,以期为进一步阐明黄芩苷的疗效机制以及后期新药开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 SHR 雄性大鼠 36 只,体重 (103±10) g;4 周龄 SPF 级 WKY 雄性大鼠 6 只,体重 (93.5±7) g,均采购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0001]。SHR 大鼠起源于东京高血压 Wistar 大鼠,经交叉培育获得,幼龄

SHR 大鼠是国际公认的 ADHD 动物模型,该模型在 10 周龄前不表现高血压特征,而表现出 ADHD 核心临床症状,被广泛应用于 ADHD 的研究,WKY 大鼠为其天然对照组^[17-18]。所有动物均饲养于河南中医药大学 SPF 级动物实验中心[SYXK(豫)2021-0015],自由饮水进食,温度 21~24℃,湿度 50%~60%。动物伦理申请经由河南中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(DWLL202202007),符合《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)、《关于善待实验动物的指导性意见》和《河南中医药大学实验动物伦理委员会章程》的相关规定。在实验中,我们严格遵循实验动物使用的 3R 原则,减少对动物的伤害并给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

黄芩苷(货号:A0016)购自成都曼斯特生物科技有限公司,保存于 4℃ 冰箱;丁苯那嗪(货号:GC13672)购自上海宏叶生物科技有限公司,保存于 -20℃ 冰箱;MPH(批号:11E648,分装批号:11E648C)购自河南中医药大学第一附属医院,生产于 Janssen-Cilag Manufacturing, LLC,西安杨森制药有限公司分装,规格为每片 18 mg,保存于 4℃ 冰箱。旷场实验设备:包含旷场实验箱、SMART V3.0 软件,购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司(型号:63041);水迷宫实验设备:包含 Morris 摄像系统、恒温水箱、SMART V3.0 软件,购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司(型号:63034)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物给药及分组

大鼠适应性饲养 5 d 后,进行给药。配药:根据给药量 150 mg/kg^[9],灌胃量 1 mL/100 g,配制黄芩苷溶液,冰箱 4℃ 保存;根据给药量 1.5 mg/kg^[19],灌胃量 1 mL/100 g,配制 MPH 溶液,每颗药(含 18 mg MPH)配 120 mL 纯水,冰箱 4℃ 保存;根据给药量 3 mg/kg^[20],注射量 0.5 mL/100 g,配制丁苯那嗪溶液,即配即用;灌胃前将药物溶液定量取出,水浴复温至 30℃ 后予大鼠灌胃。给药前称重,根据体重调整给药量,每天给药 1 次,时间固定于上午 8:00~12:00。灌胃前将药物溶液定量取出,水浴复温至 30℃ 后予大鼠灌胃,MPH 组(1.5 mg/kg)、黄芩苷组(150 mg/kg)按体重(1 mL/100 g)灌胃给药,空白组、模型组给等量生理盐水,MPH+丁苯那嗪组、黄芩苷+丁苯那嗪组在灌胃给药同时,按体重(0.5 mL/100 g)腹腔注射丁苯那嗪(3 mg/kg)。

1.3.2 旷场实验

在给药第 0、7、14、21、28 天进行旷场实验,使大鼠从中央区域进入旷场中,电脑持续稳定追踪大鼠轨迹,SMART V3.0 软件记录大鼠运动总距离及平均速度,每只大鼠每次旷场实验时间为 5 min,实验结束后将大鼠放回笼中,清理旷场后进行下一只。

1.3.3 Morris 水迷宫实验

在给药第 3 周进行为期 6 d 的 Morris 水迷宫实验,前 5 d 为隐匿站台实验,将水箱内注水,水面高出逃生平台约 1 cm;水面分为 4 个象限,按方位分别命名为西北象限、东北象限、东南象限、西南象限。逃生平台置于西南象限中央区域。将大鼠从四个象限依次放入水中,连续 5 d 入水象限的顺序采取半随机循环方式,避免固定入水顺序影响实验结果^[21];将大鼠依次从不同象限放入水中,当大鼠找到逃生平台并停留 10 s 后,停止信号追踪,若大鼠 120 s 内未找到逃生平台,将其引导至逃生平台并停留 15 s 后,进行下一次实验,结束后烘干放回笼中。实验第 6 天为空间探索实验,撤除逃生平台,将大鼠从东北象限放入水中,记录 120 s 内大鼠穿越平台次数和运动轨迹,实验进行两次求均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组定量数据的组间比较采用单因素方差分析,若等方差($P > 0.05$)则用 LSD 进行组间比较,若不等方差($P < 0.05$)则用 Dunnett T3 进行组间比较。组间比较结果中, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 旷场实验结果

2.1.1 旷场实验中大鼠运动总距离实验结果

实验第 0 天,空白组运动总距离显著小于各实验组($P < 0.05$)。实验第 7、14、21、28 天,MPH 组、黄芩苷组运动总距离较模型组显著减少($P < 0.05$),且这两组间无明显差异;MPH+丁苯那嗪组运动总距离较 MPH 组显著增加($P < 0.05$)。实验第 14、21 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较黄芩苷组显著增加($P < 0.05$)。实验第 28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较模型组显著减少($P < 0.05$),较黄芩苷组显著增加($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

表 1 旷场实验中每组大鼠运动总距离的比较结果($\bar{x}\pm s, m, n=6$)

Table 1 Comparison of total distance traveled by each group of rats in the open field experiment

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
空白组 Normal control group	7.9±3.9	4.3±1.3	4.0±0.5	3.3±0.4	3.6±1.2
模型组 Model group	45.8±3.7 ^a	31.0±5.4 ^a	29.9±5.0 ^a	30.7±4.5 ^a	28.4±5.6 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	44.2±2.5 ^a	19.7±5.5 ^{ab}	17.2±5.9 ^{ab}	16.2±3.0 ^{ab}	14.5±5.8 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	42.4±8.7 ^a	21.6±2.2 ^{ab}	17.8±5.8 ^{ab}	14.9±6.1 ^{ab}	12.3±5.4 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	46.1±4.5 ^a	33.6±5.9 ^{ac}	29.2±5.2 ^{ac}	30.4±4.1 ^{ac}	28.4±6.1 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	45.1±5.6 ^a	28.2±6.7 ^a	26.5±6.7 ^{ad}	24.3±6.6 ^{ad}	20.2±6.1 ^{abde}
<i>F</i>	33.514	18.646	14.148	21.040	13.348
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a*P*<0.05;与模型组比较, ^b*P*<0.05;与 MPH 组比较, ^c*P*<0.05;与黄芩苷组比较, ^d*P*<0.05;与 MPH+丁苯那嗪组比较, ^e*P*<0.05。

Note. Compared with normal control group, ^a*P*<0.05. Compared with model group, ^b*P*<0.05. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c*P*<0.05. Compared with baicalin group, ^d*P*<0.05. Compared with MPH+tetrabenazine group, ^e*P*<0.05.

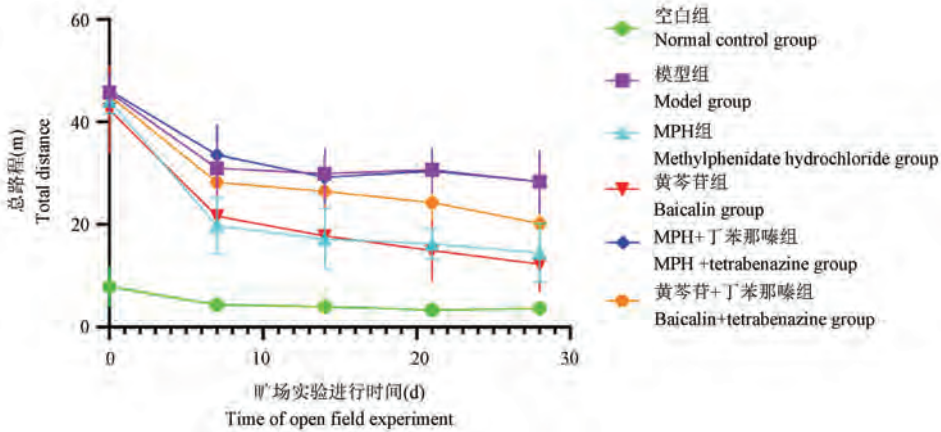


图 1 旷场实验每组大鼠运动总距离比较

Figure 1 Comparison of total distance traveled by each group of rats in the open field experiment

2.1.2 旷场实验中大鼠运动平均速度实验结果

实验第 0 天,空白组运动平均速度较各实验组显著降低(*P*<0.05)。实验第 7、14、21、28 天,黄芩苷组、MPH 组运动平均速度较模型组显著降低(*P*<0.05),且这两组间无明显差异。实验第 14、21、28 天,MPH+丁苯那嗪组运动平均速度较 MPH 组显著升高(*P*<0.05)。实验第 7、14、21、28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动平均速度较模型组明显降低,较黄芩苷组明显升高。见表 2,图 2。

2.1.3 旷场实验轨迹

旷场实验轨迹中,空白组在中央区域进入旷场后立即进入周围区域运动,未进入中央区域,运动轨迹短。模型组进入旷场后运动轨迹遍布整个旷场,中央区域运动轨迹明显增加,运动轨迹长。

MPH 组在周围区域运动轨迹多,中央区域运动少,运动轨迹较模型组明显减少。黄芩苷组进入旷场后立即进入周围区域运动,未进入中央区域,运动轨迹较模型组明显减少;MPH+丁苯那嗪组在中央区域运动轨迹占比较 MPH 组增大,运动轨迹长;黄芩苷+丁苯那嗪组在中央区域运动轨迹较模型组减少,较黄芩苷组增加,如图 3。

旷场实验结果显示,在给药第 7、14、21、28 天,MPH 组和黄芩苷组运动总距离和平均速度较模型组显著降低(*P*<0.05),且这两组间无明显差异;在给药第 14、21、28 天,黄芩苷+丁苯那嗪组运动总距离较黄芩苷组显著增大(*P*<0.05),平均速度较黄芩苷组明显增大,运动总距离和平均速度较模型组明显减小。

表 2 旷场实验中每组大鼠运动平均运动速度比较($\bar{x}\pm s$,cm/s, $n=6$)

Table 2 Comparison of average movement speed of each group of rats in the open field experiment

组别 Groups	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
空白组 Normal control group	2.5±1.4	1.4±0.4	1.3±0.2	1.1±0.1	1.4±0.2
模型组 Model group	15.4±1.4 ^a	13.1±2.2 ^a	11.3±0.8 ^a	11.3±1.2 ^a	9.1±2.3 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	14.9±0.8 ^a	7.8±3.2 ^{ab}	5.7±2.0 ^{ab}	6.7±0.7 ^{ab}	4.9±2.1 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	14.3±2.8 ^a	7.6±3.5 ^{ab}	6.7±2.8 ^{ab}	6.8±1.7 ^{ab}	4.4±2.4 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	15.5±1.4 ^a	11.2±2.0 ^a	10.1±1.8 ^{ac}	10.4±1.0 ^{ac}	9.5±2.0 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	17.8±3.3 ^a	9.7±2.1 ^a	8.6±2.5 ^a	7.1±2.3 ^{abc}	6.9±1.9 ^a
<i>F</i>	28.536	10.745	13.795	28.469	9.860
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 MPH 组比较,^c $P<0.05$;与 MPH+丁苯那嗪组比较,^e $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c $P<0.05$. Compared with MPH+tetrabenazine group, ^e $P<0.05$.

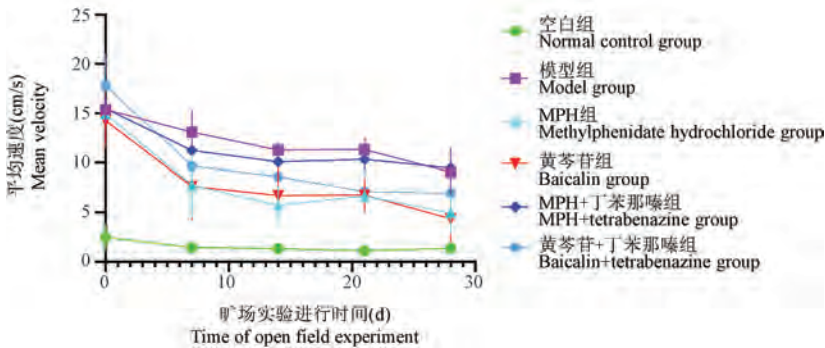


图 2 旷场实验每组大鼠运动平均速度比较

Figure 2 Comparison of average exercise speed of rats in each group in open field experiment

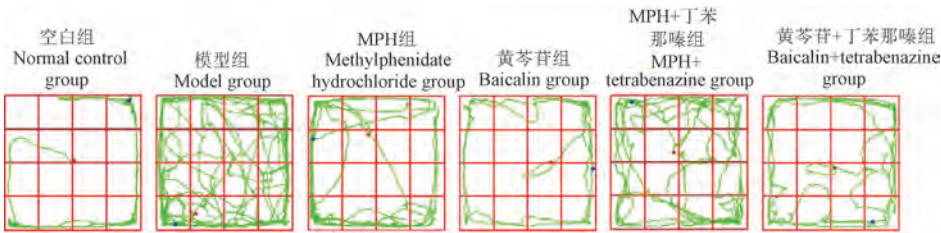


图 3 旷场实验中各组大鼠典型运动轨迹图

Figure 3 Typical movement trajectory plots of different groups of rats in the open field experiment

2.2 Morris 水迷宫实验结果

2.2.1 Morris 水迷宫空间隐匿站台实验中各组大鼠潜伏期实验结果

实验第 2~5 天,各实验组潜伏期较空白组显著缩短($P<0.05$)。实验第 1 天,黄芩苷组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$);第 2~5 天,黄芩苷组、MPH 组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$),这两

组在 2~4 d 组间无明显差异,在第 5 天黄芩苷组潜伏期较 MPH 组显著缩短($P<0.05$)。实验第 1~5 天,MPH+丁苯那嗪组潜伏期较 MPH 组显著延长($P<0.05$)。实验第 1、3、4、5 天,黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期较黄芩苷组显著延长($P<0.05$);第 4、5 天,黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期较模型组显著缩短($P<0.05$)。见表 3,图 4。

表 3 Morris 水迷宫隐匿站台实验每天各组大鼠潜伏期时间比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of latency periods of different groups of rats in the hidden platform experiment of the Morris water maze each day

组别 Groups	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5
空白组 Normal control group	38.3±9.8	41.3±3.9	38.9±4.7	47.9±8.0	28.8±4.1
模型组 Model group	27.6±3.0 ^a	20.6±6.4 ^a	26.5±5.1 ^a	25.4±4.1 ^a	22.6±6.2 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	20.6±4.8 ^a	10.2±1.8 ^{ab}	12.6±6.4 ^{ab}	9.8±4.7 ^{ab}	13.7±1.6 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	14.8±3.2 ^{ab}	11.6±2.8 ^{ab}	14.9±3.6 ^{ab}	8.9±2.4 ^{ab}	9.3±3.6 ^{abc}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	33.2±9.0 ^c	16.5±3.7 ^{ac}	21.8±4.7 ^{ac}	19.0±4.0 ^{ac}	20.7±5.1 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	27.4±7.8 ^{ad}	15.4±3.4 ^a	22.8±5.8 ^{ad}	16.8±2.7 ^{abd}	16.5±1.3 ^{abd}
<i>F</i>	6.122	33.834	13.277	37.522	11.725
<i>P</i>	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a*P*<0.05;与模型组比较, ^b*P*<0.05;与 MPH 组比较, ^c*P*<0.05;与黄芩苷组比较, ^d*P*<0.05。
Note. Compared with normal control group, ^a*P*<0.05. Compared with model group, ^b*P*<0.05. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c*P*<0.05. Compared with baicalin group, ^d*P*<0.05.

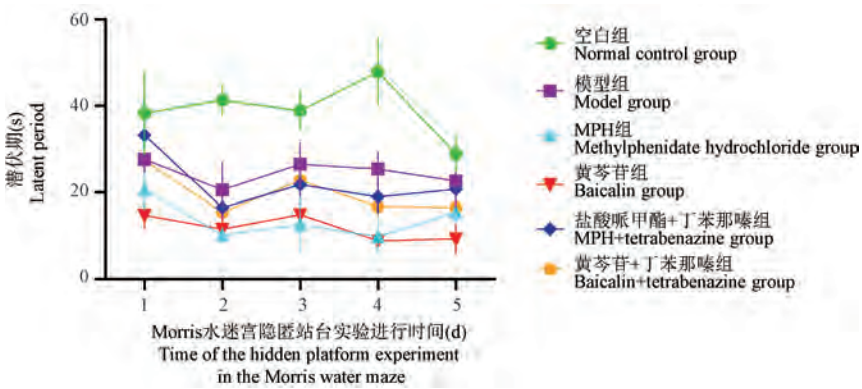


图 4 Morris 水迷宫隐匿站台实验各组大鼠潜伏期随时间的变化情况

Figure 4 Changes in the latency period of rats in different groups during the Morris water maze experiment over time

2.2.2 Morris 水迷宫空间探索实验中各组大鼠穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比实验结果

实验第 6 天,除 MPH+丁苯那嗪组外,各实验组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较空白组显著增加(*P*<0.05);MPH 组、黄芩苷组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著增加(*P*<0.05),且这两组间无明显差异;MPH+丁苯那嗪组穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较 MPH 组显著减少(*P*<0.05);黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动距离和停留时间占比较黄芩苷组显著降低(*P*<0.05),较模型组明显升高。见表 4。

2.2.3 Morris 水迷宫空间探索实验典型轨迹图

Morris 水迷宫空间探索轨迹图中,空白组运动轨迹较短,各象限运动轨迹分布均匀;模型组运动轨迹混乱,各象限平均分布;MPH 组、黄芩苷组在目标象限运动轨迹占比较模型组明显增大;MPH+丁苯那嗪组运动轨迹与模型组相当;黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动轨迹占比较模型组增加,较黄芩苷组减少。如图 5。

Morris 水迷宫实验结果显示,MPH 组、黄芩苷组潜伏期较模型组显著缩短(*P*<0.05),穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著升高(*P*<0.05),且这两组在实验 1~4 d 组间无明显差异,第 5 天黄芩苷组潜伏期较 MPH 组显著缩

表 4 Morris 水迷宫空间探索实验各组大鼠穿越平台次数、目标象限运动距离和停留时间占比 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Number of platform crossings, distance moved within the target quadrant and proportion of time spent in the target quadrant in the Morris water maze spatial exploration experiment for each group of rats

组别 Groups	穿越平台次数 Number of platform crossings	目标象限运动距离占比 (%) Proportion of movement distance within the target quadrant	目标象限停留时间占比 (%) Proportion of time spent within the target quadrant
空白组 Normal control group	0.8±0.6	16.3±4.7	15.7±4.1
模型组 Model group	2.0±0.4 ^a	25.1±1.8 ^a	25.6±5.6 ^a
MPH 组 Methylphenidate hydrochloride group	3.4±0.8 ^{ab}	38.5±7.2 ^{ab}	38.5±5.3 ^{ab}
黄芩苷组 Baicalin group	3.1±0.9 ^{ab}	34.1±1.4 ^{ab}	34.4±3.1 ^{ab}
MPH+丁苯那嗪组 MPH+tetrabenazine group	1.5±0.9 ^c	21.9±3.1 ^c	24.4±2.7 ^{ac}
黄芩苷+丁苯那嗪组 Baicalin+tetrabenazine group	2.5±0.6 ^a	27.7±3.4 ^{ad}	27.6±3.7 ^{ad}
F	7.825	15.558	14.313
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较, ^a $P<0.05$;与模型组比较, ^b $P<0.05$;与 MPH 组比较, ^c $P<0.05$;与黄芩苷组比较, ^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with methylphenidate hydrochloride group, ^c $P<0.05$. Compared with baicalin group, ^d $P<0.05$.

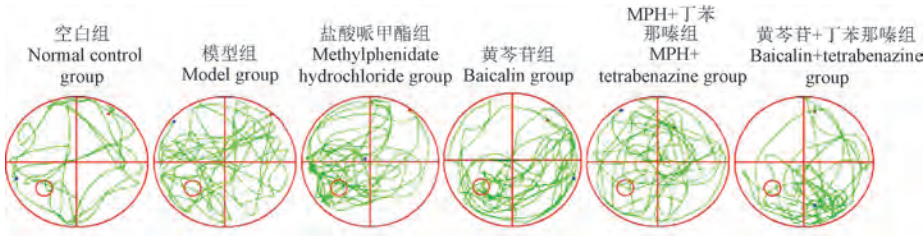


图 5 Morris 水迷宫空间探索实验中各组大鼠典型轨迹图

Figure 5 Typical trajectory plots of different groups of rats in the Morris water maze spatial exploration experiment

短($P<0.05$)。黄芩苷+丁苯那嗪组潜伏期在实验第 1、3、4、5 天,较黄芩苷组显著延长($P<0.05$),在实验第 4、5 天较模型组显著缩短($P<0.05$);黄芩苷+丁苯那嗪组在目标象限运动距离和停留时间占比相较于黄芩苷组显著降低($P<0.05$),相较于模型组明显升高。

3 讨论

脑内 DA 是由胺能神经吸收血液中酪氨酸,在酪氨酸羟化酶催化下形成左旋多巴,再由多巴脱羧化酶最终合成^[22]。合成后的 DA 主要在突触前膜经囊泡单胺转运体 II 型(VMAT2)转运进入突触小泡储存,从而避免 DA 被细胞质中单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)氧化降解失活,当动作电位到达神经末梢时,突触小泡与突触前膜融合,胞吐释放 DA^[23]。VMAT2 的正常表达对脑内 DA 的转运、释放以及维持脑内 DA 正常水平意义重大。课

题组前期研究发现,黄芩苷能够显著提高 VMAT2 蛋白及 RNA 表达水平,尤其对纹状体内 VMAT2 表达的影响最为直接^[12],但其具体的作用靶点尚不明确。这为本次探讨黄芩苷潜在作用靶点的研究奠定了基础。

旷场实验中大鼠的运动距离和平均速度反映大鼠的多动和冲动行为^[24]。Morris 水迷宫实验通过检测大鼠的学习记忆能力来评估大鼠注意力情况^[25-26]。本次实验研究显示,在给药前的旷场实验中,所有实验组运动总距离和平均速度较空白组显著升高,实验组各组间无明显差异,表明实验组大鼠与空白组对比,存在明显多动、冲动症状。在给药过程中的旷场实验中,MPH 组和黄芩苷组运动总距离和平均速度较模型组显著降低,且这两组间无明显差异,表明黄芩苷与 MPH 均能控制 SHR 大鼠多动、冲动症状,并且两种药物的疗效无明显差异。研究表明,MPH 通过与 DA 转运体(DAT)结合,抑

制 DAT 的生理功能,减少 DA 重摄取,增加脑内 DA 含量治疗 ADHD 核心症状^[27]。丁苯那嗪在本实验中作为 VMAT2 特异性阻断剂,能够可逆性抑制 VMAT2 表达^[28]。在旷场实验过程中,MPH+丁苯那嗪组大鼠运动总距离和平均速度较 MPH 组显著升高,与模型组对比无明显差异。这一实验结果我们推测,可能是丁苯那嗪阻断 VMAT2 对 DA 的转运和释放,DA 释放减少,导致 DAT 再摄取抑制过程中突触间隙 DA 含量降低,即使 MPH 发挥抑制作用也不能达到脑内 DA 水平的正常峰度,导致 MPH 疗效不佳,但其确切机制还需进一步研究。Morris 水迷宫隐匿站台实验中,MPH 组、黄芩苷组大鼠潜伏期较模型组显著缩短,穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组显著升高,且这两组间无明显差异。这一结果表明,MPH 与黄芩苷均能提高大鼠空间记忆和学习能力,改善大鼠注意力不集中,且两种药物疗效相当。

黄芩苷+丁苯那嗪组大鼠在旷场实验中运动总距离和平均速度较模型组显著降低,较黄芩苷组显著升高,在隐匿站台实验中的潜伏期较黄芩苷组显著延长,较模型组稍有缩短且两组之间的差异随实验时间的延长逐渐显著,在空间探索实验中穿越平台次数、在目标象限运动距离和停留时间占比较模型组升高,较黄芩苷组显著降低。实验结果表明,黄芩苷作用于 VMAT2 控制 ADHD 核心症状,但其作用靶点并不单一,存在黄芩苷治疗 ADHD 的其他靶点,而这些靶点尚不明确,这也是课题组后期的研究方向。

本研究在前期研究基础上,应用 VMAT2 特异性抑制剂丁苯那嗪初步探索黄芩苷治疗 ADHD 的潜在疗效机制及作用靶点,但深入的机制分析尚未进行。实验尚存在不足之处,缺乏 VMAT2 的激动剂组,以便更加明确 VMAT2 的表达对大鼠 ADHD 症状的影响,我们将在后期实验中进行补充和探索。

参考文献:

- [1] Wolraich ML, Hagan JF Jr, Allan C, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents [J]. *Pediatrics*, 2019, 144(4): e20192528.
- [2] Sayal K, Prasad V, Daley D, et al. ADHD in children and young people: prevalence, care pathways, and service provision [J]. *Lancet Psychiatry*, 2018, 5(2): 175-186.
- [3] Miovský M, Lukavská K, Rubášová E, et al. Attention deficit hyperactivity disorder among clients diagnosed with a substance

use disorder in the therapeutic communities: prevalence and psychiatric comorbidity [J]. *Eur Addict Res*, 2021, 27(2): 87-96.

- [4] Drechsler R, Brem S, Brandeis D, et al. ADHD: current concepts and treatments in children and adolescents [J]. *Neuropediatrics*, 2020, 51(5): 315-335.
- [5] Young S, Cocallis KM. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the prison system [J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2019, 21(6): 41.
- [6] 周荣易, 马丙祥, 韩新民, 等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型生长状态的影响及对 CaMK II, ERK1/2 的调控作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1220-1226.
- [7] Corona JC. Role of oxidative stress and neuroinflammation in attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1039.
- [8] 周荣易, 王娇娇, 韩新民, 等. 黄芩苷对自发性高血压大鼠突触体多巴胺释放相关因子表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2007-2013.
- [9] Zhou R, Wang J, Han X, et al. Baicalin regulates the dopamine system to control the core symptoms of ADHD [J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 11.
- [10] Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, et al. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis [J]. *Neuropsychol Rev*, 2007, 17(1): 39-59.
- [11] 周荣易, 王娇娇, 尤月, 等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍大鼠突触体 ATP 酶和 LDH 的影响及对 AC/cAMP/PKA 信号通路的调控作用 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(5): 576-582.
- [12] Zhou R, Han X, Wang J, et al. Baicalin may have a therapeutic effect in attention deficit hyperactivity disorder [J]. *Med Hypotheses*, 2015, 85(6): 761-764.
- [13] 张京钟, 余爽, 赵春礼, 等. II 型囊泡单胺转运体基因过表达对多巴胺含量影响的体外研究 [J]. *解剖学报*, 2004, 35(4): 344-349.
- [14] Lorenzo-Sanz G, Sánchez-Herranz A. Involvement of vesicular monoamine transporter in attention deficit hyperactivity disorder [J]. *Rev Neurol*, 2011, 52(1): S103-S108.
- [15] Toren P, Rehav M, Luski A, et al. Decreased platelet vesicular monoamine transporter density in children and adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2005, 15(2): 159-162.
- [16] Quansah E, Zetterström TSC. Chronic methylphenidate preferentially alters catecholamine protein targets in the parietal cortex and ventral striatum [J]. *Neurochem Int*, 2019, 124: 193-199.
- [17] Meneses A, Perez-Garcia G, Ponce-Lopez T, et al. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview [J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22(3): 365-371.

(下转第 149 页)

岳欣欣,付洋,李怡然,等. 基于 HIF-1 α /自噬途径探讨二氯化钴调控 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应及胰岛素抵抗的机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 33-38.

Yue XX, Fu Y, Li YR, et al. Effect of cobalt dichloride regulating the inflammatory response and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through the HIF-1 α /autophagy pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 33-38.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.005

基于 HIF-1 α /自噬途径探讨二氯化钴调控 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应及胰岛素抵抗的机制

岳欣欣¹, 付 洋², 李怡然¹, 尹晓燕¹, 于 飞¹, 傅全威^{3*}

(1. 辽宁何氏医学院, 沈阳 110000; 2. 北部战区总医院, 沈阳 110000; 3. 东莞康华医院, 广东 东莞 523080)

【摘要】 目的 探讨低氧诱导剂二氯化钴 (CoCl₂) 调控 3T3-L1 脂肪细胞自噬活性从而改善脂肪细胞炎症反应和胰岛素抵抗的机制。**方法** 常规培养和诱导分化 3T3-L1 脂肪细胞成为成熟的脂肪细胞, CoCl₂ 作为低氧诱导剂在不同时间、不同浓度条件下干预成熟的脂肪细胞, 确认 CoCl₂ 干预脂肪细胞自噬活性的最佳时间和浓度, 随后根据此时间和浓度分组, 分为 0 h (对照组)、12 h、24 h、48 h CoCl₂ 处理组, 收集细胞样本进行相关指标测定。MTT 法评价各组细胞存活情况; Western blot 分析各组细胞 HIF-1 α 及其下游蛋白葡萄糖转运蛋白 Glut-1、自噬相关蛋白 LC3-II 和 Beclin-1 的表达情况; 免疫荧光法检测各组细胞的自噬水平; ELISA 法检测各组细胞上清液中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 分泌情况。**结果** 150 μ mol/L CoCl₂ 是调控 3T3-L1 脂肪细胞自噬水平的最佳干预浓度; 150 μ mol/L CoCl₂ 干预成熟的脂肪细胞 24 h 时, 自噬活性水平增高, 细胞存活率无显著的减低, 脂肪细胞中 HIF-1 α 、LC3-II、Beclin-1、Glut-1 蛋白的表达水平也显著升高, 但炎症因子 TNF- α 和 IL-6 分泌水平无明显增加; 48 h 时自噬水平减低, 细胞存活率出现显著减低, 脂肪细胞中 HIF-1 α 、LC3-II、Beclin-1、Glut-1 蛋白的表达水平减低, 炎症因子 TNF- α 和 IL-6 分泌水平出现增加趋势。**结论** 150 μ mol/L CoCl₂ 可以调控脂肪细胞自噬水平增加, 自噬水平的增加以依赖 HIF-1 α 的方式活化, 从而使自噬发挥保护脂肪细胞的作用使其免受炎症损伤和改善脂肪细胞胰岛素抵抗。

【关键词】 HIF-1 α ; 自噬; 3T3-L1 细胞; 炎症反应; 胰岛素抵抗

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0033-06

Effect of cobalt dichloride regulating the inflammatory response and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through the HIF-1 α /autophagy pathway

YUE Xinxin¹, FU Yang², LI Yiran¹, YIN Xiaoyan¹, YU Fei¹, FU Quanwei^{3*}

(1. Liaoning Ho's Medical College, Shenyang 110000, China. 2. General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110000. 3. Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan 523080)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hypoxia inducer cobalt dichloride (CoCl₂) on autophagy of 3T3-L1 adipocytes. **Methods** 3T3-L1 adipocytes were cultured and induced to mature adipocytes. CoCl₂ was used as an inducer of hypoxia *in vitro*. Mature adipocytes were divided into control and CoCl₂ treatment groups with various concentrations and times. In accordance with the result, 150 μ mol/L cobalt dichloride was selected to treat adipocytes for 0, 12, 24 and 48 h. Then, the cells were collected for related tests. MTT assays were used to assess cell survival. Expression of HIF-1 α , autophagy-related protein LC3-II, Beclin-1 and Glut-1 was analyzed by Western blot. The level of autophagy was measured by immunofluorescence. TNF- α and IL-6 levels in culture supernatants of adipocytes were measured by ELISA. **Results** 150 μ mol/L CoCl₂ is the optimal intervention concentration to regulate the autophagy level

【基金项目】 国家自然科学基金 (72171042); 辽宁省教育厅高校项目 (SJ202103)。

【作者简介】 岳欣欣 (1983—), 女, 副教授, 研究方向: 内分泌与代谢病学。E-mail: yuexinxin1983@126.com

【通信作者】 傅全威 (1975—), 男, 教授, 研究方向: 公共卫生管理。E-mail: fuqw@163.com

of 3T3-L1 adipocytes. The levels of autophagic activity increased without reduction in cell viability after 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 intervention in mature adipocytes for 24 h. The expression protein levels of HIF-1 α , LC3-II, Beclin-1 and Glut-1 were significantly increased in adipocytes. However, the secretion level of inflammatory factors TNF- α and IL-6 did not increased significantly. The level of autophagic activity and cell viability were decreased at 48 h. The expression protein levels of HIF-1 α , LC3-II, Beclin-1 and Glut-1 were significantly decreased in adipocytes. However, the increased secretion of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 were observed. **Conclusions** Autophagy was moderately activated in adipocytes by 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment for 24 hours. Autophagy was activated in a HIF-1 α -dependent manner, which plays a role in protecting adipocytes from inflammatory damage and improving insulin resistance.

【Keywords】 HIF-1 α ; autophagy; 3T3-L1 cells; inflammatory reaction; insulin resistance

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

细胞自噬 (autophagy) 是细胞在生理、营养匮乏等应激条件影响下, 通过自噬溶酶体途径, 将胞质内受损的细胞器和过度积累的脂质等成分降解的生物学过程^[1]。近年来, 通过不同的干预方法调控自噬活性, 研究其对肥胖和糖尿病疾病的影响成为学者们关注的热点^[2-5]。缺氧是诱导自噬发生的常见方法之一, 然而缺氧诱导的自噬激活是把双刃剑, 它既可以发挥保护作用, 也可以发挥加重细胞损伤的作用^[6-7]。因此, 本研究在低氧诱导剂 CoCl_2 干预条件下模拟体外缺氧环境, 以 3T3-L1 诱导为成熟脂肪细胞为细胞模型, 基于 HIF-1 α /自噬途径, 探讨低氧诱导剂 CoCl_2 调控脂肪细胞自噬活性, 发挥自噬的保护作用, 阐明其使脂肪细胞免受炎症损伤和改善胰岛素抵抗的分子机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

3T3-L1 前脂肪细胞购自 ATCC (XY-XB-1608)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 不完全培养液和胰蛋白酶-EDTA 消化液 (Keygen); CoCl_2 (Sigma); MTT (Aladdin); 抗体: HIF-1 α (BD, 美国)、LC3B (Cell Signaling Technology, 美国)、Beclin-1 (Santa Cruz, 美国)、 β -actin (Abcam, 美国)。Western blot 及 IP 细胞裂解液、蛋白上样缓冲液、地塞米松溶液、胰岛素、1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤 (IBMX)、FBS 胎牛血清均购自上海碧云天生物技术有限公司。

超净工作台购自江苏通净净化设备有限公司; CO_2 细胞培养箱, 购自美国 NUAIRE 公司; 高速低温离心机, 购自英国 Dynamica 公司; PCR 仪及荧光定量系统购自美国 BIO-RAD 公司; 蛋白质电泳和转移系统购自美国 BIO-RAD 公司; Olympus CKX41 显微镜、CKX53 倒置相差显微镜、BX63 自动荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和诱导分化

3T3-L1 前脂肪细胞用含 10% 小牛血清、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、链霉素的 DMEM 高糖培养液培养。细胞融合近 80%~90% 开始诱导分化, 加入含 10% 胎牛血清 (FBS)、0.5 mmol/L IBMX、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松和 10 mg/L 胰岛素的 DMEM 高糖培养液培养 48 h, 再换为含 10% FBS、10 mg/L 胰岛素的 DMEM 高糖培养液继续培养 48 h, 随后以 10% FBS 的高糖 DMEM 继续培养, 诱导 8~12 d 后进行实验。当观察到 90% 以上的细胞变圆并有大量脂滴出现, 说明 3T3-L1 被诱导为成熟的脂肪细胞^[8]。

1.3.2 分组与干预措施

将诱导分化的成熟脂肪细胞, 给予不同浓度 (50、100、150、200、400 $\mu\text{mol/L}$) 和不同时间 (0、12 h、24 h、48 h) CoCl_2 处理, 分析 CoCl_2 干预脂肪细胞的浓度和时间, 根据此结果, 将成熟的脂肪细胞分为 0 h 组 (对照组) 和 CoCl_2 干预 12 h 组、24 h 组、48 h 组。

1.3.3 细胞存活率检测 (MTT 法)

将脂肪细胞按照一定的浓度接种于 96 孔中, 每组设置 6 个平行孔, 每孔加入 100 μL 细胞悬浮液, 培养至细胞个数接近 1×10^4 /孔时, 按照分组需求加入药物干预。然后每孔加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 放入细胞培养箱中继续培养 4 h 后弃去培养基, 每孔加入 150 μL DMSO, 放在摇床上低速摇晃 10 min, 最后用酶联免疫检测仪测定每孔在 490 nm 处的吸光值。

1.3.4 Western blot 检测

按照 Western blot 细胞裂解液说明书提取蛋白, 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转移到 PVDF 膜上后用

5% BSA 或 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,然后与各种一抗在 4℃ 孵育过夜。一抗稀释度分别为: HIF-1α (1 : 500)、LC3-Ⅱ (1 : 500)、Beclin-1 (1 : 200)、Glut-1 (1 : 500) 和 β-actin (1 : 4000)。TBS 洗涤 3 次后加入二抗,室温摇床 2 h 后,加入 ECL 发光液反应,曝光后拍照分析。

1.3.5 细胞免疫荧光检测

采用 LC3B 自噬荧光检测试剂盒检测脂肪细胞中自噬活性水平。将细胞以 3.5×10^4 /mL 接种于共聚焦培养皿,诱导分化成熟。实验分组和干预措施同 1.3.2,用甲醛:丙酮(1 : 1)固定细胞,LC3B 兔多克隆抗体 0.5 μg/mL 37℃ 孵育 1 h,山羊抗兔 IgG 0.01 mg/mL 37℃ 孵育 30 min,抗荧光淬灭剂封片,应用激光共聚焦显微镜拍照。

1.3.6 ELISA 法检测细胞上清液炎症因子的水平

取各组培养液上清,离心(1000 r/min,20 min),去除细胞碎片,保存于-20℃ 冰箱,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤,检测脂肪细胞培养液上清中 TNF-α、IL-6 的水平。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad prism 8.0 软件进行数据分析和绘图。对连续型数值变量用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所用分析方法为单因素方差分析,对符合正态性和方差齐性的检验,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度和不同时间 CoCl₂ 对脂肪细胞存活情况的影响

用 MTT 法检测不同浓度和不同时间 CoCl₂ 对脂肪细胞存活情况的影响,结果见图 1,随着干预时间的增加,不同 CoCl₂ 浓度组脂肪细胞均出现存活率下降的趋势,随着 CoCl₂ 浓度的增加,同一时间段脂肪细胞的存活率也随之降低,这提示脂肪细胞存活率与 CoCl₂ 浓度变化、干预时间存在剂量依赖和时间依赖的变化趋势。不同浓度 CoCl₂ 干预脂肪细胞 12~24 h 时,细胞存活率开始出现下降趋势,但是下降趋势不明显。干预 24~48 h 时脂肪细胞存活率出现明显下降趋势,这提示干预 24 h 是潜在的时间节点。用 50、100、150 μmol/L 浓度的 CoCl₂ 干预脂肪细胞 24 h 时,细胞存活率出现下降的趋势,但不显著,而用 200、400 μmol/L 浓度的 CoCl₂ 干预脂肪细胞 24 h,细胞存活率出现显著降低的趋势。

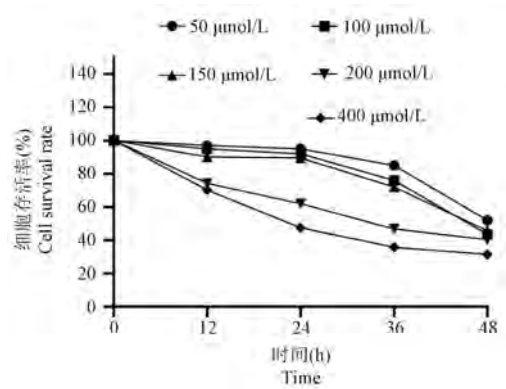


图 1 不同浓度不同时间 CoCl₂ 对脂肪细胞存活率影响
Figure 1 Effect of different concentration and time of CoCl₂ on the survival rate of adipocytes

这提示 150 μmol/L 浓度的 CoCl₂ 是干预脂肪细胞模拟适度缺氧环境的最佳浓度。

2.2 CoCl₂ 对脂肪细胞中 HIF-1α、LC3-Ⅱ、Beclin-1、Glut-1 蛋白表达水平的影响

根据 2.1 实验结果,选取 150 μmol/L 的 CoCl₂ 对脂肪细胞分别干预 0 h、12 h、24 h、48 h,检测脂肪细胞中 HIF-1α、LC3-Ⅱ、Beclin-1、Glut-1 蛋白的表达水平,结果如图 2 所示,与 0 h 组(对照组)相比,12 h 和 24 h 组 LC3-Ⅱ、Beclin-1 蛋白表达水平增高,且具有统计学意义($P<0.05$),与 12 h 组相比,24 h 组 LC3-Ⅱ、Beclin-1 蛋白表达水平增高,且具有统计学意义($P<0.05$),这一结果提示 12~24 h 自噬相关蛋白表达增加,自噬水平增加,24 h 自噬水平增加最为显著。与 0 h 组(对照组)相比,12 h 和 24 h 组 HIF-1α、Glut-1 蛋白表达水平增高,且具有统计学意义($P<0.05$),与 12 h 组相比,24 h 组 HIF-1α、Glut-1 蛋白表达水平增高,且具有统计学意义($P<0.05$),这一结果提示缺氧 12~24 h 时 HIF-1α 及其下游的 Glut-1 蛋白表达水平开始增加,且与自噬增加水平一致,自噬水平增加可能以依赖 HIF-1α 方式存在。

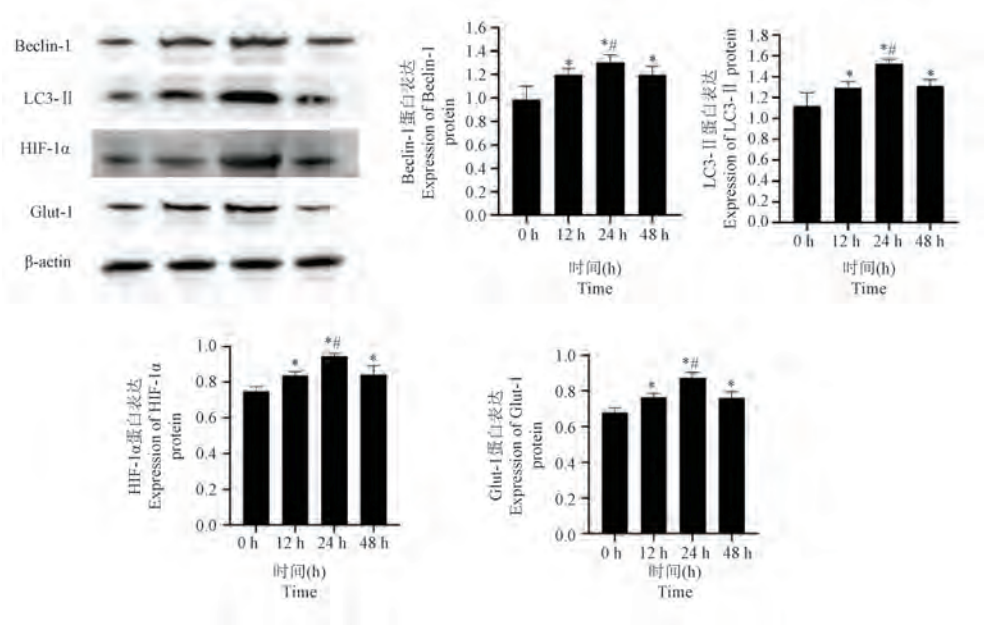
2.3 CoCl₂ 对脂肪细胞自噬水平的影响

采用 LC3B 自噬免疫荧光检测试剂盒检测脂肪细胞自噬水平,结果见图 3,与 0 h 组(对照组)相比,24 h 组自噬水平显著增加,12 h 和 48 h 组自噬水平无显著变化。这一结果提示 150 μmol/L 的 CoCl₂ 干预脂肪细胞 24 h,自噬活化水平最为显著,与自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ、Beclin-1 表达水平一致。

2.4 CoCl₂ 对脂肪细胞中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平的影响

检测脂肪细胞上清液中炎症因子 TNF-α、IL-6

的水平,结果见图 4,与 0 h 组(对照组)相比 12 h 和 24 h 组细胞中炎症因子 TNF-α、IL-6 水平无明显增加,无统计学意义($P>0.05$),48 h 组细胞中炎症因



注:与 0 h 组相比, * $P<0.05$;与 12 h 组相比, # $P<0.05$ 。

图 2 不同时间 CoCl₂ 对脂肪细胞中 HIF-1α、LC3-II、Beclin-1 和 Glut-1 蛋白的表达的影响

Note. Compared with 0 h group, * $P<0.05$. Compared with 12 h group, # $P<0.05$.

Figure 2 Effects of CoCl₂ on the expressions of HIF-1α,LC3-II ,Beclin-1 and Glut-1 in adipocytes of different times

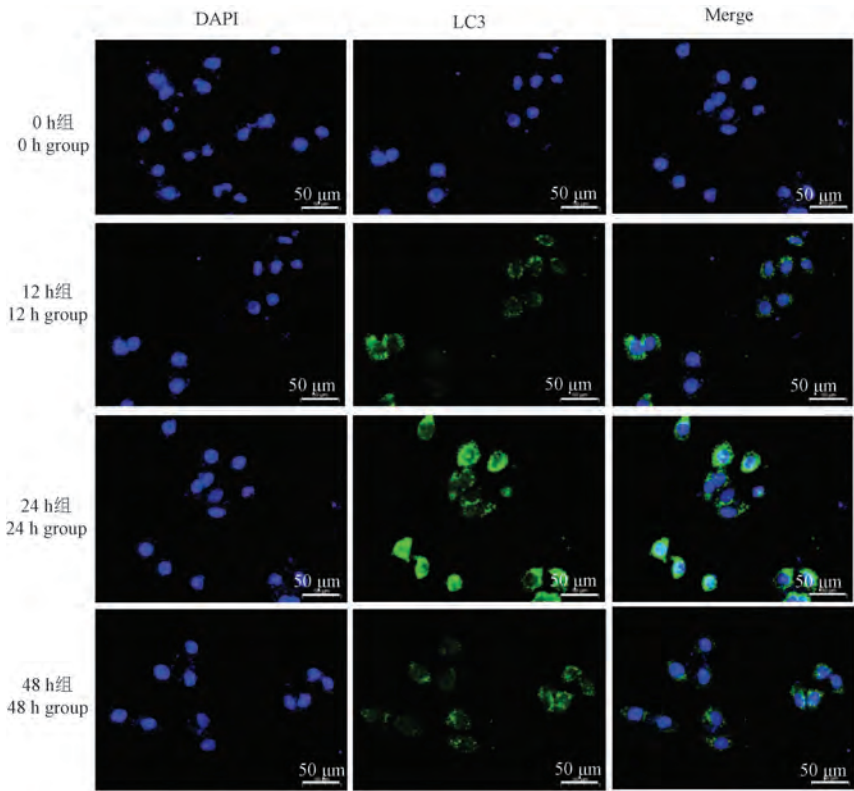
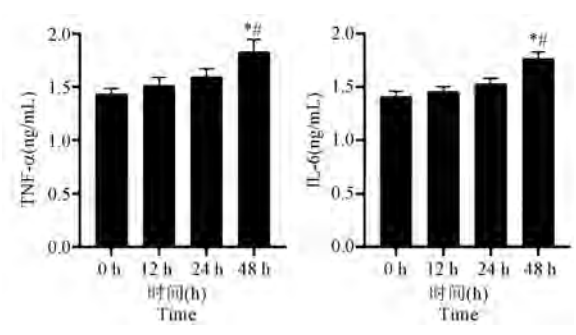


图 3 免疫荧光检测 LC3B 的表达情况

Figure 3 Results of LC3 positive cell staining in each group



注：与 0 h 组相比，* $P<0.05$ ；与 12 h 组相比，[#] $P<0.05$ 。

图 4 脂肪细胞上清液中炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的水平

Note. Compared with 0 h group, * $P<0.05$. Compared with 12 h group, [#] $P<0.05$.

Figure 4 Effects of CoCl_2 on the expressions of TNF- α and IL-6 in culture supernatants of adipocytes

子 TNF- α 、IL-6 水平显著增加,且有统计学意义($P<0.05$)。与 12 h 组相比,24 h 组细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平无明显增加,无统计学意义($P>0.05$)。48 h 组细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平显著增加,且有统计学意义($P<0.05$)。这一结果提示缺氧干预 12~24 h 时是适度缺氧条件下,自噬水平增加以依赖 HIF-1 α 的方式增加的同时,自噬发挥保护细胞的作用,减轻了细胞炎症因子的水平。

3 讨论

体外模拟缺氧环境,诱导细胞缺氧常用二氯化钴(CoCl_2),其主要机制是二价钴离子可诱导细胞低氧诱导因子(hypoxia induced factor, HIF)及其调控的下游基因的表达^[9]。因此,故本研究以此为依据将 3T3-L1 细胞暴露于二氯化钴作用条件下观察细胞在缺氧应激条件下的生物学变化情况,本研究结果发现,随着 CoCl_2 干预细胞时间的增加,不同 CoCl_2 浓度组脂肪细胞均出现存活率下降的趋势,随着 CoCl_2 浓度的增加,同一时间段脂肪细胞的存活率也随之降低,这提示脂肪细胞存活率与 CoCl_2 浓度变化、干预时间存在剂量依赖和时间依赖的变化趋势。12~24 h 时段,用不同浓度 CoCl_2 干预脂肪细胞时,细胞存活率开始出现下降趋势,但是下降趋势不明显。24~48 h 时段,用不同浓度 CoCl_2 干预脂肪细胞时,脂肪细胞存活率出现明显下降趋势,这提示 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 是潜在的影响脂肪细胞存活率的时间转折点。再观察 24 h 时,用 50、100、150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞,脂肪细胞存活率开始出现下降的趋势,但是不显著,

用 200、400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞,脂肪细胞存活率出现显著降低的趋势,这提示 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 是干预脂肪细胞模拟适度缺氧环境的最佳浓度,这一结果与既往研究结果相似^[10]。

缺氧是诱导自噬发生的最常见原因之一^[11]。缺氧后 HIF-1 α 被活化,如果自噬以依赖 HIF-1 α 活化的方式发生,将有助于抵御缺氧损伤,维持细胞稳态;如果自噬以不依赖 HIF-1 α 活化的方式被激活,将促进细胞损伤和凋亡,既往多项研究基于此探讨如何调控自噬来达到治疗疾病的作用^[12-18]。鉴于此,本研究预探讨 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞是否可调控自噬以依赖 HIF-1 α 活化的方式发生,发挥自噬保护细胞的作用。因此,阐明 HIF-1 α /自噬途径的关键分子信号通路是本研究的关键所在。本研究选取 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 分别于 0 h、12 h、24 h、48 h 干预脂肪细胞,探索 HIF-1 α 及其下游的 Glut-1 蛋白、自噬相关蛋白 LC3- II、Beclin-1 表达水平,本研究结果发现,与 0 h 组(对照组)相比,24 h 组自噬相关蛋白 LC3- II、Beclin-1 表达水平显著增加, HIF-1 α 及其下游的 Glut-1 蛋白表达水平也显著增加,且增加水平明显高于其他组,由此结果我们推测自噬的活化是以依赖 HIF-1 α 活化的方式发生的,进一步说明 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 是调控自噬活化的最佳干预条件,且在此干预条件下自噬以依赖 HIF-1 α 方式的活化,发挥其保护细胞的作用。与此同时,本研究进一步通过免疫荧光技术检测自噬活性,结果发现,与 0 h 组(对照组)相比,24 h 时自噬活化水平显著增加,且最为显著,这一研究结果与 24 h 时自噬相关蛋白 LC3- II、Beclin-1 表达水平一致。由此,本研究发现,基于 HIF-1 α /自噬途径,150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 可调控自噬活化发挥保护细胞的作用。既往研究发现 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 后,脂肪细胞开始出现凋亡表现,凋亡的相关蛋白 p53、Bcl-2 和 caspase-9 等表达增加^[10],这项研究从另一个方向说明 24 h 后自噬开始发挥促进细胞损伤和凋亡的作用,也从另一个方向证实了本研究的结果是与其一致的。

既往研究证实,与瘦体重人群相比,肥胖人群脂肪组织中自噬相关蛋白 LC3 的表达水平增高,且与脂肪组织炎状态和胰岛素抵抗密切相关,但是对

于肥胖状态下脂肪细胞自噬活性和炎症状态的变化存在争议^[4,19]。基于上述理论,为进一步说明基于 HIF-1 α /自噬途径,150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 可调控自噬活化发挥保护细胞的作用与抑制脂肪细胞炎症因子的分泌相关。本研究采用 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 0 h、12 h、24 h、48 h,分析脂肪细胞中脂肪炎症因子的分泌情况,研究结果发现随着干预时间的延长,脂肪炎症因子 TNF- α 、IL-6 分泌水平逐渐升高,与 0 h 组相比,12 h、24 h 脂肪炎症因子 TNF- α 、IL-6 分泌水平无显著升高,48 h 时脂肪炎症因子 TNF- α 、IL-6 分泌水平升高最为显著,这与 24 h 时自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin-1 表达水平显著增加趋势相反,也与 24 h 时 HIF-1 α 及其下游的 Glut-1 蛋白表达水平显著增加的趋势相反,这提示自噬活性增加时,炎症因子的分泌减少。这一结果明确了 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 可调控自噬活化,抑制脂肪细胞炎症因子的分泌,发挥保护细胞免于炎症损伤的作用。炎症因子 TNF- α 和 IL-6 分泌可干扰胰岛素信号通路转导导致胰岛素抵抗^[20-21]。由此,本研究可进一步推测 150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 可基于 HIF-1 α /自噬途径激活自噬活性,抑制炎症因子分泌进而改善脂肪细胞的胰岛素抵抗发挥细胞保护作用。

综上所述,本研究发现基于 HIF-1 α /自噬途径,150 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 CoCl_2 干预脂肪细胞 24 h 可调控自噬以依赖 HIF-1 α 的方式被活化,使脂肪细胞免于进一步的炎症损伤,并改善脂肪细胞的胰岛素抵抗,发挥其保护脂肪细胞的作用。期望低氧调控自噬成为治疗肥胖、2 型糖尿病的靶点,未来如何更加精准调控细胞的自噬活化强度,分析其治疗肥胖和糖尿病的精确分子机制,仍需要更多更先进深入的研究。

参考文献:

- [1] Lippai M, Szatmári Z. Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance [J]. Cell Biol Toxicol, 2017, 33(2): 145-168.
- [2] Tao T, Xu H. Autophagy and obesity-related reproductive dysfunction [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 463-466.
- [3] 张林,胡茂清. 自噬和肥胖 [J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(4): 372-374.
- [4] 王巍巍,邓德剑,李秋明,等. 脂肪组织中自噬与肥胖关系的研究进展 [J]. 生命科学, 2018, 30(7): 779-783.
- [5] 张一文,喻松仁,姚琦,等. 细胞自噬调控肥胖脂肪组织炎症状态的研究进展 [J]. 江西中医药, 2020, 51(8): 77-80.
- [6] 徐涛,张杰. 缺氧对自噬双重作用调节的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2017, 16(7): 750-754.
- [7] Gonzalez FJ, Xie C, Jiang C. The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 15(1): 21-32.
- [8] 郭秀玲,徐民岗,张秀丽,等. 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞培养与诱导分化方法的建立 [J]. 中国药物与临床, 2013, 13(12): 1542-1544, 1662.
- [9] 权晶晶,凌均策. 二氯化钴在体外细胞缺氧研究中的应用 [J]. 国际口腔医学杂志, 2009, 36(4): 455-458.
- [10] Kumar TV, Allur SS, Inho H. Molecular and cellular response of co-cultured cells toward cobalt chloride (CoCl_2)-Induced hypoxia [J]. ACS Omega, 2019, 4(25): 20882-20893.
- [11] 张洁,丁金旺,李文华. 低氧诱导自噬相关信号通路分子机制研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2019, 35(16): 2476-2479.
- [12] 徐倩,哈小琴. 自噬在缺氧应激中的保护作用及其调控机制 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(2): 7-9.
- [13] LI Y, GAO S, Du XY, et al. Advances in autophagy as a target in the treatment of tumors [J]. J Drug Target, 2022, 30(2): 166-187.
- [14] Zhu H, Liu H, Chen X, et al. Enhancing autophagy and energy metabolism in the meniscus can delay the occurrence of PTOA in ACLT rat [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 971736. [PubMed].
- [15] Alim AB MA, Xu P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and-independent pathways [J]. Ann N Y Acad Sci, 2020, 1467(1): 3-20.
- [16] 周罗慧,柏亚明,孙毅,等. 血管生成过程中的自噬调控作用及自噬信号通路调控机制研究进展 [J]. 山东医药, 2021, 61(6): 108-111.
- [17] 张晓红,时景璞. 缺氧诱导因子-1 调控缺氧状态下心肌细胞自噬和凋亡的研究进展 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, 27(9): 1087-1093.
- [18] 刘瑞清,袁小澎. 缺氧诱导因子-1 α 参与肝纤维化形成机制研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2021, 24(1): 145-148.
- [19] 赵永军,何玉秀. 自噬介导运动改善肥胖症脂肪组织炎症状态研究进展 [J]. 中国运动医学杂志, 2016, 35(7): 675-681.
- [20] 姚庆,王浩安,高文婷,等. 脂肪细胞分泌的炎症因子及相关信号通路介导的肥胖和胰岛素抵抗 [J]. 大连医科大学学报, 2022, 44(4): 341-345.
- [21] Wondmkun YT. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 3611-3616.

[收稿日期]2023-01-10

甘林望,李乾程,高利超,等. 大蒜素通过 JAK2/STAT3 信号通路改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 39-47.

Gan LW, LI QC, Gao LC, et al. Allicin improves human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 39-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.006

大蒜素通过 JAK2/STAT3 信号通路改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化

甘林望¹,李乾程²,高利超¹,刘琦¹,李莹¹,王玉洁¹,欧三桃^{1*}

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

【摘要】 目的 探讨大蒜素改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化的相关机制。**方法** 培养人腹膜间皮细胞(human peritoneal mesothelial cells,HPMCs)后将其进行两次分组,分组 1:①对照组;②8.5 mmol/L D-葡萄糖诱导组(8.5 mmol/L DG 组);③17 mmol/L D-葡萄糖诱导组(17 mmol/L DG 组);④34 mmol/L D-葡萄糖诱导组(34 mmol/L DG 组);⑤68 mmol/L D-葡萄糖诱导组(68 mmol/L DG 组)。其中除对照组外,其余组分别用 8.5、17、34、68 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。分组 2:①对照组;②34 mmol/L D-葡萄糖诱导组(HG 组);③34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组(AL-L 组);④34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组(AL-M 组);⑤34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组(AL-H 组);⑥34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组(JAK2 组)。其中 HG 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h,AL-L 组、AL-M 组、AL-H 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖预处理 6 h 后分别用 10、20 和 40 ng/mL 大蒜素诱导 48 h,JAK2 组加入 1 μmol/L AG490 预处理 6 h 后用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。ELISA 检测 HPMCs 上清的 IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的含量;CCK-8 检测细胞增殖并观察形态;Western blot 检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、α-SMA、MCP-1、p65、p-p65 蛋白的表达情况。**结果** 与对照组相比,高糖诱导组 HPMCs 的相对存活率明显降低($P<0.01$),细胞形态表现异常,促进上皮细胞-间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)发生的 α-SMA、N-cadherin 和 Vimentin 表达明显上调,抑制 EMT 发生的 E-cadherin 蛋白表达明显下调,JAK2/STAT3 信号通路被激活从而导致 EMT 的发生($P<0.01$);而大蒜素能明显促进高糖诱导后的 HPMCs 增殖,恢复异常的细胞形态,调节与 EMT 发生的相关蛋白水平从而改善 HPMCs 的上皮间质转分化;与高糖诱导组相比,大蒜素处理组 HPMCs 的促炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 明显降低,促炎症蛋白 p-p50 和 MCP1 表达明显下调,表明大蒜素能改善 EMT 引起的炎症。**结论** 大蒜素可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路调节 EMT 发生的标志蛋白、炎症信号蛋白及炎症因子水平从而改善高糖诱导的 EMT 及炎症。

【关键词】 人腹膜间皮细胞;EMT;大蒜素;JAK2/STAT3 信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0039-09

Allicin improves human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose through the JAK2/STAT3 signaling pathway

GAN Linwang¹, LI Qiancheng², GAO Lichao¹, LIU Qi¹, LI Ying¹, WANG Yujie¹, OU Santao^{1*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Sichuan Clinical Research Center for Nephrology, Luzhou 646000, China. 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of allicin in improving human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose. **Methods** Human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) were

[基金项目] 四川省肾脏疾病临床医学研究中心 2020 年度开放课题(2019YFS0537-16)。

[作者简介] 甘林望(1984—),男,硕士,主治医师,研究方向:血液净化。E-mail:ganlinwang1010@163.com

[通信作者] 欧三桃(1976—),女,博士,主任医师,研究方向:慢性肾脏病、血管病变。E-mail:ousantao@163.com

divided into the following groups. Group 1: ①Control group; ②8.5 mmol/L D-glucose group (8.5 mmol/L DG group); ③17 mmol/L D-glucose group (17 mmol/L DG group); ④34 mmol/L D-glucose group (34 mmol/L DG group); ⑤68 mmol/L D-glucose group (68 mmol/L DG group). Except in the control group, the groups were treated with the corresponding concentrations of D-glucose for 48 h. Group 2: ①Control group; ②34 mmol/L D-glucose group (HG group); ③34 mmol/L D-glucose + low dose allicin group (AL-L group); ④34 mmol/L D-glucose + medium dose allicin group (AL-M group); ⑤34 mmol/L glucose + high-dose allicin group (AL-H group); ⑥34 mmol/L D-glucose + JAK2 inhibitor group (JAK2 group). The HG group was treated with 34 mmol/L D-glucose for 48 h. AL-L, AL-M and AL-H groups were pretreated with 34 mmol/L D-glucose for 6 h and then treated with 10, 20 and 40 ng/mL allicin for 48 h, respectively. The JAK2 group was pretreated with 1 μ mol/L AG490 for 6 h and then treated with 34 mmol/L D-glucose for 48 h. IL-6, TNF- α , and IL-1 β contents in HPMC culture supernatants were determined by ELISA. A CCK-8 assay was used to assess cell proliferation and morphology. JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, N-cadherin, E-cadherin, Vimentin, α -SMA, MCP-1, p65 and p-p65 protein expression was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the relative survival rate of HPMCs in the high glucose induced group was significantly reduced ($P < 0.01$), cell morphology was abnormal, expression of α -SMA, N-cadherin and Vimentin that promote epithelial-mesenchymal transition was significantly upregulated, and expression of E-cadherin, which inhibits EMT, was significantly downregulated. The JAK2/STAT3 signaling pathway was activated, leading to EMT ($P < 0.01$). Allicin significantly promoted HPMC proliferation induced by high glucose, reversed the abnormal cell morphology, regulated the expression of EMT-related proteins, and improved epithelial-mesenchymal transition of HPMCs. Compared with the high glucose group, proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in HPMCs in the allicin treatment group were significantly decreased and expression of proinflammatory proteins p-p50 and MCP1 was significantly downregulated, indicating that allicin improved the inflammation caused by EMT. **Conclusions** Allicin improved EMT and inflammation induced by high glucose by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway to regulate the expression EMT markers, inflammatory signaling proteins, and proinflammatory factors.

[Keywords] human peritoneal mesothelial cells; EMT; allicin; JAK2/STAT3 signaling pathway

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

慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)是影响人们健康的重要疾病,据统计我国成人患 CKD 的比例已超过 10%,其中终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)患者约为 300 万^[1]。腹膜透析(peritoneal dialysis,PD)具有保护肾功能、维持血流动力学稳定、改善贫血等优点,已成为治疗 ESRD 的主要方式之一。而当腹膜长期处于生物不相容性的高糖透析液时其组织结构容易损伤而引起结构重塑,使腹膜纤维化(peritoneal fibrosis,PF)透析效能下降,超滤衰竭发生从而制约腹膜透析技术在临床上的应用^[2]。人腹膜间皮细胞的上皮细胞-间充质转分化是长期处于腹膜透析患者的腹膜组织中很常见的病理特征,是导致腹膜纤维化始动使腹膜超滤衰竭的主要原因之一^[3]。EMT 表现为上皮细胞表型逐渐消失,成纤维细胞的标志物增加,合成细胞外基质的能力提升等特征,其病理过程复杂,与多种细胞因子和信号通路密切相关^[4]。截至目前,对于 EMT 在纤维化的作用被广泛研究,但腹膜间皮细胞发生 EMT 的分子机制尚未清楚。

大蒜素(allicin,AL)是大蒜由水蒸气蒸馏而得到的一种挥发油,是大蒜主要的有效成分^[5]。研究

发现大蒜素在抗氧化、抗肿瘤、降血脂、提升机体免疫力等方面发挥作用^[6]。大蒜素的抗纤维化作用是近年来新发现的药理作用之一。研究表明大蒜素可抑制胃癌、卵巢癌等多种癌症的上皮间质转化,抑制癌症迁移和侵袭^[7-8]。许宁宁^[9]的研究结果表明大蒜素可通过抑制炎症反应和肾组织纤维化保护慢性肾功能衰竭的大鼠。因此,大蒜素影响部分组织纤维化的过程,但目前其对于腹膜纤维化的影响尚不清楚。本研究通过分析 D-葡萄糖(D-glucose,DG)对细胞形态及细胞增殖、EMT 发生及 JAK2/STAT3 信号通路的影响,阐明其介导 EMT 发生的分子机制;同时,通过分析高糖诱导后进行大蒜素处理是否能改善 EMT 和炎症,为减少腹膜间皮细胞的损伤及改善腹膜透析相关性腹膜炎的预后提供理论依据,为大蒜素在临床上的应用提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人腹膜间皮细胞株 HMrSV5,购自 Procell 公司,货号:CP-H180。

1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖(Solarbio,货号:G8150,规格:250 g);大蒜素(Solarbio,货号:SA8720,规格:20 mg)。ELISA 检测试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司,货号:ZC-32420, ZC-32446, ZC-35733);肌动蛋白(β -actin)、酪氨酸蛋白激酶 2(JAK2)、磷酸化的酪氨酸蛋白激酶 2(p-JAK2)、磷酸化的信号转导和转录激活因子(p-STAT3)、信号转导和转录激活因子(STAT3)、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、E-钙粘蛋白(N-cadherin)、p65、p-p65、波形蛋白(Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白抗体(α -SMA)(abclonal,货号:AC026, A19629, AP0531, AP0705, A19566, A20798, A7277, A19083, A19653, AP0123, A19607, A17910);生物素化山羊抗兔 IgG(abcam,货号:ab6721);人腹膜间皮细胞完全培养基(Procell,货号:CM-H180);胰酶(Hyclone,货号:SH30042.01);胎牛血清(TRAN,货号:P20522);双抗(Basalmedia,货号:S110JV);CCK-8 试剂盒(Biosharp,货号:BS350A);无菌 PBS 溶液(Servicebio,货号:G4202)。倒置生物显微镜(LEICA,型号:DMI1);台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,型号:TDZ4-WS);CO₂培养箱(三洋电机国际贸易有限公司,型号:MCO-15AC);掌上离心机(赛洛捷克,型号:S1010E);酶标仪(Molecular Devices,型号:spectra max PLUS 384);垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-SCZ4⁺);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY200C);水平脱色摇床(江苏科析仪器有限公司,型号:TY-80A);化学发光凝胶成像仪 5200(上海天能科技有限公司);电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司生产,型号:DZKW-4)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

将人腹膜间皮细胞 HMrSV5 解冻离心后,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞在培养皿中进行接种,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3.2 细胞分组及处理

分组 1:培养人腹膜间皮细胞后将其随机分为 5 组:①对照组;②8.5 mmol/L DG 组;③17 mmol/L DG 组;④34 mmol/L DG 组;⑤68 mmol/L DG 组;68 mmol/L D-葡萄糖诱导组。除对照组外,其余各分别用 8.5、

17、34、68 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。分组 2:培养人腹膜间皮细胞后将其随机分为 6 组:①对照组;②HG 组:34 mmol/L D-葡萄糖诱导组;③AL-L 组:34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组;④AL-M 组:34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组;⑤AL-H 组:34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组;⑥JAK2 组:34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组。对照组不做任何处理,HG 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h,AL-L 组、AL-M 组、AL-H 组用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖预处理 6 h 后分别用 10、20 和 40 ng/mL 大蒜素诱导 48 h,JAK2 组加入 1 μ mol/L AG490 预处理 6 h 后用 34 mmol/L 的 D-葡萄糖诱导 48 h。

1.3.3 CCK-8 分析

取对数生长期的 HMrSV5 细胞,PBS 洗涤,胰蛋白酶消化后收集,250 r/min 离心 5 min,吸除上清液,加入适量培养基使其成为单细胞悬液;细胞计数后调节细胞密度为 4×10^4 /mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,37℃、5% CO₂ 恒温培养。待细胞贴壁后,根据 1.3.2 进行分组并处理,用无血清培养基 1:10 稀释 CCK-8 试剂,加入已稀释 CCK-8 工作液每孔 110 μ L;并轻轻晃动培养板数次,37℃、5% CO₂ 恒温继续培养 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光值,根据公式细胞相对存活率=(各组 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%,细胞抑制率=(1-实验组平均 OD/对照组平均 OD)×100%计算相应的细胞存活率及抑制率,并在光镜下观察细胞形态并拍照。

1.3.4 ELISA 试剂盒检测

根据 ELISA 试剂盒说明书检测各组细胞上清中白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-1 β (IL-1 β)的含量。

1.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)

使用总蛋白提取试剂盒提取各组人腹膜间皮细胞的总蛋白,并用 BCA 法进行定量。各组取等量蛋白质用的 SDS-PAGE 进行分离,分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5%的脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入 β -actin、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、E-cadherin、MCP-1、N-cadherin、p65、p-p65、Vimentin、 α -SMA 抗体,4℃孵育过夜后 TBST 清洗,然后二抗孵育,TBST 清洗,ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,Image-Pro Plus 软件分析光密度,以 β -actin 为内参,计算各组蛋白质的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行统计分析,数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对于各组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),对于组间均数的比较采用最小显著差数(LSD)法,以 $P<0.05$ 作为评定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 HG 诱导对 HPMCs 及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

2.1.1 HG 诱导对 HPMCs 增殖的影响

与对照组相比,4 种浓度的葡萄糖都能不同程度地抑制 HPMCs 的增殖。其中 8.5 mmol/L D-葡萄糖诱导组具有显著性的统计意义($P<0.05$),其余 3 组有极显著性的统计意义($P<0.01$)。34 mmol/L

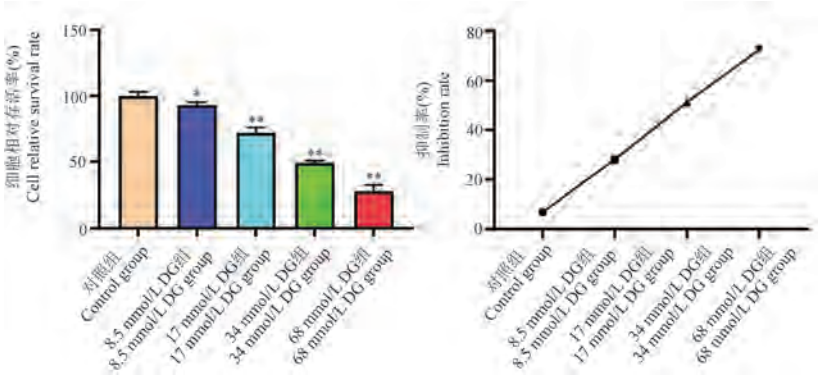
D-葡萄糖诱导组细胞的相对存活率是对照组的一半,其可以明显抑制 HPMCs 增殖,但不会过度抑制,所以选择 34 mmol/L D-葡萄糖为后续高糖诱导模型的浓度(见图 1)。

2.1.2 HG 诱导对 HPMCs 形态学变化的影响

如图 2 所示,光镜下观察 HPMCs 形态学变化发现正常条件培养下对照组 HPMCs 汇合后形态表现为卵圆石状或铺路石状。在给予不同浓度的 D-葡萄糖处理后,与对照组相比 4 种 D-葡萄糖诱导组 HPMCs 的形态均有不同比例呈现异常的梭形,而且浓度越高,异常形态比例越大。

2.1.3 HG 诱导对 HPMCs 发生 EMT 的影响

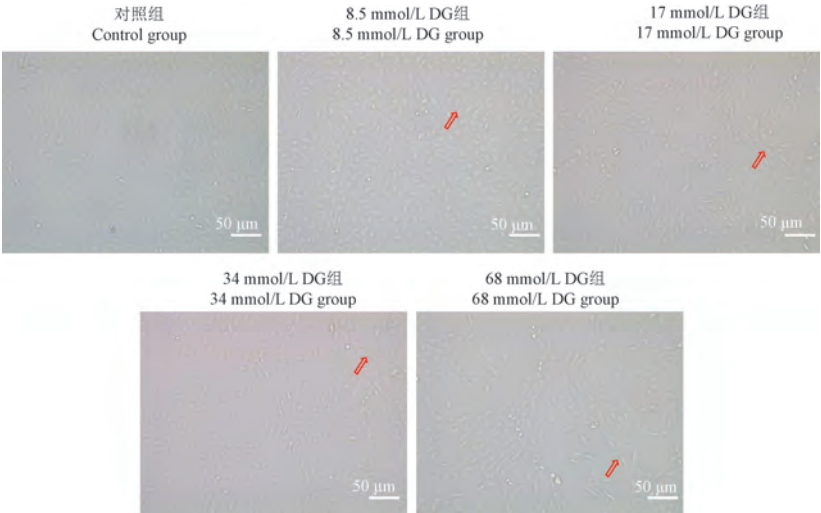
通过 Western blot 检测不同浓度的 D-葡萄糖对 EMT 相关蛋白表达的影响。与对照组比,34 mmol/L D-葡萄糖诱导组显著下调 E-cadherin 的表达($P<$



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 1 高糖诱导对人腹膜间皮细胞增殖的影响

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

Figure 1 Effects of hyperglycemia on proliferation of human peritoneal mesothelial cells



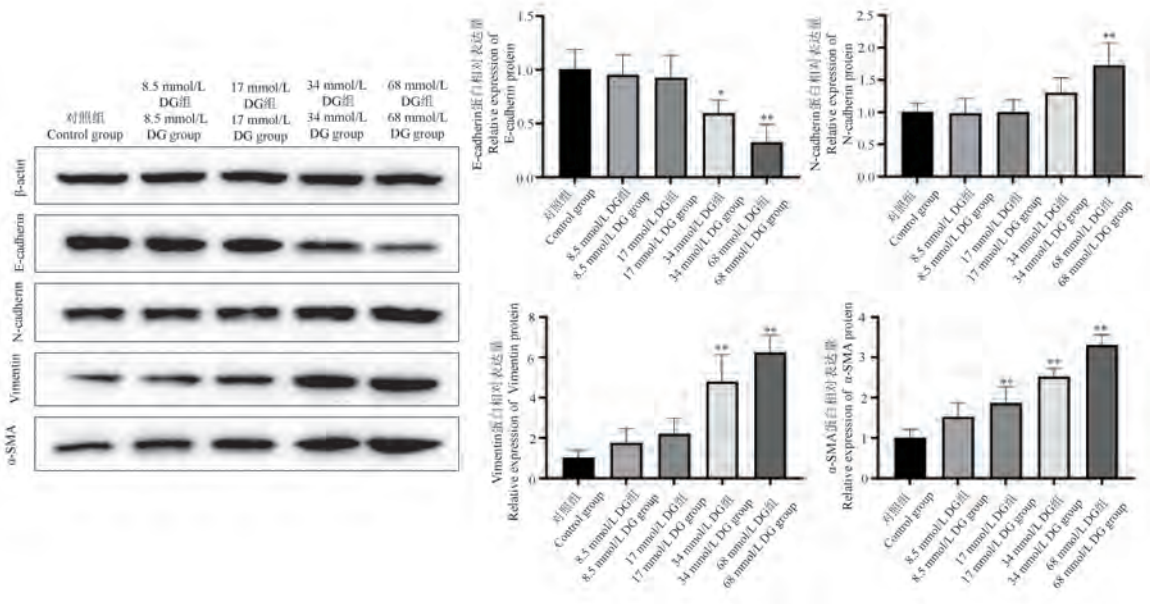
注:异常梭形细胞(↑)。
图 2 高糖诱导对人腹膜间皮细胞形态学变化的影响

Note. Abnormal spindle cells(↑).

Figure 2 Effects of high glucose induction on morphological changes of human peritoneal mesothelial cells

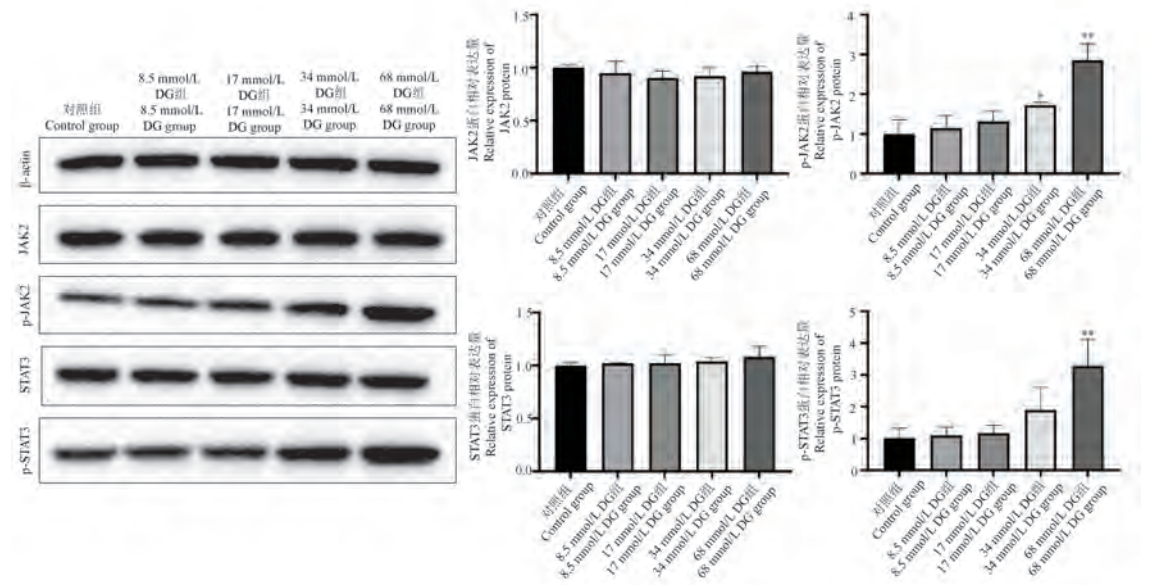
0.05), 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组明显下调 E-cadherin 和上调 N-cadherin 的表达 ($P<0.01$); 34 mmol/L D-葡萄糖和 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组明显上调 Vimentin 的表达, 17 mmol/L D-葡萄糖、34 mmol/L D-葡萄糖和 68 mmol/L D-葡萄糖诱导组均

明显上调 α -SMA 的表达 ($P<0.01$) (见图 3)。
2.1.4 HG 诱导对 HPMCs 中 JAK2/STAT3 信号通路的影响
结果见图 4, 与对照组比较, 34 mmol/L D-葡萄糖诱导组显著上调 p-JAK2 的表达 ($P<0.05$), 68



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 3 高糖诱导对 EMT 发生标志蛋白表达的影响
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 Effects of high glucose induction on the expression of EMT marker protein



注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 4 高糖诱导对 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effects of high glucose induction on the expression of JAK2/STAT3 signaling pathway related proteins

mmol/L D-葡萄糖诱导组明显上调 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达($P<0.01$);JAK2 和 STAT3 蛋白表达在对照组与四种不同浓度的 D-葡萄糖诱导组间无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 及其引起的炎症的影响

2.2.1 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 中 HPMCs 增殖的影响

通过 CCK-8 检测不同浓度的大蒜素对 HPMCs 增殖的影响,结果表明 HG 的诱导明显下调 HPMCs 的相对存活率。相比于 HG 诱导组,实验中设置的不同浓度的大蒜素及均能明显上调 HPMCs 的相对存活率($P<0.01$)。其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的促增殖作用最佳并接近于对

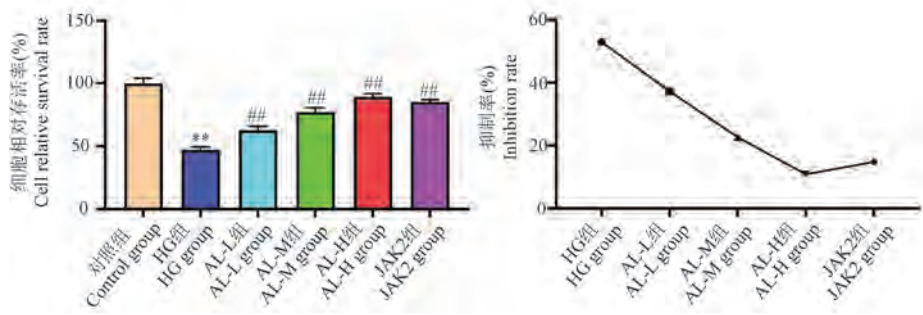
照组和 34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组(见图 5)。

2.2.2 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 中 HPMCs 形态学变化的影响

观察 HPMCs 形态学变化发现 HG 的诱导后异常梭形的 HPMCs 比例增多。而与 HG 诱导组相比,3 种浓度的大蒜素均能使异常的 HPMCs 减少,并且大蒜素的浓度越高,异常形态细胞的比例就越少,其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的细胞形态与对照组更接近(见图 6)。

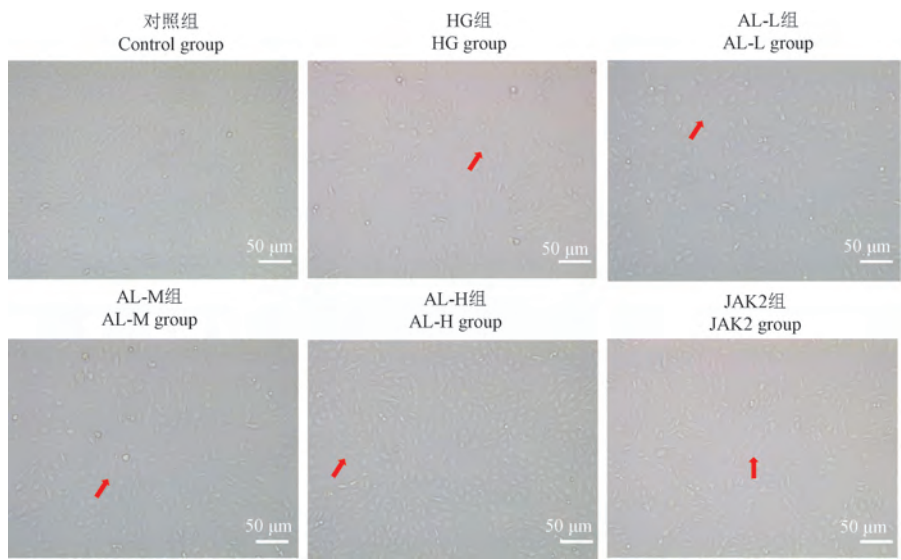
2.2.3 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 发生的影响

HG 诱导后 E-cadherin 蛋白表达明显下调,N-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达明显上调($P<0.01$),而经3种浓度的大蒜素处理后,E-cadherin



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与 HG 组比较, ## $P<0.01$ 。
图 5 大蒜素对高糖诱导的 EMT 中人腹膜间皮细胞增殖的影响
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with HG group, ## $P<0.01$.

Figure 5 Effects of allicin on proliferation of human peritoneal mesothelial cells in EMT induced by high glucose



注:异常梭形细胞(↑)。
图 6 大蒜素对高糖诱导的 EMT 中人腹膜间皮细胞形态学变化的影响
Note. Abnormal spindle cells(↑).

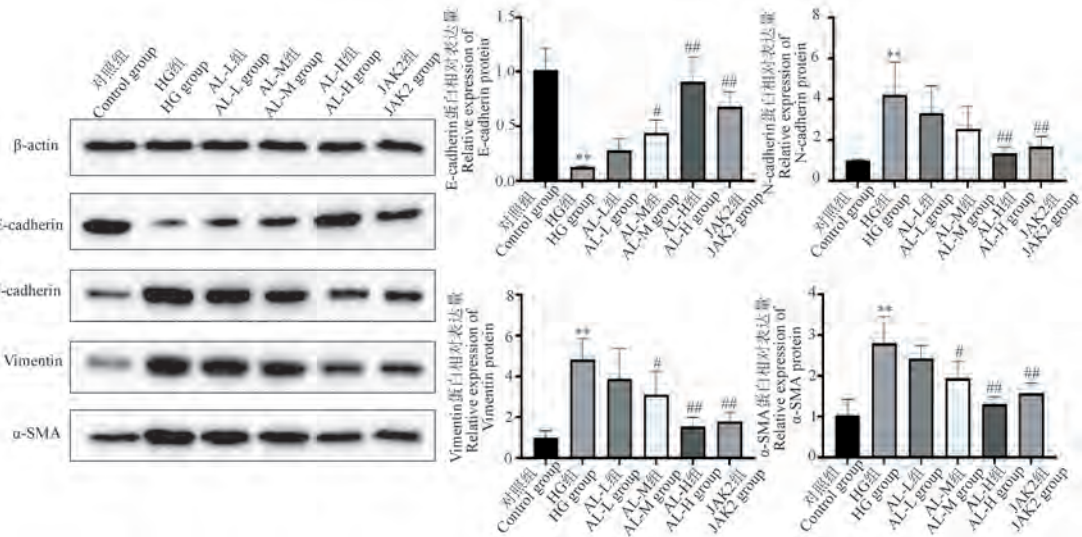
Figure 6 Effects of allicin on morphological changes of human peritoneal mesothelial cells in EMT induced by high glucose

蛋白表达上调,N-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达下调。其中 34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组的 E-cadherin、Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达与 HG 诱导组有显著性差异 ($P<0.05$),34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组、34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 诱导组的 EMT 发生相关蛋白表达与 HG 诱导组有极显著差异 ($P<0.01$)。34 mmol/L D

-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的 EMT 发生相关蛋白的水平与对照组更接近 (见图 7)。

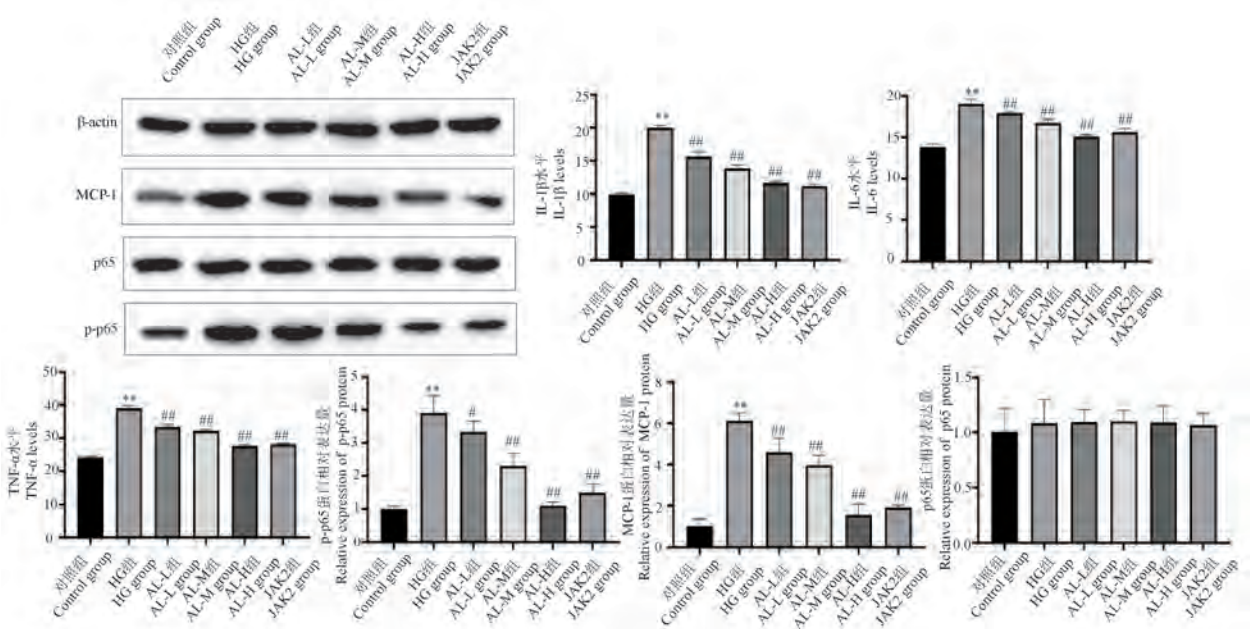
2.2.4 大蒜素对 HG 诱导的 EMT 引起的炎症的影响

如图 8 所示,HG 诱导后 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量明显升高 ($P<0.01$),而用 3 种浓度的大蒜素及 JAK2 抑制剂处理后含量明显降低 ($P<0.01$)。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与 HG 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 7 大蒜素处理后 HG 诱导的 EMT 发生标志蛋白的表达情况
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with HG group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 7 Expression of marker protein of HG induced EMT after allicin treatment



注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与 HG 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 8 大蒜素处理对炎症因子含量及炎症信号蛋白表达的影响
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with HG group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 8 Effects of allicin treatment on the content of inflammatory factors and expression of inflammatory signaling proteins

其中 34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平与对照组更接近。HG 诱导后 MCP-1 和 p-p65 蛋白的表达明显上调,经不同浓度的大蒜素及 JAK2 抑制剂处理后 MCP-1 蛋白表达明显下调($P<0.01$),34 mmol/L D-葡萄糖+低剂量大蒜素诱导组 p-p65 蛋白的表达显著下调($P<0.05$),34 mmol/L D-葡萄糖+中剂量大蒜素诱导组、34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组和 34 mmol/L D-葡萄糖+JAK2 抑制剂诱导组 p-p65 蛋白的表达明显下调($P<0.01$)。p65 蛋白的表达在不同组间均无统计学意义($P>0.05$)。34 mmol/L D-葡萄糖+高剂量大蒜素诱导组的炎症信号蛋白的水平与对照组更接近。

3 讨论

上皮间质转分化是一种有助于伤口愈合的现象,但其会造成一些纤维化的疾病,比如腹膜纤维化^[10]。在 PD 患者中,防止 EMT 的发生可以改善腹膜纤维化,保护腹膜的功能^[11]。人腹膜间皮细胞是导致腹膜纤维化的主动参与者,其通过 EMT 转变为成纤维细胞,对腹膜纤维化起到了重要作用^[12]。发生 EMT 时,腹膜间皮细胞丧失黏附性及细胞间的紧密连接,获得侵袭及迁移的能力,进而侵入腹膜间皮下紧密带,并合成致炎因子、致血管生成因子和细胞外基质^[3,13]。本研究用 D-葡萄糖诱导后明显抑制了 HPMCs 的增殖,并使其细胞形态呈现异常的梭形,同时,与 EMT 的发生相关的上皮细胞标志 E-cadherin 表达下调,间充质细胞标志 α -SMA、N-cadherin 和 Vimentin 表达上调,这与 Liu 等^[14]和赵星旭等^[15]研究结果一致,揭示此时 HPMCs 发生了上皮间质转分化;而经大蒜素处理后,HPMCs 增殖明显提高,异常形态细胞比例减少,促进 EMT 发生的间充质细胞蛋白表达显著降低,抑制 EMT 发生的上皮细胞蛋白表达显著升高,揭示大蒜素能通过影响 HPMCs 的增殖及形态和调节 EMT 发生蛋白的平衡可以显著改善 EMT。

JAK/STAT 信号通路是介导细胞因子信号转导的关键通路,其通过参与调节上皮细胞间的黏附影响上皮细胞癌恶性病变中细胞 EMT 的发生^[16]。阻断 JAK2/STAT3 信号通路时腹膜间皮细胞 EMT 的发生被抑制^[17]。磷酸化的 STAT3 形成二聚体后进入细胞核,促进纤维化和与促炎症因子相关的靶基因的表达^[18]。本研究中经 D-葡萄糖诱导后,磷酸

化的 JAK2 和 STAT3 的表达明显上调,揭示高糖诱导激活了 JAK2/STAT3 信号通路促进了 HPMCs 的上皮间质转分化。

炎症是腹膜纤维化的关键因素,其与纤维化相互诱导、相互促进^[19-20]。研究表明由免疫性细胞分泌的 IL-1、IL-6、TNF- α 等促炎因子和 IL-4、IFN- β 、TGF- β 等抗炎因子在免疫反应和慢性炎症中发挥着关键的作用^[21]。细胞核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路被激活后会使得 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等细胞炎症因子表达上调从而加剧炎症反应^[22]。而 NF- κ B 是由 p50 和 p65 亚基组成的异源性二聚体,是一种重要的胞浆内表达的多功能核转录因子,其激活后参与机体的慢性炎症、免疫反应等过程^[23]。MCP1 是机体内炎症级联的起始细胞因子,其分泌受到 IL-1、TNF- α 等信号分子的诱导^[24]。本研究中用高糖诱导后 HPMCs 的促炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 明显升高,磷酸化的 p50 比例升高,MCP1 表达明显上调,揭示此时 HPMCs 的炎症加重,而大蒜素明显缓解了 HPMCs 的炎症反应。

综上所述,高糖能使 EMT 发生蛋白、炎症相关蛋白及细胞因子的表达异常,激活 JAK2/STAT3 信号通路从而促进 EMT 的发生,而大蒜素能通过恢复 HPMCs 形态及增殖异常、调节与 EMT 发生及炎症相关的蛋白及因子的水平使其逐渐恢复正常从而改善 HPMCs 的上皮间质转分化及炎症。

参考文献:

- [1] 何叶梅,杨建波,温向琼,等.慢性肾脏病患者血清维生素水平的变化及意义[J].西部医学,2023,35(9):1325-1330.
- [2] 姚登湖,张明霞.钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂在腹膜透析中作用的研究进展[J].中国医药,2023,18(9):1427-1431.
- [3] Huang Y, Ma J, Fan Y, et al. Mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal lncRNA GAS5 in alleviating EMT of HPMCs via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Aging, 2023, 15(10): 4144-4158.
- [4] Ni Y, Deng HF, Zhou L, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorated bavachin-induced renal fibrosis via suppressing bip/eIF2 α /CHOP signaling-mediated EMT[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 872474.
- [5] Horn T, Bettray W, Noll U, et al. The sulfilimine analogue of allicin, S-allyl-S-(S-allyl)-N-cyanosulfilimine, is antimicrobial and reacts with glutathione[J]. Antioxidants, 2020, 9(11): 1086.
- [6] Zhuang F, Shi X, Qiao S, et al. Allicin promotes functional recovery in ischemic stroke via glutathione peroxidase-1 activation

- of Src-Akt-Erk [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 335.
- [7] 吴金兰, 万慧芳, 梁笑倾, 等. 大蒜素通过调控 GSK-3 β / β -Catenin 通路抑制卵巢癌细胞侵袭转移的研究 [J]. 实用癌症杂志, 2023, 38(4): 523-528.
- [8] 徐丹, 李瑞阳, 李晶, 等. 大蒜素抑制胃癌细胞上皮-间质转化作用及其机制 [J]. 医药导报, 2021, 40(3): 301-305.
- [9] 许宁宁. 大蒜素对慢性肾功能衰竭大鼠炎症反应及肾脏组织纤维化的影响 [J]. 天津中医药, 2018, 35(7): 526-530.
- [10] 洪慧, 张林. 绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯对腹膜透析患者腹膜纤维化的防治作用及其机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(1): 49-54.
- [11] 胡清华, 罗绮媚, 钟少鑫, 等. NLRP3 炎症小体与腹膜透析患者腹膜纤维化的研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(6): 1047-1051, 1057.
- [12] López-Cabrera M. Mesenchymal conversion of mesothelial cells is a key event in the pathophysiology of the peritoneum during peritoneal dialysis [J]. Adv Med, 2014, 2014: 473134.
- [13] 张青云, 傅俊江, 陈汉春. 上皮间质转化介导肿瘤转移的分子机制 [J]. 生命科学研究, 2018, 22(6): 503-510.
- [14] Liu J, Zeng L, Zhao Y, et al. Selenium suppresses lipopolysaccharide-induced fibrosis in peritoneal mesothelial cells through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Biol Trace Elem Res, 2014, 161(2): 202-209.
- [15] 赵星旭, 樊怡, 高利丽, 等. 人脐带间充质干细胞条件培养液对高糖诱导人腹膜间皮细胞-间充质转化的影响和机制 [J]. 中国血液净化, 2020, 19(7): 466-470, 504.
- [16] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition [J]. Cells, 2020, 9(1): 217.
- [17] Mo M, Zeng Y, Zeng Y, et al. N-methylpiperazine-diepoxyvatodiolide ameliorates peritoneal fibrosis via suppressing TGF- β /smad and JAK/STAT signaling pathway [J]. Chem Biol Interact, 2023, 382: 110589.
- [18] 韦泽丰, 郑金花, 王自强. 微小 RNA-223 调控白细胞介素-6/信号转导与转录激活因子 3 信号通路改善慢性肾小球肾炎大鼠炎症反应和纤维化的机制研究 [J]. 临床内科杂志, 2023, 40(7): 482-486.
- [19] Kadoya H, Hirano A, Umeno R, et al. Activation of the inflammasome drives peritoneal deterioration in a mouse model of peritoneal fibrosis [J]. FASEB J, 2023, 37(9): e23129.
- [20] Wu Z, Zuo X, Wang X, et al. The probiotic *Lactobacillus casei* Zhang-mediated correction of gut dysbiosis ameliorates peritoneal fibrosis by suppressing macrophage-related inflammation via the butyrate/PPAR- γ /NF- κ B pathway [J]. Food Funct, 2023, 14(15): 6840-6852.
- [21] 宋光永. 幽门螺杆菌感染依赖 NF- κ B 通路介导的炎症上清促进结肠上皮细胞发生 EMT 的作用机制研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [22] Semmarath W, Srisawad K, Arjsri P, et al. Protective effects of proanthocyanidin-rich fraction from red rice germ and bran on lung cell inflammation via inhibition of NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Nutrients, 2023, 15(17): 3793.
- [23] Wang Y, Liu Z, Zhang M, et al. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1 exaggerates multiple organ injury, inflammation, and immune cell imbalance by activating the NF- κ B pathway in sepsis [J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1117285.
- [24] 朱瑾, 王苑铭, 安小平, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路研究黄连化浊胶囊对糖尿病大鼠胰岛 β 细胞及 MCP1、IRE1 α 表达的影响 [J]. 中药材, 2023, 9(5): 1285-1289.

[收稿日期]2023-02-08

石瑾,吕玥,徐婷,等.抑制线粒体内膜蛋白 OMA1 对 Rot 诱导帕金森病细胞模型凋亡的影响 [J].中国比较医学杂志,2023,33(11):48-54.

Shi J, Lyu Y, Xu T, et al. Effect of inhibiting the mitochondrial inner membrane protein OMA1 on apoptosis in a Rot-induced Parkinson's disease cell model [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 48-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.007

抑制线粒体内膜蛋白 OMA1 对 Rot 诱导帕金森病细胞模型凋亡的影响

石瑾¹,吕玥¹,徐婷²,宣婷婷¹,杨娟¹,杜丹丹¹,张俊梅¹,李海宁^{1*}

(1.宁夏医科大学总医院神经内科,银川 750004;
2.宁夏医科大学总医院心脑血管病医院神经电生理科,银川 750004)

【摘要】 目的 探究抑制线粒体内膜蛋白 OMA1(overlapping activity with m-AAA protease,OMA1)对鱼藤酮(rotenone,Rot)诱导的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)凋亡的影响。**方法** 体外培养 SH-SY5Y 细胞,使用 Rot(终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 μmol/L)处理 SH-SY5Y 细胞 24 h,选择最佳浓度的 Rot(0.2 μmol/L)开展后续实验。实验分为对照组(细胞不经特殊处理)、PD 模型组(0.2 μmol/L 的 Rot 处理细胞 24 h)、空载转染组(正常对照组基础上转染 OMA1 siRNA 的阴性对照序列)、OMA1 siRNA 组(0.2 μmol/L 的 Rot 处理细胞 24 h 后转染 OMA1 siRNA)。CCK-8 检测细胞生存率、倒置相差显微镜观察各组细胞形态学、Western blot 检测 OMA1 及凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的变化、TUNEL 凋亡试剂盒检测细胞凋亡。**结果** 与对照组相比,随着 Rot 浓度的升高,SH-SY5Y 细胞生存率呈浓度依赖性降低($P<0.05$);与对照组相比,PD 模型组中 OMA1 的表达及凋亡蛋白 Caspase-3 表达升高,Bax/Bcl-2 值升高($P<0.01$);与 PD 模型组相比,OMA1 siRNA 组细胞形态学变化逐渐恢复、凋亡蛋白 Caspase-3 表达降低,Bax/Bcl-2 值降低,TUNEL 凋亡染色提示凋亡减轻($P<0.01$)。**结论** 抑制线粒体内膜蛋白 OMA1 可以改善 Rot 诱导的 PD 细胞模型引起的凋亡,对神经元可能具有保护作用。

【关键词】 线粒体内膜蛋白 OMA1;帕金森病;鱼藤酮;SH-SY5Y;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0048-07

Effect of inhibiting the mitochondrial inner membrane protein OMA1 on apoptosis in a Rot-induced Parkinson's disease cell model

SHI Jin¹, LYU Yue¹, XU Ting², XUAN Tingting¹, YANG Juan¹, DU Dandan¹, ZHANG Junmei¹, LI Haining^{1*}

(1. Department of Neurology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China.

2. Department of Nerve Electrophysiology, Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Hospital,
General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of inhibiting the mitochondrial inner membrane protein OMA1 on rotenone (Rot)-Induced apoptosis in a Parkinson's disease (PD) cell model. **Methods** SH-SY5Y cells were cultured *in vitro*, treated with Rot (final concentration of 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 or 0.4 μmol/L) for 24 h, and the best Rot concentration (0.2 μmol/L) was selected for subsequent experiments. The cells were divided into a control group (without

[基金项目]宁夏自然科学基金(2022AAC03561);2020 年度宁夏留学人员创新创业项目;宁夏医科大学校级科研项目(LNKF202101, XM2022025)。

[作者简介]石瑾(1989—),女,硕士研究生,研究方向:运动障碍性疾病。E-mail:270645795@qq.com

[通信作者]李海宁(1976—),女,副教授,研究方向:运动障碍性疾病。E-mail:lhnnwww@126.com

special treatment), PD model group (0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rot treatment for 24 h), negative control group (control group which was transfected with OMA1 negative sequence), and OMA1 siRNA group (0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rot treatment for 24 h and transfection with OMA1 siRNA). CCK-8 was used to detect cell survival rate, and an inverted phase-contrast microscope was used to observe cell morphology in each group. Western blot was used to detect changes in the expression of OMA1 and the apoptosis-related proteins Caspase-3, Bax and Bcl-2, and a TUNEL apoptosis kit was used to detect cell apoptosis.

Results Compared with the control group, the survival rate of SH-SY5Y cells decreased in a concentration-dependent manner with increasing Rot concentration ($P < 0.05$). Compared with the control group, the PD model group's expression of OMA1 and the apoptotic protein Caspase-3 and the ratio of Bax/Bcl-2 were increased ($P < 0.01$). Compared with in the PD model group, in the OMA1 siRNA group cells, morphological changes gradually restored, apoptotic protein Caspase-3 expression decreased, Bax/Bcl-2 increased, and TUNEL apoptosis staining suggested reduced apoptosis ($P < 0.01$).

Conclusions Inhibition of the mitochondrial inner membrane protein OMA1 ameliorated the apoptosis induced in the Rot-treated PD cell model, and in turn, may have a protective effect on neurons.

[Keywords] mitochondrial inner membrane protein OMA1; Parkinson's disease; rotenone; SH-SY5Y; apoptosis

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种慢性不可治愈的神经退行性疾病,主要影响老年人,就患病率而言,PD 在世界上排名第二^[1]。PD 具有广泛的表型和有限的治疗^[2]。PD 患者出现运动症状及非运动症状时其体内多巴胺能神经元通常消失 50%~80%^[3-4]。PD 目前是无法治愈的,有限的可用于临床干预的措施只能提供症状缓解。目前导致 PD 的确切原因仍有待探索,相关研究显示,线粒体功能障碍是 PD 的主要发病机制^[5]。线粒体动力学缺陷导致线粒体功能障碍,并与神经退行性疾病有关^[6-7]。

近年来,OMA1(overlapping activity with m-AAA protease, OMA1)作为一种用于调节线粒体动力学的内膜蛋白逐渐受到重视。OMA1 在生理状态下活性很低,但当线粒体应激时被迅速激活,过度活跃的 OMA1 是致病性的^[8-9],其可过度激活视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy protein 1, OPA1),导致 L-OPA1(长形式)裂解增强, S-OPA1(短形式)释放增加,过量的 S-OPA1 可通过其成膜特性提高 Bax/Bak1 活化后的外膜通透性并促进细胞色素 c 的释放,促进线粒体的分裂和神经元的凋亡^[10]。另外,相关研究报道称基因消融 OMA1 可防止 OPA1 裂解,延迟小鼠神经退化模型中的神经元凋亡^[11]。OMA1 通过激活 L-OPA1 亚型从而抑制线粒体融合而诱发凋亡。OMA1 在肿瘤方面的研究较多^[12],但是 OMA1 在 PD 中的研究有限,因此,研究设想抑制 OMA1 可能通过抑制细胞凋亡从而为以线粒体功能障碍为主要发病机制的 PD 疾病提高新的治疗靶点。本研究使用 Rot 诱导人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 建立体外 PD 细胞模型,旨在研究 PD 细胞模

型上 OMA1 的表达水平及抑制 OMA1 的表达对 PD 细胞模型凋亡的影响,为帕金森病的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号:CL-0208),细胞实验经宁夏医科大学总医院医学科研伦理审查委员会审核批准(KYLL-2022-0135)。

1.2 主要试剂与仪器

TUNEL 凋亡检测试剂盒(货号:KGA7073)、全蛋白提取试剂盒(货号:KGP250)、BCA 蛋白含量检测试剂盒(货号:KGPBCA)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(货号:KGP113)均购自江苏凯基生物公司;CCK-8 试剂盒(货号:C6005)购自苏州新赛美生物科技有限公司;MEM/F12 培养基(货号:PM151220)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DNA RNA Transfection Reagent(货号:IV1216050)购自美国 Invitrogen 公司;EDTA 含酚红胰酶胰酶(货号:T1320)购自北京索莱宝科技有限公司、胎牛血清(FBS)(货号:04-001-1ACS)购自以色列 Biological Industries 公司;鱼藤酮(Rotenone)(货号:HY-B1756-1)购自美国 MCE 公司;GAPDH Ab(货号:AF7021-30)购自江苏 Affity 公司;Anti-OMA1(货号:ab154949)、Anti-caspase-3(货号:ab32351-10 μL)、Anti-Bax(货号:ab32503)、Anti-Bcl-2(货号:ab32124)抗体均购自英国 Abcam 公司;山羊抗兔二抗 IgG-HRP 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;OMA1 siRNA 合成序列由上海汉恒生物科技有限公

司合成及提供。细胞培养箱(型号:HF-90;Heal Force 公司);生物安全柜(型号:HFSAFE-1200;NUAIRE 公司);倒置显微镜(型号: CX51; OLYMPUS 公司);倒置荧光生物显微镜(型号: AXIO OBSERVER A1; AxioCam MRc5 公司); Western blot 制胶设备(型号:mx1731;北京六一仪器公司);多色荧光凝胶成像系统(型号:CHEMI DOC MP;BioRad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 SH-SY5Y 细胞培养及传代

从液氮罐中将冻存的 SH-SY5Y 细胞取出,迅速移至提前预热的 37℃ 水浴锅中,使其快速融化。将细胞悬液吸至含有配制好的完全培养基(89% MEM/F12+10% FBS +1% 双抗)的 15 mL 离心管中,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入提前配制好的培养基吹打混匀,将细胞悬液吸至含有 4 mL 完全培养基的 60 mm 培养皿中充分混匀,然后置于 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。当细胞密度达 80% 左右时予以胰酶消化,按 1 : 2 进行传代。

1.3.2 CCK-8 法筛选出最佳 Rot 处理浓度

将 SH-SY5Y 细胞用胰酶消化后按 100 μL 中含细胞数 2×10⁴ 个接种于 96 孔板中,贴壁培养 24 h 后,加入用完全培养基稀释好不同浓度的 Rot (0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 μmol/L)轻轻混匀后继续放入培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 100 μL 配制好的 CCK-8 溶液(MEM/F12 90 μL+CCK-8 10 μL),继续放入培养箱中培养 2 h,酶标仪检测 OD₄₅₀ 进行数据统计分析。实验重复 3 次。

1.3.3 实验分组、处理及 OMA1 siRNA 转染

实验分为对照(control)组(细胞不经特殊处理)、PD 模型(PD model)组(0.2 μmol/L 的 Rot 处理细胞 24 h)、空载转染(negative control)组(正常对照组基础上转染 OMA1-siRNA 的阴性对照序列)和 OMA1 siRNA 组(0.2 μmol/L 的 Rot 处理细胞 24 h 后转染 OMA1 siRNA)。

PD 细胞构建成功后,进行 siRNA 的转染,参照 Invigentech INVI DNA RNA 转染说明书,将不同序列 siRNA 各 15 μL 与转染试剂 Invigentech INVI DNA RNA 15 μL 混合,室温静置 10~15 min 后转染至构建好的 PD 细胞模型上 24 h,采用 Western blot 检测最佳 OMA1 沉默序列。实验重复 3 次。

1.3.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡

12 孔板中接种各处理组细胞,实验分组及处理

同 1.3.3,将不同处理组的细胞固定;1% TritonX-100 通透液处理 5 min;在阳性片上滴加配制好的 DNaseI 反应液(DNaseI 30 μL + DNaseI Buffer 70 μL),37℃ 处理 30 min;滴加 TdT 酶反应液,37℃ 避光 60 min,洗涤;滴加 Streptavidin-Fluorescein 标记液,再在 37℃ 避光 30 min,洗涤;DAPI 复染细胞核,再次洗涤;荧光显微镜下观察并拍照(激发波长 450~500 nm,发射波长 515~565 nm)。实验重复 3 次。

1.3.5 Western blot 检测 OMA1、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

各个实验处理组提取总蛋白,采取 BCA 法进行蛋白浓度的测定,统一各组蛋白浓度为 2 μg/μL,100℃ 金属浴中处理蛋白 5 min,使蛋白变性,上样量为 30 μg,选取 10% SDS-PAGE 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳,转膜至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶于室温下封闭 1.5 h;加入对应的一抗 OMA1(1 : 1000)、Caspase-3(1 : 5000)、Bax(1 : 5000)、Bcl-2(1 : 1000)、GAPDH(1 : 10 000)于 4℃ 孵育过夜;然后用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,分别加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1 : 10 000),室温孵育 1 h,再次 TBST 洗膜 3 次,配制 ECL 发光液后,将目的条带置于凝胶成像仪中,进行曝光和显影。使用 Image J 软件对蛋白质相对表达量进行分析。

1.4 统计学方法

实验数据均为计量资料,结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)示,应用 GraphPad Prism 8.0 统计学软件进行数据分析,方差齐时,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 筛选出最佳 Rot 浓度

如表 1 所示,以对照组细胞存活率为 100% 计算,随着 Rot 作用 SH-SY5Y 细胞浓度逐渐增加

表 1 不同浓度 Rot 对 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

Table 1 Effect of different concentrations of Rot on the survival rate of SH-SY5Y cells		
组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate	
对照组 Control group	100.00±0.00	
鱼藤酮组 Rot group	0.05 μmol/L	80.70±0.61 *
	0.1 μmol/L	62.30±0.39 *
	0.2 μmol/L	50.00±1.01 *
	0.3 μmol/L	41.00±0.71 *
	0.4 μmol/L	30.12±0.31 *

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

(0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 $\mu\text{mol/L}$), SH-SY5Y 细胞生存率呈浓度依赖性降低 ($P<0.05$)。由于在 Rot 作用浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率为 $(50.00\pm 1.01)\%$ 。因此将 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rot 浓度设为后续实验造模最佳浓度。

2.2 不同浓度 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞中 OMA1 及凋亡相关蛋白的表达

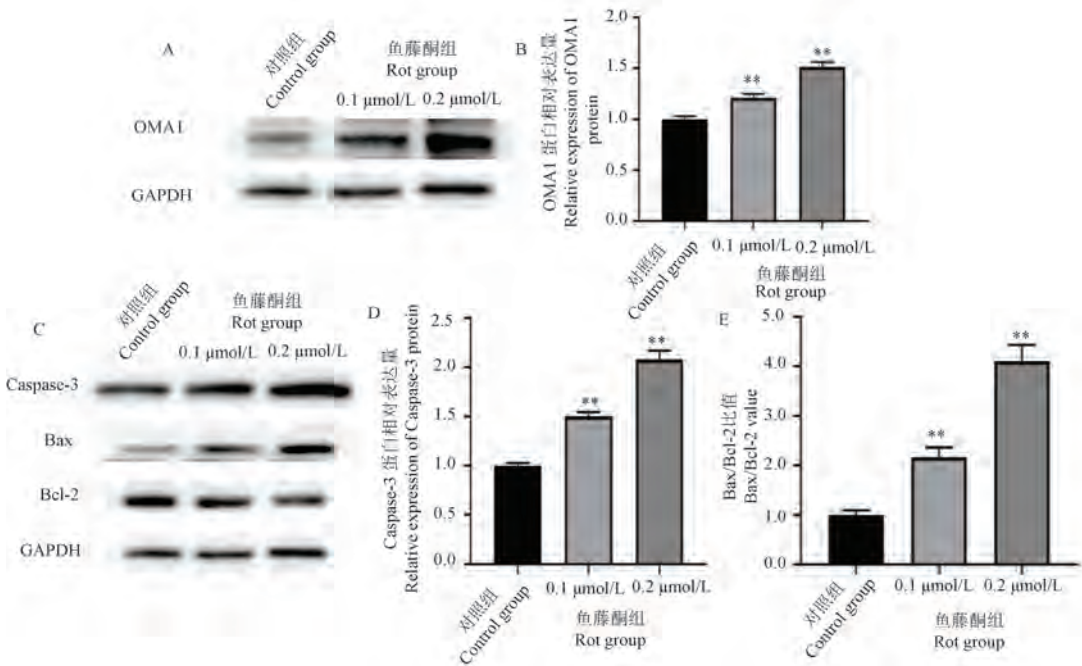
如图 1A、1B 所示,与对照组相比,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞构建的 PD 细胞模型中 OMA1 蛋白表达水平逐渐升高 ($P<0.01$)。如图 1C~1E 所示,与对照组相比,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Rot 组 Caspase-3 表达明显升

高,Bax/Bcl-2 值明显升高 ($P<0.01$)。提示随着鱼藤酮浓度的升高,PD 细胞模型中 OMA1 表达升高,凋亡蛋白的表达逐渐升高,抗凋亡蛋白的表达逐渐降低。

2.3 抑制 OMA1 对 PD 细胞模型凋亡的影响

2.3.1 抑制 OMA1 对细胞形态的影响

如图 2 所示,未分化 SH-SY5Y 细胞大小均一、细胞突起明显、呈梭形及多边形;给予 Rot 处理后形成 PD 细胞模型,其细胞形态改变、胞体变圆、突触缩短甚至消失;与 PD 细胞模型组相比,OMA1 siRNA 组细胞形态逐渐恢复、突触逐渐恢复,细胞存活率升高。



注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白 OMA1 图像进行分析;B:各组 OMA1 蛋白表达的定量分析;C:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2 图像进行分析;D:各组 Caspase-3 蛋白表达的定量分析;E:各组 Bax/Bcl-2 蛋白表达定量的比值分析。与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 1 不同浓度 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞中 OMA1 及凋亡相关蛋白表达影响

Note. A, Representative protein of OMA1 image by Western blot in different groups. B, Quantitative analysis of OMA1 protein expression in each group. C, Representative protein of Caspase-3, Bax, Bcl-2 images by Western blot in different groups. D, Quantitative analysis of Caspase-3 protein expression in each groups. E, Quantitative analysis of Bax/Bcl-2 protein ratio expression in each groups. Compared with control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effect of OMA1 and apoptosis-related protein expression in SH-SY5Y cells induced by different concentrations of Rot

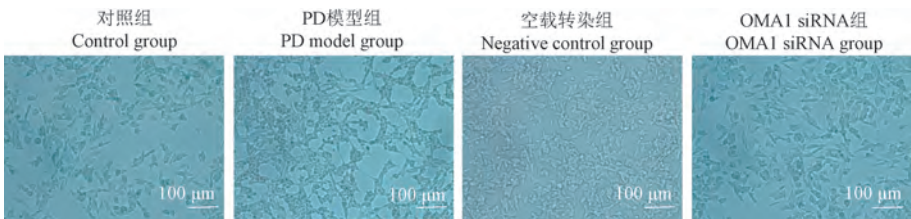
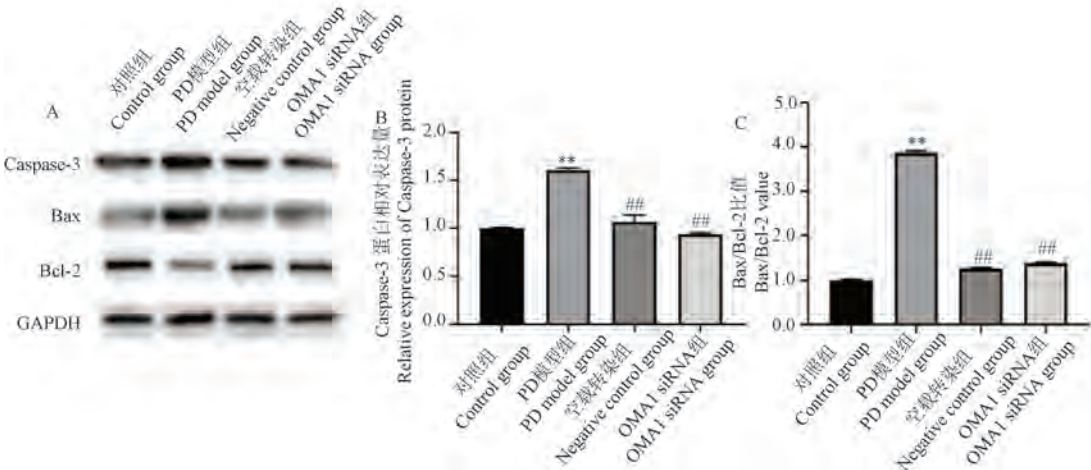


图 2 抑制 OMA1 对 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞形态学变化

Figure 2 Morphological changes of Rot-induced SH-SY5Y cells byinhibition of OMA1

2.3.2 抑制 OMA1 对 PD 细胞模型凋亡相关蛋白表达水平的影响

如图 3 所示,与 PD 模型组相比,OMA1 siRNA 组中凋亡蛋白 Caspase-3 表达水平降低($P<0.01$), Bax/Bcl-2 值明显降低($P<0.01$)。提示抑制 OMA1 的表达后,可以减轻 PD 细胞模型上调亡蛋白的表达,升高抗凋亡蛋白的表达。

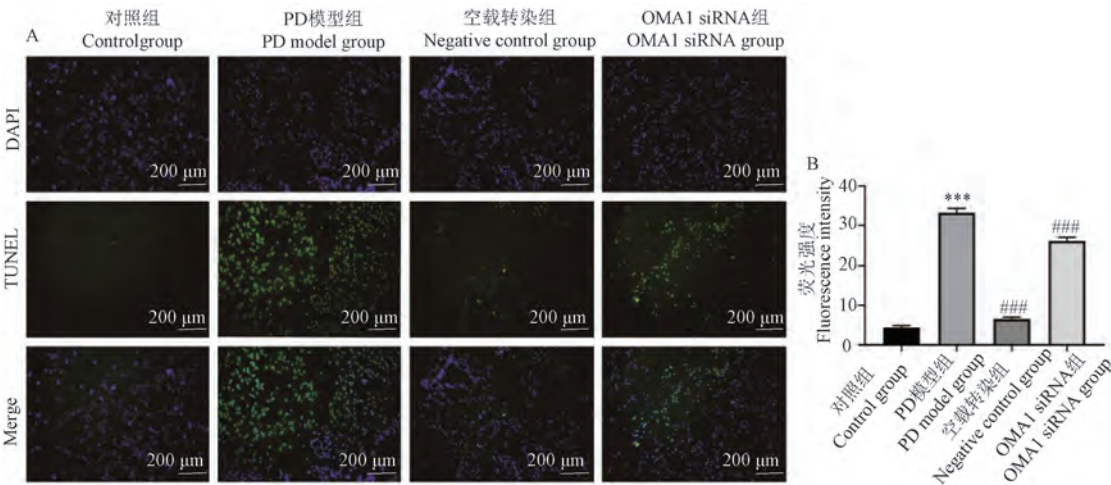


注:A:用 Western blot 对不同组的代表性蛋白 Caspase-3、Bax、Bcl-2 图像进行分析;B:各组 Caspase-3 蛋白表达的定量分析;C:各组 Bax/Bcl-2 蛋白表达定量的比值分析。与对照组比较, ** $P<0.01$;与 PD 模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 3 抑制 OMA1 在 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞中凋亡相关蛋白表达影响

Note. A, Representative protein of Caspase-3, Bax, Bcl-2 images by Western blot in different groups. B, Quantitative analysis of Caspase-3 protein expression in each groups. C, Quantitative analysis of Bax/Bcl-2 protein ratio expression in each groups. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with PD model group, ## $P<0.01$

Figure 3 Effect of inhibition of OMA1 in Rot-induced apoptosis-related protein expression in SH-SY5Y cells



注:A:TUNEL 染色检测各组凋亡荧光强度,TUNEL;绿色荧光标记凋亡细胞;DAPI;蓝色荧光标记细胞核;Merge;TUNEL 与 DAPI 合成图;B:各组荧光表达相对量。与对照组比较, *** $P<0.001$;与 PD 模型组比较, ### $P<0.001$ 。

图 4 抑制 OMA1 对 PD 细胞模型凋亡 TUNEL 染色

Note. A, TUNEL staining to detect the fluorescence intensity of apoptosis in each group, TUNEL, Green fluorescent labeling of apoptotic cells. DAPI, Blue fluorescent labeling of cell nuclei. Merge, TUNEL and DAPI synthesis chart. B, Relative amount of fluorescence expression in each group. Compared with control group, *** $P<0.001$. Compared with PD model group, ### $P<0.001$.

Figure 4 Inhibition of OMA1 on apoptosis TUNEL staining in PD cell models

3 讨论

PD 致病的常见原因有黑质多巴胺能神经元的变性^[13]、线粒体功能障碍、氧化应激^[14]等。Polito 等^[15]报道,遗传和环境因素对 PD 的影响非常重要。PD 与各种内源性和外源性毒素^[16]有关,这些毒素经常被用于建立 PD 的疾病模型。Rot 是一种线粒体电子传递链复合物 I 的抑制剂,具有明显的神经毒性,也具有高度亲脂性,容易越过血脑屏障,能够造成多巴胺神经元 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn) 聚集^[17],并且导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度生成,引起多巴胺能神经元的氧化应激^[18],是模拟 PD 病理常用的神经毒性分子^[19]。因此本研究选用 Rot 作为化学诱导剂构建体外 PD 细胞模型,并通过调节细胞凋亡为线粒体功能障碍性疾病 PD 提供新的治疗靶点。

线粒体是细胞的能量工厂,同时也是诱导细胞死亡通路激活的重要结构。线粒体的融合由 OPA1、Mfn1、Mfn2 调控,分裂则由 Drp1、Fis1 和 EndoG 调节^[20],在应激条件下,线粒体融合允许功能性线粒体内容物与受损线粒体的代偿性混合,从而减轻急性损伤。因此,融合中断会加剧急性损伤,导致不可逆转的呼吸能力丧失和随后的细胞死亡。OPA1 为线粒体形状改变和细胞生存的调控中心。OPA1 的缺失损害了线粒体融合,干扰了嵴的形态发生,并增加了细胞的凋亡敏感性^[21]。线粒体内膜蛋白 OMA1 和 i-AAA 蛋白酶 YME1L 分别在 S1 和 S2 裂解 OPA1^[22]。虽然 YME1L 对 OPA1 的加工处于代谢控制之下^[23],但 OMA1 在各种压力应激下被激活,导致 L-OPA1 的完全降解和线粒体断裂^[24-25]。此外,培养细胞中 OMA1 的缺失被发现可以防止细胞凋亡^[26-27]。相反,过度活跃的 OMA1 是致病性的^[8,11,28],可能通过破坏 OPA1 介导的线粒体融合导致疾病发生。有趣的是,缺乏 OMA1 的小鼠表现出免受神经变性^[11]、肾缺血^[27]和心力衰竭^[8]的保护,这强烈表明 OMA1 是有希望的治疗靶标。然而,OMA1 处理应激诱导的 OPA1 在体内普遍相关,但其在 PD 发病中对凋亡相关的影响报道有限。

为探究抑制 OMA1 在 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞构建的体外 PD 细胞模型中的表达及对凋亡的影响。用不同浓度 Rot 诱导 SH-SY5Y 细胞构建体外 PD 细胞模型,随着 Rot 浓度的升高,OMA1 活性被

激活,OMA1 蛋白的表达也逐渐升高,且凋亡蛋白表达升高,抗凋亡蛋白表达降低,实验中凋亡蛋白的表达结果与在 PD 患者脑组织的检查显示相符,PD 患者脑组织的检查结果显示黑质致密部活性 Caspase-3 和 Bax 水平升高^[29-31]。接下来设想,在 PD 细胞模型上 OMA1 的活性是增高的,其表达也是增加的,且凋亡蛋白的表达也是增高的,那么如果抑制 OMA1 的表达后,对 PD 细胞模型的凋亡是否具有抑制作用吗?在 PD 细胞模型基础上抑制 OMA1 的表达,首先在形态学上就可以观察到,与 PD 模型组相比,抑制 OMA1 后细胞存活率明显升高,形态恢复、数量增多,随后通过 Western blot 检测到抑制 OMA1 的表达后凋亡蛋白表达降低,抗凋亡蛋白表达升高,TUNEL 染色发现抑制 OMA1 凋亡的荧光染色与 PD 模型组相比减少。

综上所述,本研究发现在 PD 细胞模型基础上抑制 OMA1 的表达对 PD 细胞模型具有保护作用 and 抗凋亡的作用,可能为 PD 患者的治疗提供新的见解。

参考文献:

- [1] GBD Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(11): 877–897.
- [2] Kowal SL, Dall TM, Chakrabarti R, et al. The Current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States [J]. *Mov Disord*, 2013, 28(3): 311–318.
- [3] DeMaagd G, Philip A. Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis [J]. *P T*, 2015, 40(8): 504–532.
- [4] Emamzadeh FN. Role of apolipoproteins and α -synuclein in Parkinson's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 62(3–4): 344–355.
- [5] Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18(5): 21.
- [6] Joshi AU, Saw NL, Vogel H, et al. Inhibition of Drp1/Fis1 interaction slows progression of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *EMBO Mol Med*, 2018, 10(3): e8166.
- [7] Khalil B, Liévens J. Mitochondrial quality control in amyotrophic lateral sclerosis: towards a common pathway? [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12: 1052–1061.
- [8] Acin-Perez R, Lechuga-Vieco AV, Del Mar Muñoz M, et al. Ablation of the stress protease OMA1 protects against heart failure

- in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(434): eaa4935.
- [9] Yang F, Wu R, Jiang Z, et al. Leptin increases mitochondrial OPA1 via GSK3-mediated OMA1 ubiquitination to enhance therapeutic effects of mesenchymal stem cell transplantation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 556.
- [10] Alavi MV. Targeted OMA1 therapies for cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(9): 2330–2341.
- [11] Korwitz A, Merkwirth C, Richter-Dennerlein R, et al. Loss of OMA1 delays neurodegeneration by preventing stress-induced OPA1 processing in mitochondria [J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(2): 157–166.
- [12] Wu Z, Zuo M, Zeng L, et al. OMA1 reprograms metabolism under hypoxia to promote colorectal cancer development [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(1): e50827.
- [13] Creed RB, Goldberg MS. New Developments in Genetic rat models of Parkinson's Disease [J]. *Mov Disord*, 2018, 33(5): 717–729.
- [14] Subramaniam SR, Chesselet MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 106/107: 17–32.
- [15] Polito L, Greco A, Seripa D. Genetic profile, environmental exposure, and their interaction in Parkinson's disease [J]. *Parkinsons Dis*, 2016, 2016: 6465793.
- [16] Qualls Z, Brown D, Ramlochan Singh C, et al. Protective effects of curcumin against rotenone and salsolinol-induced toxicity: implications for Parkinson's disease [J]. *Neurotox Res*, 2014, 25(1): 81–89.
- [17] Rocha SM, Bantle CM, Aboellail T, et al. Rotenone induces regionally distinct α -synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57BL/6 mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2022, 167: 105685.
- [18] Radad K, Al-Shraim M, Al-Emam A, et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease [J]. *Folia Neuropathol*, 2019, 57(4): 317–326.
- [19] 胡宇, 唐慧玲, 田清, 等. 鱼藤酮对大鼠认知功能及其海马 Warburg 效应和小胶质细胞极化的影响 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2021, 42(6): 801–807.
- [20] Bastian P, Dulski J, Roszmann A, et al. Regulation of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease-is 2-methoxyestradiol a missing piece? [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2): 248.
- [21] Meeusen S, DeVay R, Block J, et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1 [J]. *Cell*, 2006, 127(2): 383–395.
- [22] Anand R, Wai T, Baker MJ, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(6): 919–929.
- [23] Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(10): 634–646.
- [24] Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, et al. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics [J]. *EMBO J*, 2014, 33(6): 578–593.
- [25] Quirós PM, Langer T, López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(6): 345–359.
- [26] Jiang X, Jiang H, Shen Z, et al. Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41): 14782–14787.
- [27] Xiao X, Hu Y, Quirós PM, et al. OMA1 mediates OPA1 proteolysis and mitochondrial fragmentation in experimental models of ischemic kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(11): F1318–F1326.
- [28] Parajuli N, Shrum S, Tobacyk J, et al. Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins [J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185542.
- [29] Mogi M, Togari A, Kondo T, et al. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2000, 107(3): 335–341.
- [30] Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(6): 2875–2880.
- [31] Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2000, 166(1): 29–43.

[收稿日期]2022-08-10

喻帅克,罗茂丽,王连睿,等. 基于数据挖掘的骨肉瘤动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 55-62.
Yu SK, Luo ML, Wang LR, et al. Application characteristics of animal models of osteosarcoma based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 55-62.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.008

基于数据挖掘的骨肉瘤动物模型应用分析

喻帅克,罗茂丽,王连睿,周天豹,苗明三*,白莉*

(河南中医药大学,郑州 450046)

【摘要】 目的 总结骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)动物模型造模要点,为完善其造模方法和评价指标提供参考与建议。**方法** 通过检索中国知网、万方数据库、PubMed 中 OS 动物模型相关文献,总结其实验动物种类、性别、造模方法、癌细胞株种类、检测指标等,建立数据库进行统计分析。**结果** 共纳入 284 篇文献,统计分析发现 OS 模型动物首选 BALB/c-nu/nu 裸鼠(227 例,75.17%),其次是 SD 大鼠(20 例,6.62%)。造模方式多选用背部皮下细胞液移植法(66 例,21.85%)、腋部皮下细胞液移植法(55 例,18.21%)或原位细胞液移植法(51 例,16.89%)等;癌细胞株种类以人源 MG-63 细胞(100 例,33.11%)、鼠源 UMR-106 细胞(39 例,12.91%)为主;检测指标主要选择肿瘤组织表观指标(238 例,83.80%)、肿瘤组织 HE 染色(129 例,45.42%)、动物表观指标(94 例,33.10%)、肿瘤组织免疫组化(89 例,31.34%)。**结论** 目前 OS 模型多选用 4~6 周龄 BALB/c-nu/nu 裸鼠作为实验动物,采用人源 MG-63 细胞异位移植法(背部、腋下移植)建立 OS 动物模型,模型检测指标以动物表观指标、肿瘤表观指标、肿瘤组织病理进行整体评价。但目前依旧缺少与临床吻合度高的动物模型制备及评价标准,本文通过文献挖掘、数据分析总结其优缺点,以期建立良好的 OS 模型提供参考,更好地应用于 OS 机制研究及新药开发。

【关键词】 骨肉瘤;动物模型;数据挖掘
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0055-08

Application characteristics of animal models of osteosarcoma based on data mining

YU Shuaike, LUO Maoli, WANG Lianrui, ZHOU Tianbao, MIAO Mingsan*, BAI Li*
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Objective To summarize the important points of animal models of osteosarcoma and to provide a reference and suggestions to improve the modeling method and evaluation indexes. **Methods** Using osteosarcoma and animals as the main topics, literature on animal models of osteosarcoma from CNKI, Wanfang Data and PubMed. The species of experimental animals, gender, modeling method, types of cancer cell lines and detection indicators were summarized, and a database was established for statistical analysis. **Results** A total of 284 reports were included. The most selected osteosarcoma model animals were BALB/c-nu/nu mice (227 times, 75.17%), followed by SD rats (20 times, 6.62%). Subcutaneous cell fluid transplantation in the back (66 times, 21.85%), subcutaneous cell fluid transplantation in the axils (55 times, 18.21%), and *in situ* cell fluid transplantation (51 times, 16.89%) were used as

[基金项目] 岐黄学者(国中医药人教函 2022-6);河南省重大公益专项(201300310100)。
[作者简介] 喻帅克(2001—),男,硕士研究生,研究方向:药理学。E-mail: yushuaike666@163.com
[通信作者] 白莉(1983—),女,副教授,博士,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail: baili64@163.com
苗明三(1965—),男,教授,博士,研究方向:中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com
* 共同通信作者

modeling method. Human MG-63 cells (100 times, 33.11%) and mouse UMR-106 cells (39 times, 12.91%) were selected as the cancer cell line. The most analyzed indexes were the tumor tissue apparent index (238 times, 83.80%), HE staining of tumor tissue (129 times, 45.42%), and Animal epigenetic metrics (94 times, 33.10%), and immunohistochemistry of tumor tissue (89 times, 31.34%). **Conclusions** At present, osteosarcoma BALB/c-nu/nu mice aged 4 to 6 weeks are used as experimental animals, and human MG-63 cell heterotopic transplantation (back and axillary transplantation) is used to establish the animal model, and the detection indexes of osteosarcoma are comprehensively evaluated by animal apparent index, tumor apparent index and tumor histopathology. It is suggested to select serum biochemical index, apparent index of tumor tissue as well, HE staining of tumor tissue and immunohistochemistry of tumor tissue to evaluate the model. However, there is still a lack of animal model preparation and evaluation criteria with high clinical consistency. In this paper, the advantages and disadvantages are summarized through literature mining and data analysis, in order to provide reference for the establishment of a good OS model and better application to OS mechanism research and new drug development.

【Keywords】 Osteosarcoma; animal model; data mining

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

骨肉瘤 (Osteosarcoma, OS) 是骨组织常见的原发性恶性肿瘤,全球发病率每一百万人约有 4 人,好发于 15~19 岁的青少年^[1-3],主要表现为疼痛、肿块、跛行等,具有高转移性、预后差、病情发展迅速等特点^[4-6]。OS 现代治疗多采用放疗、化疗、根治性手术切除和晚期截肢^[7-8],多方法结合治疗虽然可以抑制癌细胞增殖和减少转移风险,却为机体带来不可逆损伤和残疾,化疗毒性和耐药性导致机体免疫下降,加深了患者的痛苦^[9-12]。因此,对 OS 的发病机制,以及有效的治疗方法和药物进行更深入的研究是非常有必要的,而稳定可靠的动物模型是开展 OS 相关研究的关键和基础。OS 动物模型应用于骨肉瘤相关研究已有较长的历史,创造了多种可行的造模方式,例如病毒诱导模型^[13]、辐射诱导模型^[14]、肿瘤移植模型^[15]等,但相关文献缺少统一的模型制备及评价标准。本文将通过对骨肉瘤动物模型研究的文献进行归纳分析,探讨模型动物的选择、造模方法、主要检测指标等,以期为骨肉瘤动物模型的完善提供方法学参考。

1 材料和方法

1.1 资料来源

在中国知网 (CNKI)、万方数据库知识服务平台 (Wanfang) 中以“骨肉瘤”“动物”为主题词进行检索,锁定检索年限 2000 年 1 月~2022 年 10 月,在 PubMed 数据库以“(osteosarcoma) AND (animal model)”进行检索,检索时间范围均设置为 2019 年 10 月~2022 年 10 月。其中中国知网数据库检索出相关期刊文献 1478 篇、万方数据库 799 篇、PubMed 数据库检索文献 227 篇,文献总数为 2504 篇。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:选择具有骨肉瘤动物模型应用的实验性期刊文献,排除标准:(1)会议性文献、硕博学位论文、综述类文献、理论研究类文献;(2)未明确记录造模方法或实验动物种类的文献;(3)数据库之间重复的文献。

1.3 数据规范

实验动物名称、种类等均参照《实验动物和动物实验技术》^[16]进行规范总结。

1.4 数据处理及分析

将纳入标准的 284 篇文献的实验动物种类、性别、造模方法、癌细胞种类、检测指标等数据录入 Excel 表,建立骨肉瘤动物模型数据库。使用 Microsoft Excel 2016 进行统计学处理与分析。

2 结果

2.1 文献筛选结果

初次检索到文献 2504 篇,排除不符合标准以及重复的文献,最终筛选得到符合标准的文献 284 篇,建立数据库。分析数据库发现 OS 动物模型使用频数为 302 例,一篇文献中出现两次及以上 OS 模型的原因是比较不同造模方法^[17],以及癌细胞株种类原因^[18-19]引起的药效差异和模型成功率差异。

2.2 骨肉瘤造模动物种类

将 284 篇文献中使用的动物种类进行统计,共有实验动物 15 类^[20-26]。其中使用频次>10 的共有 3 种,使用最多的为 BALB/c-nu/nu 裸鼠 (227 例, 75.17%),其次为 SD 大鼠 (20 例, 6.62%) 和 C3H 小鼠 (11 例, 3.64%)。动物年龄多为 (4~6) 周龄、(6~8) 周龄,实验动物性别选择以雌性为主,共 101

例,占比 35.94%,其次为雄性(99 例,35.23%),雌雄各半(81 例,28.83%)(21 篇文献未注明性别情况,故不计入统计),动物种类分布情况见表 1。

2.3 骨肉瘤动物模型造模方法

统计纳入标准的 284 篇文献中骨肉瘤动物模型的造模方法,发现异位移植法使用频数为 230 例,原位移植法为 72 例,且异位移植模型以细胞液移植为主。异位移植法中背部皮下移植(66 例,21.85%)

最多,其次为腋部皮下移植(55 例,18.21%)、后肢皮下移植(41 例,13.58%);原位移植法是接种在股骨远端或胫骨近端的骨髓腔,其中细胞液移植(51 例,16.89%)、组织块移植(21 例,6.95%)。细胞液移植法中明确表明细胞数量的有 242 例,多选择 $1\times 10^7/\text{mL}$ 或 $1\times 10^6/\text{mL}$ 癌细胞浓度注射;瘤组织块移植法中瘤组织直径以 1~2 mm 大小为主。详细造模情况见表 2、表 3。

表 1 骨肉瘤模型动物种类
Table 1 Osteosarcoma model animal species

动物种类 Animal species	频次(<i>n</i>) Frequency	百分比(%) Percentage	年龄(周) Age(week)
BALB/c-nu/nu 裸鼠 BALB/c-nu/nu nude mice	227	75.17	4~6,3~4
SD 大鼠 Sprague Dawley rats	20	6.62	3~4
C3H 小鼠 C3H/HeJ mouse	11	3.64	4
KM 小鼠 Kunming mice	9	2.98	4~6
BALB/c 小鼠 BALB/c mice	9	2.98	6~8
SCID 小鼠 Server combined immune-deficiency mice	8	2.65	6~8
Wistar 大鼠 Wistar rats	5	1.66	4~5
C57BL6 小鼠 C57BL6 mice	3	0.99	6~8
新西兰兔 New Zealand rabbit	3	0.99	8~12
其他 Other species	7	2.32	/

表 2 骨肉瘤动物模型造模方法
Table 2 Methods for the animal model of osteosarcoma

造模方法 Methods	接种位置 Vaccination position	频次(<i>n</i>) Frequency	百分比(%) Percentage
异位移植法 Heterotopic transplantation	背部皮下 Dorsal subcutaneous	66	21.85
	腋部皮下 Axillary subcutaneous	55	18.21
	后肢皮下 Hindlimb subcutaneous	41	13.58
	腹部皮下 Abdominal subcutaneous	14	4.63
	前肢皮下 Forelimb subcutaneous	7	2.32
	胸前壁皮下 Chest subcutaneous	7	2.32
	腹股沟皮下 Subcutaneous inguinal	5	1.66
	未知皮下 Unknown subcutaneous	5	1.66
	尾静脉 Tail vein	5	1.66
	颈部皮下 Neck subcutaneous	4	1.32
	肌肉 Muscle	2	0.66
	腹腔 Abdominal cavity	1	0.33
细胞液移植法 Cytosol transplantation			

续表2

造模方法 Methods		接种位置 Vaccination position	频次(<i>n</i>) Frequency	百分比(%) Percentage
	瘤组织块移植法 Tumor tissue transplantation	背部皮下 Dorsal subcutaneous	7	2.32
		腋部皮下 Axillary subcutaneous	6	1.99
		后肢皮下 Hindlimb subcutaneous	2	0.66
		胸前壁皮下 Chest subcutaneous	1	0.33
		腹部皮下 Hindlimb subcutaneous	1	0.33
		未知皮下 Unknown subcutaneous	1	0.33
		股骨远端或胫骨近端的骨髓腔 Bone marrow cavity of the distal femur or proximal tibia	51	16.89
		股骨远端或胫骨近端的骨髓腔 Bone marrow cavity of the distal femur or proximal tibia	21	6.95
原位移植法 Orthotopic transplantation	细胞液移植法 Cell fluid transplantation method			
	瘤组织块移植法 Tumor tissue mass graft method			

表 3 细胞液移植法癌细胞浓度
Table 3 Cancer cell concentrations by cell fluid transplantation

癌细胞数量 Number of cancer cell	频次(<i>n</i>) Frequency	百分比(%) Percentage
1×10 ⁷ /mL	60	24.79
1×10 ⁶ /mL	44	18.18
2×10 ⁶ /mL	36	14.88
5×10 ⁶ /mL	34	14.05
2.5×10 ⁶ /mL	9	3.72
2×10 ⁵ /mL	8	3.31
3×10 ⁶ /mL	8	3.31
2×10 ⁷ /mL	8	3.31
1×10 ⁵ /mL	6	2.48
4×10 ⁵ /mL	4	1.65
5×10 ⁵ /mL	4	1.65
1.5×10 ⁶ /mL	4	1.65
1.5×10 ⁷ /mL	3	1.24
其他 Others	14	5.78

2.4 骨肉瘤动物模型造模癌细胞株种类

在纳入的 284 篇文献中,癌细胞种类使用频次>15 的有 5 种,分别是人源骨肉瘤 MG-63 细胞 100 例、鼠源骨肉瘤 UMR-106 细胞 39 例、人源骨肉瘤 143B 细胞 31 例、患者肿瘤细胞混悬液 23 例、人源骨肉瘤 U2OS 细胞 17 例。详细分布见表 4。

2.5 骨肉瘤动物模型检测指标

统计纳入标准的 284 篇文献中骨肉瘤动物模型的检测指标,若检测指标为同一组织的多个同类型

指标,则归为一类,不再分开统计^[27],如血清中同时检测 TNF-α、IL-6、VEGF、IL-2 水平等;若同一组织被分成不同种类的检测指标,则分别统计,如肿瘤组织在同一动物实验中既检测肿瘤组织免疫组化又检测肿瘤组织病理。且因同一文献中,不同造模方法的检测指标相同,故检测指标百分比通过纳入文献数量计算。其中频数>50 的有 5 项,检测最多的为肿瘤组织表观指标:肿瘤大小、瘤径、个数、重量等(238 例,83.80%);肿瘤组织 HE 病理染色

(129 例, 45. 42%); 动物表观指标: 体重、毛发、饮食、活动状态等 (94 例, 33. 10%); 肿瘤组织免疫组化: VEGF、Bax、Bcl-2、Caspase-3、NF-κB、CD34、CD31、HIF-1α、Ki67 等 (89 例, 31. 34%); 抑瘤率 (71 例, 25. 00%)。骨肉瘤动物模型检测指标详情见表 5。

表 4 骨肉瘤动物模型造模癌细胞株种类

Table 4 Type of molded cancer cell lines in animal models of osteosarcoma

癌细胞种类 Cancer cell types	癌细胞来源 Cancer cell source	频次 (n) Frequency	百分比 (%) Percentage
MG-63	人 Human	100	33. 11
UMR-106	大鼠 Rat	39	12. 91
143B	人 Human	31	10. 26
患者肿瘤细胞混悬液 Patients tumor cell suspension	人 Human	23	7. 62
U2OS	人 Human	17	5. 63
HOS	人 Human	14	4. 64
Saos2	人 Human	13	4. 30
LM8	小鼠 Mice	12	3. 97
OS-9901	人 Human	8	2. 65
OS-732	人 Human	8	2. 65
S180	小鼠 Mice	6	1. 99
KHOS	人 Human	6	1. 99
K7	小鼠 Mice	5	1. 66
K7M2	小鼠 Mice	5	1. 66
VX2	兔 Rabbit	3	0. 99
SOSP-9607	人 Human	2	0. 66
其他 Others	/	10	3. 31

表 5 骨肉瘤动物模型检测指标

Table 5 Test indexes of the animal model of osteosarcoma

检测指标 Detection index	检测项目 Surveillance project	检测方法 Test method	频次 (n) Frequency	百分比 (%) Percentage
肿瘤组织表观指标 Tumor tissue epigenetic indicators	肿瘤瘤径、个数、重量 Tumor diameter, number, weight	/	238	83. 80
动物表观指标 Animal epigenetic indicators	体重、毛发、饮食、活动状态等 Body mass, hair, diet, activity status, etc.	活体观察 Viviperception	94	33. 10
病理 Pathology	肿瘤病理 Tumor patholog	HE 染色 HE staining	129	45. 42
		免疫荧光染色 Immunofluorescence	17	5. 98
		Mallory 三色染色 Mallory trichrome staining	2	0. 70
		Masson 三色染色 Masson's trichrome staining	2	0. 70
		ELISA 法检测 Enzyme linked immunosorbent assay	24	8. 45
生化指标 Biochemical indicator	TNF-α, IL-2, sVCAM-1, VEGF, TGF-β1, HIF-1α, IL-6, alkaline phosphatase	血清碱性磷酸酶 Serum alkaline phosphatase	18	6. 34
		免疫组化 Immunohistochemistry	89	31. 34
		蛋白免疫印迹法 Western blot	40	14. 08
基因蛋白检测 Genetic protein detection	VEGF, Bax, Bcl-2, Caspase-3, NF-κB, CD34, CD31, HIF-1α, Ki67	PCR 检测 Polymerase chain reaction	23	8. 10

续表5

检测指标 Detection index	检测项目 Surveillance project	检测方法 Test method	频次(n) Frequency	百分比(%) Percentage
影像学检查 Imaging examination	肿瘤分布、药物分布 Tumor distribution, drug distribution	活体成像 Living imaging	13	4.58
		X 线 X-ray inspection	13	4.58
		磁共振 Magnetic resonance imaging	4	1.41
		CT 灌注 CT perfusion imaging	2	0.70
		/	8	2.82
成瘤率 Rate of tumor formation	成瘤率 Rate of tumor formation	/	8	2.82
细胞检测 Cell detection	细胞凋亡程度、免疫 T 细胞 Degree of apoptosis, immune T cells	TUNEL 法检测 TUNEL assay	24	8.45
		流式细胞检测 Flow cytometry	19	6.69
抑瘤率 Tumour suppression rate	抑瘤率 Tumour suppression rate	/	71	25.00
脏器指数 Organ index	胸腺指数、肝指数 Thymus index, liver index	电子天秤计数法 Electronic-scale counting method	5	1.76

3 讨论

骨肉瘤有两个高发期,一个是儿童及青少年时期,多原发性发于长骨的干骺端,以股骨远端及胫骨近端最为常见^[28-29],可能与骨的生长活动有关^[30],另一个是骨肉瘤高发期是老年期,患者中多为继发性肿瘤,常与 Pagets 骨病(Paget disease of bone)及放疗后恶变等相关^[31-33]。患者临床表现多为局部疼痛与肿胀,且夜间病发较为严重^[34]。但现有 OS 模型尚不完全符合 OS 临床病症特点,因此进一步研究 OS 模型,对 OS 发病机制,以及新药研发具有重要意义。下面对数据库进行分析,以期为建立简便稳定的骨肉瘤模型提供参考。

3.1 常用实验动物分析

本文通过 OS 动物模型实验性文献分析发现,骨肉瘤动物模型以鼠类为主要来源,小鼠以 BALB/c-nu/nu 裸鼠为主,大鼠以 SD 大鼠为主。鼠类在遗传学、病理学、生物学等方面与人类非常相似,且鼠类生长周期短,时间成本低,价格低廉,是做动物实验的理想材料^[35]。首选模型动物 BALB/c-nu/nu 裸鼠缺乏成熟的胸腺和免疫 T 细胞,细胞免疫功能低下,对同种或异种移植物排斥力低。又因裸鼠无毛,便于观察和测量肿瘤的生长情况,故 BALB/c-nu/nu 裸鼠更适用于制备骨肉瘤模型^[36]。纵观 BALB/c-nu/nu 裸鼠生理周期,4 周龄以下裸鼠可能不耐受,导致裸鼠死亡,而 6 周龄以上裸鼠体内 NK

细胞活性增加,免疫力会呈现一定程度的增强^[37-38],导致成瘤率降低,因此选择 4~6 周龄裸鼠有利于肿瘤的生长与转移^[39]。

3.2 常用造模方法及肿瘤细胞分析

建立与临床吻合度高的 OS 动物模型是其机制研究与新药研发的重要基础。数据分析发现目前 OS 模型造模方法主要以异位移植造模为主,占比 76.16%,其中背部皮下移植最多,其次为腋部皮下移植、后肢皮下移植。目前常用的骨肉瘤造模方法各有优劣:(1)皮下异位移植模型操作简便,肿瘤表浅,便于观察肿瘤的生长,记录肿瘤的生长曲线,但这种造模方法与原发性骨肉瘤中的转移、复发有较大差别^[40];(2)尾静脉细胞液移植法是考察骨肉瘤肺转移的重要手段,易于成模;(3)原位移植满足了肿瘤生长所需要的局部微环境,具有良好的重复性,但原位移植需要手术操作,暴露股骨或胫骨^[39,41],需考虑手术后预防感染的问题;(4)细胞液移植法增大了肿瘤细胞与周围组织的接触面积,肿瘤新生血管可为其提供更好的血供,但在细胞液中肿瘤细胞处于游离状态,可能会沿针道走行,致使细胞液流出或错位移植等问题^[23];(5)组织块移植法易于固定^[42],但瘤组织块有限的接触面积限制了机体对整个瘤组织的血供,影响了肿瘤传代率,且创面手术增加了术后出血和感染的风险^[43]。

接种的肿瘤细胞种类是影响骨肉瘤动物模型的重要因素之一,经统计,使用较多的骨肉瘤细胞

为人源 MG-63 细胞和鼠源 UMR-106 细胞,两者均具有较高的成模率。其中人源 MG-63 细胞具有较高的肺转移率^[44-45],且人源 MG-63 细胞能更好地反映骨肉瘤患者的临床特征,以便实验结果的临床转化。同时为保证细胞活力,可在荷瘤前 1 d 更换培养基,提高接种成功率^[23]。

3.3 高频检测指标分析

根据统计发现,研究者主要通过表观指标、抑瘤率、肿瘤组织病理、肿瘤组织免疫组化、肿瘤组织 PCR、血清中细胞因子表达等指标检测,评价骨肉瘤模型成模情况和药物疗效。所统计文献中,表观指标包括肿瘤组织表观指标(肿瘤瘤径、个数、重量)和动物表观指标(如体重、毛发、饮食、活动状态等),可初步判定骨肉瘤模型成模情况。肿瘤组织病理进一步判断骨肉瘤模型的病变程度和药物疗效。肿瘤组织免疫组化、PCR、Western blot 等分子生物学检测主要围绕着细胞凋亡、炎症因子、细胞增殖、细胞侵袭、肿瘤血管生成等展开,故多选择与之相关的 Bcl-2、Bax、Caspase-3、NF- κ B、STAT3、MEPK、VEGF 等相关通路进行研究^[26,46-48],同时肿瘤组织和血清的生化指标与病理染色相互佐证,进一步探究 OS 的机制通路。

综上所述,目前对骨肉瘤研究多选择 4~6 周龄的 BALB/c-nu/nu 裸鼠,性别不限,多使用细胞液移植法异位造模,癌细胞主要选择 MG-63 细胞、UMR-106 细胞、143B 细胞或 U2OS 细胞,检测指标多选择肿瘤组织表观指标、肿瘤组织 HE 染色、肿瘤组织免疫组化、动物表观指标、抑瘤率等。同时,在分析过程中发现了一些问题:(1)所统计文献中阳性药涉及较少;(2)大多文献未提及动物成模的标准,且模型成功的判定没有统一的标准。综合动物伦理学与实验实际需要,建议小鼠成模标准为小鼠肿瘤体积在 100~150 mm³; (3)血清生化指标 LDH 和 ALP 是临床检测中的重要依据^[49],建议未来的动物模型中将其作为重要指标进行考察;(4)中医认为骨肉瘤病因病机为气虚、血瘀、痰浊,而目前骨肉瘤动物模型少有对应的中医指征,因此可在造模时加入中医致病因素,如高脂饲料喂养等方法,诱发模型动物痰浊血瘀,配合肿瘤细胞液皮下移植,构建符合中西医临床病证结合要求的骨肉瘤动物模型。

本文通过对骨肉瘤动物模型相关文献挖掘与分析,对常用骨肉瘤动物模型的动物选择、造模方法、优缺点及检测指标进行整理比较,并针对不足

之处进行探讨,希望本文可为后续模型完善提供思路,为建立更符合发病机制的动物模型提供参考。

参考文献:

- [1] Haddox CL, Han G, Anijar L, et al. Osteosarcoma in pediatric patients and young adults: a single institution retrospective review of presentation, therapy, and outcome [J]. *Sarcoma*, 2014, 2014: 1-10.
- [2] 谭芷芬, 张宏方, 郝晓霞, 等. 褪黑素在骨肉瘤治疗中的应用机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(12): 115-120.
- [3] Andersen GB, Knudsen A, Hager H, et al. miRNA profiling identifies deregulated miRNAs associated with osteosarcoma development and time to metastasis in two large cohorts [J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(1): 114-131.
- [4] Nørregaard KS, Jørgensen HJ, Gårdsvoll H, et al. Osteosarcoma and metastasis associated bone degradation-a tale of osteoclast and malignant cell cooperativity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6865.
- [5] 田大为, 熊敏, 张鹏, 等. 不同细胞系在骨肉瘤动物模型中的成瘤差异性比较 [J]. *湖北医药学院学报*, 2014, 33(4): 327-331, 308.
- [6] 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.
- [7] Ghafouri-Fard S, Shirvani-Farsani Z, Hussen BM, et al. The critical roles of lncRNAs in the development of osteosarcoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 135: 111217.
- [8] 许振胜, 符芳姿, 孙南阳. 槲皮素对骨肉瘤 MG-63 细胞生长周期及 PI3K-Akt-mTOR 通路表达的影响 [J]. *广西医学*, 2022, 44(5): 526-529.
- [9] 邓必勇, 邱冰, 邓必强. 影响骨肉瘤生存率的多因素回归分析 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(6): 1127-1130.
- [10] 黄为, 唐富平, 李祖德, 等. 经典 Wnt 信号通路在骨肉瘤中的作用机制 [J]. *医学综述*, 2022, 28(6): 1121-1126.
- [11] Zhi LQ, Yang YX, Yao SX, et al. Identification of novel target for osteosarcoma by network analysis [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5914-5924.
- [12] 刘智宇, 方锋助, 李京, 等. RHPN2 在骨肉瘤细胞中高表达并与较差的预后相关 [J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(9): 1367-1373.
- [13] Czitrom AA, Pritzker KP, Langer F, et al. Virus-induced osteosarcoma in rats [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1976, 58(3): 303-308.
- [14] Tinkey PT, Lembo TM, Evans GR, et al. Postirradiation sarcomas in sprague-dawley rats [J]. *Radiat Res*, 1998, 149(4): 401-404.
- [15] Tang Z, Dong H, Li T, et al. The synergistic reducing drug resistance effect of cisplatin and ursolic acid on osteosarcoma through a multistep mechanism involving ferritinophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5192271.
- [16] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京: 人民

卫生出版社; 2007.

[17] 庞婧, 郝大鹏, 徐文坚, 等. 骨肿瘤髓外浸润实验模型的建立及影像学与病理学评价 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(8): 3460-3466.

[18] 李凡, 朴香花, 马越, 等. 舒尼替尼调控骨肉瘤细胞的增殖、迁移与凋亡机制研究 [J]. 北华大学学报(自然科学版), 2021, 22(6): 743-747.

[19] 王子凡, 陈舰, 梅炯. 仿血管通道结构在大鼠和裸鼠骨肉瘤组织微血管形成中的作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(6): 588-593.

[20] 郭建勋, 王任先, 刘巍峰, 等. 人骨肉瘤 OS-732、Saos-2 和 U2OS 裸鼠成瘤模型的建立和比较 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(7): 1103-1107.

[21] 邓必勇, 邓必祥. 天然紫草素衍生物 SYUNZ-7 对肿瘤的作用效果及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(1): 168-171.

[22] 林慧, 陈钱, 单秋生, 等. 微波消融对骨肉瘤肺转移的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(11): 2054-2058, 2023.

[23] 符策岗, 曾艳, 赵红卫, 等. 小鼠骨肉瘤模型构建的关键 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 73-75.

[24] 王展, 刘林, 张富强, 等. 重组腺病毒载体 Ad5-Eag1-shRNA 对骨肉瘤小鼠肿瘤的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(9): 1306-1310.

[25] 徐斌武, 李晨. 线粒体融合基因 2 抑制骨肉瘤及其干细胞增殖功能分析对其转移机制的影响 [J]. 吉林医学, 2018, 39(6): 1003-1005.

[26] 梅其杰, 郭锦荣, 袁长深, 等. 活血化瘀法干预下荷骨肉瘤裸鼠内环境缺氧诱导因子-1 α 变化机制的研究 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(1): 23-25.

[27] 王萍, 方晓艳, 苗明三. 基于数据挖掘的便秘动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 49-54.

[28] Eaton BR, Schwarz R, Vatner R, et al. Osteosarcoma [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68(2): e28352.

[29] Jafari F, Javdansirat S, Sanaie S, et al. Osteosarcoma: a comprehensive review of management and treatment strategies [J]. *Ann Diagn Pathol*, 2020, 49: 151654.

[30] 符策岗, 赵红卫, 刘扬, 等. 骨肉瘤动物模型新进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 216-220.

[31] 张春林. 多学科协作积极开展骨肉瘤患者的规范化保肢治疗 [J]. 赣南医学院学报, 2021, 41(8): 791-796.

[32] Bielack SS, Hecker-Nolting S, Blattmann C, et al. Advances in the management of osteosarcoma [J]. *F1000Res*, 2016, 5: 2767.

[33] Cersosimo F, Lonardi S, Bernardini G, et al. Tumor-associated macrophages in osteosarcoma: from mechanisms to therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5207.

[34] 张勇. CT、MRI 对骨肉瘤浸润侵犯范围评估及其诊断价值分析 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2022, 20(7): 168-170.

[35] 王志潇, 张亚楠, 苗明三, 等. 基于数据挖掘的结直肠癌动物模型应用特点分析 [J/OL]. (2022-10-09) [2023-08-24]. DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.20220929.001.

[36] 张龙, 葛乔枫, 吕智. 利用免疫缺陷动物构建骨肉瘤动物模型研究进展 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(4): 654-657.

[37] Lawetzky A, Hünig T. Analysis of CD3 and antigen receptor expression on T cell subpopulations of aged athymic mice [J]. *Eur J Immunol*, 1988, 18(3): 409-416.

[38] Piguet PF. Change in the humoral response of athymic nude mice with ageing [J]. *Scand J Immunol*, 1980, 12(3): 233-238.

[39] 李华, 杨英年. 骨肉瘤动物模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(33): 6257-6261.

[40] Wu NF, Wu J, Yamamoto J, et al. The first mouse model of primary osteosarcoma of the breast [J]. *In Vivo*, 2021, 35(4): 1979-1983.

[41] 王洪伟, 杨燕萍, 贾友冀, 等. 胫骨内注射肿瘤细胞法构建骨肉瘤动物模型的研究进展 [J]. 中国癌症防治杂志, 2013, 5(2): 173-176.

[42] Wu H, He Z, Li X, et al. Efficient and consistent orthotopic osteosarcoma model by cell sheet transplantation in the nude mice for drug testing [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 690409.

[43] 刘娅, 冯爽, 益磋, 等. 对比组织悬液法及组织块法建立兔 VX2 皮下肿瘤模型的差异 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(32): 5173-5178.

[44] 贺倩倩, 杨少玲, 赵坤, 等. VX2 和人骨肉瘤 MG-63 兔成瘤模型的建立和比较 [J]. 中国癌症防治杂志, 2022, 14(6): 624-630.

[45] Kim YH, Goh TS, Lee CS, et al. Prognostic value of microRNAs in osteosarcoma: a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8726-8737.

[46] 秦文英, 陈丽华, 高方方. 普鲁卡因通过 ERK/MAPK/FAK 通路抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 108-113.

[47] 洪振强, 高弘建, 赵诣, 等. 基于 NF- κ B 信号通路的薯蓣皂苷元抗骨肉瘤作用机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(2): 748-752.

[48] 宋奇, 程安源, 徐立, 等. 山竹醇介导 JAK2/STAT3 信号通路发挥抗骨肉瘤作用 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(9): 36-41.

[49] 郭卫, 牛晓辉, 肖建如, 等. 骨肉瘤临床循证诊疗指南 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2018, 11(4): 288-301.

[收稿日期] 2022-11-28

柳扬,范伟,丁洁. lncRNA SNHG16 通过调控 miR-570 对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 63-70.

Liu Y, Fan W, Ding J. MiR-570-related lncRNA SNHG16 regulation of hepatoma cell resistance to sorafenib [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 63-70.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.009

lncRNA SNHG16 通过调控 miR-570 对肝癌细胞 索拉非尼耐药的机制研究

柳 扬¹, 范 伟^{1*}, 丁 洁²

(1. 贵州省人民医院肝胆外科二部, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院肿瘤科, 贵阳 550002)

【摘要】 目的 分析长链非编码 RNA SNHG16(long non-coding RNA SNHG16, lncRNA SNHG16)通过调控微小 RNA-570(miR-570)对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究。**方法** 采用实时荧光 RT-PCR 检测人体正常肝组织、肝癌细胞组织中 HepG2、HepG2-R 细胞的 lncRNA SNHG16、miR-570 表达,并对 HepG2-R 细胞做转染,后分别记为 HepG2-R+pcDNA 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16 组、HepG2-R+anti-miR-NC 组、HepG2-R+anti-miR-570 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组,用于后续试验,且将 miR-NC、miR-570、si-NC、si-SNHG16 用相同方式转染至 HepG2 细胞,分别记为 miRNC 组、miR-570 组、si-NC 组、si-SNHG16 组。用 MTT 法、流式细胞仪、Transwell 试验检测细胞增殖、凋亡及侵袭,Western blot 法测定细胞 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 表达变化。**结果** 与人体正常肝组织组相比,肝癌细胞组织组的 lncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 表达下降($P < 0.05$)。与正常细胞 HepG2-P 组相比,HepG2-R 组的 lncRNA SNHG16 及 IC₅₀ 值提高,miR-570、HepG2-R 细胞在索拉非尼浓度为 1、2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 中的抑制水平下降($P < 0.05$)。HepG2-R+pcDNA SNHG16 作为过表达组,其 lncRNA SNHG16 表达显著升高($P < 0.05$),与 HepG2-R+pcDNA 组对比,HepG2-R+pcDNA SNHG16 组的迁移的细胞个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平上升($P < 0.05$)。与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比,HepG2-R+anti-miR-570 组 miR-570 表达水平降低($P < 0.05$),与 HepG2-R+anti-miR-NC 组比较,HepG2-R+anti-miR-570 组 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高($P < 0.05$)。双荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 组相比,miR-570 使 WT-SNHG16 荧光素酶活性降低($P < 0.05$),而对 MUT-SNHG16 荧光素酶活性影响较小($P > 0.05$)。过表达 lncRNA SNHG16 可使 HepG2-R 细胞中 miR-570 表达下降($P < 0.05$),与 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组相比,HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组迁移的细胞个数及 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平升高,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平降低($P < 0.05$)。**结论** lncRNA SNHG16 可调控 HepG2-R 肝癌细胞的耐药性,其机制与 lncRNA SNHG16 靶向调控 miR-570 有关,为临床治疗肝癌细胞提供了新的靶点。

【关键词】 肝癌;长链非编码 RNA SNHG16;微小 RNA-570;索拉非尼

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0063-08

MiR-570-related lncRNA SNHG16 regulation of hepatoma cell resistance to sorafenib

LIU Yang¹, FAN Wei^{1*}, DING Jie²

(1. Department 2 of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China.

2. Oncology Department, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

【基金项目】 贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目(gzwbj2021-175)。

【作者简介】 柳扬(1986—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肝胆胰脾疾病治疗。E-mail: iquyk84@163.com

【通信作者】 范伟(1967—)男,博士,主任医师,研究方向:肝胆胰脾疾病治疗。E-mail: zhuyufanwei@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which long non-coding RNA SNHG16 (lncRNA SNHG16) promotes liver cancer cell resistance to sorafenib by regulating microRNA-570 (miR-570). **Methods** Real-time fluorescent RT-PCR was used to detect lncRNA SNHG16 and miR-570 expression of human normal liver tissue and liver cancer cells, HepG2 and HepG2-R. HepG2-R cells were transfected to provide the following groups: HepG2-R+pcDNA, HepG2-R+pcDNA SNHG16, HepG2-R+anti-miR-NC, HepG2-R+anti-miR-570, and HepG2-R+pcDNA group. HepG2-R+SNHG16+miR-NC and HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 groups were used for follow-up tests. miR-NC, miR-570, si-NC, and si-SNHG16 were transfected into HepG2 cells in the same way to give HepG2+miRNC, HepG2+miR-570, HepG2+si-NC, and HepG2+si-SNHG16 groups. MTT assay, flow cytometry and Transwell assay were used to detect cell proliferation, apoptosis, and invasion. Western blot assay was used to detect the changes in expression of CyclinD1, P21, MMP-9, and MMP-2. **Results** Compared with normal liver tissue, the liver cancer tissue showed increased lncRNA SNHG16 and decreased miR-570 expression ($P<0.05$). Compared with the normal cell HepG2-P group, the HepG2-R group had increased lncRNA SNHG16 and IC₅₀ values, and the inhibition rates of miR-570 in HepG2-R cells were decreased at sorafenib concentrations of 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.05$). In the HepG2-R+pcDNA SNHG16 overexpression group, lncRNA SNHG16 expression was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+pcDNA group, the HepG2-R+pcDNA SNHG16 group's number of migrated cells and expression of CyclinD1, P21, MMP-9, and MMP-2 were decreased, while the inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression were increased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+anti-miR-NC group, the HepG2-R+anti-miR-570 group's miR-570 levels were decreased ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+anti-miR-NC group, the HepG2-R+anti-miR-570 group showed decreased levels of CyclinD1, MMP-9, and MMP-2 and increased inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression ($P<0.05$). A dual luciferase reporting experiment showed that, compared with the miR-NC group, miR-570 reduced WT-SNHG16 luciferase activity ($P<0.05$), but there was little effect on the luciferase activity of MT-SNHG16 ($P>0.05$). Overexpression of lncRNA SNHG16 decreased the expression of miR-570 in HepG2-R cells ($P<0.05$). Compared with the HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group, the HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 group's number of migrated cells and expression levels of CyclinD1, MMP-9, and MMP-2 were increased, while the inhibition rate, apoptosis rate, and P21 expression were decreased ($P<0.05$). **Conclusions** lncRNA SNHG16 can regulate the drug resistance of HepG2-R liver cancer cells. The mechanism is related to the targeted regulation of miR-570 by lncRNA SNHG16, thus miR-570 provides a new target for the clinical treatment of liver cancer cells.

【Keywords】 liver cancer; lncRNA SNHG16; microRNA-570; sorafenib
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

原发性肝癌的死亡率在全世界排名第三,患病率位居第五,有约 70%的肝癌患者在确诊时已处于晚期,生存时长低于 1 年^[1-2]。索拉非尼属于在肝癌治疗指南中主要推荐的诊治晚期肝癌的重要方案,有效率约 40%,但其长时间服用会出现耐药性,最后导致治疗效果相对较差^[3-4]。且有越来越多的学者研究显示,肿瘤中的上皮-间质的转化为影响药物耐药的因素之一,但耐药机制尚不清晰,因而探索索拉非尼的耐药机制对于晚期肝细胞肝癌临床效果的改善及预后有着积极作用。lncRNA 为一类特异性的非编码 RNA,在修饰组蛋白、重塑基因构造、转录及遗传后基因的表达等过程中起到了一定的作用,SNHG16 属于 lncRNA 家族中的其中一员,且在 miRNA 分子的作用下能够对细胞的分化及增殖有效调节,并在肿瘤的化疗耐药及发展中有所参与^[5]。miR-570 是肿瘤抑制因子的一种,在减缓

肝癌细胞增殖、血管的生长中有着重要的作用,且在血清及肝癌组织内其表达呈低水平^[6]。基于此,本文探究了 lncRNA SNHG16 通过靶向调控 miR-570 可有效改善肝癌细胞 HepG2 对于索拉非尼的耐药性,效果显著。

1 材料和方法

1.1 细胞

人肝癌细胞 HepG2 购自于(澳睿赛生物技术(上海)有限公司;货号:ORC0088)。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(上海百赛生物技术股份有限公司,货号:10-040-CM);MTT 试剂(艾美捷科技有限公司,货号:MBS843090-C);Lipofectamine TM 2000 转染试剂(11668019)购自于北京百奥创新科技有限公司;BCA 蛋白试剂盒(赛默飞世尔科技,货

号:23221-23230); CyclinD1、P21、MMP9、MMP2 抗体分别购自于上海抚生实业有限公司、北京泽平科技有限责任公司、北京义翘神州科技股份有限公司。酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司,型号: SpectraMax iD5); 流式细胞仪(上海顶仪科技有限公司,型号:FACSCalibur)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

通过浓度递增方法对肝癌细胞 HepG2 实施长期的培养,创建索拉非尼耐药 HepG2 细胞株模型,即为 HepG2-R。使用 HepG2 作亲本细胞,通过在 37℃、5% CO₂ 的环境中培育,待细胞的状态平稳后,在培养液中置入 1、2、4、8 及 16 μmol/L 索拉非尼,行 1 周培育后,索拉非尼换为更高的含量,直到在索拉非尼(16 μmol/L)的培养液中细胞能稳定生长,说明诱导 HepG2-R 细胞成功。后续在培养基中对 HepG2-R 细胞中低浓度的索拉非尼施以常规培育,维持耐药性,且将 HepG2 的正常细胞标记成 HepG2-P。

1.3.2 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞中表达水平检测

提取肝癌细胞、正常肝细胞中总 RNA,逆转录为 cDNA,选取实时荧光定量法予以检测 lncRNA SNHG16、miR-570 表达量,采用 Primer 5.0 软件设计引物序列,PCR 反应体系:0.5 μL 的上下游引物、模板为 2 μL cDNA、8 μL 的 SYBR Green,放蒸馏水至 30 μL。反应条件:96℃ 6 min、92℃ 30 s、75℃ 45 s、80℃ 10 min,共行 45 个循环,以 GAPDH 为内参,采取 2^{-△△Ct} 方法计算出 lncRNA SNHG16、miR-570 的表达量。(见表 1)

1.3.3 细胞转染

通过对 SNHG16 的 siRNA 进行合成,HepG2-R 细胞按密度为 2×10⁵/孔置于 6 个孔板内,待细胞开

始贴壁后,放入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640。培养箱内培育 24 h,细胞融合程度为 35%~55%,后将完成稀释的 HepG2 siRNA 混合于 Lipofectamine™ 2000 试剂中,产生 HepG2 siRNA/Lipofectamine™ 2000 复合物,接着在细胞培养板孔中加 HepG2 siRNA 转染载体予以融合,后置入 5% CO₂ 37℃ 的培养箱实施培育,6 h 之后换为 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清),20 h 恢复生长,使用荧光显微镜检测细胞荧光蛋白的表达量,使用 qRT-PCR 法检测转染率,确认成功转染后,分别将其记作 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组、HepG2-R+anti-miR-570 组、HepG2-R+anti-miR-NC 组、HepG2-R+pcDNA SNHG16 组和 HepG2-R+pcDNA 组,用于后续的试验。接着将 si-NC、si-SNHG16、miR-NC、miR-570 通过类似的操作在 HepG2 细胞内实施转染,分别记 si-NC 组、si-SNHG16 组、miRNC 组和 miR-570 组。

1.3.4 MTT 法测定细胞增殖抑制率

集取细胞,调至 5×10⁵/mL,于 96 孔板内进行接种,加 MTT 溶液(5 g/L 25 μL),培育 4 h,去除清液,放入二甲基亚砷(DMSO)(120 μL),摇匀,直到结晶紫开始融化,后将酶标仪调到 470 nm 波长,以此对细胞吸光(A)值进行测定。细胞增殖抑制率=(对照组 A 值-试验组 A 值)/对照组 A 值×100%。并根据药物的浓度及抑制率分别记作横轴与纵轴,描绘出浓度对应的曲线,算出半数的抑制浓度 IC₅₀。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

按照上述的形式收集每组的 HepG2-R 细胞通过 PBS 洗涤后制出单细胞的悬浮液(2×10⁵/mL),接着将 100 mL 细胞悬浮液放入 96 孔板中,后滴加 Annexin V-FITC 6 mL,在 5℃ 环境中培育约 30 min,接着加 4 mL 的碘化丙啶,均匀混合后于室温下培育 10 min,并采用流式细胞仪测试细胞的凋亡。

1.3.6 Transwell 测定细胞迁移

首先将细胞在无血清的培养基中培育 24 h,集取细胞,调节至 5×10⁶/mL,取 150 μL 的细胞放于 Transwell 小室的上室中,取 550 μL 含有清液的培养基放于 Transwell 小室的下室中,后将 Transwell 小室放置于培养箱内培育 48 h,接着预备结晶紫染色液与甲醛固定液予以备用,后将 Transwell 小室取出,利用棉签缓慢地擦拭掉聚碳酸酯膜表面上的细胞,后将膜移置固定液内,30~35 min,接着将膜放入染色液内 15 min 进行染色,后通过镊子缓慢将膜的下

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物 Primer	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
lncRNA SNHG16-F	5'-AGGCTGAAGTTACAGGTC-3'
lncRNA SNHG16-R	5'-TCGCTCCCAGTGTCTTA-3'
miR-570-F	5'-TGCGGTTTGGAATGGTAGAAC-3'
miR-570-R	5'-CCAGTGCAGGCTCCGAGGT-3'
GAPDH-F	5'-GGACCTGACCTGCCCTCTAG-3'
GAPDH-R	5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'

方朝上置于载玻片予以固定,使用光镜检测细胞数目,取其平均数值。

1.3.7 CyclinD1、P21、MMP9、MMP2 检测

选用 Western blot 法测定细胞内的细胞周期蛋白(CyclinD1、P21、MMP9、MMP2)表达,首先在含甲基磺酰氟(PMSF)的裂解液内使细胞发生裂解反应,取蛋白后经 BCA 法对蛋白进行定量测定,接着在沸水内进行约 15 min 的浸泡处理,使其变性,加样本,调节 60 V 电压实施电泳处理,40 min 左右,调电压到 120 V 后继续电泳,90~120 min 后停止,将蛋白经转膜仪换至 PVDF 膜上,在低温环境下转膜,完成后通过 5%的脱脂奶粉进行 1 h 封闭处理,培养一抗(抗体 P21、CyclinD1、MMP2、MMP9)、二抗(经过氧化酶所标记后的 LgG 抗体),并在暗室放置膜,加 ECL 试剂,用凝胶检测软件观察条带的灰度数值,内参为 GAPDH。

1.3.8 双荧光素酶报告试验

集取细胞,取裂解液裂解细胞,加荧光素酶底物(5 μL)、缓冲液,混匀,测定荧光强度,放入缓冲液及底物,混匀,对荧光的强度进行检测。实验重复 5 次,分别对各个样本作复孔 3 个,最后对荧光素酶强度比较分析,检测 SNHG16 联合 miR-570 在细胞中的影响。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析,shapiro-wilk 检验符合正态分布,以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用重读测量方差分析,同一时间点两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间进行比较采用 *F* 检验,以率(%)表示计数资料采用 χ^2 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

表 3 IncRNA SNHG16 和 miR-570 在肝癌细胞及肝癌不同浓度的索拉非尼耐药细胞中的表达($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Expression of IncRNA SNHG16 and miR-570 in liver cancer cells and Sorafenib resistant cells with different concentrations of liver cancer

组别 Groups	宿主基因 16 SNHG16	miR-570	半抑制浓度(μmol/L) IC ₅₀	索拉非尼(μmol/L) Sorafenib				
				1	2	4	8	16
HepG2-P 组 HepG2-P group	1.12±0.16	1.05±0.18	30.28±2.11	6.97±0.71	20.95±2.77	38.86±3.18	69.34±6.06	86.24±9.05
HepG2-R 组 HepG2-R group	2.08±0.22 ^a	0.59±0.10 ^a	200.46±12.07 ^a	5.06±0.57 ^a	16.57±2.03 ^a	24.43±2.26 ^a	37.41±2.58 ^a	40.57±5.69 ^a
<i>t</i>	13.670	8.652	53.790	8.125	4.940	14.330	18.780	16.550
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 HepG2-P 组相比, ^a*P*<0.05。
Note. Compared with HepG2-P group, ^a*P*<0.05.

2 结果

2.1 IncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞组织及正常肝组织中的表达

如表 2 所示,与人体正常肝组织相比,肝癌细胞组织的 IncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 表达下降,具有显著性差异(*P*<0.05)。

2.2 IncRNA SNHG16 和 miR-570 在肝癌细胞及肝癌不同浓度的索拉非尼耐药细胞中的表达

如表 3 所示,与 HepG2-P 组相比,HepG2-R 组 IncRNA SNHG16 表达上升,miR-570 表达水平下降(*P*<0.05),表明与 HepG2-P 组对比,HepG2-R 组细胞在索拉非尼浓度为 1、2、4、8、16 μmol/L 中的抑制率均下降,IC₅₀ 值上升,具有显著性差异(*P*<0.05)。

2.3 IncRNA SNHG16 过表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响

如表 4、图 1、图 2 所示,HepG2-R + pcDNA SNHG16 作为过表达组,其 IncRNA SNHG16 表达明

表 2 IncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌细胞组织组及正常肝组织组中的表达($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Expression of IncRNA SNHG16 and miR-570 in liver cancer cell tissue group and normal liver tissue group

组别 Groups	宿主基因 16 SNHG16	miR-570
人体正常肝组织组 Human normal liver tissue group	1.13±0.14	1.08±0.20
肝癌细胞组织组 Liver cancer cell tissue group	2.10±0.27 ^a	0.61±0.15 ^a
<i>t</i>	12.350	7.281
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:与人体正常肝组织组相比, ^a*P*<0.05。
Note. Compared with human normal liver tissue group, ^a*P*<0.05.

显升高 ($P<0.05$),表明 lncRNA SNHG16 过表达的 HepG2-R 细胞株构建成功,与 HepG2-R+pcDNA 组相比,HepG2-R+pcDNA SNHG16 组的迁移细胞个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平上升,具有显著

性差异 ($P<0.05$)。
2.4 抑制 miR-570 表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响
如表 5,图 3、图 4 所示,与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比,HepG2-R+anti-miR-570 组 miR-570 表达

表 4 lncRNA SNHG16 过表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effects of lncRNA SNHG16 overexpression combined with Sorafenib on proliferation, apoptosis and migration of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+pcDNA 组 HepG2-R+pcDNA group	HepG2-R+pcDNA SNHG16 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16 group	<i>t</i>	<i>P</i>
宿主基因 16 SNHG16	1.17±0.15	2.12±0.24 ^a	13.000	<0.001
抑制率(%) Inhibition rate	11.72±1.10	42.29±2.44 ^a	44.240	<0.001
凋亡率(%) Apoptosis rate	17.87±2.09	22.41±3.24 ^a	4.560	<0.001
迁移的细胞个数(<i>n</i>) Number of migrated cells	138.51±10.16	83.28±7.55 ^a	16.900	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.95±0.13	0.51±0.07 ^a	11.540	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.35±0.09	0.73±0.14 ^a	8.843	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.67±0.08	0.35±0.05 ^a	13.140	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.83±0.09	0.49±0.06 ^a	12.170	<0.001

注:与 HepG2-R+pcDNA 组相比, ^a $P<0.05$ 。
Note. Compared with HepG2-R+pcDNA group, ^a $P<0.05$.

表 5 抑制 miR-570 表达联合索拉非尼对 HepG2-R 细胞增殖、凋亡、迁移的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effects of miR-570 inhibition combined with Sorafenib on proliferation, apoptosis and migration of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+anti-miR-NC 组 HepG2-R+anti-miR-NC group	HepG2-R+anti-miR-570 组 HepG2-R+anti-miR-570 group	<i>t</i>	<i>P</i>
微小 RNA-570 miR-570	1.11±0.12	0.52±0.09 ^a	15.230	<0.001
抑制率(%) Inhibition rate	12.36±2.25	41.61±3.18 ^a	29.080	<0.001
凋亡率(%) Apoptosis rate	18.32±2.11	24.46±3.47 ^a	5.856	<0.001
迁移的细胞个数(<i>n</i>) Number of migrated cells	76.86±8.10	40.43±6.06 ^a	13.950	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.76±0.09	0.39±0.06 ^a	13.250	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.33±0.04	0.79±0.09 ^a	18.090	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.68±0.07	0.25±0.04 ^a	20.660	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.79±0.08	0.36±0.05 ^a	17.650	<0.001

注:与 HepG2-R+anti-miR-NC 组相比, ^a $P<0.05$ 。
Note. Compared with HepG2-R+anti-miR-NC group, ^a $P<0.05$.

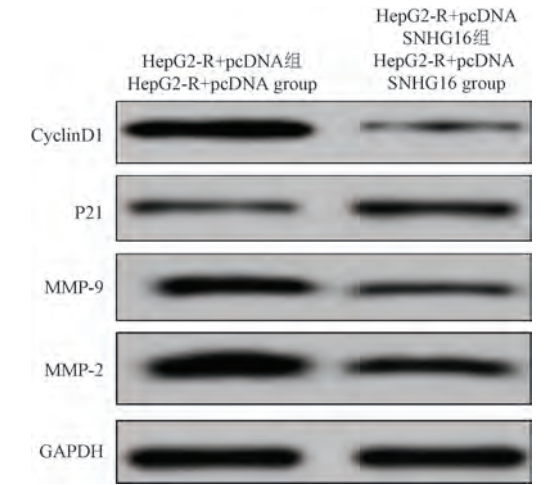


图 1 增殖、凋亡、迁移相关蛋白表达

Figure 1 Expression of proteins related to proliferation, apoptosis and migration

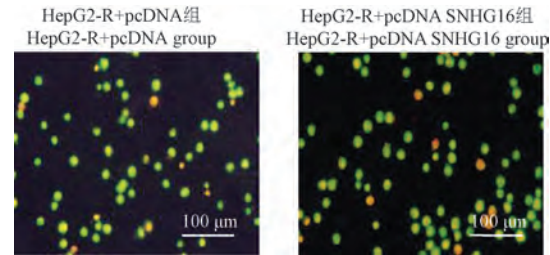


图 2 细胞凋亡图

Figure 2 Cell apoptosis

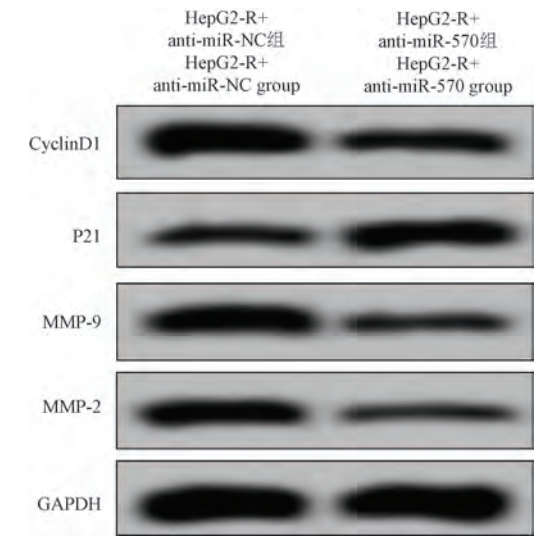


图 3 增殖、凋亡、迁移相关蛋白表达

Figure 3 Expression of proteins related to proliferation, apoptosis and migration

水平降低($P<0.05$),表明抑制 miR-570 的 HepG2-R 细胞株构建成功,与 HepG2-R+anti-miR-NC 组比较, HepG2-R+anti-miR-570 组 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 表达水平降低,抑制率、凋亡率及 P21 表达水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 双荧光素酶报告试验

如表 6 所示,双荧光素酶报告试验显示,miR-NC 组 WT-SNHG16、miR-570 组 WT-SNHG16、miR-NC 组 MUT-SNHG16、miR-570 组 MUT-SNHG16 细胞相对荧光素酶表达活性分别为(1.16 ± 0.14)、(0.50 ± 0.10)、(1.02 ± 0.08)、(0.98 ± 0.07),且相较于 miR-NC 组 WT-SNHG16,miR-570 组 WT-SNHG16 表达活性较低,说明 lncRNA SNHG16 靶向调控 miR-570。

2.6 过表达 miR-570 干扰 lncRNA SNHG16 对 HepG2-R 细胞耐药性的影响

如表 7、图 5 所示,过表达 lncRNA SNHG16 可使 HepG2-R 细胞中 miR-570 表达下降($P<0.05$),与 HepG2-R + pcDNA SNHG16 + miR-NC 组相比, HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组的迁移细胞个数及 CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平升高,抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平降低,具有显著性差异($P<0.05$)。

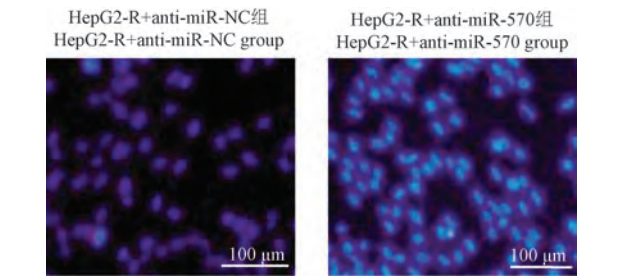


图 4 细胞凋亡图

Figure 4 Cell apoptosis

表 6 双荧光素酶报告试验($\bar{x}\pm s$)		
Table 6 Double luciferase reporting tests		
组别 Groups	野生型宿主基因 16 WT-SNHG16	变异型宿主基因 16 MUT-SNHG16
miR-NC 组 miR-NC group	1.16±0.14	1.02±0.08
miR-570 组 miR-570 group	0.50±0.10 ^a	0.98±0.07
<i>t</i>	14.860	1.457
<i>P</i>	<0.001	0.156

注:与 miR-NC 组相比, ^a $P<0.05$ 。
Note. Compared with miR-NC group, ^a $P<0.05$.

表 7 过表达 miR-570 干扰 lncRNA SNHG16 对 HepG2-R 细胞耐药性的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Effect of overexpression of miR-570 interfering lncRNA SNHG16 on drug resistance of HepG2-R cells

组别 Groups	HepG2-R+pcDNA 组 HepG2-R+pcDNA group	HepG2-R+pcDNA SNHG16 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16 group	HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group	HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 组 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-570 group	<i>F</i>	<i>P</i>
miR-570	0.93±0.13	0.44±0.07 ^a	0.38±0.06	0.79±0.11 ^b	14.880	<0.001
抑制率(%) Inhibition rate	13.29±1.12	45.35±3.76 ^a	47.30±3.13	18.68±2.09 ^b	39.620	<0.001
凋亡率(%) Apoptosis rate	17.95±2.11	20.46±2.87 ^a	29.40±3.06	17.75±2.09 ^b	11.930	<0.001
迁移的细胞个数(<i>n</i>) Number of migrated cells	90.48±8.29	50.21±6.75 ^a	47.37±5.42	80.54±7.67 ^b	16.860	<0.001
周期素 D1 CyclinD1	0.71±0.07	0.25±0.03 ^a	0.24±0.04	0.62±0.06 ^b	22.580	<0.001
p21 蛋白抗体 P21	0.31±0.03	0.72±0.08 ^a	0.76±0.09	0.45±0.05 ^b	18.370	<0.001
基质金属蛋白酶 9 MMP-9	0.68±0.07	0.29±0.04 ^a	0.25±0.03	0.54±0.05 ^b	21.870	<0.001
基质金属蛋白酶 2 MMP-2	0.80±0.09	0.36±0.05 ^a	0.32±0.03	0.60±0.07 ^b	19.600	<0.001

注:与 HepG2-R+pcDNA 组相比, ^a*P*<0.05;与 HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC 组相比, ^b*P*<0.05。
Note. Compared with HepG2-R+pcDNA group, ^a*P*<0.05. Compared with HepG2-R+pcDNA SNHG16+miR-NC group, ^b*P*<0.05.

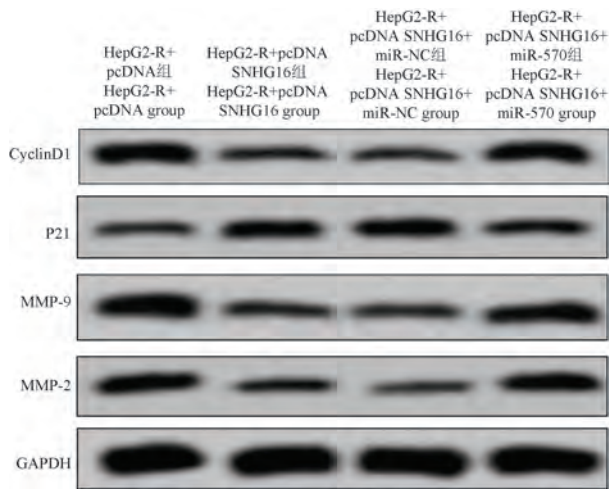


图 5 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2 表达 Western blot 图
Figure 5 Western blot expression of CyclinD1, P21, MMP-9 and MMP-2

3 讨论

肝癌在每个年龄段都有可能会出现,各种类型肝炎病毒引起的慢性感染可致使机体发生慢性肝炎,伴随疾病的进展发展为肝癌,且肝内脂肪的积累、肝硬化或长时间进食霉变的食物等均与肝癌疾病发生有着紧密联系^[7-8]。

化疗是临床治疗癌症最基本的方案之一,临床救治失败主要因为化疗药物的耐药性产生、DNA 受损修复、药物的排外、细胞凋亡等因素互相作用,使

耐药病理机制相对复杂^[9]。索拉非尼通过靶向多项相关靶点,可减缓肿瘤细胞的增殖及新生血管的产生,发挥对肝癌抑制的效果,并且该药物为首要诊治晚期肝癌的靶向药物,能有效改善预后^[10-11]。研究发现,上皮间质的转化、肿瘤的微环境及信号通路等可能会与索拉非尼的耐药有关^[12-13]。本文研究发现肝癌细胞 HepG2 与 lncRNA SNHG16 对索拉非尼耐药有一定的关联性,说明 lncRNA SNHG16 对 miR-570 进行调控可有助于减轻肝癌细胞对索拉非尼耐药的预后。

研究显示,lncRNA 在肿瘤出现及进展中有一定的参与,lncRNA 也可对肝癌的转移起到调节作用^[14-15]。SNHG16 在乳腺癌、肝癌、结直肠癌等肿瘤组织及细胞中表达异常,与肿瘤细胞的侵袭、迁移及增殖相关^[16-17]。随着临床对 miRNA 的研究不断加深,可知其能对多类肿瘤发挥出明显的调节作用,且在恶性肿瘤中表达异常,其主要的特异性常表现为对恶性肿瘤细胞增殖、分化的调控^[18]。研究显示,miR-570 可在肿瘤产生及进展中有所参与,且可有效调节肿瘤免疫有关的靶向基因,进而对肝癌细胞的侵袭、转移、增殖及凋亡的过程发挥一定的干预效果,同时可经调节 B7-H1 基因进行靶向调控,抑制肝癌细胞的侵袭、增殖^[19]。研究发现,与人体正常的肝组织比较,肝癌细胞组织中的 lncRNA SNHG16 表达升高,miR-570 呈低表达,且在 HepG2-R+pcDNA SNHG16 组及 HepG2-R+anti-miR-570 组

中迁移细胞的个数及 CyclinD1、P21、MMP-9、MMP-2、miR-570 的表达水平降低, lncRNA SNHG16、抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高; CyclinD1、MMP-9、MMP-2 的表达水平降低, 抑制率、凋亡率及 P21 的表达水平升高, 促进肝癌细胞的发展, 经对 lncRNA SNHG16 水平进行调控可有效改善 HepG2-R 细胞耐药性, 与其他学者研究较相似^[20-21]。表明 lncRNA SNHG16 经调控 miR-570 水平表达, 可有效改善 HepG2 细胞对索拉非尼耐药。

综上所述, 在肝癌细胞中分析 lncRNA SNHG16、miR-570 的作用, 探究 lncRNA SNHG16、miR-570 在肝癌病症中的病理机制, 结果显示 lncRNA SNHG16 在肝癌索拉非尼耐药细胞中呈高水平表达, 经靶向调控 miR-570 表达可有效促进索拉非尼的耐药性, 为临床进一步分析肝癌索拉非尼耐药病理机制指明了方向。

参考文献:

- [1] Li X, Ramadori P, Pfister D, et al. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(9): 541-557.
- [2] Pope ED 3rd, Kimbrough EO, Vemireddy LP, et al. Aberrant lipid metabolism as a therapeutic target in liver cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2019, 23(6): 473-483.
- [3] 杨惠华, 陈大红, 刁文婧, 等. G6PD 调控 PI3K/Akt 信号通路诱导肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究 [J]. 中国药房, 2022, 33(19): 2338-2342.
- [4] 陈鹏, 崔锐, 梁鸿飞, 等. microRNA-124 靶向髓样分化因子 88 增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(9): 913-918.
- [5] 刘景云, 杨斌, 熊丽, 等. 上皮性卵巢癌患者血清 miR-302b-3p、lncRNA SNHG16 水平变化及其临床意义 [J]. 山东医药, 2022, 62(16): 9-13.
- [6] 袁冲, 赵征, 廖子君, 等. 血清 miR-122 和 miR-570 联合检测对原发性肝癌的临床诊断价值 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(2): 267-270.
- [7] Liu J, Li P, Wang L, et al. Cancer-associated fibroblasts provide a stromal niche for liver cancer organoids that confers trophic effects and therapy resistance [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(2): 407-431.
- [8] 徐彦楠, 赵青, 赵俊霞, 等. 异牛肝菌素对人肝癌细胞增殖、

凋亡影响及其与 PI3K/Akt 通路的关系 [J]. 山东医药, 2022, 62(20): 1-5.

- [9] 曹绍华, 王庆庆, 张金冉. 索拉非尼联合卡培他滨治疗肝细胞肝癌疗效及对患者血清 miR-212 和 miR-132 水平的影响 [J]. 陕西医学杂志, 2020, 49(5): 615-618.
- [10] 刘路政, 陈家诚, 陈良, 等. HBx 不同表达水平对 HepG2 肝癌细胞增殖、侵袭以及索拉非尼耐药的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2021, 27(11): 842-846.
- [11] 林智才, 陈燕丽, 苏小清, 等. Hsp90 抑制剂减弱肝癌耐药细胞株对索拉非尼诱导铁死亡的耐受性 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(21): 3862-3868.
- [12] 黄玉双, 孙艾军, 高鹏, 等. 索拉非尼通过调节 Beclin-1 的表达诱导肝癌细胞自噬的实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2021, 24(3): 220-222, 226.
- [13] 韩丽丽, 吴菲, 黄蓝莹, 等. 香菇多糖对培养肝癌细胞索拉非尼耐药的逆转作用及机制 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2021, 42(1): 48-52, 64.
- [14] 陶玲. lncRNA SNHG16 促进宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭并抑制凋亡及机制初探 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2021, 29(4): 449-457.
- [15] 周云松, 温小辉, 张琦, 等. lncRNA SNHG16 在结直肠癌组织和细胞中表达及其调控结肠癌细胞中 GPAM 表达的机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(1): 58-66.
- [16] 倪志福, 汪晓玲, 屈振繁, 等. lncRNA SNHG16 通过靶向 miR-22-3p 调控肾母细胞瘤 WIT49 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的分子机制 [J]. 临床外科杂志, 2021, 29(9): 883-888.
- [17] 李萍, 刁玉佩, 宋春霞. 长链非编码 RNA SNHG16 通过微小 RNA-455-3p/Noct2 对鼻咽癌细胞增殖、凋亡和周期的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(10): 1964-1967.
- [18] 杨大伟, 刘晓飞, 钱娟娟. TIPE2、IP-10、miR-570 在肝癌患者外周血单个核细胞中的表达及意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(18): 2196-2200.
- [19] 孙凤仪, 黄煜, 刘敏敏, 等. miR-124 联合 miR-570 在宫颈癌不同病变阶段组织中的表达及其意义 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(5): 734-737.
- [20] 胡娜, 盛磊, 饶辉, 等. 淫羊藿素对肝癌 HepG2 细胞的抗增殖作用及其机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(16): 1887-1891.
- [21] 郭梦雅, 邵晓雯, 黄佳宁, 等. LINC02870 对肝细胞性肝癌细胞增殖的影响及机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(31): 48-51.

[收稿日期] 2023-03-23

蔡瑜,王璐婉,谢冬琳,等. 小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 71-77.

Cai Y, Wang LW, Xie DL, et al. Establishment of chronic alcoholic brain injury model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 71-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.010

小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型的建立

蔡瑜¹, 王璐婉², 谢冬琳^{2,3}, 高大鹏^{2,3*}

(1. 浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315500; 2. 宁波大学, 浙江 宁波 315211; 3. 宁波大学附属第一医院, 浙江 宁波 315020)

【摘要】 目的 建立有效稳定的小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型。**方法** 将40只C57BL/6J小鼠随机分成对照组和模型组,模型组小鼠除基础饮用水中添加5%(v/v)酒精外,同时灌胃28%(v/v)酒精,灌胃剂量前两周呈梯度增长(从0逐渐增加至6 g/kg体重),随后4周维持在6 g/kg体重,对照组饮用水中不添加酒精同时灌胃等量生理盐水。实验结束后,通过行为学实验测定小鼠的认知功能和运动能力,通过组织病理染色检测小鼠脑组织的形态学变化。**结果** 与对照组比较,模型组小鼠在行为学实验中表现出认知功能和运动功能障碍,模型组小鼠脑组织病理染色显示海马区形态损伤和细胞坏死。**结论** 实验有效建立了小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型,该模型可应用于慢性酒精中毒性脑病的机制和药物研究。

【关键词】 慢性酒精中毒性脑病;动物模型;动物行为学;组织病理;认知;运动

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0071-07

Establishment of chronic alcoholic brain injury model in mice

CAI Yu¹, WANG Luwan², XIE Donglin^{2,3}, GAO Dapeng^{2,3*}

(1. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315500, China. 2. Ningbo University, Ningbo 315211.

3. the First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315020)

【Abstract】 Objective To establish an effective and reliable chronic alcoholic brain injury model in mice. **Methods** Forty C57BL/6J mice were randomly assigned to a control group or a model group. Mice in the model group were given free access to 5% (v/v) alcohol in drinking water and were intragastrically administered 28% (v/v) alcohol. The gavage dosage increased gradually over the first two weeks (from 0 g/kg to 6 g/kg body weight) and remained at 6 g/kg body weight for the subsequent four weeks. Mice in the control group were provided with normal water and given the same amount of saline via gavage. At the end of the experiment, the cognitive function and motor ability of the mice were evaluated through behavioral tests. Morphological changes in the brain tissue of mice were examined by histopathological staining. **Results** Compared to mice in the control group, mice in the model group showed cognitive impairments and motor dysfunction in the behavioral tests. Pathological examination of brain tissue from the model group mice showed morphological damage and cell necrosis in the hippocampus. **Conclusions** A mouse model of chronic alcoholic brain injury was effectively established in this study, providing a valuable tool for investigating the underlying mechanisms of and potential drug interventions for chronic alcoholic encephalopathy.

【Keywords】 chronic alcoholic encephalopathy; animal model; animal behavior; histopathology; cognitive; motor

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

【基金项目】 浙江省公益基础研究项目(LGF21H090016);宁波市自然科学基金项目(202003N4245)。

【作者简介】 蔡瑜(1985—),女,博士,讲师,研究方向:酒精中毒性脑病方向。E-mail: caiyuhk@163.com

【通信作者】 高大鹏(1983—),男,博士,主治医师,研究方向:酒精中毒性脑病方向。E-mail: aresgdp@163.com

酒是人类社会流传下来最古老的饮料之一。无论庆典、社交还是日常生活,酒都是必不可少之物。但长期过量饮酒会造成酒精滥用及依赖,严重影响学习、记忆和认知等神经功能,是世界范围内最严重的公共卫生问题之一^[1]。据世界卫生组织发表的全球酒精与健康报告指出,全球所有死亡人数的 5.9% 和全球疾病经济负担的 5.1% 可归因于过量饮酒^[1]。我国是一个酒类生产和消费的大国,到 2030 年中国成人的人均饮酒量将超过美国,成为世界上最大的饮酒国家^[1]。酒精依赖患者由于长期大量饮酒造成的中枢神经系统营养代谢紊乱、神经损伤及神经退行性病变,被称为慢性酒精中毒性脑病^[2-3]。该病临床主要表现为认知功能障碍,包括注意力不集中、记忆力下降和思维能力受损等,后期可出现酒精性痴呆、酒精性谵妄等^[4-5]。临床病例研究发现,长期饮酒造成脑内海马和额叶区域的灰质和白质体积异常减少,提示这些区域有显著的神经元丢失^[6]。过量饮酒对个体、家庭及社会造成了沉重的负担,因此,为探究慢性酒精中毒性脑损伤的发病机制和治疗药物而构建有效稳定的动物研究模型十分重要。

目前,国内外文献报道的常见的动物模型给酒方式包括口服、灌胃、腹腔注射和吸入。通常,腹腔注射和灌胃方式用于急性饮酒模型,而口服和吸入方式用于慢性的酒精暴露方案^[7]。但是,以上任何一种单一的给酒方式均存在不足,无法满足方便经济、稳定可靠和尽可能模拟人类饮酒的造模要求。因此探索多种给酒方式结合的造模方法可能是解决单一给酒方式局限性的有效途径。此外,已报道的慢性酒精中毒性脑损伤小鼠模型的评价尚有很多不足。因此,探索建立多种给酒方式结合的慢性酒精中毒的动物模型,并全面、客观评价脑损伤动物模型具有重要意义。本实验通过小鼠长期饮水中添加酒精结合酒精灌胃法,观察小鼠的认知和运动行为学改变以及检测脑组织的形态学变化,构建慢性小鼠酒精中毒性脑损伤模型,为后续慢性酒精中毒性脑病机制的研究和治疗药物的评价建立有效稳定的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

40 只 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体重(19 ± 1.5)g,7 周龄,购自浙江维通利华实验动物技术有

限公司[SCXK(浙)2019-0001]。实验动物饲养于宁波大学实验动物中心[SYXK(浙)2019-0005]。本实验经宁波大学实验动物中心实验动物伦理委员会审查批准(IACUC-NBU20230138),并在动物饲养和实验过程严格遵循实验动物 3R 原则。所有小鼠适应性喂养 1 周后,随机分成对照组 20 只和模型组 20 只,开始正式实验。

1.2 主要试剂与仪器

北京 56°二锅头酒(北京京极酒业有限公司,生产批号:20210827);苏木素-伊红(hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒(Solarbio 北京索莱宝科技有限公司,G1120,生产批号:20230217)和尼氏染色试剂盒(焦油紫法)(Solarbio 北京索莱宝科技有限公司,G1430,生产批号:20220214)。ANY-maze 行为学分析系统(美国 stoelting 公司);徕卡 RM2235 轮转式切片机(徕卡显微系统(上海)有限公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立

根据美国国家酒精滥用与酒精中毒研究所(National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, NIAAA)的定义,危险饮酒(risky use)是指 65 岁以下的男性,每天饮用超过 4 个标准杯乙醇。为了模拟人类酗酒者的每日酒精饮用量,经过体表面积折算,每只小鼠每天的酒精使用量需达到 10 g/kg 及以上。造模过程使用的酒精浓度和实验时长基于预实验的结果,具体动物模型建立过程如下:将 56°白酒稀释成 5%(v/v)和 28%(v/v)两个浓度,模型组小鼠除基础饮用水中含终浓度为 5%(v/v)的酒精外,同时灌胃 28%(v/v)酒精,前两周灌胃剂量呈梯度增长(从 0 逐渐增加至 6 g/kg 体重),随后 4 周灌胃剂量维持在 6 g/kg 体重,对照组饮用水中不添加酒精同时灌胃等量生理盐水。继 6 周的建模过程后,所有小鼠接受认知和运动行为学实验包括 Y 迷宫、Morris 水迷宫、爬杆实验和平衡木实验,每个实验之间间隔 1~3 d,使得动物获得充分的休息。具体慢性酒精中毒性脑损伤的建模过程和行为学实验时间表见图 1。

1.3.2 行为学测试方法

(1) Y 迷宫实验

Y 迷宫实验参照文献^[8]进行并稍有改进。Y 迷宫装置由三个等长水平臂组成(每个臂长 40 cm,宽 10 cm,高 20 cm),彼此成 120°角,从一个中心点向

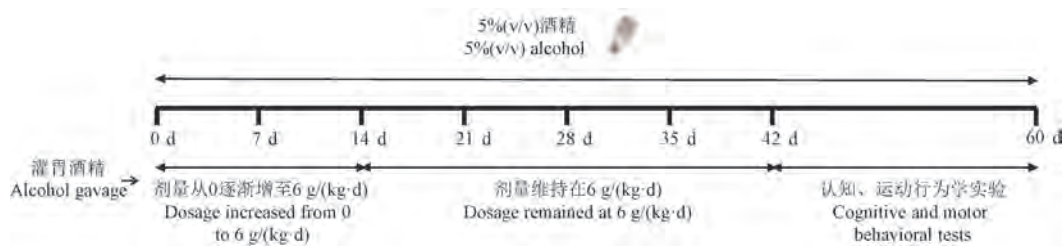


图 1 慢性酒精中毒性脑损伤的建模过程和行为学实验时间表

Figure 1 Modeling process of chronic alcoholic brain injury and timeline for behavior experiments

外辐射。简要步骤如下:小鼠被放置在三个臂的中心,在 8 min 的时间里,它们可以自由地出入所有的三个臂。记录进入三个臂的总次数和进入顺序。交替百分比被定义为连续进入三个不同臂的次数/(总次数-2)。交替百分比可以作为动物空间工作记忆的指标,而进入三个臂的总次数可以作为动物自发运动的指标。

(2) Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验参照文献^[9-10]进行并稍有改进。水迷宫宫体直径 125 cm,高 75 cm。内壁涂黑,宫体内充满自来水,水温保持在(23±2)℃。逃生平台直径 9 cm,距离圆周 30 cm,置于宫体内坐标位置的第一象限。简要步骤如下:整个水迷宫实验包括 1 d 的适应环境,1 d 的寻找可见平台定位航行,5 d 的寻找隐藏平台(平台低于水面 0.7 cm)定位航行和去除平台后 1 d 的空间探索。在定位航行过程中,将自由活动的小鼠分别从四个象限随机放入水中,让其在逃生中寻找平台,若 90 s 后,小鼠仍未找到平台,则引导小鼠找到平台上,并在平台上待 15 s,每天训练 3 次;在空间探索过程中,将小鼠从迷宫的固定位置放入水中,让其自由探索 60 s。小鼠活动通过水池上方固定的摄像头进行图像采集并用 ANY-maze™ 软件进行处理。主要观察指标有:定位航行实验中小鼠找到平台的平均逃避潜伏期和平均游泳速度,空间探索实验中小鼠穿越平台的次数、在平台象限的停留时间和搜索路径。动物在最后 1 d 空间探索实验中的表现可以用来全面评估小鼠的空间记忆能力。

(3) 平衡木实验

参照 Drucker-Colin 等^[11]报道的平衡木实验方法并稍有改进,简要步骤如下:取 100 cm 长、直径 1.8 cm 的圆木棒作为平衡木,平放于地面,两端各一木架支撑(高 60 cm)。其中一端置一黑色塑料笼,为每次实验小鼠的终点。实验前,训练小鼠从平衡木一端爬行至另一端的塑料笼里,并在笼里待

15 s,每只小鼠训练 6 次。训练完毕进行平衡木爬行时间测定,记录每只小鼠在整根平衡木爬行的总时间,作为动物运动和平衡能力的指标。

(4) 爬杆实验

参照 Arai 等^[12]报道的爬杆实验方法并稍有改进。简要步骤如下:将小鼠放在长 50 cm,直径 1.2 cm,45°固定的圆木棒上,使肌肉处于静力紧张状态。先引导动物在 15 s 内由杆顶爬至杆底,每只训练 4 次,训练完毕进行爬杆时间测定,记录每只小鼠的爬杆时间,作为动物运动协调能力的指标。

1.3.3 脑组织形态学检测方法

将小鼠麻醉后,开胸,左心室插入灌注针头,先灌注生理盐水 50 mL,再灌注 4% 多聚甲醛溶液 50 mL,待小鼠全身僵直后,断头处死,冰上取全脑,4%多聚甲醛溶液固定 18 h,石蜡包埋,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片,片厚 8 μm,HE 及尼氏染色,光镜观察皮层及海马神经元形态学变化。

1.4 统计学方法

所有数据均以平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验进行分析, Morris 水迷宫隐藏平台测试期采用 two-way ANOVA 进行分析。所有统计分析及作图均使用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠认知功能比较

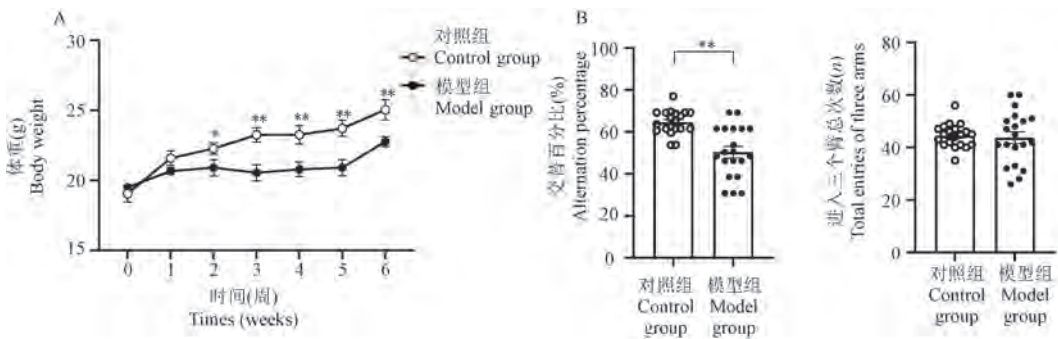
在建立慢性酒精中毒性脑损伤模型小鼠的过程中,模型组小鼠体重增长显著低于对照组,从第 2 周开始直至第 6 周,模型组小鼠的体重明显低于同龄的对照组小鼠(图 2)。为了揭示酒精暴露小鼠的空间学习和记忆缺陷,每只小鼠都接受了 Y 迷宫测试和 Morris 水迷宫测试。在 Y 迷宫测试中,对照组和模型组小鼠进入三臂的总次数没有差异,这表明动物自发活动不受长期酒精暴露的影响。在 Y 迷

官测试中,模型组小鼠的自发交替率低于对照组($P<0.01$),提示慢性乙醇处理可诱发小鼠短期空间工作记忆障碍(图2)。

在 Morris 水迷宫实验结果中,平台测试中两组的逃避潜伏期和平均游泳速度均无显著差异(图3)。在隐藏平台试验测试中,对于两组小鼠在连续 4 d 训练的逃避潜伏期数据进行 two-way ANOVA 分析(针对组别和训练天数这两个因素),所得的分析结果说明,无论是组别因素,还是训练天数因素,均对最终的逃避潜伏期有显著影响(分别是 $P<0.05$ 和 $P<$

0.001),但上述两个因素没有交叉影响($P=0.9313$)。

这些分析结果表明,在隐藏平台试验测试中,两组小鼠随训练天数的增加,逃避潜伏期逐渐降低,结果有显著性差异;并且相对于对照组,模型组的逃避潜伏期维持较长时间,结果有显著性差异。此外,对于隐藏平台试验测试的数据进行 t 检验发现,两组小鼠隐藏平台测试第 1 天逃避潜伏期差异无统计学意义。与对照组相比,模型组在第 2~4 天逃避潜伏期显著增加($P<0.05$)。在空间探索测试中,长期暴露于酒精的小鼠与对照组小鼠相比,穿

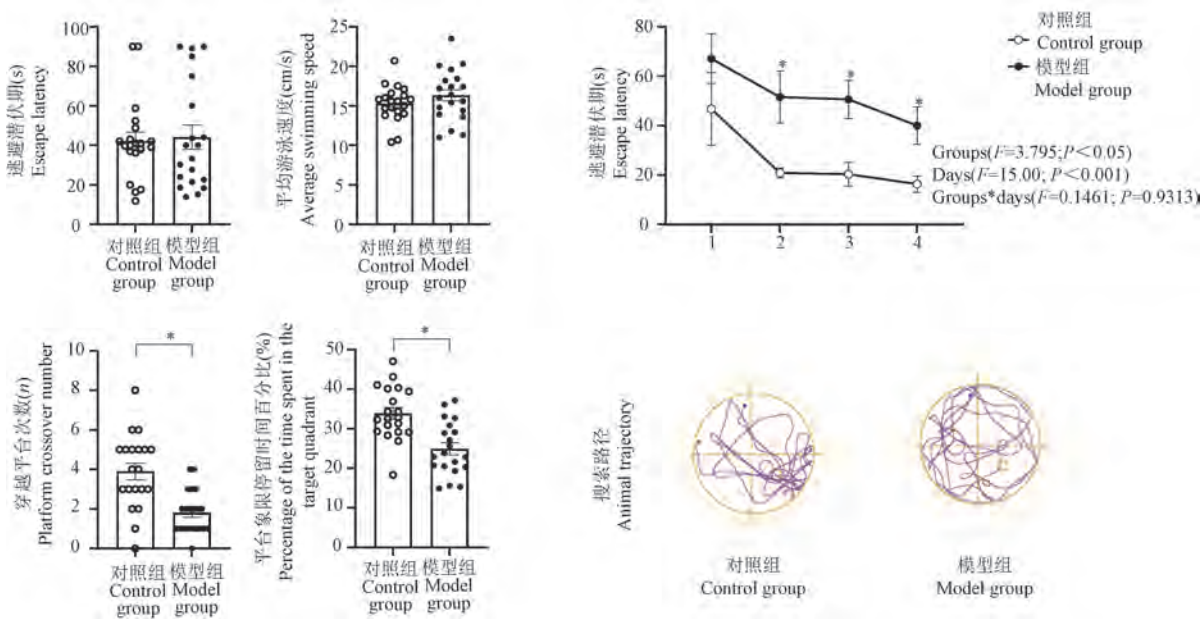


注:A:小鼠体重变化;B:Y 迷宫实验。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 小鼠体重和 Y 迷宫实验结果比较

Note. A, Body weight changes of mice. B, Y maze test. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Comparison of body weights and the performance in Y maze between two groups



注:A:可见平台测试;B:隐藏平台测试;C:空间探索测试。与对照组相比, * $P<0.05$ 。

图3 水迷宫实验结果比较

Note. A, Visible platform trial. B, Hidden platform trial. C, Probe trial. Compared with the control group, * $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of the results of water maze between two groups

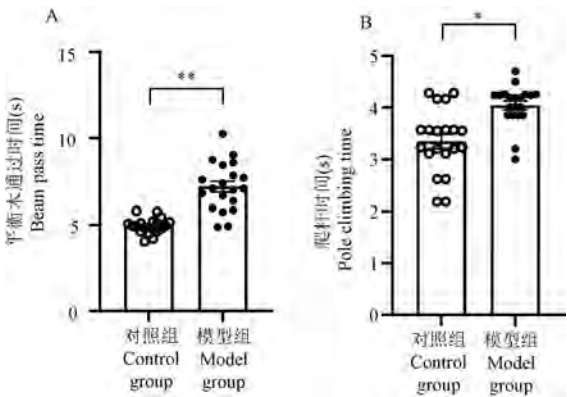
越平台次数显著减少 ($P<0.05$) 以及在平台象限停留时间百分比显著降低 ($P<0.05$)。在搜索策略方面,模型组小鼠的路径轨迹不太集中于平台所在象限。综上,与对照组相比,长期酒精暴露导致小鼠的空间学习和记忆缺陷。

2.2 两组小鼠运动功能比较

在平衡木实验中,模型组小鼠通过平衡木的总时间显著大于对照组 ($P<0.01$),见图 4。在爬杆实验中,模型组小鼠的爬杆时间与对照组相比显著延长 ($P<0.05$),见图 4。综上,与对照组相比,慢性酒精暴露导致小鼠的运动协调能力明显降低。

2.3 两组小鼠脑组织形态学比较

HE 染色显示对照组小鼠海马区神经元排列清晰,细胞结构完整、轮廓清晰,而模型组小鼠神经元表型明显收缩变形(图 5A),并且,在长期乙醇暴露后,小鼠海马组织 CA1 区神经元数量显著减少。尼氏染色结果进一步证实了两组神经元的这些病理

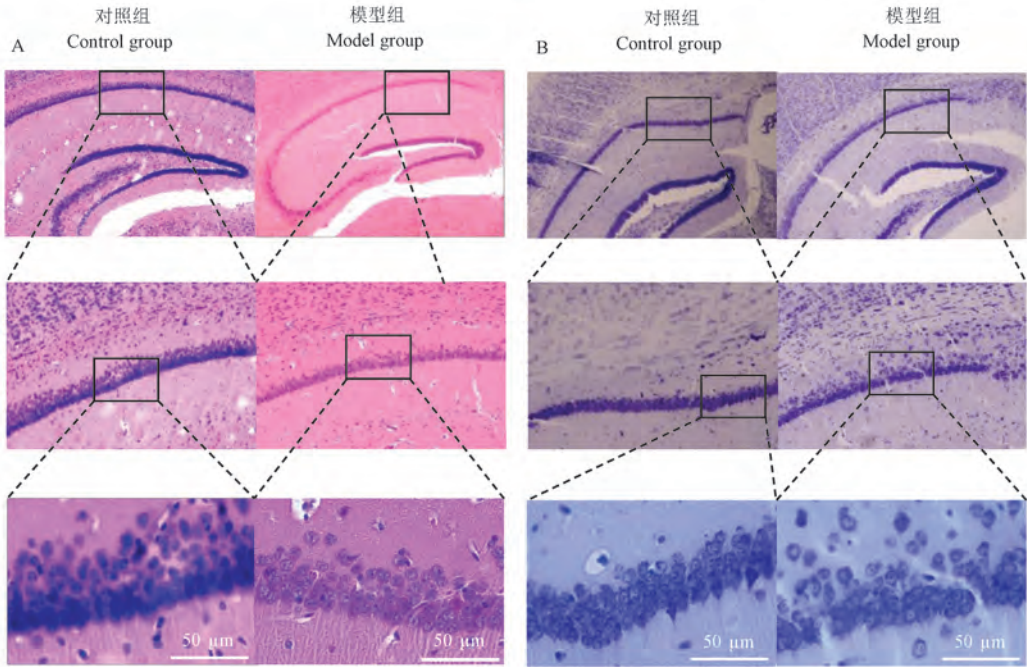


注:A:平衡木实验;B:爬杆实验。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 平衡木和爬杆实验结果比较

Note. A, beam balance experiment. B, pole test. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 Comparison of the results of beam balance experiment and pole test between two groups



注:A:海马组织 HE 染色;B:海马组织尼氏染色。

图 5 海马组织 HE 和尼氏染色结果比较

Note. A, HE staining of hippocampus. B, Nissl staining of hippocampus.

Figure 5 Comparison of the results of HE staining and Nissl staining of hippocampus

改变(图 5B)。即对照组海马区神经元结构轮廓清晰,而模型组小鼠神经元萎缩,形态破坏。并且,经长期乙醇暴露后,小鼠海马组织 CA1 区神经元数量显著减少。两组小鼠脑组织病理染色结果表明,与对照组相比,长期乙醇暴露导致小鼠海马区形态损伤和细胞坏死。

3 讨论

酒精使用障碍是发达国家最常见的神经和精神疾病之一,影响全球数百万人^[13]。随着我国社会经济发展,慢性酒精中毒性脑病的发病率逐年上升,但目前尚未得到足够的重视。为了进一步对长

期过量酗酒所致的脑损伤的病理变化和发病机制有更好的研究,探索建立合适的动物模型至关重要。

国内外文献报道的慢性酒精中毒性肝损伤模型和慢性饮酒成瘾/戒断模型及评价已较成熟,而慢性酒精诱导的脑损伤动物模型及评价尚未完善。对于建立慢性酒精中毒性脑损伤动物模型,有一些重要的造模因素需考虑并优化,包括选取的动物种类品系、给予动物酒精的方式、给予酒精的浓度、动物酒精暴露的时间和剂量等。本研究均通过文献调研结合预实验对上述各因素进行确定并优化,以期得到一种尽可能模拟人类慢性饮酒过程、稳定可靠且造模时间短的脑损伤模型,这也是本研究对于目前已有造模方法的改进创新之处。具体模型建立过程中,首先,本实验选取了 C57BL/6J 品系的小鼠作为建立模型的对象,这向该品系小鼠有较高的自愿饮酒量以及对酒精的生理反应与人类非常相似等特征有关^[14]。尽管国内外文献也选用过 BALB/c、ICR 及昆明小鼠作为造模对象^[15-17],但总体而言,C57BL/6J 小鼠是目前研究酒精诱导的器官损伤最常用的动物之一。此外,建立模型过程中,如何给予动物酒精的方式也是需要考虑并优化的。国内外文献报道常见的给酒方式包括口服(含酒精的流质饮食或饮用水)、灌胃、腹腔注射和吸入(暴露于酒精蒸气)。通常,急性饮酒模型采用的是腹腔注射和灌胃方式,而慢性的动物酒精暴露方案采用口服和吸入方式^[7]。含酒精的流质饮食最早是由 Lieber 和 DeCarli 开发的,在造模过程中,该饮食作为实验动物唯一的食物和水来源^[18-19]。Lieber-DeCarli 模型虽然造模简便但未模仿人类饮酒。并且,还存在造模耗时长、饮食种类受限、营养情况与正常饮食时不同等不足。Tsukamoto-French 模型是通过动物胃内植入导管的方式给予酒精^[20],造模过程需要特殊的设备技术和持续的动物监测、成本高,不便于广泛应用。饮用水中添加酒精的模型是长期乙醇暴露的更实用的解决方案,该模型已用于多种物种,包括小鼠、大鼠和豚鼠^[21-22]。该模型优点是模拟人类饮酒的生理过程、建模方便便宜,可长期给酒(8 个月以上),但存在造模时间长,并且可能无法模拟人类酒精疾病的晚期阶段等不足^[23]。de Witte 等^[24]开发了一种称为“肺酒精化”的酒精吸入模型,可以长期达到较高的(200 mg/dL)血液酒精水平,适合酒精成瘾方面的研究,但吸入酒精毕竟不同于饮用酒精,不能完全模拟真实情况。综

合考量上述给酒方式的优缺点,此次模型采用饮水中添加酒精+灌胃法,避免单一给酒方式的局限性,使动物模型尽可能模拟人类慢性饮酒过程并缩短造模时间。更值得一提的是,通过预实验发现,小鼠灌胃时能耐受的酒精浓度需低于 30% (v/v),因此 56° 的白酒原液需稀释 1 倍后使用并 1 d 中分两次灌胃。陈翠桃等^[16]采用白酒原液灌胃前 30 min 给予小鼠灌胃蒸馏水的方法,这些都是为了减少高度酒精灌胃引起的小鼠中毒症状甚至死亡。并且,造模前两周采用酒精剂量梯度提升,提高小鼠耐受性和存活率。最后,动物暴露酒精的时间长短也是建立模型时需要考虑的问题。通常研究人员会将 1 个月或更长时间地给予酒精视为慢性酒精暴露^[23]。酒精引起的慢性疾病,如慢性酒精中毒性脑病,是一个多步骤的疾病过程,研究者感兴趣的多步骤多进程的哪个阶段将决定酒精的给药持续时间^[23]。本研究对慢性酒精中毒性脑病的早期症状尤其是认知功能障碍和运动功能障碍最为关注,结合前期的预实验结果,最终将小鼠慢性酒精暴露的时间优化为 6 周,相比目前报道的造模方法,既缩短了造模时间,又可以获得稳定的慢性酒精中毒性脑损伤模型。

采用动物模型效度对本研究所建立的小鼠动物模型进行评价。动物模型效度是动物模型的综合评价标准,即评价所建立的动物模型在多大程度上模拟了临床该种疾病。动物模型效度主要由表面效度、结构效度和预测效度组成,其中表面效度指动物模型与临床症状和体征的相似性,结构效度指动物造模过程与临床疾病的致病过程和病理机制的相似性,预测效度指动物模型与临床患者对治疗药物反应的相似性。首先,从表面效度看,本实验结果发现,与对照组比较,模型组体重增长幅度显著降低,日常活动易被噪声惊吓、动作刻板;在认知行为学实验中,模型组在 Y 迷宫测试中的自发交替率显著降低,在水迷宫空间探索阶段的穿越平台次数和在平台象限停留时间百分比显著降低;在运动行为学实验中,长期酒精暴露会导致小鼠通过平衡木的总时间和爬杆时间显著延长;并且,模型组小鼠脑组织 HE 染色和尼氏染色均显示出海马区形态损伤和细胞坏死。这些与临床上观察到的患者在病理及病理生理方面的变化极为相似。例如,慢性酒精中毒性脑病的患者早期常有焦虑不安、头痛、失眠、乏力、注意力不集中等,逐渐出现智能障碍和精神异常,表现反应迟钝、注意力不集中、

记忆力下降,常伴有虚构、思维能力受损,有的出现眼肌麻痹、共济失调和影像学改变等。与国内文献已报道的慢性酒精中毒性脑损伤模型评价相比,本研究对模型小鼠的认识功能、运动功能以及海马区病理损伤都采用两种经典实验方法进行评价,结果相互佐证。其次,从结构效度看,慢性饮酒是酒精中毒性脑病的重要诱因,据此,建立小鼠长时间酒精暴露可以认为是一种具有良好效度的疾病模型。最后,从预测维度看,目前临床尚无药物治疗该疾病,因此无从验证模型的预测效度。综上所述,本实验所建立的小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型在动物模型的表面和结构效度上是非常有优势的,基本模拟了人类长期饮酒导致的早期神经病理和行为学改变。此外,本实验造模方法简单方便、饲养成本较低、动物存活率高、时间短,在 6 周内可初步建立小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型。本研究的局限性在于,仅从动物行为学和脑组织形态学两方面评价了慢性酒精对小鼠脑组织所造成的损伤。在接下来的研究工作中,我们将进一步探讨慢性酒精所致的认知功能障碍的分子机制以及潜在药物的治疗作用。

参考文献:

- [1] Caneva S, Ottonello M, Torselli E, et al. Cognitive impairments in early-detoxified alcohol-dependent inpatients and their associations with socio-demographic, clinical and psychological factors; an exploratory study [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 1705–1716.
- [2] Peacock A, Leung J, Larney S, et al. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report [J]. *Addiction*, 2018, 113(10): 1905–1926.
- [3] de la Monte SM, Kril JJ. Human alcohol-related neuropathology [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 127(1): 71–90.
- [4] Topiwala A, Ebmeier KP. Effects of drinking on late-life brain and cognition [J]. *Evid Based Ment Health*, 2018, 21(1): 12–15.
- [5] Khalifa N, Magee T, Shirazi S, et al. The neurocognitive profiles of justice involved people with foetal alcohol spectrum disorder: a systematic review [J]. *Behav Sci Law*, 2022, 40(1): 87–111.
- [6] Karoly HC, Skrzynski CJ, Moe EN, et al. Exploring relationships between alcohol consumption, inflammation, and brain structure in a heavy drinking sample [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2021, 45(11): 2256–2270.
- [7] Bell RL, Hauser SR, Liang T, et al. Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 122: 201–243.
- [8] Detrait E, Maurice T, Hanon E, et al. Lack of synaptic vesicle protein SV2B protects against amyloid- β_{25-35} -Induced oxidative

- stress, cholinergic deficit and cognitive impairment in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 271: 277–285.
- [9] Ding N, Jiang J, Xu A, et al. Manual acupuncture regulates behavior and cerebral blood flow in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 37.
- [10] Tian H, Ding N, Guo M, et al. Analysis of learning and memory ability in an Alzheimer's disease mouse model using the Morris water maze [J]. *J Vis Exp*, 2019(152): 1–6.
- [11] Drucker-Colín R, García-Hernández F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function [J]. *J Neurosci Methods*, 1991, 39(2): 153–161.
- [12] Arai N, Misugi K, Goshima Y, et al. Evaluation of a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for Parkinsonism [J]. *Brain Res*, 1990, 515 (1–2): 57–63.
- [13] Rehm J, Anderson P, Barry J, et al. Prevalence of and potential influencing factors for alcohol dependence in Europe [J]. *Eur Addict Res*, 2015, 21(1): 6–18.
- [14] Crawley JN, Belknap JK, Collins A, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies [J]. *Psychopharmacology*, 1997, 132(2): 107–124.
- [15] 叶覃, 马文俊, 史小溪. 慢性酒精摄入脑损伤小鼠模型的建立 [J]. *中国保健营养*, 2013, 23(2): 43.
- [16] 陈翠桃, 陈静, 吴伟青, 等. 大蒜多糖对慢性酒精中毒小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2013, 39(3): 458–462, 420.
- [17] 林巍, 曲国强, 刘晓兰, 等. 玉米肽对慢性酒精中毒小鼠认知损伤的改善作用 [J]. *中国油脂*, 2022, 47(4): 29–35.
- [18] Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1982, 6(4): 523–531.
- [19] Lieber CS and DeCarli LM. The feeding of ethanol in liquid diets [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1986, 10(5): 550–553.
- [20] Tsukamoto H, Mkrtchyan H, Dynnyk A. Intragastric ethanol infusion model in rodents [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 447: 33–48.
- [21] Li TK, Lumeng L, McBride WJ, et al. Progress toward a voluntary oral consumption model of alcoholism [J]. *Drug Alcohol Depend*, 1979, 4(1–2): 45–60.
- [22] Juggi JS, Prathap K. Lipid accumulation in the rat liver: a histological and biochemical study [J]. *Cytobios*, 1979, 24 (94): 117–134.
- [23] D'Souza El-Guindy NB, Kovacs EJ, de Witte P, et al. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2010, 34(9): 1489–1511.
- [24] de Witte PA, Hamon M, Mauborgne A, et al. Ethanol and opiate decrease the axonal transport of substance-P like immunoreactive material in rat vagus-nerves [J]. *Neuropeptides*, 1990, 16(1): 15–20.

杨锋,刘广龙,王艳卿. LncRNA FGD5-AS1 对口腔鳞状细胞癌细胞恶性表型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 78-87.

Yang F, Liu GL, Wang YQ. Effect of LncRNA FGD5-AS1 on the malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma cells [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 78-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.011

LncRNA FGD5-AS1 对口腔鳞状细胞癌细胞恶性表型的影响

杨 锋¹, 刘广龙^{1*}, 王艳卿²

(1. 济宁医学院附属滕州市中心人民医院口腔科, 山东 滕州 277599; 2. 滕州市中心人民医院手术室, 山东 滕州 277599)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA (LncRNA) FGD5-AS1 对口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响与机制。**方法** 利用在线数据库分析 FGD5-AS1 在 OSCC 中的表达。以在滕州市中心人民医院口腔科收集的 30 例 OSCC 患者的肿瘤组织、正常组织和体外培养的人口腔黏膜细胞 (HOK) 和 OSCC 细胞 (SCC-9、HSC-4、SCC-25、CAL-27) 为研究对象, 采用 qRT-PCR 法检测 FGD5-AS1 和 miR-129-5p 表达。将 FGD5-AS1 表达最高的 CAL-27 细胞分成 Control 组、si-NC 组、si-FGD5-AS1 组、si-FGD5-AS1 + NC inhibitor 组和 si-FGD5-AS1 + miR-129-5p inhibitor 组, CCK-8 法和克隆形成实验检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞凋亡水平; 划痕愈合实验检测细胞迁移能力; Transwell 小室检测细胞侵袭能力; 双荧光素酶报告实验验证 FGD5-AS1 与 miR-129-5p 的靶向关系; Western blot 检测高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 蛋白表达。构建体内异种移植瘤模型, 并分为 sh-NC 组、sh-FGD5-AS1 组、miR-129-5p inhibitor 组和 sh-FGD5-AS1 + miR-129-5p inhibitor 组, 检测肿瘤体积和肿瘤; qRT-PCR 检测移植瘤组织 FGD5-AS1、miR-129-5p 表达; 免疫组化检测移植瘤组织 HMGB1、Ki67 表达。**结果** 数据库分析显示, OSCC 肿瘤组织中 FGD5-AS1 的表达水平是正常组织的 4 倍, 且 FGD5-AS1 表达与 OSCC 患者分级较差相关。与正常组织或人口腔黏膜细胞相比, 肿瘤组织和 OSCC 细胞系中 FGD5-AS1 表达明显升高, miR-129-5p 表达明显降低 ($P < 0.05$), 选择 FGD5-AS1 表达水平最高的 CAL-27 细胞进行转染实验。沉默 FGD5-AS1 可升高细胞凋亡率, 降低细胞活力、划痕愈合率及侵袭细胞数, 并增强 miR-129-5p 表达, 下调 HMGB1 表达 ($P < 0.05$)。miR-129-5p 是 FGD5-AS1 的靶基因, 抑制 miR-129-5p 表达可逆转沉默 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。体内实验显示, 沉默 FGD5-AS1 明显抑制移植瘤生长和 HMGB1、Ki67 表达 ($P < 0.05$), 抑制 miR-129-5p 则相反; 抑制 miR-129-5p 可逆转沉默 FGD5-AS1 对肿瘤生长和 HMGB1、Ki67 表达的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论** FGD5-AS1 在 OSCC 细胞中上调, 干扰 FGD5-AS1 可通过靶向调控 miR-129-5p/HMGB1 轴, 抑制 OSCC 细胞增殖、迁移、侵袭, 促进凋亡。

【关键词】 FGD5-AS1; miR-129-5p; 口腔鳞状细胞癌; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0078-10

Effect of LncRNA FGD5-AS1 on the malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma cells

YANG Feng¹, LIU Guanglong^{1*}, WANG Yanqing²

(1. Stomatological Department of Tengzhou Central People's Hospital Affiliated to Jining Medical College, Tengzhou 277599, China.
2. Operating Room of Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277599)

【基金项目】 济宁医学院校级科研项目 (JY2017FS043)。

【作者简介】 杨锋 (1982—), 男, 主治医师, 研究方向: 口腔医学。E-mail: yangfeng2@163.com

【通信作者】 刘广龙 (1987—), 男, 硕士, 研究方向: 口腔医学。E-mail: uw7bki@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect and mechanism of long non-coding RNA (LncRNA) FGD5-AS1 on the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. **Methods** FGD5-AS1 expression in OSCC was analyzed using an online database. Tumor and normal tissues of 30 patients with OSCC collected at the Stomatology Department of Tengzhou Central People's Hospital, and human oral mucosal cell line HOK and OSCC cell lines SCC-9, HSC-4, SCC-25, and CAL-27 cultured *in vitro* were investigated. qRT-PCR was performed to measure FGD5-AS1 and miR-129-5p expression. CAL-27 cells with the highest FGD5-AS1 expression were divided into Control, si-NC, si-FGD5-AS1, si-FGD5-AS1+NC inhibitor, and si-FGD5-AS1+miR-129-5p inhibitor groups. CCK-8 and colony formation assays were used to assess cell proliferation. Apoptosis was detected by flow cytometry. Cell migration was assessed by wound healing assays. Transwell chambers were used to assess cell invasion. Dual luciferase reporter assays were used to verify the targeting relationship between FGD5-AS1 and miR-129-5p. Expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) was detected by Western blot. An *in vivo* xenograft tumor model was established and divided into sh-NC, sh-FGD5-AS1, miR-129-5p inhibitor, and sh-FGD5-AS1+miR-129-5p inhibitor groups. The tumor volume and tumor were assessed. qRT-PCR was used to measure FGD5-AS1 and miR-129-5p expression in transplanted tumor tissues. HMGB1 and Ki67 expression was detected by immunohistochemistry. **Results** Database analysis showed that the expression level of FGD5-AS1 in OSCC tumor tissues was 4 times higher than that in normal tissues. FGD5-AS1 expression was associated with a poor grade in OSCC patients. Compared with normal tissues and human oral mucosal cells, FGD5-AS1 expression in tumor tissues and OSCC cell lines was significantly increased, and miR-129-5p expression was significantly decreased ($P < 0.05$). CAL-27 cells with the highest expression level of FGD5-AS1 were selected for transfection experiments. Silencing FGD5-AS1 increased the apoptosis rate, decreased cell viability, the scratch healing rate, and number of invaded cells, enhanced miR-129-5p expression, and downregulated HMGB1 expression ($P < 0.05$). MiR-129-5p was the target gene of FGD5-AS1. Inhibition of miR-129-5p expression reversed the effects of silencing FGD5-AS1 on OSCC cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion. *In vivo* experiments showed that FGD5-AS1 silencing significantly inhibited tumor growth and expression of HMGB1 and Ki67 ($P < 0.05$), and inhibition of miR-129-5p resulted in the opposite trend. Inhibition of miR-129-5p reversed the effects of FGD5-AS1 inhibition on tumor growth and expression of HMGB1 and Ki67 ($P < 0.05$). **Conclusions** FGD5-AS1 is upregulated in OSCC cells. Interfering with FGD5-AS1 expression inhibit the proliferations, migration, and invasion of OSCC cells and promotes apoptosis by targeting the miR-129-5p/HMGB1 axis.

[Keywords] FGD5-AS1; miR-129-5p; oral squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis

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

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率、高恶性度和不良预后的特点^[1-2]。虽然在手术和放化疗方面有很大进步,但 OSCC 患者的总生存率并无明显提高^[3]。癌细胞远处转移是 OSCC 进展过程中的致命因素^[4]。长链非编码 RNA (long non-coding RNAs, LncRNAs)在恶性肿瘤(包括 OSCC)进展中发挥重要作用^[5-6]。FGD5 反义 RNA1 (FGD5 antisense RNA 1, FGD5-AS1)是一个新发现的 LncRNA,在喉鳞状细胞癌^[7]、胶质母细胞瘤^[8]、乳腺癌^[9]等多种癌症中呈高表达。最近发现,FGD5-AS1 表达在 OSCC 组织和细胞中异常上调,敲低 FGD5-AS1 可抑制 OSCC 细胞恶性行为^[10]。但 FGD5-AS1 在 OSCC 中的作用机制尚未完全明确。

研究显示,miR-129-5p 的表达水平在 OSCC 组织中下调^[11];且高迁移率族蛋白 1 (high-mobility

group box 1, HMGB1) 的 3'-非翻译区(3'-UTR)与 miR-129-5p 存在结合位点,miR-129-5p 可通过靶向负调节 HMGB1 表达抑制癌细胞的恶性生物学行为^[12]。HMGB1 已被证实在 OSCC 中呈高表达,与 OSCC 的易感性和恶性进展有关^[13-14]。然而,FGD5-AS1 在 OSCC 中的作用是否与 miR-129-5p 和 HMGB1 有关还未可知。因此,本研究旨在探讨 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞生物学行为的影响并分析潜在机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人口腔黏膜细胞 (human oral keratinocytes, HOK) 和 OSCC 细胞 (SCC-9、HSC-4、SCC-25、CAL-27)均购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 临床样本

2018 年 1 月~2021 年 1 月,从滕州市中心人民医院口腔科获得 30 例 OSCC 患者的肿瘤组织及邻近的正常组织。30 例 OSCC 患者包括 26 例男性,4 例女性,年龄 32~76 岁;TNM 分期:Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 8 例,Ⅲ期 9 例,Ⅳ期 10 例;病理分化高 17 例,病理分化低或中 13 例。纳入标准:经病理诊断结果为 OSCC 患者;术前未接受抗肿瘤治疗。排除标准:术前接受抗肿瘤治疗或放疗、化疗的患者;患有其它类型肿瘤的患者;患有免疫系统疾病的患者;有严重的心脏、肺部等系统性疾病的患者;资料不完整的患者。本实验获得本院科研伦理审查委员会的批准。此外,每个参与者在研究前都签署了书面知情同意书。组织样本立即在-80℃冰箱冷冻。

1.1.3 实验动物

40 只 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠取自山东大学实验动物中心[SCXK(鲁)2019-0001],体重 19~22 g,6 周龄,饲养于济宁医学院动物房内[SYXK(鲁)2021-0030]。

所有小鼠都被饲养在 18~22℃、湿度 20%、光照/黑暗周期 12 h/12 h 的特定无病原体条件下。所有动物实验均经济宁医学院附属滕州市中心人民医院动物伦理委员会批准(H20220513),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

FGD5-AS1 小干扰 RNA/过表达载体(si-FGD5-AS1/pc-FGD5-AS1)及相应对照(si-NC/pcDNA)、miR-129-5p 模拟物/抑制物(miR-129-5p mimics/inhibitor)及相应对照(NC mimics/inhibitor)购自上海吉玛制药技术有限公司(批号:20181019、20180511);Lipofectamine 3000 购自山东博科再生医学有限公司(批号:20190322);RevertAid 第一链互补 DNA(complementary DNA,cDNA)合成试剂盒购自北京百诺威生物科技有限公司(批号:20170605);SYBR Green PCR 试剂盒购自北京毕特博生物技术有限责任公司(批号:20150627);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8,CCK-8)购自武汉菲恩生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司(批号:20140520);双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司(批号:20170825);HMGB1 抗体购自 Abcam 公司(批号:20201123)。FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公

司);ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Varioskan LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 TANRIC 数据库分析

采用癌症非编码 RNA 图谱(TANRIC)来获取和分析 FGD5-AS1 在 OSCC 中的表达水平。利用来自癌症基因组图谱(the cancer genome atlas,TCGA)的大规模 RNA-seq 数据集来探索 LncRNAs 的功能(<http://bioinformatics.mdanderson.org/main/TANRIC:Overview>)。

1.3.2 细胞培养

HOK 细胞和 OSCC 细胞(SCC-9、HSC-4、SCC-25、CAL-27)用添加 1%青霉素/链霉素和 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃和 5% CO₂ 条件下培养。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)检测 FGD5-AS1 和 miR-129-5p 表达水平

组织和细胞的 RNA 提取采用 TRIzol 试剂。利用 RevertAid 第一链 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反向转录为 cDNA。用 SYBR Green PCR 试剂盒在 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增。GAPDH 和 U6 作为内部对照,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算目标基因的相对表达量。引物如下:FGD5-AS1,正向 5'-TTTGCTGTTTGATATTGG-3',反向 5'-TGTTTTGAGTTGTCTTCG-3';miR-129-5p,正向 5'-ACCCAGTGC GATTTGTCA-3',反向 5'-ACTGTACTGGAAGATGGACC-3';U6,正向 5'-GCCAGCTCCTACATCTCAGC-3',反向 5'-AGCCTGACTTGCTAGTGGATTAT-3';GAPDH,正向 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',反向 5'-GAAGGCTGGGCTCATTT-3'。

1.3.4 细胞转染

CAL-27 细胞分为 Control 组(正常培养,不转染)、si-NC 组(转染 si-NC)、si-FGD5-AS1 组(转染 si-FGD5-AS1)、si-FGD5-AS1+NC inhibitor 组(共转染 si-FGD5-AS1 和 NC inhibitor)和 si-FGD5-AS1+miR-129-5p inhibitor 组(共转染 si-FGD5-AS1 和 miR-129-5p inhibitor),转染按照 Lipofectamine 3000 说明书进行。转染 48 h 后,收集细胞。

1.3.5 细胞增殖能力检测

CCK-8 法:转染后的 CAL-27 细胞置于 96 孔板

中。在培养 24、48、72 和 96 h 后用 CCK-8 检测细胞活力。最后,通过酶标仪记录 450 nm 处的光密度(OD)值。以 OD 值代表细胞增殖活力(简称细胞活力)。克隆形成实验:将细胞以每孔 300 个细胞的密度接种到 6 孔板中,在细胞培养箱中培养 14 d。当克隆体肉眼可见时,培养终止。弃去培养基,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫染色 15 min。在显微镜下观察并计数细胞克隆数(>50 个细胞)。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将各组 CAL-27 细胞重悬于 100 μL 结合缓冲液中,分别与 5 μL FITC-Annexin V 染色液和 5 μL PI 染色液一起孵育 10 min,使用 FACSCalibur 流式细胞仪评估细胞凋亡。

1.3.7 划痕愈合实验检测细胞迁移能力

将各组 CAL-27 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h。当细胞铺满 80%以上的板后,用无菌移液管划伤单层细胞,观察划痕并拍照。然后,将 CAL-27 细胞在无血清 DMEM 培养基中继续培养 24 h,再次观察划痕并拍照。使用 Image J 软件计算划痕愈合率。划痕愈合率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。

1.3.8 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

将各组 CAL-27 细胞重悬在无血清培养基中,取 200 μL 细胞悬液(2×10⁴ 个细胞)加入到预涂有基质胶的上室,下室加入 600 μL 含 10%胎牛血清的培养基。孵育 24 h 后,将附着在膜下表面的细胞分别用甲醇和结晶紫固定和着色。在显微镜下随机选取 5 个视野进行入侵细胞计数。

1.3.9 双荧光素酶报告实验验证 FGD5-AS1 与 miR-129-5p 的靶向关系

将 WT-FGD5-AS1/MUT-FGD5-AS1 克隆到 pmirGLO 双荧光素酶载体中,构建 pmirGLO-WT-FGD5-AS1/MUT-FGD5-AS1 重组载体。将 pmirGLO-WT-FGD5-AS1/MUT-FGD5-AS1 载体分别与 miR-129-5p mimic 或 NC mimic 共转染至 CAL-27 细胞。采用双荧光素酶报告分析系统对荧光素酶活性进行评估。

1.3.10 Western blot 检测 HMGB1 蛋白水平

从 OSCC 组织和细胞中提取总蛋白。蛋白质用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到聚偏二氟乙烯膜上,用 5%脱脂牛奶封闭膜 1 h。随后,将膜与抗 HMGB1、β-actin 的一抗 4℃下孵育过夜,再与二抗孵育 1 h。显影,使用 ImageJ 软件计

算 HMGB1 蛋白表达,β-actin 为内参。

1.3.11 裸鼠移植瘤实验

将转染阴性对照(sh-NC)、sh-FGD5-AS1、miR-129-5p inhibitor 或 sh-FGD5-AS1 与 miR-129-5p inhibitor 共转染的 CAL-27 细胞(5×10⁶)皮下注射至 BALB/c 裸鼠(n=5),记为 sh-NC 组、sh-FGD5-AS1 组、miR-129-5p inhibitor 组和 sh-FGD5-AS1 + miR-129-5p inhibitor 组。每周记录移植瘤的宽度和长度,计算肿瘤体积:肿瘤体积=(长×宽²)/2。5 周后处死小鼠,取肿瘤称重。将肿瘤组织一部分固定后制备石蜡切片,切片经常规脱蜡后进行 Ki67、HMGB1 免疫组化染色,另一部分进行匀浆检测 FGD5-AS1 和 miR-129-5p 表达。

1.4 统计学方法

SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料符合正态分布以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TANRIC 数据库分析 FGD5-AS1、miR-129-5p 在 OSCC 中的表达

TANRIC 平台数据挖掘显示,在 OSCC 肿瘤组织中 FGD5-AS1 的表达水平是正常组织的 4 倍,见表 1。288 份 OSCC RNA-seq 样本中,FGD5-AS1 表达与 OSCC 患者 G 级较差相关,见表 2。

表 1 TANRIC 平台获得的人类 OSCC 组织和正常组织中 FGD5-AS1 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Expression level of FGD5-AS1 in human OSCC tissues and normal tissues obtained from TANRIC platform		
组织 Organization	<i>n</i>	FGD5-AS1
正常组织 Normal tissue	38	0.36±0.12
肿瘤组织 Tumor tissue	297	1.29±0.35
<i>t</i>	/	16.239
<i>P</i>	/	0.000

表 2 不同分级 OSCC 组织中 FGD5-AS1 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression level of FGD5-AS1 in OSCC tissues of different grades

级别 Classification	<i>n</i>	FGD5-AS1
G1	43	0.79±0.18
G2	178	0.98±0.25*
G3	62	1.32±0.41*
G4	5	1.51±0.43*

注:与 G1 比较,**P*<0.05。
Note. Compared with G1,**P*<0.05.

2.2 FGD5-AS1、miR-129-5p 在 OSCC 中的表达

与正常组织相比,肿瘤组织中 FGD5-AS1 表达显著增加,miR-129-5p 表达显著减少($P<0.05$),见表 3。与人口腔黏膜细胞 HOK 相比,OSCC 细胞系 SCC-9、HSC-4、SCC-25、CAL-27 中 FGD5-AS1 表达明显升高,miR-129-5p 表达显著降低($P<0.05$),且 CAL-27 细胞中 FGD5-AS1 表达水平最高、miR-129-5p 表达最低,因此选择 CAL-27 细胞进行后续实验,见表 4。

2.3 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞增殖的影响

si-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞中的 FGD5-AS1 表达量、OD 值(48 h、72 h、96 h)、克隆细胞数显著低于 Control 组和 si-NC 组($P<0.05$),见表 5 和图 1。

2.4 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞凋亡、迁移、侵袭的影响

与 Control 组和 si-NC 组比较,si-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞凋亡率明显上升,划痕愈合率明显降低,侵袭细胞数显著减少($P<0.05$),见表 6 和图 2。

2.5 FGD5-AS1 靶向调控 miR-129-5p 表达

Starbase 软件预测显示 FGD5-AS1 与 miR-129-5p 可能存在相互作用关系,具体的结合位点如图 3A 所示。与 NC mimics + WT-FGD5-AS1 组比较,miR-129-5p mimics + WT-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞的相对荧光素酶活性明显降低($P<0.05$),而 NC mimics + MUT-FGD5-AS1 组与 miR-129-5p mimics +

表 3 FGD5-AS1、miR-129-5p 在 OSCC 组织中的表达水平($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 3 Expression level of FGD5-AS1 and miR-129-5p in OSCC tissues

组织 Organization	FGD5-AS1	miR-129-5p
正常组织 Normal tissue	2.13±0.34	2.43±0.31
肿瘤组织 Tumor tissue	4.78±0.59	0.89±0.12
<i>t</i>	21.315	25.375
<i>P</i>	0.000	0.000

表 4 FGD5-AS1、miR-129-5p 在 OSCC 细胞系中的表达水平($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Expression level of FGD5-AS1 and miR-129-5p in OSCC cell line

细胞系 Cell line	FGD5-AS1	miR-129-5p
HOK	1.00±0.03	1.03±0.08
SCC-9	2.46±0.12 [*]	0.45±0.04 [*]
HSC-4	3.47±0.23 [*]	0.42±0.06 [*]
SCC-25	4.35±0.29 [*]	0.39±0.05 [*]
CAL-27	5.12±0.34 [*]	0.35±0.03 [*]

注:与 HOK 比较,^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with HOK, ^{*} $P<0.05$.

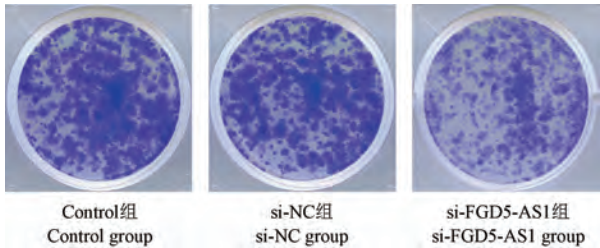


图 1 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞克隆细胞数的影响

Figure 1 Effect of interfering with FGD5-AS1 on the number of OSCC cell clones

表 5 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of FGD5-AS1 interference on OSCC cell proliferation

组别 Groups	FGD5-AS1	OD 值(450 nm) OD value (450 nm)				克隆细胞数(n) Number of cloned cells
		24 h	48 h	72 h	96 h	
Control 组 Control group	1.00±0.06	0.46±0.03	0.75±0.09	1.16±0.13	1.40±0.25	489.52±56.23
si-NC 组 si-NC group	0.99±0.05	0.49±0.05	0.78±0.11	1.14±0.15	1.42±0.23	488.94±56.12
si-FGD5-AS1 组 si-FGD5-AS1 group	0.21±0.02 ^{**}	0.47±0.06	0.53±0.08 ^{**}	0.67±0.12 ^{**}	0.75±0.16 ^{**}	245.61±37.45 ^{**}

注:与 Control 组比较,^{*} $P<0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with si-NC group, [#] $P<0.05$.

表 6 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞凋亡、迁移、侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of FGD5-AS1 interference on apoptosis, migration and invasion of OSCC cells

组别 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate	划痕愈合率(%) Scratch healing rate	侵袭细胞数(n) Number of invasive cells
Control 组 Control group	3.74±0.13	83.45±9.21	89.26±10.15
si-NC 组 si-NC group	3.72±0.17	84.16±9.34	88.47±10.24
si-FGD5-AS1 组 si-FGD5-AS1 group	8.69±0.35 ^{**}	37.58±2.57 ^{**}	28.76±1.89 ^{**}

注:与 Control 组比较,^{*} $P<0.05$;与 si-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with Control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with si-NC group, [#] $P<0.05$.

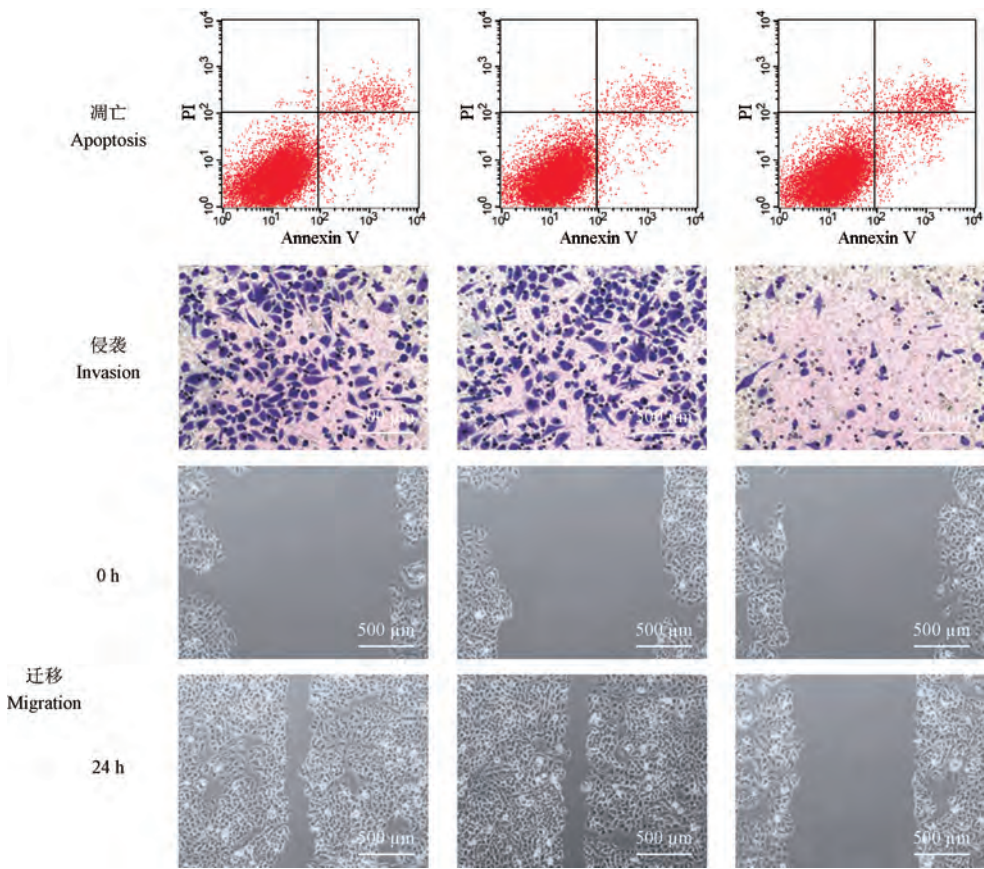
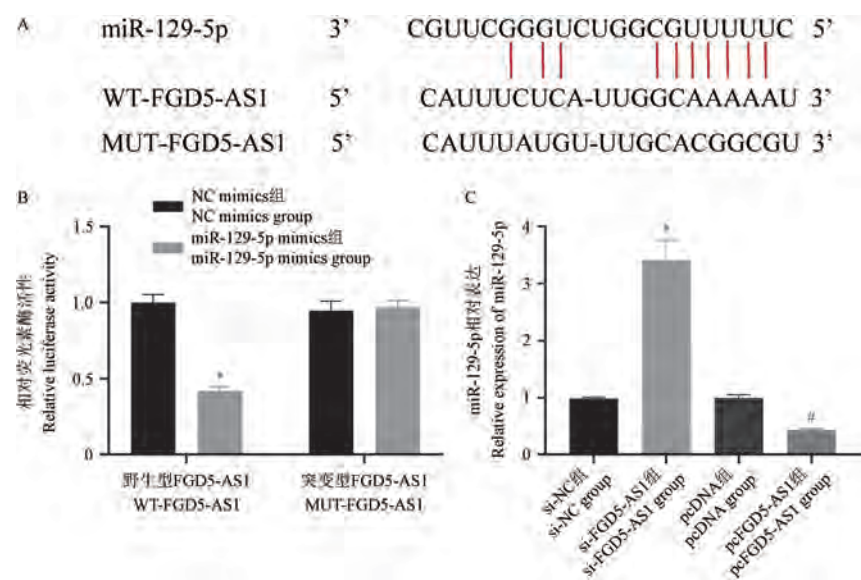


图 2 干扰 FGD5-AS1 对 OSCC 细胞凋亡、侵袭和迁移的影响

Figure 2 Interference of FGD5-AS1 on apoptosis, invasion and migration of OSCC cells



注:A:FGD5-AS1 与 miR-129-5p 的结合位点;B:验证 FGD5-AS1 与 miR-129-5p 靶向关系的双荧光素酶活性检测结果,与 NC mimics+WT-FGD5-AS1 组相比,* $P<0.05$;C:FGD5-AS1 靶向调控 miR-129-5p 表达,与 si-NC 组相比,* $P<0.05$;与 pcDNA 组相比,# $P<0.05$ 。

图 3 FGD5-AS1 靶向调控 miR-129-5p 表达

Note. A, Binding site of FGD5-AS1 and miR-129-5p. B, Results of dual luciferase activity detection to verify the targeting relationship between FGD5-AS1 and miR-129-5p. Compared with NC mimics+WT-FGD5-AS1 group, * $P<0.05$. C, FGD5-AS1 targeted miR-129-5p expression. Compared with si-NC group, * $P<0.05$. Compared with pcDNA group, # $P<0.05$.

Figure 3 FGD5-AS1 targeted regulation of miR-129-5p expression

MUT-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞的相对荧光素酶活性无明显变化 ($P>0.05$), 见图 3B。与 si-NC 组比较, si-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞中 miR-129-5p 表达升高 ($P<0.05$); 与 pcDNA 组比较, pc-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞中 miR-129-5p 表达降低 ($P<0.05$), 见图 3C。

2.6 抑制 miR-129-5p 可逆转 si-FGD5-AS1 对 OSCC 细胞的影响

与 si-FGD5-AS1 组和 si-FGD5-AS1+NC inhibitor 组相比, si-FGD5-AS1+miR-129-5p inhibitor 组 CAL-27 细胞中 miR-129-5p 表达显著降低, 48 h、72 h 和

96 h 的 OD 值显著升高, 克隆细胞数明显增多, 细胞凋亡率明显下降, 划痕愈合率显著增加, 侵袭细胞数显著增多 ($P<0.05$), 见图 4 和表 7。

2.7 FGD5-AS1 通过 miR-129-5p 调控 HMGB1 蛋白表达

与 Control 组和 si-NC 组相比, si-FGD5-AS1 组 CAL-27 细胞中 HMGB1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 与 si-FGD5-AS1 组和 si-FGD5-AS1 + NC inhibitor 组相比, si-FGD5-AS1 + miR-129-5p inhibitor 组 CAL-27 细胞中 HMGB1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), 见图 5。

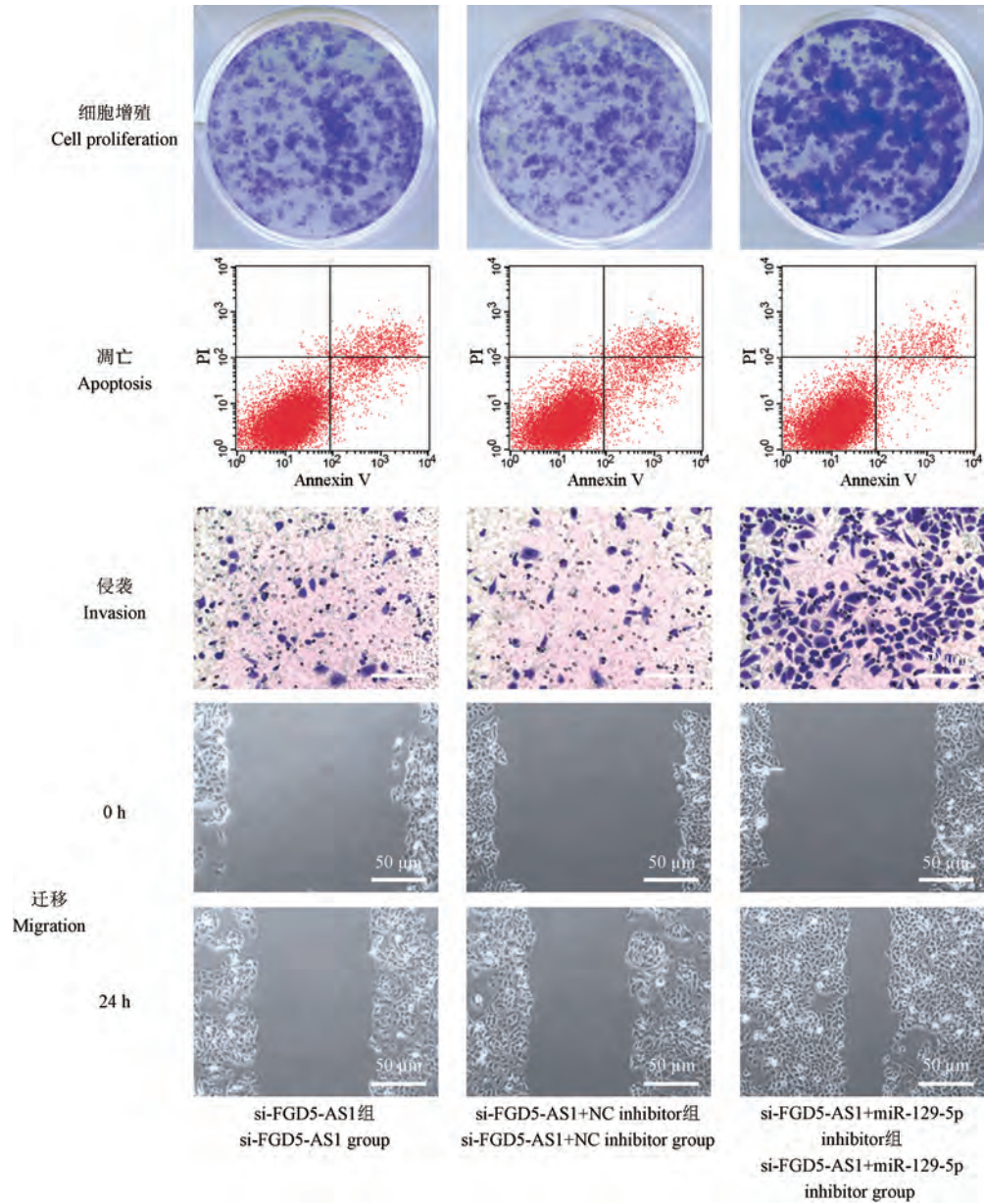


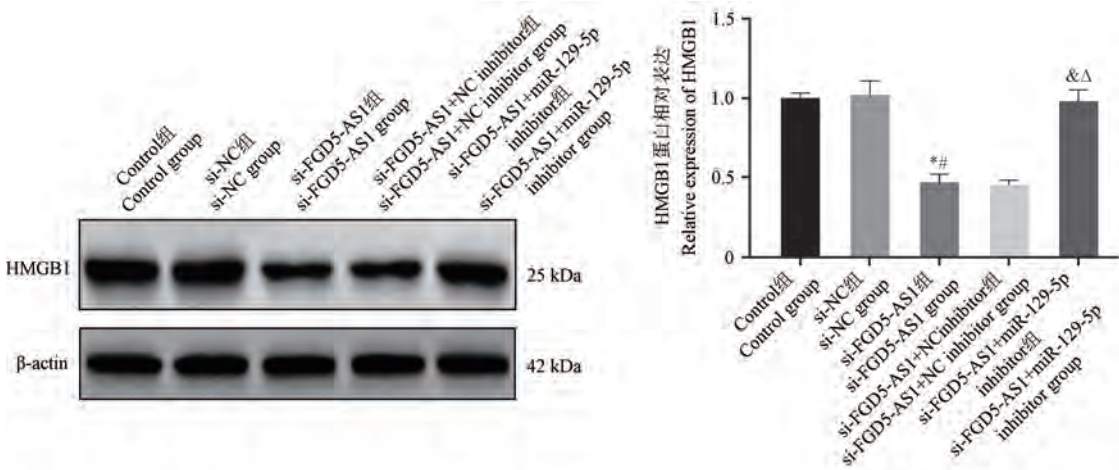
图 4 抑制 miR-129-5p 可逆转 si-FGD5-AS1 对 OSCC 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响

Figure 4 Inhibition of miR-129-5p can reverse the proliferation, apoptosis, invasion and migration of si-FGD5-AS1 on OSCC cells

表 7 抑制 miR-129-5p 可逆转 si-FGD5-AS1 对 OSCC 细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 7 Inhibition of miR-129-5p can reverse the effect of si-FGD5-AS1 on OSCC cells

组别 Groups	miR-129-5p	OD 值(450 nm)OD value (450 nm)				克隆细胞 数(<i>n</i>) Number of cloned cells	凋亡率 (%) Apoptosis rate	划痕 愈合率(%) Scratch healing rate	侵袭 细胞数(<i>n</i>) Number of invasive cells
		24 h	48 h	72 h	96 h				
si-FGD5-AS1	3.38±0.32	0.48±0.04	0.55±0.10	0.69±0.14	0.78±0.17	245.74±38.21	8.57±0.29	36.75±2.63	29.46±2.04
si-FGD5-AS1 +NC inhibitor	3.36±0.34	0.49±0.03	0.54±0.09	0.68±0.13	0.76±0.18	246.15±38.67	8.61±0.32	36.94±2.59	28.85±1.96
si-FGD5-AS1 +miR-129-5p inhibitor	1.21±0.15 ^{*#}	0.51±0.07	0.81±0.16 ^{*#}	1.21±0.16 ^{*#}	1.45±0.27 ^{*#}	497.89±86.52 ^{*#}	4.03±0.11 ^{*#}	84.24±5.62 ^{*#}	91.26±7.38 ^{*#}

注:与 si-FGD5-AS1 组相比, ^{*}*P*<0.05;与 si-FGD5-AS1+NC inhibitor 组相比, [#]*P*<0.05。
Note. Compared with si-FGD5-AS1 group, ^{*}*P*<0.05. Compared with si-FGD5-AS1+NC inhibitor group, [#]*P*<0.05.



注:与 Control 组相比, ^{*}*P*<0.05;与 si-NC 组相比, [#]*P*<0.05;与 si-FGD5-AS1 组相比, [&]*P*<0.05;与 si-FGD5-AS1+NC inhibitor 组相比, ^Δ*P*<0.05。

图 5 各组 OSCC 细胞中 HMGB1 蛋白表达

Note. Compared with Control group, ^{*}*P*<0.05. Compared with si-NC group, [#]*P*<0.05. Compared with si-FGD5-AS1 group, [&]*P*<0.05. Compared with si-FGD5-AS1+NC inhibitor group, ^Δ*P*<0.05.

Figure 5 HMGB1 protein expression in OSCC cells of each group

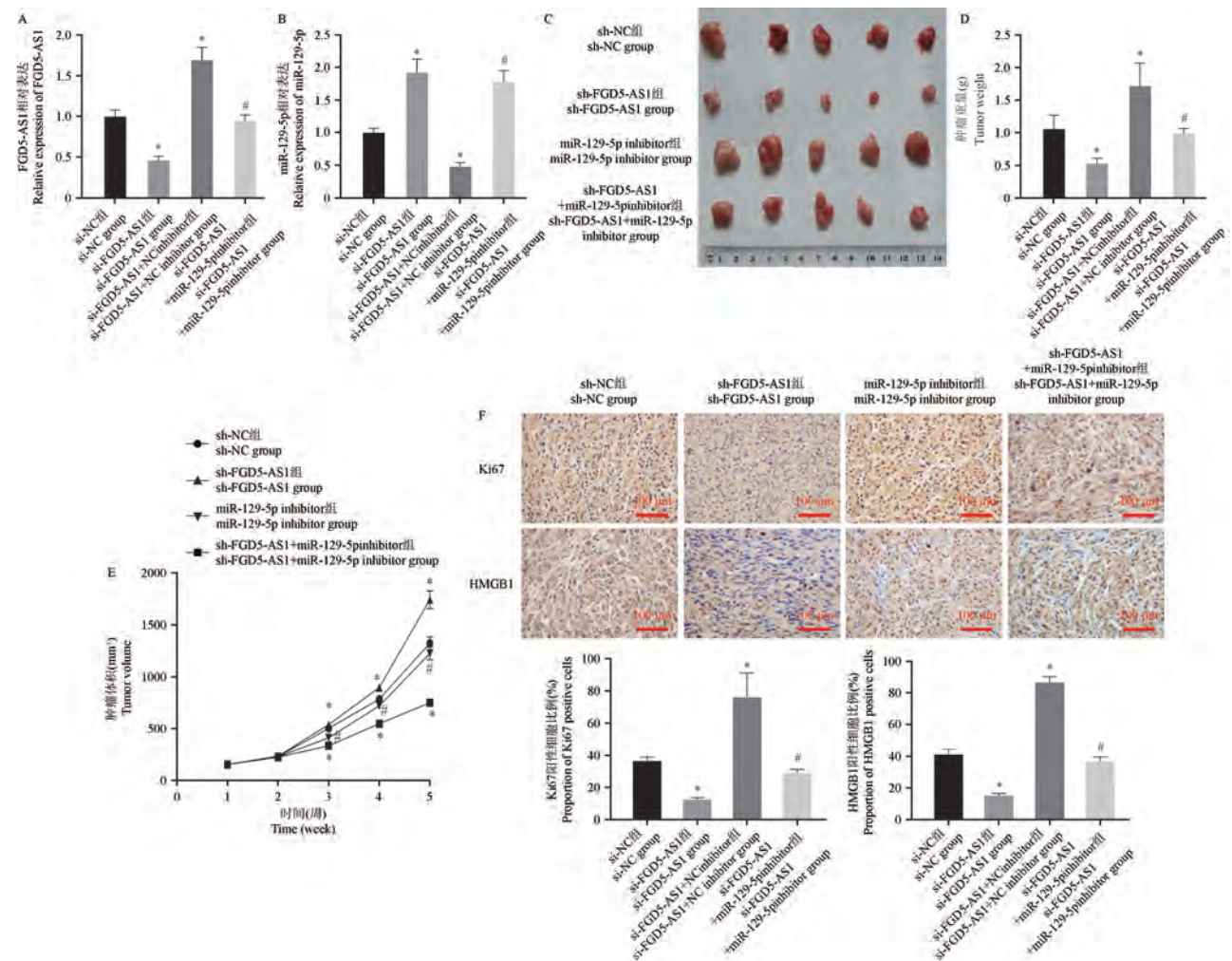
2.8 FGD5-AS1 通过靶向 miR-129-5p/HMGB1 促进体内 OSCC 进展

结果如图 6 所示,与 sh-NC 组相比,sh-FGD5-AS1 组肿瘤重量和肿瘤体积、FGD5-AS1 表达及 Ki67、HMGB1 阳性细胞比例显著降低,miR-129-5p 表达显著升高(*P*<0.05),而 miR-129-5p inhibitor 组肿瘤重量和肿瘤体积、FGD5-AS1 表达及 Ki67、HMGB1 阳性细胞比例显著升高,miR-129-5p 表达显著降低(*P*<0.05);与 sh-FGD5-AS1 组相比,sh-FGD5-AS1+miR-129-5p inhibitor 组和 miR-129-5p inhibitor 组肿瘤重量和肿瘤体积、FGD5-AS1 表达及 Ki67、HMGB1 阳性细胞比例显著升高,miR-129-5p 表达显著降低(*P*<0.05)。

3 讨论

LncRNA 已被报道与 OSCC 有关^[15-16]。有报道显示 FGD5-AS1 为 OSCC 的潜在诊断生物标志物,FGD5-AS1 的敲低可抑制 OSCC 细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究通过 TANRIC 平台的数据挖掘发现,FGD5-AS1 在 OSCC 中呈高表达,且与预后不良相关^[10]。此外,本研究还发现,OSCC 组织样本和细胞系中 FGD5-AS1 表达升高,敲低 FGD5-AS1 后,CAL-27 细胞增殖活力、迁移和侵袭能力均受到抑制,细胞凋亡增加,这与以往的研究结果一致,提示 FGD5-AS1 可能在 OSCC 中起促癌基因作用^[10]。

LncRNA 可以海绵吸附调节 miRNA 表达,进而



注:A、B:移植瘤组织中 FGD5-AS1 和 miR-129-5p 相对表达水平;C:不同组皮下肿瘤的代表性图像;D:肿瘤重量比较;E:肿瘤体积比较;F:免疫组化方法检测肿瘤组织中 Ki67、HMGB1 阳性表达。与 sh-NC 组相比,* $P<0.05$;与 sh-FGD5-AS1 组相比,# $P<0.05$ 。

图 6 FGD5-AS1 通过靶向 miR-129-5p/HMGB1 促进体内 OSCC 进展

Note. A/B, Relative expression levels of FGD5-AS1 and miR-129-5p in transplanted tumor tissues. C, Representative images of subcutaneous tumors in different groups. D, Tumor weight comparison. E, Tumor volume comparison. F, Positive expressions of Ki67 and HMGB1 in tumor tissues were detected by immunohistochemical method. Compared with sh-NC group, * $P<0.05$. Compared with sh-FGD5-AS1 group, # $P<0.05$.

Figure 6 FGD5-AS1 promotes OSCC progression in vivo by targeting miR-129-5p/HMGB1

调控癌症进展^[17]。miR-129-5p 可作为抑癌因子阻碍胃癌、肺癌、乳腺癌等发展^[18-20]。在本研究中,miR-129-5p 在 OSCC 组织和细胞中的表达均下降,这与 Supic 等^[14]的研究结果一致,说明 miR-129-5p 在 OSCC 中发挥抑癌作用。研究证实,在胶质瘤细胞中 FGD5-AS1 通过调控 miR-129-5p 刺激 Wnt/ β -catenin 信号通路进而促进细胞生长和侵袭^[21]。本研究发现 miR-129-5p 与 FGD5-AS1 的表达趋势相反,Starbase 软件预测 miR-129-5p 可能是 FGD5-AS1 的靶基因。本研究通过双荧光素酶实验和过表达/敲低 FGD5-AS1 实验证实了 FGD5-AS1 和 miR-129-5p 的负向调控关系。此外,抑制 miR-129-5p 可减

弱敲低 FGD5-AS1 的肿瘤抑制作用,提示敲低 FGD5-AS1 可能通过上调 miR-129-5p 表达,抑制 OSCC 细胞的恶性生物学行为。

本研究通过数据库预测和查阅文献发现, HMGB1 是 miR-129-5p 的靶基因^[12], Western blot 证实干扰 FGD5-AS1 在上调 miR-129-5p 表达的同时可抑制 HMGB1 蛋白表达。为了进一步验证 FGD5-AS1/miR-129-5p/HMGB1 轴在 OSCC 中的作用,本研究建立了体内异种移植瘤模型,发现沉默 FGD5-AS1 可通过调控 miR-129-5p/HMGB1 轴来减弱 OSCC 细胞的肿瘤发生,与体外结果一致,提示 FGD5-AS1 通过调控 miR-129-5p/HMGB1 促进

OSCC 进展。但尚需设计 HMGB1 过表达以确定 FGD5-AS1/miR-129-5p 在异种移植模型 OSCC 中的作用。

综上所述,FGD5-AS1 在 OSCC 中表达上调,干扰 FGD5-AS1 可通过靶向负调控 miR-129-5p 表达,抑制 OSCC 细胞增殖、侵袭和迁移并促进凋亡。本研究为 FGD5-AS1 在 OSCC 中的机制研究提供新依据,有望为 OSCC 患者提供一种潜在的治疗策略。然而,miR-129-5p 下游的靶点众多,FGD5-AS1/miR-129-5p 能否通过其他靶基因参与 OSCC 进展尚需进一步探究。此外,本研究仅使用一种细胞系进行 FGD5-AS1 功能研究,后期将通过其他 OSCC 细胞来进一步验证 FGD5-AS1 的致癌作用。

参考文献:

[1] Dhumal SN, Choudhari SK, Patankar S, et al. Cancer stem cell markers, CD44 and ALDH1, for assessment of cancer risk in OPMDs and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck Pathol*, 2022, 16(2): 453-465.

[2] 杜永秀, 杨琴, 杨晨希, 等. hBD-3 和 NF- κ B p65 在口腔潜在恶性病变和口腔鳞状细胞癌中的表达及意义 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18(17): 25-28, 35.

[3] Vos JL, Elbers JBW, Krijgsman O, et al. Neoadjuvant immunotherapy with nivolumab and ipilimumab induces major pathological responses in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7348.

[4] Fukumoto C, Uchida D, Kawamata H. Diversity of the origin of cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications [J]. *Cancers*, 2022, 14(15): 3588.

[5] Jin KT, Yao JY, Fang XL, et al. Roles of lncRNAs in cancer: focusing on angiogenesis [J]. *Life Sci*, 2020, 252: 117647.

[6] Tang Y, Li C, Zhang YJ, et al. Ferroptosis-Related Long Non-Coding RNA signature predicts the prognosis of Head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(3): 702-711.

[7] Song K, Yu P, Zhang C, et al. The LncRNA FGD5-AS1/miR-497-5p axis regulates septin 2 (SEPT2) to accelerate cancer progression and increase cisplatin-resistance in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2021, 60(7): 469-480.

[8] Su D, Ji Z, Xue P, et al. Long-noncoding RNA FGD5-AS1 enhances the viability, migration, and invasion of glioblastoma cells by regulating the miR-103a-3p/TPD52 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6317-6329.

[9] Fang K, Xu ZJ, Jiang SX, et al. lncRNA FGD5-AS1 promotes breast cancer progression by regulating the hsa-miR-195-5p/NUAK2 axis [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(6): 460.

[10] Liu L, Zhan Y, Huang Y, et al. LncRNA FGD5-AS1 can be predicted as therapeutic target in oral cancer [J]. *J Oral Pathol Med*, 2020, 49(3): 243-252.

[11] Chen H, Liu X, Jin Z, et al. A three miRNAs signature for predicting the transformation of oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(8): 1403-1413.

[12] Feng J, Guo J, Wang JP, et al. miR-129-5p inhibits proliferation of gastric cancer cells through targeted inhibition on HMGB1 expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(7): 3665-3673.

[13] Min HJ, Suh KD, Lee YH, et al. Cytoplasmic HMGB1 and HMGB1-Becclin1 complex are increased in radioresistant oral squamous cell carcinoma [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 57(3): 219-225.

[14] Supic G, Kozomara R, Zeljic K, et al. HMGB1 genetic polymorphisms in oral squamous cell carcinoma and oral lichen planus patients [J]. *Oral Dis*, 2015, 21(4): 536-543.

[15] Wu C, Chen W, Yu F, et al. Long noncoding RNA *HITTERS* protects oral squamous cell carcinoma cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via promoting MRE11-RAD50-NBS1 complex formation [J]. *Adv Sci*, 2020, 7(22): 2002747.

[16] Gao L, Wang S, Meng J, et al. LncRNA LUADT1 promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation by regulating miR-34a/GAS1 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 3401-3407.

[17] 赵建刚, 赵光远, 鲍双振, 等. LncRNA SNHG16 通过 miR-106b-5p/PHF1 轴调节结直肠癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(2): 56-65.

[18] Tu XP, Li H, Chen LS, et al. OTX1 exerts an oncogenic role and is negatively regulated by miR129-5p in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 794.

[19] Li G, Xie J, Wang J. Tumor suppressor function of miR-129-5p in lung cancer [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6): 5777-5783.

[20] Wu D, Zhu J, Fu Y, et al. LncRNA HOTAIR promotes breast cancer progression through regulating the miR-129-5p/FZD7 axis [J]. *Cancer Biomark*, 2021, 30(2): 203-212.

[21] Wu L, Zhu X, Song Z, et al. FGD5-AS1 facilitates glioblastoma progression by activation of Wnt/ β -catenin signaling via regulating miR-129-5p/HNRNPK axis [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117998.

[收稿日期] 2022-12-23

孔露娇,王心,刘静,等. 金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 88-95.

Kong LJ, Wang X, Liu J, et al. Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 88-95.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.012

金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响

孔露娇,王 心,刘 静,郭晓阳,薛明伟*

(邢台市人民医院肾内科,河北 邢台 054000)

【摘要】 目的 探究金丝桃苷(Hyp)对肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)大鼠肾自噬及 AMPK/mTOR/ULK1 通路的影响。**方法** 32 只 6 周龄 SD 大鼠分为正常组(N 组)、肾病综合征组(NS 组)、金丝桃苷组(Hyp 组, 60 mg/kg Hyp)、金丝桃苷+AMPK 抑制剂组(Hyp+CC 组, 60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC),每组 8 只。除 N 组外,其余各组大鼠采用一次性尾静脉注射阿霉素(6.5 mg/kg)建立 NS 模型,模型成功率为 75.0%。Hyp 组大鼠灌胃给予 60 mg/kg 的 Hyp,Hyp+CC 组给予 60 mg/kg 的 Hyp 灌胃和 0.2 mg/kg CC 腹腔注射,N 组和 NS 组给予等量溶剂,每天 1 次,连续 14 d。给药结束后,全自动分析仪检测 24 h 尿液总蛋白(UTP)、血尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)和白蛋白(ALB)水平;HE 染色观察肾组织病理形态;透射电子显微镜(TEM)观察肾组织超微结构变化;Western blot 检测肾中自噬、足细胞及 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白表达;免疫荧光染色观察自噬体和足细胞的定位。**结果** 相比于 N 组,NS 组肾小球体积变大、肾小管萎缩或部分消失、基底膜增厚;UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值显著增加($P<0.05$),ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低($P<0.05$)。相比于 NS 组,Hyp 治疗可改善肾小球形态,降低 UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值($P<0.05$),增加 ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值($P<0.05$)。相比于 Hyp 组,Hyp+CC 组肾小球体积变大、肾小管萎缩或部分消失、基底膜增厚;UTP、BUN、Scr、基底膜厚度、足突宽度及 p-AMPK/AMPK 比值显著增加($P<0.05$),ALB、LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2 蛋白水平、NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度及 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低($P<0.05$)。**结论** Hyp 可能通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 通路促进肾细胞自噬活性,减轻 NS 大鼠的足细胞损伤等肾病变。

【关键词】 金丝桃苷;肾病综合征;AMPK/mTOR/ULK1 通路;自噬;足细胞损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0088-08

Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway

KONG Lujiao, WANG Xin, LIU Jing, GUO Xiaoyang, XUE Mingwei*

(Department of Nephrology, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of hypericin (Hyp) on renal autophagy and the AMPK/mTOR/ULK1 pathway in nephrotic syndrome (NS) rats. **Methods** Thirty-two 6-week-old SD rats were grouped into normal (N), NS, Hyp (60 mg/kg Hyp), and Hyp+CC (60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC AMPK inhibitor) groups, with eight rats per group. The NS model was established by one-time injection of adriamycin (6.5 mg/kg) through the tail vein,

[基金项目] 邢台市科技计划项目(2019ZC214)。

[作者简介] 孔露娇(1986—),女,硕士,研究方向:肾病综合征及肾衰竭的诊治。E-mail: 448626740@qq.com

[通信作者] 薛明伟(1985—),男,硕士,研究方向:原发性膜性肾病及急性肾衰竭。E-mail: 258417587@qq.com

and the success rate of the model was 75.0%. Rats in the Hyp group were given 60 mg/kg Hyp intragastric administration; rats in the Hyp+CC group were given 60 mg/kg Hyp intragastric administration and 0.2 mg/kg CC intraperitoneal injection; and rats in the N and NS groups were given the same amount of solvent once a day for 14 days. After administration, an automatic analyzer was applied to detect the levels of 24-h urine total protein (UTP), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), and albumin (ALB). HE staining was used to observe the pathological morphology of the kidney tissue. The ultrastructure of the renal tissue was observed by transmission electron microscope. Western blot was applied to detect the expression of autophagy, podocyte, and AMPK/mTOR/ULK1 pathway proteins in the kidney. Immunofluorescence staining was applied to visualize the localization of autophagosomes and podocytes. **Results** Compared with the N group, the NS group had increased glomerular volume; atrophied or partially disappeared renal tubules; a thickened basement membrane; and obviously increased UTP, BUN and Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ratio ($P<0.05$), while the levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7 and NPHS2; the relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios were obviously decreased ($P<0.05$). Compared with the NS group, the Hyp treatment group had improved glomerular morphology and decreased UTP, BUN, and Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ($P<0.05$) ratio, but there was an increase in the protein levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7, NPHS2; relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios ($P<0.05$). Compared with the Hyp group, the Hyp+CC group's glomerular volume increased; renal tubules atrophied or partially disappeared; basement membrane thickened; and UTP, BUN, Scr levels, basement membrane thickness, foot process width, and p-AMPK/AMPK ratio were obviously increased ($P<0.05$), whereas the protein levels of ALB, LC3-II/I, Beclin-1, Atg5, Atg7, and NPHS2; relative fluorescence intensity of NPHS2 and Beclin-1; and p-AMPK/AMPK and p-ULK1/ULK1 ratios were obviously decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Hyp may enhance the autophagic activity of renal cells and attenuate renal pathology, such as podocyte injury, in NS rats by activating the AMPK/mTOR/ULK1 pathway.

[Keywords] hyperoside; nephrotic syndrome; AMPK/mTOR/ULK1 pathway; autophagy; podocyte injury

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

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是由于基底膜受损和肾小球通透性增加等导致的临床综合征,多伴随水肿、蛋白尿和低白蛋白血症等症状,若不能有效纠正,可能导致感染、血栓形成、肾功能衰竭等,威胁患者生命^[1]。尽管多数患者对类固醇有反应,但是易复发,且长期服用类固醇的患者面临耐药、全身感染、骨质疏松等并发症的风险^[2],因此,有必要开发新型治疗药物。据报道,感染、过量药物等病理生理压力会导致足细胞损伤,损害肾小球的滤过功能,使得蛋白质等未经过滤直接进入尿液,导致蛋白尿症状^[3-4]。与 NS 相对应的动物模型是目前国际公认的大鼠阿霉素肾性水肿模型,与临床 NS 患者肾活检结果相似,是经典的研究 NS 的动物模型,基于该模型可筛选治疗肾病相关中药的药效评价。足细胞丢失后无法通过增殖恢复数量,但在其脱落前及时给予药物干预,能让足细胞恢复到健康状态^[5]。据报道,自噬功能障碍会导致足细胞损伤,而 AMP 活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/unc-51 样自噬激活激酶 1 (AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/unc-51 like autophagy activating kinase 1, AMPK/mTOR/

ULK1)通路的活化可诱导自噬^[6],可能是防止足细胞衰老和损伤的保护机制,有望成为 NS 的治疗策略。金丝桃苷(hyperoside, Hyp)为桔梗科、豆科、金丝桃科等植物的天然活性物,具有抗炎、调节自噬、抑氧化及肾保护等活性^[7]。研究显示, Hyp 可通过抑制线粒体分裂减轻足细胞损伤,改善糖尿病肾病大鼠的肾炎症、肾小球硬化等损伤^[8-9],但其对足细胞自噬的调节作用鲜见报道。本研究拟构建 NS 大鼠模型,探讨 Hyp 对 NS 大鼠足细胞自噬和 AMPK/mTOR/ULK1 通路的影响,以进一步揭示 Hyp 对 NS 的治疗机制,为 Hyp 的开发提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

32 只雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 190~205 g, 6 周龄(北京维通利华实验动物公司[SCXK(京)2019-0009])。统一在河北医科大学实验动物中心[SYXK(冀)2020-0002]的动物房中分笼饲养,温度(25.0±1.0)℃、湿度(46.0±2.0)%,昼/夜循环设为 12 h/12 h, 确保自由获取水和食物。本研究通过河北医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-

202103008)。实验动物饲养和实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

金丝桃苷 (Hyp, $\geq 95\%$ 纯度) (美国 Merck 公司, 批号: 20200405); AMPK 抑制剂 Compound C (CC) (美国 MCE 公司, 批号: 20200811); 阿霉素 (每支 10 mg, 深圳万乐药业有限公司, 批号: 1905E1); HE 试剂盒、电泳预制胶 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C0105S、P0539S); 兔源抗 pAMPK、AMPK、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、自噬相关蛋白 5 (Autophagy associated protein 5, Atg5)、Atg7、pmTOR、mTOR 抗体 (美国 CST 公司, 批号: #2535、#2532、#4108、#5174、#12994、#8558、#5536、#2983); 兔源 NPHS2、pULK1、ULK1 抗体、小鼠源 Beclin-1 抗体、羊抗兔 (Cy3) 和羊抗小鼠 (Alexa Flour 488) 荧光二抗 (美国 Proteintech 公司, 批号: 20384-1-AP、29006-1-AP、20986-1-AP、66665-1-Ig、SA00009-2、SA00006-1)。带荧光组件的光学显微镜 (德国 Leica 公司); 7100 型全自动生化分析仪、透射电子显微镜 (日本 HITACHI 公司); 全自动生化分析仪 (美国 BECKMAN 公司); 转膜及电泳仪器 (美国 BioRad 公司); 7500 型 RT-qPCR 仪 (美国 ABI 公司); MDF-392 型超低温冰箱 (日本 SONY 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 NS 大鼠模型建立及分组

将 6 周龄 SD 大鼠适应喂养至 7 周龄, 分为正常组 (N 组)、肾病综合征组 (NS 组)、金丝桃苷组 (Hyp 组, 60 mg/kg Hyp)、金丝桃苷 + AMPK 抑制剂组 (Hyp+CC 组, 60 mg/kg Hyp+0.2 mg/kg CC), 每组 8 只。除 N 组的 8 只外, 其他大鼠一次性尾静脉注射 6.5 mg/kg 阿霉素建立 NS 大鼠模型^[10]。末次阿霉素注射 14 d 后, 尾静脉采血检测血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 水平, 并收集大鼠 24 h 尿液, 检测尿蛋白含量。以建模大鼠 BUN 和 Scr 水平显著高于 N 组大鼠, 且 24 h 尿蛋白量 >100 mg 为模型复制成功。实验共采用 32 只大鼠造模, 在造模过程中有 5 只大鼠死亡, 3 只大鼠造模失败, 共成功造模 24 只大鼠, 模型成功率为 75.0%。Hyp 剂量 (溶在 1% 羧甲基纤维素钠中) 根据文献^[9]和体表面积法确定为 60 mg/kg 且预实验显示 60 mg/kg Hyp 灌胃可有效减轻 NS 大鼠

肾损伤; 抑制剂 CC 剂量根据文献^[11]确定为 0.2 mg/kg, N 组和 NS 组给予等量 1% 羧甲基纤维素钠灌胃和生理盐水腹腔注射。每天 1 次, 连续 14 d。

1.3.2 样本采集

给药结束后, 收集 24 h 尿液测定尿总蛋白 (urine total protein, UTP); 异氟醚麻醉大鼠后从颈动脉针刺采血, 4℃ 离心 (3000 r/min, 15 min) 收集血清, 分装存在 -80℃ 冰箱用于检测 BUN、Scr 及白蛋白 (albumin, ALB) 水平; 处死大鼠, 剖腹取肾, 剪下左肾纵剖为两半, 一半甲醛固定并做石蜡切片 (5 μ m) 用于 HE 染色和免疫荧光染色, 另一半戊二醛、锇酸固定并做超薄树脂切片用于透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 实验; 剪碎右肾用 RIPA 裂解液提取蛋白, 分装、标记并存在 -80℃ 冰箱用于 Western blot 实验。

1.3.3 UTP、BUN、Scr 及 ALB 水平测定

取尿液和血清样本, 采用全自动生化分析仪检测 24 h 尿液总蛋白 (UTP)、BUN、Scr 和白蛋白 (ALB) 水平。

1.3.4 HE 染色观察肾组织病理变化

取肾石蜡切片, 进行脱蜡复水后, 采用苏木素染色和伊红染色, 脱水封片后, 在光镜下观察肾组织病理形态变化。

1.3.5 TEM 观察肾组织超微结构变化

将肾超薄树脂切片放在铜网上烙片, 用醋酸铀和柠檬酸铅行双重染色, TEM 下观察肾小球超微结构, 并用 Image J 软件分别对每只大鼠某一肾切片电镜图的随机 5 个视野下肾小球基底膜、足细胞突等超微结构进行分析, 计算平均值。

1.3.6 Western blot 检测

将 20 μ g 肾蛋白样品冰上解冻、凝胶孔上样、恒压电泳、恒流转聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜, 取封闭后的膜与 pAMPK、AMPK、GAPDH、LC3、Beclin-1、Atg5、Atg7、NPHS2、pmTOR、mTOR 特异性一抗孵育 (4℃ 过夜), 之后与二抗孵育 (室温 1.5 h), 用化学发光液显示条带, 在凝胶成像系统的暗盒中曝光拍照, 分析相对灰度 (以 GAPDH 为内参)。

1.3.7 免疫荧光染色

肾石蜡切片经烤片、抗原修复、封闭混杂抗原表位等处理后, 滴加小鼠源 Beclin-1、兔源 NPHS2 特异性一抗孵育 (4℃ 过夜), 次日滴加羊抗兔 (Cy3) 和羊抗小鼠 (Alexa Flour 488) 荧光二抗避光孵育

50 min,接着加 DAPI 染细胞核后封片,荧光显微镜下(同样曝光时间)观察拍照。绿色荧光的 Beclin-1⁺小泡为自噬体,红色荧光的 NPHS2⁺细胞为足细胞,Image J 随机统计每只大鼠某一肾切片荧光图的随机 5 个视野肾小球区域的荧光强度,计算平均值。

1.4 统计学方法

数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析和作图,计量资料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hyp 对生化指标的影响

相比于 N 组,NS 组 UTP、BUN、Scr 水平显著增高,ALB 水平显著降低($P<0.05$);相比于 NS 组,Hyp 组 UTP、BUN、Scr 水平显著降低,ALB 水平显著增高($P<0.05$);相比于 Hyp 组,Hyp+CC 组 UTP、

BUN、Scr 水平显著增高,ALB 水平显著降低($P<0.05$),见表 1。提示 Hyp 可改善 NS 大鼠肾小球滤过功能。

2.2 Hyp 对肾组织形态的影响

如图 1 所示,N 组肾小球、肾小管形态完整、结构清晰;NS 组肾小球体积变大、系膜基质增生、大量肾小管空泡变性;Hyp 组肾形态明显恢复;与 Hyp 组比较,Hyp+CC 组肾病理形态损伤加重,肾小管空泡变性增多。提示 Hyp 可减轻 NS 大鼠肾组织损伤。

2.3 Hyp 对肾小球超微结构的影响

如图 2,表 2 所示,TEM 下可见 NS 大鼠基底膜普遍增厚,足细胞肿胀,足突消失、散开或融合。量化分析显示,相比于 N 组,NS 组基底膜厚度和足突宽度显著增加($P<0.05$);相比于 NS 组,Hyp 组基底膜厚度和足突宽度显著降低($P<0.05$);相比于 Hyp 组,Hyp

表 1 各组 UTP、BUN、Scr 和 ALB 水平比较($\bar{x}\pm s,n=8$)
Table 1 Comparison of UTP、BUN、Scr and ALB levels among groups

组别 Groups	尿总蛋白(mg) UTP	血尿素氮 (mmol/L) BUN	血清肌酐(μmol/L) Scr	白蛋白(g/L) ALB
正常组 N group	6.28±1.47	4.27±1.05	28.61±2.53	43.89±4.16
肾病综合征组 NS group	45.37±5.46 [*]	6.86±1.16 [*]	46.02±4.17 [*]	19.46±2.53 [*]
金丝桃苷组 Hyp group	20.75±3.52 [#]	4.51±0.73 [#]	31.38±3.76 [#]	37.68±3.17 [#]
金丝桃苷+AMPK 抑制剂组 Hyp+CC group	39.64±4.27 [▲]	6.63±0.94 [▲]	40.42±4.28 [▲]	25.74±3.02 [▲]

注:与正常组比较, * $P<0.05$;与肾病综合征组比较, [#] $P<0.05$;与金丝桃苷组比较, [▲] $P<0.05$ 。
Note. Compared with N group, * $P<0.05$. Compared with NS group, [#] $P<0.05$. Compared with Hyp group, [▲] $P<0.05$.

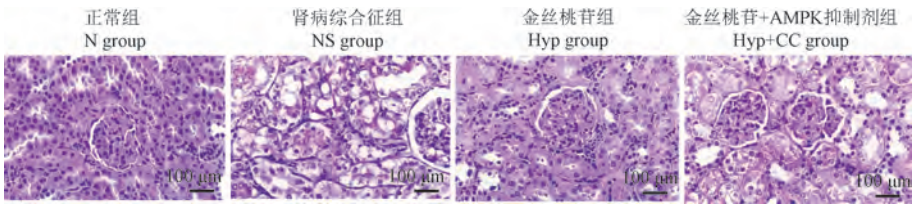


图 1 各组肾组织学观察(HE 染色)

Figure 1 Histological observation of the renal issue among groups (HE staining)

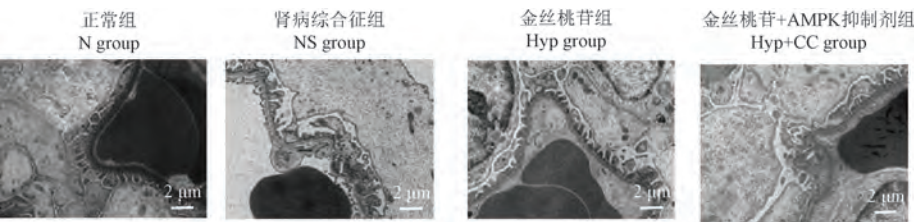


图 2 各组肾小球透射电镜图

Figure 2 Representative image of glomerular transmission electron microscope

+CC 组基底膜厚度和足突宽度显著增高 ($P<0.05$)。提示 Hyp 可减轻 NS 大鼠肾组织肾小球损伤。

2.4 Hyp 对自噬蛋白和足细胞蛋白的影响

如图 3 所示,NS 组 LC3-Ⅱ/Ⅰ 比值、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著低于 N 组 ($P<0.05$); Hyp 组 LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著增高于 NS 组 ($P<0.05$); 而 Hyp + CC 组 LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1、Atg5、Atg7 和 NPHS2 蛋白水平显著低于 Hyp 组 ($P<0.05$)。提示 Hyp 可提高 NS 大鼠肾组织自噬水平。

2.5 免疫荧光观察自噬体和足细胞在肾小球中的定位

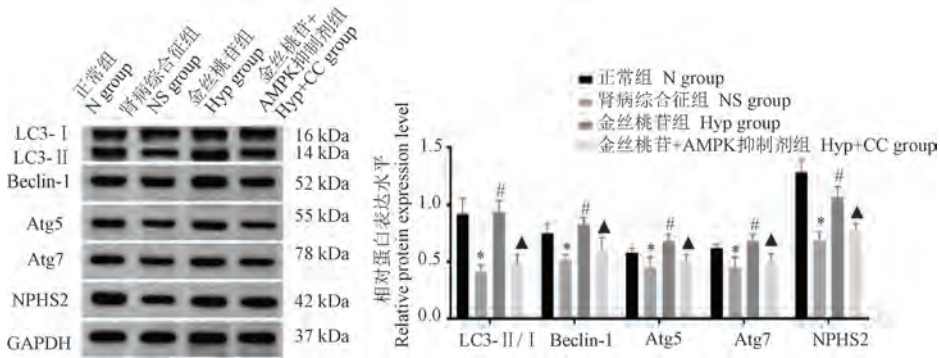
如图 4、图 5 所示,足细胞采用 NPHS2 抗体标

表 2 各组基底膜厚度和足突宽度比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Comparison of glomerular basement membrane thickness and foot process width among groups

组别 Groups	肾小球基底膜厚度(μm) Glomerular basement membrane thickness	足突宽度(μm) Foot process width
正常组 N group	0.22±0.06	0.14±0.03
肾病综合征组 NS group	0.34±0.08 [*]	0.21±0.04 [*]
金丝桃苷组 Hyp group	0.25±0.05 [#]	0.16±0.04 [#]
金丝桃苷+AMPK 抑制剂组 Hyp+CC group	0.31±0.09 [▲]	0.20±0.05 [▲]

注:与正常组比较, $^*P<0.05$;与肾病综合征组比较, $^{\#}P<0.05$;与金丝桃苷组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。
Note. Compared with N group, $^*P<0.05$. Compared with NS group, $^{\#}P<0.05$. Compared with Hyp group, $^{\Delta}P<0.05$.



注:与正常组比较, $^*P<0.05$;与肾病综合征组比较, $^{\#}P<0.05$;与金丝桃苷组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

图 3 Western blot 检测 LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1、Atg5、Atg7 及 NPHS2 蛋白表达

Note. Compared with N group, $^*P<0.05$. Compared with NS group, $^{\#}P<0.05$. Compared with Hyp group, $^{\Delta}P<0.05$.

Figure 3 The level of LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1、Atg5、Atg7 and NPHS2 protein detected by Western blot

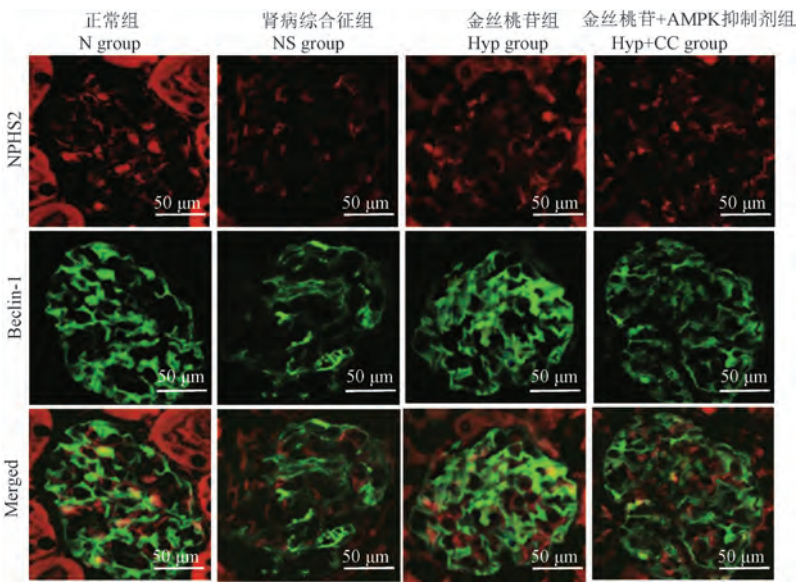


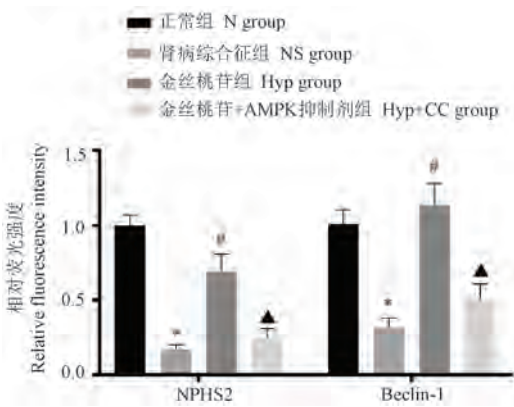
图 4 自噬体和足细胞标记蛋白的免疫荧光染色图

Figure 4 Representative images of immunofluorescence staining for autophagosome and podocyte marker proteins

记,呈红色荧光;自噬体采用 Beclin-1 抗体标记,呈绿色荧光,绿色荧光主要集中在红色荧光附近。NS 组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度弱于 N 组 ($P<0.05$);Hyp 组 NPHS2、Beclin-1 蛋白相对荧光强度强于 NS 组 ($P<0.05$);Hyp+CC 组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度弱于 Hyp 组 ($P<0.05$)。提示 Hyp 可增强 NS 大鼠肾组织足细胞自噬。

2.6 Hyp 对 AMPK/mTOR/ULK1 通路的影响

如图 6 所示,相比于 N 组,NS 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低, p-mTOR/mTOR 比值显著增加 ($P<0.05$);相比于 NS 组,Hyp 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 水平显著增加, p-mTOR/mTOR 比值显著降低 ($P<0.05$);相比于 Hyp 组,Hyp+CC 组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值显著降低, p-mTOR/mTOR 比值显著增加 ($P<0.05$)。提示 Hyp 可激活 NS 大鼠肾组织 AMPK/mTOR/ULK1 通路。

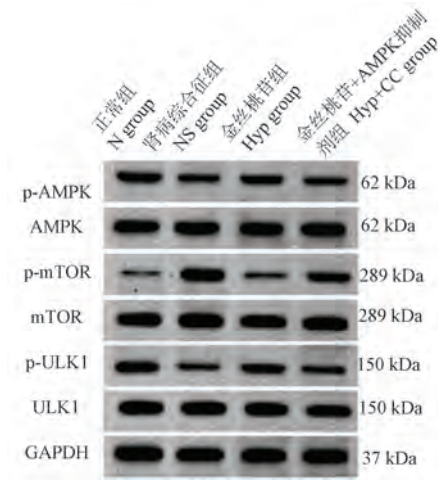


注:与正常组比较, * $P<0.05$;与肾病综合征组比较, # $P<0.05$;与金丝桃苷组比较, ^ $P<0.05$ 。

图 5 各组 NPHS2、Beclin-1 相对荧光强度比较

Note. Compared with N group, * $P<0.05$. Compared with NS group, # $P<0.05$. Compared with Hyp group, ^ $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of relative fluoescence intensity of NPHS2 and Beclin-1 among groups



注:与正常组比较, * $P<0.05$;与肾病综合征组比较, # $P<0.05$;与金丝桃苷组比较, ^ $P<0.05$ 。

图 6 Western blot 检测 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白水平

Note. Compared with N group, * $P<0.05$. Compared with NS group, # $P<0.05$. Compared with Hyp group, ^ $P<0.05$.

Figure 6 Level of AMPK/mTOR/ULK1 pathway protein detected by Western blot

3 讨论

NS 肾损伤涉及炎症、氧化、自噬等参与,类固醇等药物为主要治疗药物,但对器官实质性损伤的改善效果有限。阿霉素是一种含醌式结构的抗肿瘤药物,在体内药物代谢酶的作用下,形成半醌自由基,半醌自由基与氧化反应生成超氧阴离子和羟自由基,两者可通过膜的脂质过氧化作用,对肾造成损伤,从而诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应,破坏滤过膜结构和功能,产生蛋白尿,并导致肾小

管和肾小球发生病理变化^[10]。尾静脉注射阿霉素是制作 NS 大鼠模型常用的造模方法,具有操作简单、成模较快、动物死亡率低等优点,已被广泛应用于 NS 治疗药物的药效学研究^[12]。在本研究中,模型组大鼠在造模后第 15 天 24 h 尿蛋白含量、BUN 和 Scr 水平显著高于正常大鼠,表明成功复制阿霉素肾病模型。Hyp 已被证实具有保护肾细胞免于氧化损伤^[13]、抑制缺血再灌注造成的肾细胞凋亡^[7]、预防糖尿病相关肾小球基底膜损伤^[14]等作用,因此 Hyp 可作为肾保护药物。本研究与 Zhou 等^[9]研究

一致, Hyp 可降低 NS 大鼠 UTP、BUN、Scr 和 ALB 水平,减轻肾小球体积变大、肾小管萎缩、足细胞肿胀、足突消失等损伤,表明 Hyp 可恢复足细胞形态,提高肾小球滤过功能,对 NS 大鼠肾损伤有保护作用。

足细胞为一类有很多足突的无法增殖且高度特化上皮细胞,包围着肾小球基底膜、毛细血管等组成滤过屏障,其稳态和完整性依赖于较高的基础自噬水平^[15]。研究已指出,自噬水平的变化与足细胞稳态密切相关,并参与多种肾病的发展^[16-17]。细胞质中的 LC3-I 与磷脂酰乙醇胺结合并转变为膜型 LC3-II,是自噬体膜形成的关键标志^[18];在 ATG 家族蛋白的作用下自噬体膜进一步延伸^[18];另外, Beclin-1 也可通过招募其他自噬蛋白参与自噬过程的启动^[19]。因此,LC3-II/I、Beclin-1 和 ATG 蛋白表达增加提示自噬激活。在本研究中,NS 大鼠 LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 蛋白水平降低;同时足细胞特异蛋白 NPHS2 表达降低。推测 NS 组大鼠的肾自噬活性不足,导致受损细胞器、蛋白质等在足细胞中不断积累,损害足细胞。而给予 Hyp 干预后,LC3-II/I、Beclin-1、Atg5、Atg7 蛋白水平和 NPHS2 表达均升高,提示 Hyp 可增强 NS 大鼠自噬活性,恢复足细胞稳态,减轻足细胞损害。另外,免疫荧光半定量分析显示,肾组织中 NPHS2 和 Beclin-1 的荧光总量均呈 NS 组、Hyp 组、N 组依次增高趋势,与 Western blot 结果趋势相符,且 Beclin-1⁺的绿色自噬体主要分布在 NPHS2⁺的红色足细胞周围,佐证了足细胞是自噬活性增强的主要受益者。

自噬可作为适应性应激,促进对有害物质的清除,减轻细胞损伤或死亡^[20]。AMPK/mTOR/ULK 通路是重要的自噬通路之一,其中 AMPK 为主要的能量传感器,通过直接磷酸化并活化 ULK1 来维持细胞的能量代谢、促进自噬并维持细胞稳态^[21]。而 mTOR 也通过磷酸化活化,活化的 mTOR 可抑制 ULK1 的激活,是自噬过程的关键负调节剂^[22]。AMPK/mTOR 通路已被证实参与肾病大鼠的自噬进程,AMPK/mTOR 通路的激活有利于自噬体的形成、足细胞的恢复和肾病理损伤的改善^[11,23]。Hyp 对自噬具有双重调节作用,一方面 Hyp 可通过抑制 AMPK-ULK1 介导的自噬来减轻 D-半乳糖诱导的肾衰老和损伤^[24];另一方面 Hyp 可通过激活沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, Sirt1)/

AMPK 信号通路,促进自噬,改善糖尿病骨质疏松大鼠骨代谢^[25];在皮肤癌中,Hyp 可激活 AMPK 信号,诱导癌细胞自噬和凋亡,抑制增殖^[26]。本研究中,给予 Hyp 干预后大鼠 p-AMPK/AMPK 和 p-ULK1/ULK1 水平增加,p-mTOR/mTOR 水平降低,结合 Hyp 可增加 LC3-II/I、Beclin-1 和 ATG 蛋白水平的结果,提示 Hyp 可促进 NS 大鼠体内的 AMPK/mTOR/ULK1 自噬通路活化。此外,在 Hyp 的基础上采用 AMPK/mTOR 通路抑制剂 CC 抑制 AMPK/mTOR/ULK1 通路的活化,结果显示,CC 可减弱 Hyp 的足细胞保护作用及促自噬作用,部分抵消 Hyp 对 NS 的改善效果,验证了 AMPK/mTOR/ULK1 通路的活化在 Hyp 保护 NS 大鼠足细胞损伤中发挥了积极作用。本研究结果表明 Hyp 在 NS 中通过激活 AMPK 信号发挥促自噬作用,推测 Hyp 对自噬是发挥抑制或促进作用,可能与疾病种类及病程有关,不同疾病或同一疾病在不同时期其自噬水平是不同的。

综上所述,Hyp 可通过促进肾细胞自噬,减轻足细胞损伤实现对 NS 的治疗作用,其中 AMPK/mTOR/ULK1 通路为其促进自噬的重要靶点。下一步将分离足细胞,进一步探讨 Hyp 对足细胞自噬的作用机制。

参考文献:

- [1] Rodriguez-Ballesteros E, Reid-Adam J. Nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Rev*, 2022, 43(2): 87-99.
- [2] Iijima K, Sako M, Oba M, et al. Mycophenolate mofetil after rituximab for childhood-onset complicated frequently-relapsing or steroid-dependent nephrotic syndrome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(2): 401-419.
- [3] Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci*, 2022, 136(7): 493-520.
- [4] Blaine J, Dylewski J. Regulation of the actin cytoskeleton in podocytes [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1700.
- [5] Müller-Deile J, Schiffer M. Podocyte directed therapy of nephrotic syndrome-can we bring the inside out? [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(3): 393-405.
- [6] 熊哲学,唐明娟,李凝旭. 达格列净通过上调 SIRT1 增强糖尿病肾病大鼠肾脏细胞自噬从而抑制足细胞损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(4): 680-687.
- [7] Wu L, Li Q, Liu S, et al. Protective effect of hyperoside against renal ischemia-reperfusion injury via modulating mitochondrial fission, oxidative stress, and apoptosis [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(7): 727-736.
- [8] Chen Z, An X, Liu X, et al. Hyperoside alleviates adriamycin-

- induced podocyte injury via inhibiting mitochondrial fission [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88792–88803.
- [9] Zhou J, Zhang S, Sun X, et al. Hyperoside ameliorates diabetic nephropathy induced by STZ via targeting the miR-499-5p/APC axis [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 146(1): 10–20.
- [10] 包玉龙, 杨瑞, 刘禾, 等. 阿霉素大鼠肾病综合征模型最佳剂量的筛选 [J]. *动物医学进展*, 2018, 39(5): 61–63.
- [11] 李浩田, 李梦丽, 张臣, 等. 基于 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径研究黄芪多糖对急性放射性肠炎大鼠肠黏膜的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(2): 311–317.
- [12] 马雪莉, 魏锦慧, 马鸿斌. 草薢分清颗粒对阿霉素肾病大鼠足细胞 podocalyxin、 α -actinin-4 的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(12): 49–56.
- [13] Chen Y, Ye L, Li W, et al. Hyperoside protects human kidney-2 cells against oxidative damage induced by oxalic acid [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(1): 486–494.
- [14] An X, Zhang L, Yuan Y, et al. Hyperoside pre-treatment prevents glomerular basement membrane damage in diabetic nephropathy by inhibiting podocyte heparanase expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6413.
- [15] Tagawa A, Yasuda M, Kume S, et al. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2016, 65(3): 755–767.
- [16] Chen XC, Li ZH, Yang C, et al. Lysosome depletion-triggered autophagy impairment in progressive kidney injury [J]. *Kidney Dis*, 2021, 7(4): 254–267.
- [17] Sun B, Zhai S, Zhang L, et al. The role of extracellular vesicles in podocyte autophagy in kidney disease [J]. *J Cell Commun Signal*, 2021, 15(3): 299–316.
- [18] de la Ballina LR, Munson MJ, Simonsen A. Lipids and lipid-binding proteins in selective autophagy [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(1): 135–159.
- [19] Hill SM, Wrobel L, Ashkenazi A, et al. VCP/p97 regulates beclin-1-dependent autophagy initiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(4): 448–455.
- [20] Li W, He P, Huang Y, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 222–256.
- [21] Puustinen P, Keldsbo A, Corcelle-Termeau E, et al. DNA-dependent protein kinase regulates lysosomal AMP-dependent protein kinase activation and autophagy [J]. *Autophagy*, 2020, 16(10): 1871–1888.
- [22] Xiang H, Zhang J, Lin C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 569–581.
- [23] Liu H, Wang Q, Shi G, et al. Emodin ameliorates renal damage and podocyte injury in a rat model of diabetic nephropathy via regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1253–1266.
- [24] Liu B, Tu Y, He W, et al. Hyperoside attenuates renal aging and injury induced by D-galactose via inhibiting AMPK-ULK1 signaling-mediated autophagy [J]. *Aging*, 2018, 10(12): 4197–4212.
- [25] 王云飞, 王会方, 史栋梁, 等. 金丝桃苷激活 Sirt1/AMPK 自噬通路改善糖尿病骨质疏松大鼠骨代谢和骨结构的机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(3): 434–444.
- [26] Kong Y, Sun W, Wu P. Hyperoside exerts potent anticancer activity in skin cancer [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2020, 25(3): 463–479.

[收稿日期]2022-12-20

刘书一,王正波. 非人灵长类帕金森动物模型中的行为学评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 96-103.
Liu SY, Wang ZB. Behavioral assessment of the Parkinson's disease model in non-human primates [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 96-103.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.013

非人灵长类帕金森动物模型中的行为学评估

刘书一¹,王正波^{1,2*}

(1.昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500;
2.云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

【摘要】 帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种神经退行性疾病, 目前发病机制不明, 患者会出现与疾病相关的运动和非运动症状。啮齿类动物模型只能部分精准模拟患者的症状, 导致相关的临床前研究存在局限性, 非人灵长类动物模型能够较好的弥补这种缺陷, 对非人灵长类 PD 模型的运动和非运动症状的量化有利于发病机制和治疗的研究, 本综述中总结了不同行为学量化方式, 同时对比了不同方法之间的优劣性, 为进行 PD 猴模型研究提供了行为学测试的参考。

【关键词】 帕金森病; 非人灵长类; 评分量表; 精细运动; 精神障碍; 认知障碍
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0096-08

Behavioral assessment of the Parkinson's disease model in non-human primates

LIU Shuyi¹, WANG Zhengbo^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China. 2. Yunnan Province Key Laboratory of Primate Biomedicine, Kunming 650500)

【Abstract】 Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease. Its pathogenesis is currently unknown. Patients may present with motor and non-motor symptoms. To explore the mechanisms underlying these phenotypes, appropriate animal models are needed. Rodent models only partially recapitulate the symptoms of PD. Therefore, relevant preclinical studies are limited. Non-human primate animal models are better able to recapitulate such symptoms. Quantifying motor and non-motor symptoms in non-human primate models of PD is useful to study its pathogenesis and treatment. This review summarizes various approaches to quantifying behavioral paradigms and compares the advantages and disadvantages of the approaches. It also provides a reference for behavioral testing in PD monkey models.

【Keywords】 Parkinson's disease; non-human primate; rating scale; fine motor; mental disorders; cognitive impairment

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界第二大神经退行性疾病, 主要的病理表现为中脑黑质致密部的多巴胺能神经元的丢失和脑中路易小体的形成, 从而引起病人出现静息性震颤、运动迟缓、僵硬、步态障碍和姿势不稳等运动症状, 以及睡眠障碍、痴呆、焦虑、抑郁和便秘等非运动症状^[1]。目前针对 PD 的药物治疗和手术治疗虽然能够在一定程度上缓解症状, 但是无法阻止病情的进展^[2], 动物模型对于研究帕金森病的发病机制以及治疗策略至关重要^[3-5], 非人灵长类(non-human primate, NHP)帕金森动物模型可以较好的模拟该疾病, 特别是在疾病早期阶段的非运动症状的描述, 以及疾

【基金项目】 国家自然科学基金(31960120); 云南省科技厅人才项目(202105AC160041)。
【作者简介】 刘书一(1997—), 女, 博士研究生, 研究方向: 帕金森病细胞治疗研究。E-mail: lpbrliushuyi@163.com
【通信作者】 王正波(1977—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 帕金森动物模型构建以及干细胞治疗研究。E-mail: wangzb@lpbr.cn

病后期的运动障碍表型呈现。针对运动障碍表型的行为学评估有助于 PD 发病机制和治疗的研究。本文针对非人灵长类帕金森动物模型中涉及的行为学评估方式的研究进展进行综述,为将来 PD 行为学研究提供参考。

1 非人灵长类帕金森动物模型的行为学优势

啮齿类动物是目前应用最广泛的 PD 动物模型,啮齿类 PD 模型可以重现 PD 的部分行为症状,在此动物模型上开展的经典的行为学实验包括自发旋转实验、阿扑吗啡诱导的旋转实验、开放场实验、滚轴实验和水迷宫实验等^[6],对 PD 的发病机制和治疗的研究起到了一定的促进作用,但由于啮齿类动物在大脑结构及行为表现等方面与人类相差很大,在啮齿类 PD 模型上获得的研究结果很难进行临床转化^[7]。相比之下非人灵长类动物与人类在基因相似度和生理机能等方面有着更密切的关系,在大脑结构上和行为表现上与人高度近似。尤其是猕猴、食蟹猴等猴模型,是典型的非人灵长类动物模型^[8],它们具有精细的手部动作,可以抓取食物和操作物体。此外具有和人类类似的面部表情,以及直立姿势等进化优势,因此利用非人灵长类帕金森模型研究 PD 相关的行为症状会比啮齿类动物更加有助于效果评估和临床转化^[9]。例如结合患者的临床表现而衍生出的非人灵长类 PD 评分量表,该量表主要涉及对模型动物的总体运动能力的评估^[10],能够用来评估模型动物的疾病的严重程度。在 PD 患者中,患者的精细运动,包括抓握、书写等会随疾病进展受到损伤,啮齿类动物无法模拟这类手部的精细运动,非人灵长类动物具有与人类相似的手指,能够进行一些更高级的手部精细运动,可以对非人灵长类 PD 模型的精细运动进行测试,这一类测试则包含布林克曼板、走廊测试以及抽屉抓取实验,可以综合评估模型动物的总体和精细运动能力的变化^[11]。

PD 患者中除了运动症状还存在非运动症状,这些症状不但包括从轻度认知障碍到痴呆以及精神症状和情绪障碍,而且大多都早于运动症状的出现,这些非运动症状也是导致患者生活质量差的关键因素,可以作为早期 PD 诊断的标准之一。非人灵长类有更好的社会化行为、情感表现以及睡眠节律,且具有更高级的认知能力,能够进行较为复杂的测试,从而能够进行非运动症状的评估。

认知功能障碍属于 PD 非运动症状中的一种,主要包括注意力、识别能力、工作记忆以及解决问题和执行能力下降,并且随着疾病的进程,症状逐渐加重,非人灵长类动物相对于啮齿类动物可以更好模拟 PD 患者中的认知症状,可以用于研究与该病理表现相关的病理变化和内在机制,先前研究建立了一些认知检测的测试,包括物体绕道检索任务(object detour retrieval task, ODRT),延迟反应任务以及注意力转移测试等,这些检测项目不仅可以测试模型动物记忆能力的变化,还可以对注意力以及应变能力进行测试,以评估造模和治疗对动物认知能力的影响。

随着人们对于精神疾病的认识的深入,PD 患者的精神症状也得到了更多的关注,近年来研究发现有多达 60% 的 PD 患者可以出现多种形式的精神症状,其较高的发病率和较低的诊断率使其成为诊断和治疗中的挑战性难题,目前 PD 中精神病样症状的发病机制仍然不清楚^[12],非人灵长类相比啮齿类动物具有更高级的情感,并拥有类似于人类社会的社会属性和阶级属性,因此使用非人灵长类 PD 模型评估 PD 中的精神病样行为,对于研究 PD 中精神病样行为的发病机制及其中的分子通路等研究都具有重要的现实意义,因此也建立了针对精神病样行为和认知障碍的评估包括评分量表和相关行为实验^[13]。

此外,在过去的几十年中有大量的研究对 PD 中的睡眠障碍进行了调查,PD 中睡眠障碍的患病率高达 90%,这些问题主要包括:失眠、白天过度嗜睡以及夜间睡眠觉醒等问题,非人灵长类动物具有和人类相似的睡眠节律,故非人灵长类 PD 模型能够更好的重现这些睡眠改变,例如在睡眠开始后觉醒次数增加,白天嗜睡以及快速眼动期睡眠的抑制等^[14]。

非人灵长类具有的这些优势,使量化与患者相似的运动障碍和非运动障碍特征成为可能,简化了从实验室的研究到临床的转化。因此,建立合理客观的行为学量化方式十分重要。

2 非人灵长类帕金森动物模型中的运动症状评估

2.1 帕金森病评分量表

PD 患者最为显著的运动症状包括静息性震颤、肌肉强直、运动迟缓以及姿势步态异常等。目前临床上对于 PD 患者的诊断评分量表也主要针对

这些运动症状。如前所述,非人灵长类 PD 模型可以复制这些运动症状,针对特异性 PD 症状,PD 评分量表是一种有力的评价工具。目前,针对非人灵长类 PD 模型的评分量表大多是由临床患者评分量表为基础改变而来,用来衡量非人灵长类 PD 模型的造模情况和治疗效果。

评分开始前,被测试的动物需要先熟悉录像笼子,正式开始录像的 30 min 内,测试者分别在笼子的底部和顶部给予食物,用于评估动物如何站起,站起时是否摇晃以及支撑情况;随后在笼子的中间将食物分别向左右移动,用于评估双手的使用和震颤;测试者离开前将大块的食物放在笼子里,以评估动物对物体的操控能力。录像结束后,由不同的测试者根据录像和评分量表对猴子的行为进行评分,并消除不同测试者之间的误差。目前常用的评分量表主要有 8 种,这 8 种量表虽然都是针对 PD 中的主要症状,但是在评分的细节上会有一些不同之处,表 1 将这 8 种经典评分量表进行了总结概述,并对比了其优缺点^[15-22]。

在对比了不同量表的优缺点后可以发现,PD Kurian 量表^[19]对于运动和非运动症状的评价更为全面,得分描述也更为准确,从而降低了评分者之间的客观差异性和难度,但仍缺乏对于攀爬能力的评估。PD 评分量表的设计应该更加考虑向猴子行为的转化,例如对攀爬能力和对刺激反应等,同时需要更准确的分数实例标准,可用于标准化不同测试者的评分。针对这些问题,在实际应用中,可以根据需要将不同量表结合使用,开发统一标准的培训练习,以缩小测试者的主观差异,这可以更好地帮助测试者定义 PD 非人灵长类动物模型症状的严重程度。

2.2 手指精细运动评价

对非人灵长类 PD 模型中精细运动的评估能够指示活动的灵巧性,针对精细运动的评估方法包括 FMS 测试、布林克曼板、手抓抽屉任务、走廊任务等。

不同的测试方法能够评估不同水平的精细运动,FMS 测试在几种测试方法中最为简单可行,常被作为非人灵长类帕金森动物模型的造模或者治疗研究中的重要行为学检测项目之一,可以描述模型猴抓取食物的能力,实验需要区分模型猴的左右手,并利用摄像机对过程进行录像,在规定的时间内进行规定次数的测试,随后对录像进行分析,记

录不同的数据,例如反应时间、拿取时间和总时间等,这些指标能客观量化猴子手部整体的抓取能力,但是 FMS 测试只能评价相对较简单的抓取运动,对更精细的手部运动的检测较不敏感^[23]。

相较于 FMS 测试,布林克曼板能够测试更精细的手部运动,该方法是 1973 年 Brikman 等^[24]在研究恒河猴中左右手大脑控制的研究中建立的,该实验中的食物颗粒,例如糖球或花生等会被放置在带有小孔的板子中(图 1),考验模型猴取食时的手部灵巧性,同时借助猴椅的帮助,可以区分左右手的灵巧程度,对于单侧 PD 猴模型的检测十分有利,布林克曼板在后期还进行了改良,出现了旋转的布林克曼板,录像记录被测试猴子取食的数量和接触时间后,通过录像数据分析可以评估实验猴左右手的精细运动和灵活性,从而量化造模或治疗恢复情况。

除了这两种经典的精细运动检测方法之外,手抓抽屉任务^[25]和走廊任务^[26]也可以评估猴子手部和综合运动能力,但是这两种测试方法由于训练难度高,硬件要求高等因素,实际应用相对较少。

在实际的实验中,FMS 测试和布林克曼板与 PD 评分量表通常结合使用,从而在一定程度上评估出实验猴在 PD 相关运动症状上的严重程度,达到互补的效果。

2.3 整体运动量变化的评价

除了 PD 评分量表和手部精细测试之外,研究者根据猴子生性好动的特性,延伸出对整体运动量变化的一套评价体系,包括针对小体型狨猴的塔式测试^[27],以及自主运动水平测试^[28],该测试应用最广泛,测试在有机玻璃建造的透明观察笼子里进行,录像机被设立在笼子的不同侧边,录像的时间一般为 20~40 min,录像完毕后将视频导入软件中对猴子活动范围和四肢活动进行圈定,以便于计算机算法可以对其活动进行计算,在分析完毕后,计算机可以自动生成猴子一定时间内在观察笼中的运动距离,以及不同运动方式所占的时间和距离。整体的运动量能够反映猴子的运动能动性 and 自主运动能力,随着疾病的进展,猴子运动的能动性降低,并伴随着运动能力的下降。

此外,利用不同的药物例如阿扑吗啡和左旋多巴也可以检测整体运动的变化,该方法只能用于单侧 PD 模型,因为单侧造模后猴子会向损毁侧自发旋转,使用一定量的多巴胺受体激动剂后,猴子会向健侧进行旋转,这种药物的处理方式也可以证明

表 1 8 种评分量表内容差异比较

Table 1 Comparison of content differences of eight rating scales

评分量表作者 Scoring range author	是否广泛使用 Widely used	分数范围 Rating scale	是否评估帕金森运动症状 Assess Parkinson's motor symptoms	是否评估帕金森非运动症状 Assess Parkinson's non-motor symptoms	是否区分上下肢的运动能力 Distinguish the motor capacity of the upper and lower limbs
运动会帕金森病 评定量表专责 小组 ^[15]	是	0~28	部分,评估震颤、僵直、姿势不稳、步态异常,但对肢体运动评分标准不明确。	部分,仅提及面部表情缺乏。	否
Movement disorder society task force on rating scales for Parkinson's disease	Yes	0~28	Partially, tremor, rigidity, postural instability and abnormal gait were assessed, but it is not clear how to score the body movement.	Partially, only the lack of facial expression was assessed.	No
Imbert C 等 ^[16]	是	0~39	部分,评估震颤、上肢运动能力、运动和步态等,但对运动迟缓和僵直未进行评估。	是,评估面部表情和对刺激反应,但只评定有/无,不准确。	否
Imbert C,et al	Yes	0~39	Partially, tremor, rigidity, upper limb motor ability, movement and gait were assessed, bradykinesia and rigidity were not assessed.	Yes, assess facial expressions and responses to stimuli, but only rated yes/no is inaccurate.	No
Benazzouz A 等 ^[17]	否	0~20	部分,评估震颤、运动和姿势障碍等典型症状,但描述词“轻微、中等、严重”定义不明确。	否	否
Benazzouz A,et al	No	0~20	Partially, tremors, movement and postural disturbances were assessed, but the descriptors “mild, moderate, severe” are not well defined.	No	No
Gomez-Mancilla B 等 ^[18]	否	0~10	部分,评估姿势、步态、震颤等,但评分方式无法对症状严重程度准确分级。	部分,评估了社会性互动,但评估标准过于模糊。	否
Gomez-Mancilla B,et al	No	0~10	Partially, posture, gait and tremor were assessed, but could not accurately grade the severity of symptoms.	Partially, social interaction was assessed, but the criteria are vague.	No
Kurlan R 等 ^[19]	是	0~29	是,评估震颤、姿势、步态、运动迟缓、平衡和上下肢等,对症状描述能准确分级。	是,评估了面部表情和防御反应。	是
Kurlan R,et al	Yes	0~29	Yes, tremor, posture, gait, bradykinesia, balance, and upper and lower limbs accurately graded symptom descriptions were assessed, the description of symptoms can be accurately graded.	Yes, facial expressions and defensive responses were assessed.	Yes
Papa SM 等 ^[20]	否	0~20	部分,评估震颤、姿势、步态、攀爬能力,但对平衡和下肢能力未进行评估。	部分,评估了饮食和社交互动,但对饮食异常定义不明确。	否
Papa SM,et al	No	0~20	Partially, tremor, posture, gait, and climbing ability were assessed, but balance and lower limb ability were not assessed.	Partially, diet and social interaction were assessed, the definition of dietary abnormalities is not clear.	No
Schneider JS 等 ^[21]	否	0~24	部分,评估上下肢和震颤、运动障碍未评估步态、平衡,但分级不明确。	否	是
Schneider JS,et al	No	0~24	Partially, upper and lower limbs and tremors, dyskinesia were not assessed gait, balance were assessed, but classification ambiguity.	No	Yes
Smith RD 等 ^[22]	是	0~20	是,评估震颤、姿势、步态、运动迟缓、平衡和上下肢等,对症状描述能准确分级。	部分,评估了防御能力。	是
Smith RD,et al	Yes	0~20	Yes, upper and lower limbs and tremors, dyskinesia were not assessed gait, balance were assessed, the description of symptoms can be accurately graded.	Partially, defense capability was assessed.	Yes

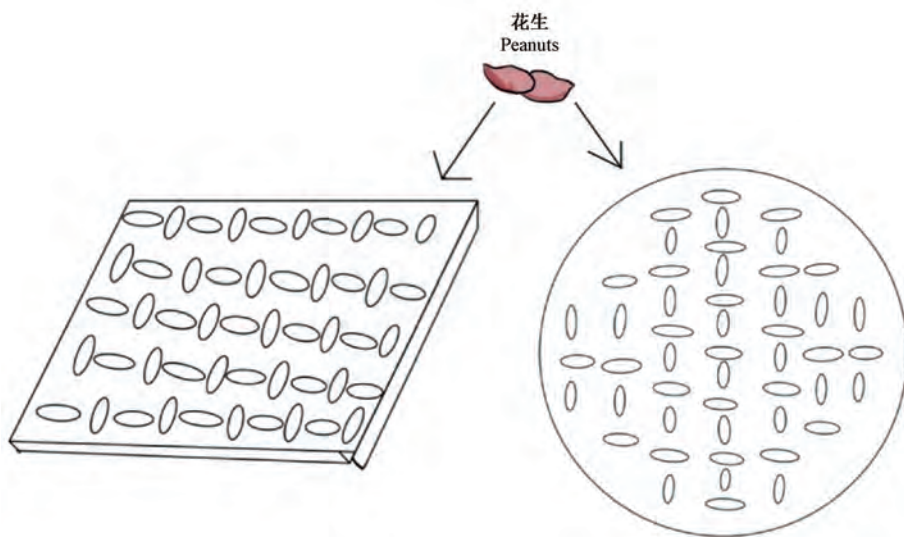


图 1 静止和旋转的布林克曼板示意图

Figure 1 Schematic of a Brinkmann plate at rest and rotating

造模的程度和治疗的效果^[29]。该测试一般是对比给药前后 30 min 的转圈次数,从而指示疾病的严重程度。

上述三类测试方法可以对 PD 猴模型的运动症状进行评价,包括粗运动和精细运动以及总体运动量,测试者需要将以上评价方式结合使用,才能得到客观准确、全面细致的数据,这对实验的可信性至关重要,单一的评价方式会导致实验结果主观性过强,失去评价的意义。

3 非人灵长类帕金森模型中的抑郁水平评价

3.1 情感和社会行为相关的抑郁评价

近期有很多临床前研究常聚焦于 PD 中的抑郁症状^[30],快感缺失被认为是抑郁症的核心症状之一,研究者们利用非人灵长类动物对于糖水的天然偏好性,设计出了糖水偏好实验,以评估快感缺失情况^[31],实验时同时给被测试猴一瓶糖水和一瓶纯净水,对比其对于糖水和纯净水的摄取量,通过对比不同时间的糖水饮用量的变化,评估其抑郁表型,糖水偏好实验在很多的被用于评估抑郁中的快感缺失,也证明了其可靠性。

对非人灵长类 PD 模型的情绪障碍和社会行为相关的抑郁表现的评价主要是对比自身的一些典型行为,例如情绪障碍中典型的焦虑起搏、自损行为、刻板行为、拥挤姿势等^[32],这类行为以有/无来量化,通常以造模前为参照,抗抑郁药处理后以上行为的变化,也可以反映 PD 猴模型抑郁症状的存在^[33]。

此外,非人灵长类动物与人类一样具有社会属性,它们有社会组织机制,并且有明确稳定的等级制度,研究表明等级较低的猴子在种群中具有更强的警惕性,独处的时间更多,压力相对更大,这类动物更容易观察到抑郁相关的社会行为,且这类行为通常先于运动症状出现^[34-35],因此研究抑郁行为时,动物的选择也是重要的一环。

3.2 睡眠障碍评价

先前的研究表明,临床 PD 病人中的睡眠障碍的患病率高达 90%,包括失眠、白天过度嗜睡、快速眼动期睡眠障碍、夜间睡眠惊醒行为,通常与抑郁并存^[36]。非人灵长类和人类具有相似的睡眠节律,例如晚上睡眠稳定,白天会有一些小睡等,适合用于研究 PD 中的睡眠障碍^[37]。对睡眠的监测方式包括脑电图、肌电图以及眼电图等侵入性策略,以及佩戴项圈,录像后人工分析等非侵入性策略^[38],需要关注的睡眠变化包括:

- (1) 在睡眠开始后醒来的频率增加;
- (2) 白天更容易进行长时间的睡眠;
- (3) 快速眼动期睡眠被急性抑制^[39]。

4 非人灵长类帕金森模型中的精神障碍和认知障碍

4.1 精神病样行为评分

使用非人灵长类帕金森精神病样行为评分量表(表 2)可以对非人灵长类动物的精神状态进行评估,在实验的过程中对实验动物进行 2 h 的录像,录像后由测试人员对于视频进行分析量化^[40]。

对精神病样行为的评估有利于寻找可能的分

子机制和通路,为寻找 PD 的早期发病机制提供有力的帮助。

4.2 帕金森相关的认知障碍

导致认知障碍的细胞和分子机制是未知的,有研究认为这种障碍可能与线粒体功能障碍相关^[41],但仍需要进一步验证,相关的行为学研究方式包括一些演化而来的检索任务和视觉任务^[42]。

在检索任务中,ODRT 能够检测动物对执行任务的应变能力^[43],其类似于啮齿类动物行为检测中的水迷宫或 Y 迷宫实验,该实验中的任务在奖励信息和错误信息之间存在冲突性,动物需要依靠绕道来获取食物,这种能力是衡量其推理能力、积极能动性和解决问题能力的指标,所以可以用于衡量认知能力。

与之类似的是可变延迟反应任务 (variable delay response task, VDR)^[44]和修改延迟反应任务 (modify the delayed response task, MDR)^[45],VDR 任务主要可以测试猴子的短期记忆的能力,短期记忆能力也是认知能力中很重要的一部分,该任务是由针对患者的经典测试威斯康辛卡片分类测试 (wisconsin card sorting test, WCST) 演变而来^[46],在这项任务中包含有几个不同的子测试,使得刺激的特征不断发生改变,这就要求动物始终保持适当的反应策略,从而衡量动物的执行力和变通力。

PD 中的非运动症状虽然不如运动症状那样典型,但是患者上的研究显示其能够指征早期的 PD 症状,目前有很多 PD 动物模型在尝试从病因角度造模,从而模拟早期的 PD 进程,因此使用相关的行

为评估策略,对在非人灵长类 PD 模型中的早期的疾病诊断、生物标志物的筛选,早期神经保护药物的开发,基因治疗策略的检测等都是不可缺少的工具。

5 非人灵长类帕金森模型中行为学相关深层指标

对于非人灵长类 PD 模型的评估,除了以上介绍的行为学指标,还可以结合一些深层指标一起进行分析,包括影像学检查、代谢物分析和病理学分析等。影像学检查主要包括核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)^[47]、单光子发射计算机断层扫描 (single photon emission computed tomography, SPECT)^[48]和正电子发射断层扫描 (positron emission tomography, PET) 等,可以对脑结构、功能和分子变化等进行成像,结合行为学结果,可以评估出脑内结构等变化与行为之间的联系^[49]。此外,脑脊液或血液中的一些物质的变化,也被认为可以作为生物标记物来确认 PD 的存在,其中包括在脑脊液 (CSF)、血液中的 α -突触核蛋白 (α -syn) 总量及寡聚体量^[50],相关外泌体^[51]、microRNA^[52]和炎症相关标志物^[53]等。其中一些生物标志物结合影像学检查以及行为学检测,可以对 PD 有较高的诊断性和预测价值。

以上的检测方法可以在活体动物上实现对 PD 的诊断,病理学检测则可以在组织学层面对 PD 的一些指标进行检测,经典的病理学检测包括:黑质和纹状体位置的多巴胺能神经元数量;脑中尤其是黑质和纹状体的病理性 α -syn 炎症反应等^[54]。病

表 2 非人灵长类帕金森精神病样行为评分量表
Table 2 Nonhuman primate psychopathic-like behavior scale

行为	评分标准	有/无
Behavior	Standrd of scoring	Yes/No
焦虑	a. 运动亢进;快速驱动性、向不同方向机械性跑动;b. 发出声音 (>10 s/min)	
Anxiety	a. Hyperkinesia; fast driving, mechanical running in different directions;b. Sound (>10 s/min)	0/1
幻觉样反应	a. 对非明显刺激的跟随 (>10 s/min);b. 凝视:保持静止,长时间观察同一个方向 (>10 s/min)	
Fantasy-like reaction	a. Following of non-obvious stimuli (> 10 s/min);b. Gaze: keep still and observe the same direction for a long time (> 10 s/min)	0/1
强迫性梳理	反复抓挠/梳理 (>每分钟 2 次)	
Compulsive grooming	Repeated scratching/combing (> 2 times/min)	0/1
刻板行为	a. 左右跳跃;快速跳跃 (>每分钟 2 次);b. 头部动作:左右快速摆动,幅度较大 (>每分钟 3 次);c. 无目的绕圈跳跃 (>每分钟 2 次);d. 重复抓杆上下攀爬 (>每分钟 2 次)	
Stereotyped behavior	a. Jump left and right: quick jump (> 2 times/min);b. Head movement: left and right rapid swing, large amplitude (> 3 times/min);c. Aimless circle jump (> 2 times/min);d. Climb up and down repeatedly (> 2 times/min)	0/1

理学检测的指标来源于患者尸检的结果,能够对于疾病进程进行更准确的预测,同时结合行为检测结果,可以帮助挖掘一些非运动症状背后的病理机制^[55]。

6 结语

本综述总结了在非人灵长类 PD 模型中,针对运动症状和非运动症状被广泛应用的测试方式,选择不同的测试方法,能够帮助研究者对不同方向进行表型和机理结合的测试,这对于在非人灵长类动物模型上进行 PD 研究的研究者是十分有力的工具。

参考文献:

- [1] Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2016, 139(Suppl 1): 318-324.
- [2] 李光英, 庄乾兴, 李斌, 等. 底丘脑核: 从环路、功能到深部脑刺激治疗帕金森病的靶点[J]. 生理学报, 2017, 69(5): 611-622.
- [3] van Laar AD, van Laar VS, San Sebastian W, et al. An update on gene therapy approaches for Parkinson's disease: restoration of dopaminergic function [J]. J Parkinsons Dis, 2021, 11(2): S173-S182.
- [4] Niu W, Zang T, Wang LL, et al. Phenotypic reprogramming of striatal neurons into dopaminergic neuron-like cells in the adult mouse brain [J]. Stem Cell Reports, 2018, 11(5): 1156-1170.
- [5] Rivetti di Val Cervo P, Romanov RA, Spigolon G, et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes *in vitro* and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model [J]. Nat Biotechnol, 2017, 35(5): 444-452.
- [6] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases [J]. Neuropathology, 2013, 33(5): 491-504.
- [7] Grow DA, McCarrey JR, Navara CS. Advantages of nonhuman Primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease [J]. Stem Cell Res, 2016, 17(2): 352-366.
- [8] Cenci MA, Björklund A. Animal models for preclinical Parkinson's research: an update and critical appraisal [M]. Amsterdam: Progress in Brain Research Elsevier; 2020.
- [9] Didier ES, MacLean AG, Mohan M, et al. Contributions of nonhuman Primates to research on aging [J]. Vet Pathol, 2016, 53(2): 277-290.
- [10] Fox SH, Johnston TH, Li Q, et al. A critique of available scales and presentation of the Non-Human Primate Dyskinesia Rating Scale [J]. Mov Disord, 2012, 27(11): 1373-1378.
- [11] Schmidlin E, Kaeser M, Gindrat AD, et al. Behavioral assessment of manual dexterity in non-human Primates [J]. J Vis Exp, 2011(57): 3258.
- [12] Chang A, Fox SH. Psychosis in Parkinson's disease: epidemiology, pathophysiology, and management [J]. Drugs, 2016, 76(11): 1093-1118.
- [13] Tao Y, Vermilyea SC, Zammit M, et al. Autologous transplant therapy alleviates motor and depressive behaviors in parkinsonian monkeys [J]. Nat Med, 2021, 27(4): 632-639.
- [14] Palmeri R, Buono VL, Bonanno L, et al. Potential predictors of quality of life in Parkinson's Disease: sleep and mood disorders [J]. J Clin Neurosci, 2019, 70: 113-117.
- [15] Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations [J]. Mov Disord, 2003, 18(7): 738-750.
- [16] Imbert C, Bezard E, Gross CE. A new rating scale for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in monkeys [J]. Fr Soc Neurosci Bordeaux, 1997, 3: 212.
- [17] Benazzouz A, Boraud T, Dubédat P, et al. Riluzole prevents MPTP-induced Parkinsonism in the Rhesus monkey: a pilot study [J]. Eur J Pharmacol, 1995, 284(3): 299-307.
- [18] Gomez-Mancilla B, Bedard PJ. Effect of nondopaminergic drugs on L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP-treated monkeys [J]. Clin Neuropharmacol, 1993, 16(5): 418-427.
- [19] Kurlan R, Kim MH, Gash DM. Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey Parkinsonism [J]. Mov Disord, 1991, 6(2): 111-118.
- [20] Papa SM, Chase TN. Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys [J]. Ann Neurol, 1996, 39(5): 574-578.
- [21] Schneider JS, Lidsky TI, Hawks T, et al. Differential recovery of volitional motor function, lateralized cognitive function, dopamine agonist-induced rotation and dopaminergic parameters in monkeys made hemi-parkinsonian by intracarotid MPTP infusion [J]. Brain Res, 1995, 672(1-2): 112-117.
- [22] Smith RD, Zhang Z, Kurlan R, et al. Developing a stable bilateral model of Parkinsonism in rhesus monkeys [J]. Neuroscience, 1993, 52(1): 7-16.
- [23] Gash DM, Zhang Z, Umberger G, et al. An automated movement assessment panel for upper limb motor functions in rhesus monkeys and humans [J]. J Neurosci Methods, 1999, 89(2): 111-117.
- [24] Brinkman J, Kuypers HG. Cerebral control of contralateral and ipsilateral arm, hand and finger movements in the split-brain Rhesus monkey [J]. Brain, 1973, 96(4): 653-674.
- [25] Kazennikov O, Wicki U, Corboz M, et al. Temporal structure of a bimanual goal-directed movement sequence in monkeys [J]. Eur J Neurosci, 1994, 6(2): 203-210.
- [26] Campos-Romo A, Ojeda-Flores R, Moreno-Briseño P, et al. Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian Primates in the HALLWAY task [J]. J Neurosci Methods, 2009, 177(2): 361-368.

- [27] Verhave PS, Vanwersch RA, van Helden HP, et al. Two new test methods to quantify motor deficits in a marmoset model for Parkinson's disease [J]. Behav Brain Res, 2009, 200(1): 214–219.
- [28] Kikuchi T, Morizane A, Doi D, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model [J]. Nature, 2017, 548(7669): 592–596.
- [29] Caiola M, Pittard D, Wichmann T, et al. Quantification of movement in normal and parkinsonian macaques using video analysis [J]. J Neurosci Methods, 2019, 322: 96–102.
- [30] Rodríguez-Violante M, Zerón-Martínez R, Cervantes-Arriaga A, et al. Who can diagnose Parkinson's disease first? role of pre-motor symptoms [J]. Arch Med Res, 2017, 48(3): 221–227.
- [31] Paul IA, English JA, Halaris A. Sucrose and quinine intake by maternally-deprived and control rhesus monkeys [J]. Behav Brain Res, 2000, 112(1–2): 127–134.
- [32] Qin D, Chu X, Feng X, et al. The first observation of seasonal affective disorder symptoms in *Rhesus* macaque [J]. Behav Brain Res, 2015, 292: 463–469.
- [33] Chu X. Preliminary validation of natural depression in macaques with acute treatments of the fast-acting antidepressant ketamine [J]. Behav Brain Res, 2019, 360: 60–68.
- [34] Shively CA, Register TC, Friedman DP, et al. Social stress-associated depression in adult female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Biol Psychol, 2005, 69(1): 67–84.
- [35] Durand E, Petit O, Tremblay L, et al. Social behavioral changes in MPTP-treated monkey model of Parkinson's disease [J]. Front Behav Neurosci, 2015, 9: 42.
- [36] Li M, Cui J, Xu B, et al. Sleep disturbances and depression are co-morbid conditions: insights from animal models, especially non-human primate model [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 827541.
- [37] Fifel K, Piggins H, Deboer T. Modeling sleep alterations in Parkinson's disease: how close are we to valid translational animal models? [J]. Sleep Med Rev, 2016, 25: 95–111.
- [38] Choudhury GR, Daadi MM. Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease [J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0202770.
- [39] Barraud Q, Lambrecq V, Forni C, et al. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model [J]. Exp Neurol, 2009, 219(2): 574–582.
- [40] Visanji NP, Gomez-Ramirez J, Johnston TH, et al. Pharmacological characterization of psychosis-like behavior in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2006, 21(11): 1879–1891.
- [41] Das NR, Sharma SS. Cognitive impairment associated with Parkinson's disease: role of mitochondria [J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(6): 584–592.
- [42] Solari N, Bonito-Oliva A, Fisone G, et al. Understanding cognitive deficits in Parkinson's disease: lessons from preclinical animal models [J]. Learn Mem, 2013, 20(10): 592–600.
- [43] Schneider JS, van Velson M, Menzaghi F, et al. Effects of the nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y on object retrieval performance in MPTP-treated monkeys: comparison with levodopa treatment [J]. Ann Neurol, 1998, 43(3): 311–317.
- [44] Schneider JS, Tinker JP, van Velson M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonist SIB-1508Y improves cognitive functioning in chronic low-dose MPTP-treated monkeys [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(2): 731–739.
- [45] Decamp E, Schneider JS. Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human Primates [J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(5): 1371–1378.
- [46] Decamp E, Tinker JP, Schneider JS. Attentional cueing reverses deficits in spatial working memory task performance in chronic low dose MPTP-treated monkeys [J]. Behav Brain Res, 2004, 152(2): 259–262.
- [47] Bidesi N, Andersen I, Windhorst A, et al. The role of neuroimaging in Parkinson's disease [J]. J Neurochem, 2021, 159: 660–689.
- [48] Suwijn SR, van Boheemen CJ, de Haan RJ, et al. The diagnostic accuracy of dopamine transporter SPECT imaging to detect nigrostriatal cell loss in patients with Parkinson's disease or clinically uncertain Parkinsonism: a systematic review [J]. EJNMMI Res, 2015, 5: 12.
- [49] Wing YK, Lam SP, Zhang J, et al. Reduced striatal dopamine transmission in REM sleep behavior disorder comorbid with depression [J]. Neurology, 2015, 84(5): 516–522.
- [50] Kang UJ, Boehme AK, Fairfoul G, et al. Comparative study of cerebrospinal fluid α -synuclein seeding aggregation assays for diagnosis of Parkinson's disease [J]. Mov Disord, 2019, 34(4): 536–544.
- [51] Wang S, Kojima K, Mobley JA, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles reveal biomarkers for neurologic disease [J]. EBioMedicine, 2019, 45: 351–361.
- [52] Schulz J, Takousis P, Wohlers I, et al. Meta-analyses identify differentially expressed micromas in Parkinson's disease [J]. Ann Neurol, 2019, 85(6): 835–851.
- [53] Dutta D, Jana M, Majumder M, et al. Selective targeting of the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway reduces α -synuclein spreading *in vitro* and *in vivo* [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5382.
- [54] Chu Y, Muller S, Tavares A, et al. Intrastriatal α -synuclein fibrils in monkeys: spreading, imaging and neuropathological changes [J]. Brain, 2019, 142(11): 3565–3579.
- [55] Zhang Y, Roy DS, Zhu Y, et al. Targeting thalamic circuits rescues motor and mood deficits in PD mice [J]. Nature, 2022, 607(7918): 321–329.

罗卓慧,庞硕,张连峰. CREB 通过调节突触可塑性调节记忆及与阿尔茨海默病的联系 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (11): 104-109.

Luo ZH, Pang S, Zhang LF. Advances of CREB in the regulation of memory through synaptic plasticity and its relationship with Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 104-109.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.014

CREB 通过调节突触可塑性调节记忆及 与阿尔茨海默病的联系

罗卓慧¹, 庞硕¹, 张连峰^{1,2*}

(1.中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,国家卫生健康委员会人类疾病
比较医学重点实验室,北京 100021;2.中国医学科学院神经科学中心,北京 100730)

【摘要】 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发病机制复杂,不可逆转的神经退行性疾病。AD 患者表现为记忆缺失,突触可塑性受损。本文关注与突触可塑性密切相关的环腺苷酸反应元件结合蛋白 (cAMP responsive element-binding protein, CREB), 总结 CREB 的结构、激活途径、下游基因及对记忆的调控作用,关注 CREB 与 AD 的联系,为基于神经可塑性的 AD 的研究提供参考。

【关键词】 CREB; 突触可塑性; 长期记忆; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0104-06

Advances of CREB in the regulation of memory through synaptic plasticity and its relationship with Alzheimer's disease

LUO Zhuohui¹, PANG Shuo¹, ZHANG Lianfeng^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC),
Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medicine College, Chinese Academy of Medical Sciences,
Beijing 100021, China. 2. Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is an irreversible heterogeneous neurodegenerative disease. AD patients have memory loss and impaired synaptic plasticity. In view of cAMP responsive element-binding protein (CREB), which is intimately associated with synaptic plasticity, this article summarizes the research progress on the structure, signaling pathways, downstream genes, and relative memory regulation. The involvement of CREB in AD development serves as a reference for AD researchers to improve synaptic plasticity.

【Keywords】 CREB; synaptic plasticity; long term memory; Alzheimer's disease

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

环腺苷酸反应元件结合蛋白 (cAMP responsive element-binding protein, CREB) 是碱性区亮氨酸拉链 (basic region-leucine zipper, bZIP) 转录因子超家族

的重要成员之一,定位于细胞核内,在脑组织的各种细胞中广泛表达。CREB 基因与环腺苷酸反应元件调制器 (cAMP responsive element-binding

【基金项目】 国家自然科学基金 (31970508)。

【作者简介】 罗卓慧 (1997—), 女, 博士, 研究方向: 基因工程动物模型。E-mail: 13979131230@163.com

【通信作者】 张连峰 (1963—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 转基因动物模型的研制及动物模型。E-mail: zhanglf@cnilas.org

modulator, CREM) 和激活转录因子-1 (activating transcription factor-1, ATF-1) 两个同源基因共同构成 CREB 转录因子家族^[1]。作为一种重要的转录因子, CREB 参与调节钙、神经营养因子、细胞因子信号通路以及各种细胞应激信号通路, 通过调节神经元相关蛋白的表达调控单个神经元及整体神经通路的功能, 主要调节分化、生存和可塑性, 影响学习记忆, 并与帕金森症、精神分裂症、酒精依赖、抑郁、焦虑等多种神经精神疾病的发生发展密切相关^[1]。

1 CREB 的结构与激活

CREB 蛋白的主要结构域包括 Q1 区、激酶诱导结构域(KID) 区、Q2/CAD 区和亮氨酸拉链结构域(bZIP) 区 4 个区域。位于蛋白 C 端的基本结构域介导 CREB 与 DNA 结合, Q1 和 Q2/CAD 两个结构域含有丰富的谷氨酰胺, bZIP 区介导与 DNA 的结合和二聚化, 其他的区域促进 CREB 与激活子或转录复合物结合。KID 区的 Ser-133 残基磷酸化后与转录激活子 CREB 结合蛋白(CREB binding protein, CBP) 结合, 在内在或相关的乙酰基转移酶的作用下 CREB 与核心转录机器相互作用诱导转录进行, 该过程可持续数小时^[2], Ser-133 位点是 CREB 激活的标志, 研究发现 Ser-133 位点激活的 CREB 对转录调控, 继而调节基础神经传输, 突触可塑性和空间认知发挥了不可或缺的作用。CREB S133A 突变小鼠在空间认知, 神经传输和神经电位等方面表现出明显的缺陷^[3], 而 Ser-142 位点磷酸化后促进 CREB 二聚体解聚, 抑制转录^[4]。回文序列“TGACGTCA”是 cAMP 反应元件, 可被 CREB 特异性识别。不同物种的 CRE 序列存在差异, 但“CGTCA”序列相对保守^[1]。

兴奋性神经递质、神经生长因子、G 糖蛋白偶联受体(G-PCRs) 配体和压力等可激活 CREB 的磷酸化, 常见的激活 CREB 磷酸化的通路按来源可分为 cAMP 信号通路、钙离子信号通路、生长因子诱导和压力诱导的信号通路, 包括 Ca/CaM/CaMK/CREB、G-PCRs/AC/cAMP/PKA/CREB、RTK/Ras/ERK/RSK/CREB 和 RTK/PI3K/AKT/CREB 信号通路等^[2], 近年来又发现 PPAR α /CREB^[5-6] 和 CCR5/CREB 通路^[7]。蛋白磷酸酶(protein phosphatase 1, PP1) 是 CREB 最主要的磷酸酶, 抑制 CREB 活性^[1,4]。除磷酸化修饰外, 研究发现 CREB 还存在糖基化修饰, 阻断 CREB 的糖基化可增强神经元轴突和树突生长,

促进长期记忆巩固^[8]。

CREB 是转录因子网络的重要组成部分, CREB 介导的转录受转录激活子和抑制子共同调节, CREB 的转录激活子包括激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)、CREB 调控的转录辅激活因子(CREB regulated transcription activator 1, CRTCA1) 和 CREB 结合蛋白(CREB binding protein, CBP)。AP-1 是亮氨酸拉链蛋白 Fos 和 Jun 的异二聚体, 通过调节 CREB 的转录水平调节突触强度和突触数目间接调节突触可塑性, CREB 又可正反馈调节 AP-1 的表达^[9]。静息状态下神经元中的 CRTCA1 定位于突触上, 在局部刺激下 CRTCA1 被钙流或钙调磷酸酶激活, 迅速转移至核内, 与喂食状态感应核受体(fed-state sensing nuclear receptor, FXR) 竞争性结合 CREB^[10]。CRTCA1 的核内表达受 cAMP 调节^[11], CRTCA1 与 CREB 的 bZIP 区结合, 促进 CREB 与 DNA 二聚化结合可激活 CREB 的非磷酸化状态^[12]。CBP/p300 具有组蛋白乙酰转移酶活性, 与 CREB 的 KID 区结合并与和 Ser133 位点相互作用^[12], 通过招募 p53、ATF-1、ATF-2、junB、c-myc、E2F、c-jun 等转录因子介导转录^[13]。

2 CREB 的下游目标基因

CREB 被多种信号通路激活后, 可在 T 细胞、肝细胞和精母细胞的分化等长期适应过程中发挥作用。已确定的 CREB 目标基因超过 100 种, 这些基因在结构上含有一个或多个 CREB 结合位点, 影响核转录、信号转导、神经传输、代谢、细胞增殖与生长、细胞结构等方面^[2,14]。

CREB 可通过调节下游基因调节突触可塑性。一方面, CREB 可激活一系列突触可塑性相关基因包括 BDNF、NGF、tPA、Arc、PPARGC1、PLC γ 、VGF 等^[15]。BDNF 和 NGF 是神经营养因子, 在发育过程中支持神经元和神经突生长, 共同调节细胞凋亡、细胞连接、纤维引导和突触形态。BDNF 在海马体中指导神经发生, 在突触前和突触后位置发挥旁分泌因子和自分泌因子的作用, 促进血清素和多巴胺的传递。体内和体外研究发现 BDNF 可促进神经递质释放, 突触传输和 LTP^[16]。作为一种神经保护因子, BDNF 对许多神经和精神疾病都具有治疗潜力^[17]。BDNF 调节中枢神经系统的发育与可塑性, 在 LTP 中通过增加突触囊泡的释放调节突触的结构和功能, 表现为长期调节作用^[18]。NGF 通过调节

胆碱能系统调节 LTP^[19]。tPA 是细胞外丝氨酸蛋白酶,促进纤溶酶原转化为纤溶酶,纤溶酶可降解部分细胞外基质,通过调节谷氨酸受体增加谷氨酸诱导的钙离子内流,增加 PKA 活性^[18]。Arc 是一种立早基因(immediately early genes, IEG),通过调节 AMPA 型谷氨酸受体(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazopropionic acid receptor, AMPAR)的转运和细胞骨架调控突触强度^[20]。线粒体定位于神经轴突末梢和树突,是真核细胞内的负责能量供给和钙缓冲细胞器,调节钙和氧化还原信号,与 LTP 的发生与维持密切相关^[21],PPARGC1 是调节线粒体融合的重要基因,促进形成缓慢的氧化纤维,影响线粒体发生和突触形成^[21]。PLC γ 通过被 TrkB 招募,激活下游突触可塑性信号通路,主要维持海马内树突形态与棘突收缩功能^[21-23],VGF 是一种分泌多肽,在神经细胞和神经内分泌细胞中均表达,定位于胞体与突触内,剂量依赖性增加突触电位^[24]。

另一方面,许多目标基因自身就是转录因子,如 C/EBP β 、Egr1、Nurr1 等,这些基因对神经功能表现为间接调节作用^[14]。

3 CREB 通过调节突触可塑性调控记忆

突触可塑性是中枢神经系统参与感知、学习和记忆的细胞基础^[25-27],突触前膜释放神经递质触发突触后膜的能力称为突触效能,受到刺激时突触效能的变化称为突触可塑性^[27],常见的突触刺激包括学习记忆、环境变化和脑损伤^[28]。突触可塑性改变时,突触前后的神经传输和膜转运情况均改变,相关蛋白合成或激活,细胞骨架重塑,突触可塑性在神经元层面上表现为突触发生和棘突生长^[28],在电位上表现为长时程增强(long-term potential, LTP)和长时程抑制(long-term depression, LTD)两种。LTP 和 LTD 的诱导,表达和相互作用依赖相关突触蛋白基因的转录与翻译和树突骨架的重塑^[29]。按照突触效能变化的持续时间突触可塑性可分为短期突触可塑性(持续几毫秒至几分钟)和长期突触可塑性(持续超过几十分钟)^[27]。突触效能变化的第一阶段细胞内仅对现有的蛋白进行修饰,第二阶段转录并合成新的蛋白^[30]。

记忆是重要的神经活动,包括短期记忆和长期记忆两种,短期记忆立即形成,长期记忆形成缓慢但是相对短期记忆更稳固,需要合成相关 mRNA 和蛋白质^[31]。记忆在海马区中的形成,在大脑皮层中

的巩固,在记忆形成的不同阶段突触可塑性发挥的作用表现为时空特异性^[32]。研究发现与青年的对照组小鼠相比老年小鼠突触可塑性明显下降,树突的棘突数目减少,生物反应路径分析(ingenuity pathway analysis, IPA)结果表明 CREB 在该突触可塑性神经网络中占据中心位置,相比青年对照组小鼠,老年小鼠 CREB 的表达明显下调^[33]。由反义寡核苷酸, RNA 干扰和基因突变等导致 CREB 表达下调时,将导致记忆缺陷,影响回忆功能。相反, CREB 表达增加时,记忆增强^[34]。

CREB 通过调节突触可塑性调节记忆,主要影响长期记忆。研究发现抑制海马 CA1 区 CREB 转录因子家族基因后,与对照组相比小鼠短期记忆无明显差异,长期记忆和空间记忆受损^[31]。CREB 已被证明是参与小鼠、大鼠、海兔、果蝇等多种动物长期记忆的重要转录因子^[18], CREB 对突触可塑性的调节作用表现在以下几个方面:(1)影响离子流, CREB 激活后调控电压门控 Na⁺-K⁺通道的开放,钠离子流增加,钾离子流减少。(2)影响递质释放, CREB 激活后突触前膜神经递质的释放增加,突触效能增加^[35]。(3)影响神经元兴奋性,研究发现相比野生型细胞相同强度的电脉冲在 CREB 过表达细胞引发更高的动作电位及更低的动作电位后超极化, CREB 激活后海马区谢氏侧支神经元 L-LTP 增加^[36],神经元兴奋性增加,海马 CA1 区神经元产生 L-LTP 所需要的刺激阈值降低^[18]。(4)影响树突的棘突形成,抑制 CREB 后棘突数目减少^[18]。(5)影响与可塑性相关基因的转录,进而调控相关生理过程^[18]。CREB 通过调节固有神经元的兴奋性的影响神经元进入记忆轨迹的可能性,增加 IEG 的表达,促进记忆相关基因的转录,实现对记忆的分配与调控^[34,37]。当环境发生变化时, CREB 参与皮层的躯体感觉和运动通路的重新投射,增加轴突数目和神经元棘突数目,诱导回路中新连接的形成,在脑卒中恢复中发挥重要作用^[38]。

4 CREB 与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的关系

研究发现 CREB 不仅调控许多神经可塑性相关基因的转录,还调控 AD 相关蛋白的表达。受 CREB 调控的淀粉样前体蛋白胞内结构域相关蛋白(ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B, AIDA-1)主要分布在突触后密度区域(post synaptic density, PSD)。AIDA-1 基因的转录受

CREB 调控^[39],是迟发型 AD 的候选风险基因^[40]。一方面,AIDA-1 通过下调 γ -分泌酶降低 $A\beta$ 分泌,降低 $A\beta$ 含量^[39],另一方面,AIDA-1 是突触后密度蛋白(discs large MAGUK scaffold protein 4, PSD95)/N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)复合物的结合蛋白,在 NMDAR 介导的突触传输和可塑性中必不可少,AIDA-1 失活导致海马依赖的突触传输缺陷,AIDA-1 基因敲除小鼠活动性增加,前脉冲抑制,出现刻板行为^[40]。

AD 患者表现出严重的认知和记忆恶化^[41],突触可塑性损伤,神经元内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),胞外淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)沉积和神经元大量死亡,海马 CA1 和 CA3 区椎体神经元密度降低和神经元树突棘密度降低是 AD 早期的重要病理表型之一,这些突触异常是由可溶性 $A\beta$ 寡聚体($A\beta$ oligomers, $A\beta$ Os)积聚和过度磷酸化的微管相关蛋白 tau (hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau, HPTau)引起^[29]。 $A\beta$ Os 与突触后膜的 NMDAR 结合,诱导谷氨酸兴奋毒性,扰乱谷氨酸再摄取及表面 AMPAR 的去除,导致线粒体损伤,氧化应激和钙离子稳态失衡,产生的突触毒性最终导致细胞死亡^[42]。以 Tg2576、PDAPP、APP/PS1、J20、3×Tg、5×FAD 为代表的 AD 转基因小鼠模型表现出明显的突触可塑性损伤,LTP 受损^[43]。Tau 通过调控微管结合域与微管蛋白的结合调控微管动力学,Tau 异常时抑制神经元生长和轴突延伸,微管密度降低,HPTau 从微管上解离,形成神经纤维缠结,损害正常的树突结构^[44]。AD 患者脑内 CREB 和磷酸化的 CREB (phosphorylated CREB, P-CREB) 的表达均下降^[45],AD 常见动物模型 APP/PS1 小鼠 3 月龄 P-CREB 明显下调^[46],3×Tg 小鼠 CREB 和 P-CREB 表达明显下降^[47]。 $A\beta$ 病理假说是 AD 重要的病理假说之一,体外研究发现 $A\beta_{42}$ 诱导的神经元 P-CREB 表达下降^[45,47], $A\beta$ Os 诱导的神经元 P-CREB 表达下降^[13]。 $A\beta$ 通过下调 NO/cGMP/cGK/CREB 通路损伤突触可塑性,影响学习记忆功能^[48]。

CREB 与 AD 联系密切,且 AD 表现的突触可塑性损伤先于 $A\beta$ 沉积和 NFTs 病理表型出现,可能是可逆的^[29],因此 CREB 可能是 AD 潜在的治疗靶点之一。某些磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)抑制剂和乙酰胆碱酯酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitor, AChEI)已被发现可通过维持或激活 CREB

的 Ser-133 位点磷酸化改善认知功能。PDE 的主要功能是水解 cAMP 和 cGMP。部分 PDE 抑制剂通过促进抑制 PDE,提高 cAMP 和 cGMP 的含量,激活 CREB 进而改善长期记忆缺陷和认知障碍^[49]。PDE4 抑制剂罗利普兰在 APP/PS1 小鼠中通过激活 cAMP/PKA/CREB 通路,改善 LTP 缺陷,改善条件性学习和长期空间学习记忆^[50]。在高脂饮食和低剂量四氮唑诱导的 SD 大鼠糖尿病认知缺陷模型中,罗利普兰可改善长期的空间记忆,提高 P-CREB 和突触相关蛋白 BDNF、ARC 的表达^[53]。研究发现衰老后 PDE5 抑制剂(PDE5 inhibitors, PDE5Is)的活性和表达增加^[48]。以米罗那非为代表的 PDE5Is 通过激活 cGMP/PKG/CREB 通路增加 LTP,减少细胞凋亡,HPTau 和 $A\beta$ 表型,改善认知功能^[48,52]。除 PDE 抑制剂外,阿司匹林已被证明可与 PPAR α 结合,在 5×FAD 小鼠中通过激活 PPAR α /CREB 通路激活钙离子内流,加强下游 BDNF, PSD95 和 NR2A 的表达,增加棘突的数目和密度^[5]。组胺 H3 受体(H3 receptor, H3R)抑制剂塞普酰胺可通过激活 CREB 介导的自噬途径和溶酶体途径,减少 APP/PS1 小鼠缺血性损伤和神经元损伤,改善认知功能,在原代细胞模型可明显改善 $A\beta$ 病理表型^[53]。三环类抗抑郁药地昔帕明在 AD 大鼠中通过上调 P-CREB 改善认知障碍^[42]。糖皮质激素受体抑制剂米非司酮可改善 3×Tg 小鼠的认知缺陷,减少营养不良的神经突数目,改善 $A\beta$ 和 HPTau 病理表型,并上调 CREB 和 P-CREB 的表达^[47]。

5 结果和展望

现有的抗 AD 药物包括 AChEI (多奈哌齐、利伐斯的明、加兰他敏),NMDAR 抑制剂(美金刚)和基于 $A\beta$ 病理表型的药物阿杜那单抗。以上药物可缓解 AD 症状,已被批准上市,但目前没有药物可彻底延缓 AD 的发病进程。现有的 AD 治疗措施不足,AD 发生发展机制依旧不明,发现更多有潜力的 AD 靶点,并针对特定的靶点进行药物研发,是 AD 治疗的研究方向之一。CREB 是与突触可塑性密切相关的蛋白,AD 患者 CREB 表达和活性均抑制,表现出明显的记忆缺失,认知缺陷和突触可塑性损伤。本文总结 CREB 的结构与功能,归纳了 CREB 通过调节突触可塑性对记忆的调节作用及 CREB 激活对认知障碍的改善作用。在一定范围内通过调节 CREB 实现对突触可塑性的调节,在避免兴奋毒性的前提

下改善突触间信息传递, CREB 的直接或间接激活剂或许是 AD 潜在的治疗措施。

参考文献:

- [1] Alberini CM. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1): 121–145.
- [2] Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. *Neuron*, 2002, 35(4): 605–623.
- [3] Morè L, Privitera L, Perrett P, et al. CREB serine 133 is necessary for spatial cognitive flexibility and long-term potentiation [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 219: 109237.
- [4] Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(8): 436–445.
- [5] Patel D, Roy A, Kundu M, et al. Aspirin binds to PPAR α to stimulate hippocampal plasticity and protect memory [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(31): E7408–E7417.
- [6] Roy A, Kundu M, Jana M, et al. Identification and characterization of PPAR α ligands in the hippocampus [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(12): 1075–1083.
- [7] Zhou M, Greenhill S, Huang S, et al. CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory [J]. *Elife*, 2016, 5: e20985.
- [8] Rexach JE, Clark PM, Mason DE, et al. Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(3): 253–261.
- [9] Sanyal S, Sandstrom DJ, Hoeffler CA, et al. AP-1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2002, 416(6883): 870–874.
- [10] Pan Y, He X, Li C, et al. Neuronal activity recruits the CRTC1/CREB axis to drive transcription-dependent autophagy for maintaining late-phase LTD [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(3): 109398.
- [11] Ch'ng TH, Uzgil B, Lin P, et al. Activity-dependent transport of the transcriptional coactivator CRTC1 from synapse to nucleus [J]. *Cell*, 2012, 150(1): 207–221.
- [12] Saura CA, Cardinaux JR. Emerging roles of CREB-regulated transcription coactivators in brain physiology and pathology [J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(12): 720–733.
- [13] Saura CA, Valero J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders [J]. *Rev Neuro*, 2011, 22(2): 153–169.
- [14] Impey S, McCorkle SR, Cha-Molstad H, et al. Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 1041–1054.
- [15] Chen DY, Bambah-Mukku D, Pollonini G, et al. Glucocorticoid receptors recruit the CaMKII α -BDNF-CREB pathways to mediate memory consolidation [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(12): 1707–1714.
- [16] Castrén E, Antila H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(8): 1085–1095.
- [17] Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7777.
- [18] Pang PT, Lu B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF [J]. *Ageing Res Rev*, 2004, 3(4): 407–430.
- [19] Conner JM, Franks KM, Titterness AK, et al. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(35): 10883–10889.
- [20] Zhang H, Bramham CR. Arc/Arg3.1 function in long-term synaptic plasticity: Emerging mechanisms and unresolved issues [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 54(8): 6696–6712.
- [21] Todorova V, Blokland A. Mitochondria and synaptic plasticity in the mature and aging nervous system [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(1): 166–173.
- [22] Minichiello L, Calella AM, Medina DL, et al. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation [J]. *Neuron*, 2002, 36(1): 121–137.
- [23] Zhou L, Martinez SJ, Haber M, et al. EphA4 signaling regulates phospholipase C γ 1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(19): 5127–5138.
- [24] Alder J, Thakker-Varia S, Bangasser DA, et al. Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(34): 10800–10808.
- [25] Fernández de Sevilla D, Nuñez A, Araque A, et al. Metabotropic regulation of synaptic plasticity [J]. *Neuroscience*, 2021, 456: 1–3.
- [26] Kornijuk V, Kim D, Kim G, et al. Simplified calcium signaling cascade for synaptic plasticity [J]. *Neural Netw*, 2020, 123: 38–51.
- [27] Barroso-Flores J, Herrera-Valdez MA, Galarraga E, et al. Models of short-term synaptic plasticity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1015: 41–57.
- [28] Gorgey AS, Witt O, O'Brien L, et al. Mitochondrial health and muscle plasticity after spinal cord injury [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2019, 119(2): 315–331.
- [29] Benarroch EE. Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: emerging mechanisms [J]. *Neurology*, 2018, 91(3): 125–132.
- [30] Costa-Mattoli M, Gobert D, Harding H, et al. Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2 α kinase GCN2 [J]. *Nature*, 2005, 436(7054): 1166–1173.
- [31] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory [J]. *Neuron*, 2002, 34(3): 447–462.

- [32] Goto A, Bota A, Ken M, et al. Stepwise synaptic plasticity events drive the early phase of memory consolidation [J]. Science, 2021, 374(6569): 857–863.
- [33] Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice [J]. Nat Med, 2014, 20(6): 659–663.
- [34] Lisman J, Cooper K, Sehgal M, et al. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability [J]. Nat Neurosci, 2018, 21(3): 309–314.
- [35] Davis GW, Schuster CM, Goodman CS. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity [J]. Neuron, 1996, 17(4): 669–679.
- [36] Gruart A, Benito E, Delgado-García JM, et al. Enhanced cAMP response element-binding protein activity increases neuronal excitability, hippocampal long-term potentiation, and classical eyeblink conditioning in alert behaving mice [J]. J Neurosci, 2012, 32(48): 17431–17441.
- [37] Sehgal M, Zhou M, Lavi A, et al. Memory allocation mechanisms underlie memory linking across time [J]. Neurobiol Learn Mem, 2018, 153(Pt A): 21–25.
- [38] Caracciolo L, Marosi M, Mazzitelli J, et al. CREB controls cortical circuit plasticity and functional recovery after stroke [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2250.
- [39] Marcello E, Di Luca M, Gardoni F. Synapse-to-nucleus communication; from developmental disorders to Alzheimer's disease [J]. Curr Opin Neurobiol, 2018, 48: 160–166.
- [40] Parra-Damas A, Saura CA. Synapse-to-nucleus signaling in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders [J]. Biol Psychiatry, 2019, 86(2): 87–96.
- [41] Alzheimer's association report. 2021 Alzheimer's disease facts and figures [J]. Alzheimers Dement, 2021, 17(3): 327–406.
- [42] Kaushik M, Kaushik P, Parvez S. Memory related molecular signatures; the Pivots for memory consolidation and Alzheimer's related memory decline [J]. Ageing Res Rev, 2022, 76: 101577.
- [43] Singh A, Abraham WC. Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease [J]. Exp Brain Res, 2017, 235(6): 1645–1655.
- [44] Weerasinghe-Mudiyanselage PDE, Ang MJ, Kang S, et al. Structural plasticity of the hippocampus in neurodegenerative diseases [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6): 3349.
- [45] Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease [J]. Life Sci, 2020, 257: 118020.
- [46] Ettcheto M, Abad S, Petrov D, et al. Early preclinical changes in hippocampal CREB-binding protein expression in a mouse model of familial Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(6): 4885–4895.
- [47] Baglietto-Vargas D, Medeiros R, Martinez-Coria H, et al. Mifepristone alters amyloid precursor protein processing to preclude amyloid beta and also reduces tau pathology [J]. Biol Psychiatry, 2013, 74(5): 357–366.
- [48] El-Bakly W, Wagdy O, Sobhy A, et al. The efficacy and underlying mechanism of phosphodiesterase-5 inhibitors in preventing cognitive impairment and Alzheimer pathology: a systematic review of animal studies [J]. Behav Brain Res, 2019, 372: 112004.
- [49] Tully T, Bourtchouladze R, Scott R, et al. Targeting the CREB pathway for memory enhancers [J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(4): 267–277.
- [50] Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, et al. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment [J]. J Clin Invest, 2004, 114(11): 1624–1634.
- [51] Zhong Y, Zhu Y, He T, et al. Rolipram-induced improvement of cognitive function correlates with changes in hippocampal CREB phosphorylation, BDNF and Arc protein levels [J]. Neurosci Lett, 2016, 610: 171–176.
- [52] Kang BW, Kim F, Cho JY, et al. Phosphodiesterase 5 inhibitor mirodenafil ameliorates Alzheimer-like pathology and symptoms by multimodal actions [J]. Alzheimers Res Ther, 2022, 14(1): 92.
- [53] Wang J, Liu B, Xu Y, et al. Activation of CREB-mediated autophagy by thioperamide ameliorates β -amyloid pathology and cognition in Alzheimer's disease [J]. Aging Cell, 2021, 20(3): e13333.

[收稿日期]2023-01-05

李泓宇,兰瑞,付雪琴,等. miRNA 在缺血性脑卒中神经保护领域的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 110-117.

Li HY, Lan R, Fu XQ, et al. Progress of research into the roles of miRNA in neuroprotection against ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 110-117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.015

miRNA 在缺血性脑卒中神经保护领域的研究进展

李泓宇¹, 兰 瑞^{2*}, 付雪琴¹, 王玮玮¹, 邹旭欢¹, 王漫漫¹, 张 勇³, 唐 琛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;
3.郑州大学第三附属医院,郑州 450000)

【摘要】 缺血性脑卒中是一种具有高残疾率和死亡率,严重者可危及生命的脑血管疾病,在全球范围内具有沉重的社会经济负担。缺血性脑卒中的病因及病理过程是由多种分子过程介导,这些分子机制部分转录后被动态调节。越来越多证据表明,微小 RNA(micro-ribonucleic-acid,miRNA)作为转录后基因沉默的重要介质在基因表达和缺血性脑卒中病理过程中起着至关重要的作用。在本综述中,我们介绍了 miRNA 在缺血性脑卒中不同机制中的神经保护作用。由于通过特定的药物和非药物治疗促进或抑制 miRNA 的表达可能有益于缺血性脑卒中的恢复,本文还详细论述了关于 miRNA 在缺血性脑卒中的临床诊断和治疗相关作用,旨在对本领域临床和基础研究提供一定的参考。

【关键词】 缺血性脑卒中;miRNA;神经保护;脑损伤机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0110-08

Progress of research into the roles of miRNA in neuroprotection against ischemic stroke

LI Hongyu¹, LAN Rui^{2*}, FU Xueqin¹, WANG Weiwei¹, ZOU Xuhuan¹, WANG Manman¹, ZHANG Yong³,
TANG Chen¹, LIU Shuang¹

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China.
2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000.
3. the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Ischemic stroke is a cerebrovascular disease that leads to high incidences of disability and mortality and can be life-threatening in severe cases, thus, it has a heavy social and economic burden worldwide. The etiology and pathological processes of ischemic stroke are mediated by a variety of molecular processes, some of which are dynamically regulated after transcription. Increasing evidence has shown that micro (mi)-RNA, as important mediators of post-transcriptional gene silencing, play crucial roles in gene expression and the pathological processes of ischemic stroke. In this review, we discuss the neuroprotective effects of miRNAs in the different mechanisms involved in ischemic stroke. As the promotion or inhibition of miRNA expression through specific drug and non-drug therapies may be beneficial to the

【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);河南省自然科学基金资助项目(202300410399)。

【作者简介】 李泓宇(1999—)女,硕士研究生,研究方向:中西医结合脑病方向的基础研究。E-mail:lihongyu03042022@163.com

【通信作者】 兰瑞(1984—)女,博士,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

recovery of ischemic stroke, the use of miRNA in clinical diagnosis and treatment are also discussed in detail in this paper. This article aims to provide a reference for further clinical and basic research in this field.

【Keywords】 ischemic stroke; miRNA; neuroprotection; mechanisms of brain injury

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

脑卒中是一种残疾率、复发率和死亡率都很高的脑血管疾病,严重影响了患者的生活质量^[1]。脑卒中可以分为缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)和出血性脑卒中,其中 87% 的病例属于缺血性脑卒中^[2]。尽管组织纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)溶栓和血管内血栓切除术是临床治疗的重要手段,但改善卒中后长期恢复的方法仍然有限。因此,保护神经细胞免受脑缺血性损伤一直是 IS 的治疗目标。

miRNA 属于小的非编码 RNA 分子,可以通过靶向 mRNA 的 3' UTR 或促进 mRNA 的降解来调节基因表达^[3]。miRNA 主要调节脑内关键基因的表达,在细胞凋亡、抗炎、抗氧化应激、神经分化、脑血管生成等过程中均发挥了重要作用^[4]。本文综述了近年来 miRNA 参与缺血性脑卒中的神经保护的文献证据,从而指出其在神经元保护方面的潜力。

1 miRNA 概论

miRNA 是由 18~25 个核苷酸组成的小的单链非编码 RNA 分子,miRNA 来源于细胞核,它首先被 RNA 聚合酶 II 转录为初级 miRNA,然后通过微处理器切割成前体 miRNA,随后又被转移到细胞质中并加工成双链 RNA,成为成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 被释放到受体细胞中参与转录并进行基因表达,同时调节多种细胞和分子途径^[5]。miRNA 几乎在所有细胞活动中都起着至关重要的作用,它可通过多种途径发挥生物学功能^[6-7]。并且不同的 miRNA 可在缺血性损伤后负责脑细胞之间的通信,缺血后脑细胞产生的 miRNA 可以穿过细胞外囊泡或外泌体中的血脑屏障(blood brain barrier, BBB),然后在脑缺血再灌注后的神经修复机制中起着调节作用^[8]。

2 miRNA 在缺血性脑卒中神经保护作用

据报道,miRNA 在中枢神经系统疾病发生发展中起着重要的作用^[9-10]。Gómez-Valero 等^[11]研究表明,miRNA 对不同退行性痴呆疾病具有神经保护作用,还反映了痴呆疾病差异性特征,有助于路易体痴呆和阿尔茨海默病的鉴别诊断。Bai 等^[12]研究

证实,在帕金森疾病中,miRNA 抑制了神经胶质细胞中的 NF- κ B 信号传导,减少了神经胶质细胞活化和神经炎症,多巴胺产生增多,进而达到了神经保护作用。然而 miRNA 在 IS 中的神经保护机制了解甚少,有研究认为^[3,13-15],miRNA 对缺血性脑卒中的神经保护作用与抑制炎症、减少凋亡、促进血管新生、抑制氧化应激、增强神经可塑性和神经发生等机制有关。

2.1 miRNA 抑制炎症反应

炎症反应是 IS 神经元死亡的主要原因之一^[16],炎症反应在脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)后几分钟内开始,它的发生机制包括脑驻留细胞的激活和外周白细胞通过 BBB 浸润到脑实质中,活化的小胶质细胞和星形胶质细胞与浸润的外周免疫细胞一起释放活性氧(reactive oxygen species, ROS)、促炎细胞因子和其他神经毒性物质,从而导致神经元死亡^[17]。Wang 等^[18]实验证实,miR-34-73b 拮抗剂可以显著减弱大鼠脑组织缺血中促炎因子(iNOS、COX-2、TNF- α 和 IL-6)和细胞因子信号传导抑制因子 3(suppressors Of Cytokine Signaling 3, SOCS3)的表达,来保护神经元细胞,并且在体外实验中取得相同结果。郭泉等^[19]发现,miR-221 在脑缺血再灌注大鼠模型中,下调 miR-221 的表达后可以明显抑制炎症反应,从而达到神经保护的作用。保护 BBB 的完整性减弱其渗透性也是抑制炎症反应的重要途径之一。Bernstein 等^[20]研究表明,miR-98 减少了促炎因子 Ly6C 的浸润,并降低了受影响区域内活化的 M1 小胶质细胞的数量,进而减弱 BBB 渗透性从而达到神经保护的作用。而来自外周白细胞的 miR-29b 则可以通过肿瘤坏死因子(C1q tumor necrosis factor, C1QTNF)来增强 BBB 完整性,从而减弱炎症反应^[21]。也有其他研究证实,来源于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)的外泌体 miRNA 对炎症反应具有抑制作用。例如 Zhao 等^[22]发现来自 MSC 的外泌体 miR-223-3p 抑制了 M1 小胶质细胞极化引起的促炎反应,减轻了脑缺血再灌注损伤,从而改善了神经功能障碍,促进了学习和记忆能力。来源于 MSC 的外泌体 miR-542-3p 通过抑制 Toll 样受体(toll-like

receptor 4, TLR4) 来抑制脑缺血后导致的神经胶质细胞炎症反应^[23]。此外,外泌体衍生的 miR-146a-5p 通过抑制 IRAK1/TRAF6 信号通路,降低 NF- κ B 活化和 M1 极化,最终减少脑缺血再灌注诱导的组织水肿、细胞死亡、缺血性梗死和功能性运动缺陷^[24]。大量证据强调了 miRNA 在缺血性脑卒中炎症反应中的调节作用,并表明 miRNA 在 IS 的神经保护中的潜在作用。

2.2 miRNA 抑制细胞凋亡

IS 后会出现大量的细胞凋亡。小胶质细胞在调节细胞凋亡和神经保护起着关键的作用,活化的小胶质细胞产生的外泌体,称为 M2 表型小胶质细胞外泌体 (bv2-exosome, BV2-Exo)。有研究证明, BV2-Exo 衍生的 miRNA 在体内外会被神经元吸收,从而减弱氧葡萄糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 后的神经元凋亡^[25-27]。Zhang 等^[25]发现 Notch1 是 miR-137 的直接靶标,miR-137 在 BV2-Exo 表达升高,miR-137 通过靶向 Notch1 信号通路保护神经元免受 OGD 引起的神经元凋亡。Song 等^[26]发现泛素特异性蛋白酶 14 (ubiquitin-specific protease 14, USP14) 是 miR-124 的直接下游靶标, BV2-Exo 可以通过 miR-124 及其下游靶标 USP14 减轻缺血性脑损伤和凋亡并促进神经元存活。其他研究表明, miRNA 还可以通过抑制靶基因或信号通路来发挥抗凋亡作用。FOXO1 被发现是 miR-27a-3p 在 HT22 细胞中的直接靶基因, miR-27a-3p 拮抗剂可以显著减轻了 I/R 大鼠模型的体内症状,而 miR-27a-3p 可能是通过靶向 FOXO1 抑制 I/R 损伤^[27]。此外,来自 MSC 的外泌体 miR-26a-5p 是通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK6) 来减少小胶质细胞凋亡,从而减轻小鼠的脑缺血再灌注损伤^[28]。源自内皮祖细胞的 miR-126 也被证明可以抑制细胞凋亡, miR-126 水平与梗死体积和细胞凋亡呈负相关,与微血管密度呈正相关,上调 miR-126 水平对缺氧诱导的神经元凋亡和轴突生长具有保护作用^[29]。而 miR-29b-3p 的抗凋亡作用是通过调节 PTEN/Akt 信号通路来减轻缺氧缺血性脑损伤的作用^[30]。值得一提的是, MSC 衍生的外泌体 miR-145 可以显著抑制氧糖剥夺再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 后小胶质细胞的凋亡,细胞周期停滞和氧化应激反应,这些是通过 miR-145 从 MSC 转移到小胶质细胞中,然后小胶质细胞极化转变为抗炎 M2 表型来完成的^[31]。

2.3 miRNA 抑制氧化应激反应

氧化应激反应与 I/R 损伤的病理进展密切相关,它是由于 ROS 的过量产生或降解不足引起的,在生理条件下,ROS 的产生和清除二者之间会保持平衡, I/R 后这种平衡就会被打破,会表现为 ROS 产量增加、抗氧化剂消耗增加,最后诱导蛋白质、脂质、DNA 和 RNA 的氧化损伤。因此,在脑缺血后, miRNA 可以通过内源性促氧化酶和抗氧化酶调控 ROS 生成来减少这些有害作用^[32]。Chu 等^[33]证实, Nrf2 是调节内源性抗氧化剂的重要转录因子,而 miR-144 是 I/R 损伤中 Nrf2 的上游调节因子,抑制 miR-144 活性可以在翻译后促进 Nrf2/ARE 途径的抗氧化应激防御,从而缓解了 I/R 后的氧化应激反应,促进神经元细胞的修复。另外,在 OGD 模型中, miR-31 的过表达和多囊肾病 1 型致病基因 (polystic kidney disease 1, PKD1) 的沉默减轻了氧化应激诱导的神经元损伤,降低了 ROS 水平,同时神经元活力升高。所以说, miR-31 是通过下调 PKD1 和 JAK/STAT3 途径来减轻 IS 小鼠的炎症反应以及氧化应激诱导的神经元损伤^[34]。Shi 等^[35]证实,肌细胞增强因子 2D (myocyte enhancer factor 2D, MEF2D) 是 miR-217 的直接靶标, miR-217 通过 MEF2D 抑制 NADH 脱氢酶亚基 6 (NADH dehydrogenase subunit 6, ND6) 的表达。MEF2D 的过表达可以减少 OGD 后神经元氧化应激反应和 ROS 的生成,减轻神经元损伤。非编码 RNA OIP5-AS1 与缺血性脑卒中密切相关,上调 lncRNA OIP5-AS1 可以使 miR-186-5p 激活 TNF 相关蛋白 3 (tumor necrosis factor-related protein 3, CTRP3), 保护神经元免受 I/R 诱导的炎症和氧化应激反应^[36]。而且 lncRNA OIP5-AS1 还可以通过调控 miR-155-5p/IRF2BP2 轴来抑制氧化应激和炎症反应,减轻 HMC3 和 SH-SY5Y 细胞 OGD/R 诱导引起的细胞损伤^[37]。综上所述, miRNA 可以有效抑制氧化应激反应并为缺血性脑卒中的神经保护提供新的靶向基因。

2.4 miRNA 促进血管新生

血管新生是目前公认的治疗 IS 的一个潜在靶点,它有助于在 IS 后脑组织的神经功能的恢复。血管新生是通过刺激血管的生长来实现的,血管的生成可使脑灌注趋于稳定,继而促进神经元的生存,提高大脑可塑性及恢复神经功能^[38]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial cell growth factor,

VEGF)是调控血管生成的关键分子之一。miRNA 在 VEGF 及相关信号通路中发挥着直接或间接调控血管生成的作用。Sun 等^[39]认为 miR-15a/16-1 簇的内皮靶向缺失会减轻卒中后脑梗死和萎缩,并改善缺血性卒中后长期感觉运动和认知障碍。它通过上调 VEGF,纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor receptor 2,FGFR2)及受体 VEGFR2 和 FGFR1 的蛋白表达促进血管重塑和血管生成来增加同侧脑的血流量,有利于 IS 后的神经恢复。而 miR-107 模拟物是通过增强内皮 VEGF165/164 的水平促进血管生成来减少缺血性脑梗死并增加半影区域的毛细血管数量。Fan 等^[40]研究证实,抑制 miR-377 的表达可以促进脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells,BMEC)的毛细管样管形成和细胞增殖迁移,OGD 后 miR-377 调节了早期生长应答因子 2(early growth response protein 2,EGR2)的抗炎作用和 VEGF 的血管生成作用,所以抑制 miR-377 可减少 MCAO 大鼠脑梗死体积并抑制炎症促进血管生成,从而达到神经保护的作用。除此之外,还有其他研究证明 miRNA 有益于神经保护,例如 miR-27b 转染增加了大脑中动脉闭塞后半影区的血管生成,从而促进了缺血后的恢复并改善了神经行为表现^[41]。另有研究发现抑制 miR-155 的过表达后,可以明显缓解大鼠脑组织的病理损伤,升高网络微血管密度(microvessel density,MVD)和 VEGF 表达水平,并通过 PI3K/AKT 信号通路降低炎症反应,促进血管新生,从而发挥神经元保护作用^[42]。总之,越来越多的研究致力于证实 miRNA 可以通过促进血管新生来发挥神经元保护作用。

2.5 miRNA 增强神经可塑性和神经发生

miRNA 与其他调控因子共同调控神经可塑性和神经发生的不同过程,并对神经发育有着至关重要的作用^[43]。而且它还可以通过促进神经发生、神经突重塑和存活发挥神经保护作用^[44]。例如来自 MSC 的外泌体 miRNA 在增强神经可塑性和神经发生有着关键的作用。在体外,用来自 MSC 的 miR-133b 处理后的 OGD 星形胶质细胞可显著促进胚胎皮质神经元的神经突分支和延长,提高了神经可塑性和功能恢复^[45]。在体内,用 miR-133b 治疗缺血性脑卒中可显著改善缺血半暗带的功能和神经突重塑性^[46]。另外,在大脑中动脉闭塞的大鼠和小鼠模型中,MSC 外泌体 miR-17-92 和 miR-133b 以及内皮细胞外泌体 miR-126 对神经元可塑性和神经恢复都有促进作用^[47]。此外,给予富含 miR-17-92 簇的外泌体也可增强卒中后的神经发生和少突胶质发生,这表明 miR-17-92 簇参与卒中后的神经可塑性和脑恢复^[48]。除此之外,miR-138 可以延长少突胶质细胞终末分化为髓鞘轴突的能力,它是通过调节 NF-κB 活性来调节轴突再生,神经元发育和轴突存活^[49]。诸葛陆杰等^[50]研究证明,补阳还五汤可上调 miR-199a-5p 的水平,并在脑缺血后 14 h 后增加 VEGF 和脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的蛋白表达,来促进大鼠血管新生和神经发生。(见表 1)

表 1 miRNA 在缺血性脑卒中神经保护领域的意义
Table 1 Significance of miRNA in the field of neuroprotection in ischemic stroke

miRNA	作用机制 Mechanism of action
miR-34-73 ^[18]	下调其表达可以抑制促炎因子和 SOCS3 的表达,促进患者卒中后的功能恢复。 Down-regulation of its expression can inhibit the expression of pro-inflammatory factors and SOCS3, and promote the functional recovery of patients after stroke.
miR-221 ^[19]	通过下调 miR-221 的表达,可以减轻缺血性卒中损伤并保护神经元细胞。 Down-regulating the expression of miR-221 can reduce ischemic stroke injury and protect neurons.
miR-98, miR-29b ^[20]	通过减少 BBB 渗透性,减轻炎症并促进神经修复。 It reduces inflammation and promotes nerve repair by reducing BBB permeability.
miR-542-3p ^[23]	通过抑制 TLR4 来抑制神经胶质细胞炎症反应。 Inhibiting the inflammatory response of glial cells by inhibiting TLR4.
miR-223-3p ^[22]	抑制 M1 小胶质细胞极化,可以减轻脑缺血再灌注损伤,改善患者神经功能障碍。 Inhibition of M1 microglia polarization can reduce cerebral ischemia-reperfusion injury and improve neurological dysfunction in patients with cerebral ischemia reperfusion injury.
miR-146a-5p ^[24]	通过抑制 IRAK1/TRAF6 信号通路,降低 NF-κB 活化和 M1 极化,促进神经恢复。 By inhibiting IRAK1/TRAF6 signaling pathway, it reduces NF-κB activation and M1 polarization and promotes nerve recovery.
miR-137 ^[25]	通过靶向 Notch1 信号通路保护神经元免受 OGD 引起的神经元凋亡。 Protecting neurons from OGD-induced neuronal apoptosis by targeting Notch1 signaling pathway.

续表1

miRNA	作用机制 Mechanism of action
miR-124 ^[26]	通过 miR-124 及其下游靶标 USP14 减轻缺血性脑损伤和凋亡并促进神经元存活。 Reduce ischemic brain injury and apoptosis and promote neuronal survival through miR-124 and its downstream target USP14.
miR-27a-3p ^[27]	通过靶向 FOXO1 抑制 I/R 损伤。 Inhibition of I/R injury by targeting FOXO1.
miR-29b-3p ^[30]	通过调节 PTEN/Akt 信号通路来减轻缺氧缺血性脑损伤的作用。 To alleviate hypoxic-ischemic brain damage by regulating PTEN/Akt signaling pathway.
miR-26a-5p ^[28]	通过抑制 CDK6 来减少小胶质细胞凋亡。 To reduce microglia apoptosis by inhibiting CDK6.
miR-126 ^[29]	抑制神经元凋亡和轴突生长具有保护作用。 Inhibition of neuronal apoptosis and axon growth has a protective effect.
miR-145 ^[31]	抑制小胶质细胞极化,减少神经元凋亡。 Inhibition of microglia polarization and reduction of neuronal apoptosis.
miR-144 ^[33]	通过调节 Nrf2/ARE 途径促进神经元修复。 It promotes neuronal repair by regulating the Nrf2/ARE pathway.
miR-31 ^[34]	通过下调 PKD1 和 JAK/STAT3 途径来减轻炎症反应及氧化应激诱导的神经元损伤 It can reduce inflammatory response and oxidative stress-induced neuronal injury by down-regulating PKD1 and JAK/STAT3 pathway.
miR-217 ^[35]	通过 MEF2D 抑制 ND6 的表达,抑制 ROS 的产生,减轻神经元损伤。 Inhibition of ND6 expression by MEF2D inhibits ROS production and alleviates neuronal injury.
miR-186-5p ^[36]	激活 CTRP3,减轻炎症和氧化应激反应,保护神经元。 Activation of CTRP3 can reduce inflammation and oxidative stress and protect neurons.
miR-155-5p ^[37]	调控 miR-155-5p/IRF2BP2 轴来抑制氧化应激和炎症反应,减轻 OGD 损伤。 Regulation of miR-155-5p/IRF2BP2 axis can inhibit oxidative stress and inflammatory response, and reduce OGD injury.
miR-15a/ 16-1 ^[39]	通过上调 VEGF,FGF2 及受体 VEGFR2 和 FGFR1 的蛋白表达,促进血管重塑和血管的生成,有利于卒中后的神经恢复。 By up-regulating the protein expression of VEGF, FGF2 and its receptors VEGFR2 and FGFR1, it can promote vascular remodeling and angiogenesis, which is conducive to neurological recovery after stroke.
miR-107 ^[39]	通过增强内皮 VEGF165/164 的水平促进血管生成来减少缺血性脑梗死。 By enhancing the level of endothelial VEGF165/164 to promote angiogenesis to reduce ischemic cerebral infarction.
miR-377 ^[40]	下调 miR-377 的表达,可抑制炎症促进血管生成,从而达到神经保护的作用。 Down-regulating the expression of miR-377 can inhibit inflammation and promote angiogenesis, thereby achieving neuroprotection.
miR-155 ^[42]	通过 PI3K/AKT 信号通路降低炎症反应,促进血管新生。 It can reduce inflammatory response and promote angiogenesis through PI3K/AKT signaling pathway.
miR-133 ^[47, 51]	增强神经突重塑和神经可塑性,从而促进卒中的功能恢复。 Enhance neurite remodeling and neuroplasticity, thus promoting functional recovery of stroke.
miR-17-92 ^[48]	增强卒中后的神经发生和少突胶质发生。 Enhance neurogenesis and oligodendrocyte after stroke.
miR-138 ^[49]	通过调节 NF-κB 活性来调节轴突再生、神经元发育和轴突存活。 By adjusting NF-κB activity regulates axonal regeneration, neuronal development and axonal survival.
miR-199a-5p ^[50]	增加 VEGF 和 BDNF 的蛋白表达,促进大鼠血管新生和神经发生。 Increase the protein expression of VEGF and BDNF to promote angiogenesis and neurogenesis in rats.

3 miRNA 在 IS 临床诊断及治疗作用

3.1 miRNA 可作为 IS 生物标志物和临床诊断指标

miRNA 在血液中非常稳定,可以成为潜在的临床诊断和生物标志物^[51]。有研究表明,miRNA 可作为不同时期卒中患者的生物标志物,在卒中患者中,血浆细胞外的 miRNA 和来自血细胞内的

miRNA 两者水平存在差异,在 IS 的亚急性和慢性期,血浆中 miR-21, miR-221 和 miR-145 增加,而 miR-210 减少。在急性卒中中,miR-143-3p、miR-125a-5p、miR-125b-5p 均增加^[10]。众所周知,引起 IS 的发生发展有诸多危险因素,如高血压、糖尿病、动脉粥样硬化、年龄、性别和种族等。所以,与这些危险因素的发病机制相关的几种 miRNA,包括 miR-155(高血压)、miR-33(高脂血症)、miR-144 和 miR-

223(糖尿病)以及 miR-21、miR-126 和 miR-320b(动脉粥样硬化)都已被提议作为 IS 的潜在预测标志物^[52]。miRNA 还可作为缺血性脑卒中后运动和认知恢复的预测生物标志物和诊断指标。有研究表明,我们可以通过调控 miRNA 的表达为运动和认知恢复提供了预测信息^[53]。例如 Burlacu 等^[54]研究表明 miR-132、miR-140-5p、miR-22 和 miR-221-3p 在 IS 后认知障碍患者中上调,miR-424、miR-100-5p 在预后不良的运动障碍患者中下调。此外,袁芳等^[55]证明,miR-233 与外周血 TNF- α 、IL-10 水平之间呈正相关,它参与了 IS 的整个炎症过程,miR-233 相对表达量增高提示神经损伤严重,miR-233 可能会成为 IS 临床诊断及疾病严重程度预测指标。

3.2 miRNA 与 IS 治疗

目前 IS 的急性期和慢性期的治疗策略都很有限,我们还需要探求更多的治疗方法。近几年发现,特异性 miRNA 表达的改变有助于缺血性脑卒中的病理生理机制,脑卒中后神经系统难以自我修复,而 miRNA 可以促进神经修复,进而有利于 IS 后患者预后发展,这说明它有望成为一种潜在的治疗方法。来自小胶质细胞的 miR-137 的过表达减少了缺血小鼠的梗死体积和行为缺陷^[26]。来自 M2 小胶质细胞的 miR-124 通过抑制信号转导器和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的表达,减少了神经胶质细胞瘢痕的形成,促进了 IS 的恢复,并缓解了星形胶质细胞的迁移和增殖^[56],来源于脑内皮细胞的外泌体 miR-126-3p 改变了脑可塑性,促进神经突生长^[57]。而 miR-126 的过表达调节了脑损伤后内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的数量以及增殖、迁移和管形成能力,减少了脑缺血再灌注损伤^[58]。这些都可以证明 miRNA 可以通过各种机制和途径来改善神经损伤,促进神经修复,减少 I/R 的损伤,这说明 miRNA 有望成为 IS 的治疗方法。

4 展望与总结

近几年的研究表明,miRNA 作为基因调控因子,可以靶向和调控细胞多个网络中的数百种蛋白质。miRNA 的正常表达对大脑的正常发育和功能至关重要,而脑细胞或神经血管系统中 miRNA 的失调会增加 IS 和其他神经系统疾病的易感性。脑缺血后,数百种 miRNA 的表达在急性和慢性时间点发生显著改变,这些变化已被证明在 IS 的临床诊断和

生物标志物中有着预测的作用。然而,miRNA 在参与缺血性脑卒中的诊断和治疗上仍有很多局限性。尽管 miRNA 模拟物和抑制物的神经保护作用已经在体内和体外实验中得到验证,但如何使其应用于临床诊断及如何修饰 miRNA 使其在缺血性脑卒中患者神经恢复治疗中发挥作用,目前尚不明确。其次,miRNA 可在各种组织中进行表达,一种 miRNA 可调控多种基因,一种基因也可被多种 miRNA 调控,良好准确的靶向性和安全性应该是未来研究的重点。未来可针对不同 miRNA 及其靶向不同信号通路在缺血性脑卒中的神经保护作用,建立信号通路网络,并通过基因组学、转录组学、蛋白组学、代谢组学等综合组学技术,去探索 miRNA 参与神经保护作用的基因、蛋白质、代谢物和信号通路,从而为 IS 提供更多的治疗选择和治疗新思路。综上所述,miRNA 在调节缺血性脑卒中的神经保护方面发挥了重要作用。并且 miRNA 有着重要的生物学功能,与缺血性脑卒中预后进展紧密相关,miRNA 有望成为缺血性脑卒中的生物标志物和治疗靶点。

参考文献:

- [1] Salehin S, Muhammad S, Rasmussen P, et al. A comparison of atrial fibrillation detection strategies after ischemic stroke—a retrospective study [J]. *Curr Probl Cardiol*, 2023, 48 (3): 101515.
- [2] Ajoalabady A, Wang S, Kroemer G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: from molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107848.
- [3] Burlacu CC, Neag MA, Mitre AO, et al. The role of miRNAs in dexmedetomidine's neuroprotective effects against brain disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5452.
- [4] He T, Yang GY, Zhang Z. Crosstalk of astrocytes and other cells during ischemic stroke [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(6): 910.
- [5] Diener C, Keller A, Meese E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic [J]. *Trends Genet*, 2022, 38 (6): 613–626.
- [6] Ferragut Cardoso AP, Banerjee M, Nail AN, et al. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 76: 120–131.
- [7] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202–1207.
- [8] Han B, Zhang Y, Zhang Y, et al. Novel insight into circular RNA HECTD1 in astrocyte activation via autophagy by targeting MIR142-TIPARP: implications for cerebral ischemic stroke [J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1164–1184.
- [9] Zhang ZG, Buller B, Chopp M. Exosomes—beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(4): 193–203.

- [10] Sun P, Liu DZ, Jickling GC, et al. microRNA-based therapeutics in central nervous system injuries [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2018, 38(7): 1125–1148.
- [11] Gámez-Valero A, Campdelacreu J, Vilas D, et al. Exploratory study on microRNA profiles from plasma-derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies [J]. Transl Neurodegener, 2019, 8: 31.
- [12] Bai X, Zhang X, Fang R, et al. Deficiency of *miR-29b2/c* leads to accelerated aging and neuroprotection in MPTP-induced Parkinson's disease mice [J]. Aging, 2021, 13(18): 22390–22411.
- [13] Sha R, Zhang B, Han X, et al. Electroacupuncture alleviates ischemic brain injury by inhibiting the miR-223/NLRP3 pathway [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 4723–4733.
- [14] Chen YM, He XZ, Wang SM, et al. δ -opioid receptors, microRNAs, and neuroinflammation in cerebral ischemia/hypoxia [J]. Front Immunol, 2020, 11: 421.
- [15] Venkat P, Shen Y, Chopp M, et al. Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke [J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 310–322.
- [16] Ban E, Jeong S, Park M, et al. Accelerated wound healing in diabetic mice by miRNA-497 and its anti-inflammatory activity [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109613.
- [17] Ma Q, Zhang L, Pearce WJ. microRNAs in brain development and cerebrovascular pathophysiology [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 317(1): C3–C19.
- [18] Wang X, Chen S, Ni J, et al. miRNA-3473b contributes to neuroinflammation following cerebral ischemia [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(1): 11.
- [19] 郭泉, 张怡, 李海军, 等. 微小 RNA-221 和巨噬细胞迁移抑制因子及血栓调节蛋白与心房颤动合并缺血性脑卒中的相关性 [J]. 海南医学, 2022, 33(18): 2321–2325.
- [20] Bernstein DL, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, et al. miR-98 reduces endothelial dysfunction by protecting blood-brain barrier (BBB) and improves neurological outcomes in mouse ischemia/reperfusion stroke model [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(10): 1953–1965.
- [21] Ma X, Yun HJ, Elkin K, et al. microRNA-29b suppresses inflammation and protects blood-brain barrier integrity in ischemic stroke [J]. Mediators Inflamm, 2022, 2022: 175416.
- [22] Zhao Y, Gan Y, Xu G, et al. Exosomes from MSCs overexpressing microRNA-223-3p attenuate cerebral ischemia through inhibiting microglial M1 polarization mediated inflammation [J]. Life Sci, 2020, 260: 118403.
- [23] Cai G, Cai G, Zhou H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome miR-542-3p suppresses inflammation and prevents cerebral infarction [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 2.
- [24] Zhang Z, Zou X, Zhang R, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a-5p reduces microglial-mediated neuroinflammation via suppression of the IRAK1/TRAF₆ signaling pathway after ischemic stroke [J]. Aging, 2021, 13(2): 3060–3079.
- [25] Zhang D, Cai G, Liu K, et al. Microglia exosomal miRNA-137 attenuates ischemic brain injury through targeting Notch1 [J]. Aging, 2021, 13(3): 4079–4095.
- [26] Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124 [J]. Theranostics, 2019, 9(10): 2910–2923.
- [27] Li W, Zhu Q, Xu X, et al. miR-27a-3p suppresses cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting FOXO1 [J]. Aging, 2021, 13(8): 11727–11737.
- [28] Cheng C, Chen X, Wang Y, et al. MSCs-derived exosomes attenuate ischemia-reperfusion brain injury and inhibit microglia apoptosis might via exosomal miR-26a-5p mediated suppression of CDK6 [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 67.
- [29] Wang J, Liu H, Chen S, et al. Moderate exercise has beneficial effects on mouse ischemic stroke by enhancing the functions of circulating endothelial progenitor cell-derived exosomes [J]. Exp Neurol, 2020, 330: 113325.
- [30] Hou K, Li G, Zhao J, et al. Bone mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-29b-3p prevents hypoxic-ischemic injury in rat brain by activating the PTEN-mediated Akt signaling pathway [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 46.
- [31] Zhou H, Zhou J, Teng H, et al. miR-145 enriched exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through downregulation of FOXO1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 632: 92–99.
- [32] Xu W, Gao L, Zheng J, et al. The roles of microRNAs in stroke: possible therapeutic targets [J]. Cell Transplant, 2018, 27(12): 1778–1788.
- [33] Chu SF, Zhang Z, Zhou X, et al. Ginsenoside Rg1 protects against ischemic/reperfusion-induced neuronal injury through miR-144/Nrf2/ARE pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 13–25.
- [34] Li J, Lv H, Che YQ. Retracted: Upregulated microRNA-31 inhibits oxidative stress-induced neuronal injury through the JAK/STAT3 pathway by binding to PKD1 in mice with ischemic stroke [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(3): 2414–2428.
- [35] Shi L, Tian Z, Fu Q, et al. miR-217-regulated MEF2D-HDAC5/ND6 signaling pathway participates in the oxidative stress and inflammatory response after cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2020, 1739: 146835.
- [36] Chen Y, Liu W, Chen M, et al. Up-regulating lncRNA OIP₅-AS1 protects neuron injury against cerebral hypoxia-ischemia induced inflammation and oxidative stress in microglia/macrophage through activating CTRP3 via sponging miR-186-5p [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 92: 107339.
- [37] Zhang JK, Li Y, Yu ZT, et al. OIP₅-AS1 inhibits oxidative stress and inflammation in ischemic stroke through miR-155-5p/IRF₂BP₂ axis [J]. Neurochem Res, 2023, 48(5): 1382–1394.
- [38] Yang Y, Torbey MT. Angiogenesis and blood-brain barrier

- permeability in vascular remodeling after stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(12): 1250–1265.
- [39] Sun P, Zhang K, Hassan SH, et al. Endothelium-targeted deletion of microRNA-15a/16-1 promotes poststroke angiogenesis and improves long-term neurological recovery [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 1040–1057.
- [40] Fan Y, Ding S, Sun Y, et al. miR-377 regulates inflammation and angiogenesis in rats after cerebral ischemic injury [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 327–337.
- [41] Yuan Y, Zhang Z, Wang Z, et al. MiRNA-27b regulates angiogenesis by targeting AMPK in mouse ischemic stroke model [J]. *Neuroscience*, 2019, 398: 12–22.
- [42] 范穗强, 孟春想. MicroRNA—155 通过磷脂酰肌醇 3 激酶/丝—苏氨酸蛋白激酶信号通路调节低氧诱导的缺血性脑卒中的血管生成研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(12): 1354–1358, 1377.
- [43] Stevanovic M, Stanisavljevic Ninkovic D, Mojsin M, et al. Interplay of SOX transcription factors and microRNAs in the brain under physiological and pathological conditions [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(11): 2325–2334.
- [44] Bang OY, Kim EH, Cho YH, et al. Circulating extracellular vesicles in stroke patients treated with mesenchymal stem cells; a biomarker analysis of a randomized trial [J]. *Stroke*, 2022, 53(7): 2276–2286.
- [45] Yao B, Zhang Q, Yang Z, et al. CircEZH2/miR-133b/IGF₂BP₂ aggravates colorectal cancer progression via enhancing the stability of m⁶A-modified CREB1 mRNA [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 140.
- [46] Sun Z, Ma Y, Chen F, et al. miR-133b and miR-199b knockdown attenuate TGF- β 1-Induced epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 837: 96–104.
- [47] Venkat P, Cui C, Chopp M, et al. miR-126 mediates brain endothelial cell exosome treatment-induced neurorestorative effects after stroke in type 2 diabetes mellitus mice [J]. *Stroke*, 2019, 50(10): 2865–2874.
- [48] Xin H, Liu Z, Buller B, et al. miR-17-92 enriched exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells enhance axon-myelin remodeling and motor electrophysiological recovery after stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41(5): 1131–1144.
- [49] Cho KHT, Xu B, Blenkiron C, et al. Emerging roles of miRNAs in brain development and perinatal brain injury [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 227.
- [50] 诸葛陆杰, 方燕, 金华倩, 等. 补阳还五汤上调 miR-199a-5p 表达促进脑缺血大鼠神经发生和血管生成 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2020, 49(6): 687–696.
- [51] Dupraz S, Hilton BJ, Husch A, et al. RhoA controls axon extension independent of specification in the developing brain [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(22): 3874–3886.
- [52] Tian R, Wu B, Fu C, et al. miR-137 prevents inflammatory response, oxidative stress, neuronal injury and cognitive impairment via blockade of Src-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke [J]. *Aging*, 2020, 12(11): 10873–10895.
- [53] Vijayan M, Reddy PH. Non-coding RNAs based molecular links in type 2 diabetes, ischemic stroke, and vascular dementia [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 75(2): 353–383.
- [54] Burlacu CC, Ciobanu D, Badulescu AV, et al. Circulating microRNAs and extracellular vesicle-derived microRNAs as predictors of functional recovery in ischemic stroke patients; a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 251.
- [55] 袁芳, 潘静, 宋腾腾, 等. MiR-223、UCH-L1、NGB 水平在缺血性脑卒中患者的表达及相关性研究 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2022, 30(10): 646–650.
- [56] Li Z, Song Y, He T, et al. M2 microglial small extracellular vesicles reduce glial scar formation *via* the miR-124/STAT3 pathway after ischemic stroke in mice [J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1232–1248.
- [57] Gao B, Zhou S, Sun C, et al. Brain endothelial cell-derived exosomes induce neuroplasticity in rats with ischemia/reperfusion injury [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(15): 2201–2213.
- [58] Pan Q, Zheng J, Du D, et al. microRNA-126 priming enhances functions of endothelial progenitor cells under physiological and hypoxic conditions and their therapeutic efficacy in cerebral ischemic damage [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 2912347.

[收稿日期]2023-04-13

杨斯棋,邹亲玲,金明. miRNAs 对消化系统肿瘤肝转移影响的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 118-125.
Yang SQ, Zou QL, Jin M. Research progress on the effect of miRNAs on liver metastasis of digestive system tumors [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 118-125.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.016

miRNAs 对消化系统肿瘤肝转移影响的研究进展

杨斯棋,邹亲玲,金 明*

(延边大学医学院,吉林 延吉 133000)

【摘要】 肝是最常见的肿瘤远处转移脏器,miRNAs 的表达对肿瘤肝转移的过程非常重要。本文整理分析了相关 miRNAs 调节消化系统中恶性肿瘤发生肝转移起调节作用的研究进展。查阅相关文献介绍 miRNAs 在结直肠癌、胃癌、胰腺癌、胆囊癌等几类消化系统肿瘤肝转移过程中发挥的调节作用,为肿瘤肝转移诊断、治疗及研究提供帮助。

【关键词】 miRNAs;消化系统恶性肿瘤;肝转移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0118-08

Research progress on the effect of miRNAs on liver metastasis of digestive system tumors

YANG Siqi, ZOU Qinling, JIN Ming*

(Department of Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China)

【Abstract】 The liver is the most common organ for tumor spread, and expression of miRNA is crucial for liver metastasis. In this study, research progress of related miRNAs in regulating liver metastases from malignant tumors in the digestive system was collated and analyzed. By searching related literature, this article provides an introduction to the role of miRNAs in liver metastasis of colorectal, gastric, pancreatic, and gallbladder cancers, which helps with the diagnosis, treatment, and research of tumor liver metastasis.

【Keywords】 miRNAs; digestive system malignancy; liver metastases

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

在消化系统中肿瘤发生肝转移的概率较高,虽然可以通过手术切除进行治疗,但是仅有不到 15% 的患者达到可以治疗的要求。本文对 miRNA 在消化系统恶性肿瘤肝转移过程中发挥的作用进行综述,以为消化系统肿瘤肝转移的机制研究及治疗提供帮助。

1 概述

1.1 miRNA

广泛存在真核生物中微小 RNA(miRNAs)在遗

传过程高度保守,miRNA 在细胞核内转录生成 miRNA 前体 (pri-miRNA),后在细胞质中加工成熟^[1]。miRNA 是基因表达过程关键调控因子,通过靶向 mRNA 3' 端的非翻译区并抑制其表达影响下游信号通路激活进而影响细胞内稳态来调控表观遗传^[2-3]。mRNA 存在不同与 miRNA 结合位点,不同 miRNA 也可靶向同一 mRNA,并抑制 mRNA 翻译生成目的蛋白^[4]。miRNA 编码在物种的基因组中是重要细胞功能调节器,调节人类 30% 基因,

【基金项目】 国家自然科学基金(82060537)。

【作者简介】 杨斯棋(2000—),女,硕士研究生,研究方向:分子肿瘤学。E-mail: yangsiqi475015@163.com

【通信作者】 金明(1972—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:分子肿瘤学。E-mail: jinming@ybu.edu.cn

miRNA 之间可以相互配合形成调控网络,通过直接或间接的方式调节细胞分化、细胞增殖、血管生成和细胞凋亡等过程^[5]。miRNA 在染色体与肿瘤相关基因区域或在染色体的脆性区域易受到基因扩增、缺失或易位的影响^[6],导致肿瘤细胞发生凋亡、分化或转移^[7]。

在肿瘤发生发展过程中有些 miRNA 可以促进肿瘤发展,有些 miRNA 抑制肿瘤发展,在不同肿瘤组织中,同一 miRNA 可能发挥不同作用。例如,miR-146a^[8]既通过靶向肿瘤抑制因子 NUMB,抑制其表达促进黑色素瘤的发展,也靶向 ITGAV 促进黑色素瘤发生转移^[9-10]。外周血中外泌体 miRNA 进入体液循环,成为肿瘤筛查早期的标志物,肿瘤细胞中 miRNA 有其特异性表达谱在新鲜组织中具有更高稳定性。miRNA 发生异常分布代表疾病的发生,miRNA 在肿瘤组织中发挥的作用取决于其在癌组织中上调或者下调,以及其靶基因功能。

1.2 肿瘤肝转移

肿瘤是如何产生和发展的?从 20 世纪 30 年代开始不同学者给予了不同的解释,其中被人们广泛接受的注释是:肿瘤作为一个独立的器官、其所处的环境——肿瘤微环境属于复杂的动态网络,其内的血管、免疫细胞加上肿瘤细胞及肿瘤细胞外基质相互作用而共同促进肿瘤的形成^[11]。同一种肿瘤细胞具有不同的亚群,其转移的潜能是不尽相同的;而对于不同类别的肿瘤细胞而言,其转移的器官具有特异性,因此不同类别的肿瘤细胞转移能力也不相同^[12]。

侵袭进入外周血循环在继发肿瘤部位开始增殖发展成实体瘤。在原来肿瘤发生部位所处的肿瘤微环境下细胞可以分泌出许多不同种类的趋化因子促进肿瘤转移^[13-14]。肝因其血流可以提供双重血供,而成为许多恶性肿瘤发生转移的靶器官,肿瘤转移过程中通过血液循环到达肝并与肝窦血的微环境相互作用而促进肿瘤转移灶的生成^[15],肿瘤肝转移会加重全身肿瘤负荷导致患者的体力、状态相应变差^[16]。

而在肿瘤细胞发生转移的过程中,肿瘤微环境的变化是非常显著的,如结直肠癌发生肝转移时,肿瘤微环境中整合素、趋化因子及其受体、转化生长因子等发生改变,进而促进结直肠癌细胞发生转移^[17]在肿瘤肝转移的发生过程中,相较于正常肿瘤细胞恶性程度较高的肿瘤细胞在原发灶的部位发

生了上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),进而脱离原发灶进入体液循环从而通过静脉流入肝,在肝中增殖、形成转移灶,而肿瘤细胞的生长转移时刻被免疫细胞所监视,因此肿瘤通过改造肝微环境使其适合肿瘤本身生长来躲避免疫细胞的追踪^[18]。

1.3 miRNA 与肿瘤肝转移

肿瘤发展过程 miRNA 既可以充当原癌基因,又可以充当抑癌基因,王江波等^[7] miR-218-5p 可靶向 EGLN3 抑制肺腺癌迁移能力,田莉等^[19]发现下调 miR-330 表达抑制前列腺癌细胞增殖迁移和侵袭能力。肖磊等^[20]发现 miR-573 结合 NTN4 促进肺癌 EMT。肿瘤发生肝转移因为肝中血流丰富,miRNA 影响肿瘤肝转移是因为某些 miRNA 可以促进血管生成,血管形成对肿瘤的发生发展至关重要。Umezumi 等^[21]研究表明,培养多发性浆细胞瘤在不同氧环境下所分泌 miR-135a 可以抑制肿瘤抑制因子表达水平促进转录因子的表达,诱导人脐带静脉内皮细胞形成类似于血管的结构。

2 miRNAs 与消化系统肿瘤肝转移

2.1 miRNA 与结直肠癌肝转移

中国新发恶性肿瘤中结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)新发人数占 10%,结直肠癌早期常伴有腹泻便秘,由于缺乏特异性,随病情发展逐渐出现便血、大便秘结改变等。CRC 患者高死亡率和预后不良的主要原因是发生 CRC 向远处转移^[22],肝在可能发生肿瘤远处转移的靶器官中至关重要,常以 CRC 为模型探究肿瘤的肝转移^[23]。肿瘤转移过程 miRNA 通过调节基因和遗传途径作为关键介质对结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastasis, CRLM)起双重作用^[24]。

miRNAs 对 CRLM 起促进作用,WIF-1 是 miR-181a 下游靶基因,Zhang 等^[25]过表达 miR-181a 发现抑制 Wnt 信号通路中的 WIF-1 结合相应的蛋白导致 β -catenin 促进 CRC 组织中血管生成促进肿瘤肝转移。Ji 等^[26]抑制 miR-181a 表达对 CRC 转移和侵袭起抑制作用。两位学者在探究 miR-181a 对 CRLM 影响时采用过表达 miR-181a 或 si-miR-181a 方法来探究 miR-181a 对 CRLM 促进作用。Zhao 等^[27]发现 CRC 来源 miR-181a-5p 促进 CRC 细胞向肝发生转移,miR-181a-5p 可以靶向 LX3 下调 SOCS3 表达,SOCS3 表达受到抑制时通过 IL-6/

STAT3 信号通路激活肝星状细胞的表达促进 CRLM。研究表明巨噬细胞 M2 型极化会促进新生血管生成,导致 CRC 细胞向肝发生转移。黎文华等^[28]上调 miR-454-3p 会促进 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭能力提高,通过构建小鼠肝转移模型过表达 miR-454-3p 促进 CRLM 发生。Takano 等^[29]在探究 miR-203 对 CRLM 作用时发现 miR-203 促进单核细胞发生与肿瘤相关的巨噬细胞 M2 型极化促进 CRLM。Zhao 等^[30]探究 miR-934 在促进 CRLM 机制时发现,miR-934 激活 PI3K/Akt 信号通路通过靶向下调 PTEN 表达,PI3K/Akt 信号通路激活会诱导巨噬细胞 M2 型极化,导致 CRC 组织中 CXCL12/CXCR5 轴激活,提高 CRC 向肝转移能力,在 NF- κ B/P65 信号通路中上调 P65 转录活性上调 miR-934 表达,miR-934 促进 CRLM 发生通过 CXCL13/CXCR5/NF- κ B/p65/miR-934 正反馈环。Wang 等^[31]发现 CXCL12/CXCR4 轴激活后 CRC 细胞来源外泌体 miR-25-3p、miR-130b-3p 和 miR-425-5p 靶向下调 PTEN 激活 PI3K/Akt 信号通路,促进巨噬细胞 M2 型极化增加 CRLM 发生概率。Shao 等^[32]研究 CRC 外泌体 miR-21 促进 CRLM 通过靶向肿瘤巨噬细胞中 TLR7 蛋白上调炎症因子 IL-6 表达进一步促进巨噬细胞 M2 型极化促进 CRLM。周斯宁^[33]探究 miRNA 对 CRC 的影响时,利用 TCGA 数据库分析 mRNA 与 miRNA 相关性发现 CRC 中 miR-17/92 簇表达量较高,构建小鼠肿瘤肝转移模型观察 CRC 细胞转移情况,高表达 miR-17/92 簇会抑制 PTEN 的表达,促进 CRLM 通过调节 Wnt/ β -catenin、激活 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。符芳芳^[34]探究 CRC 细胞外泌体 miR-17 对 CRLM 影响时发现 miR-17 靶向 TLR8 激活 NF- κ B 信号通路使巨噬细胞 M2 型极化促进 CRLM 的发生。Tian 等^[35]对比原发性肝癌细胞和 CRLM 组织细胞中发现 CRC 外泌体 miR-221/222 高表达促进 CRLM,miR-221/222 靶向下调 SPINT1 表达,促进 CRLM。分析观察 CRC 组织样本,Hur 等^[36]过表达 miR-200c 介导结肠细胞发生 EMT 降低靶基因 ZEB1、ETS1 和 FLT1 表达,促进 CRC 向肝发生转移。Chen 等^[37]通过 miRNA 微阵列分析在有肝转移的原发性 CRC 和无肝转移的 CRC 组织中发现 miR-214 在有肝转移的 CRC 中显著下调,敲除或过表达 miR-214 发现 miR-214 促进 CRC 细胞系增殖、迁移和侵袭。李佩等^[38]发现 miR-122 对 CRLM 促进作用,通过分析 CRC 患者在

手术后发生肝转移的时间随 miR-122 过表达缩短。与前者不同,李杰等^[39]选取了发生 CRLM 的患者检测 miR-106-3p、miR-654-5p 表达水平,Logistic 回归分析显示术后 miR-106-3p、miR-654-5p 表达上调促进 CRLM。Sun 等^[40]研究外泌体来源 miR-135-5p 通过上调 MMP7 表达促进 CRLM。Ding 等^[41]比较有无肝转移的 CRC 患者血清中 miRNAs,miR-200 和 miR-141 过表达时会通过抑制 E-钙粘蛋白(E-Cadherin)表达促进 CRC 患者肝转移。PTEN 是肿瘤抑制因子,Arabsorkhi 等^[42]过表达 miR-298 抑制抑癌基因 PTEN 表达通过 Akt/ERK 和 Akt/mTOR/P70 S6K 通路促进 CRLM。

某些 miRNAs 对 CRLM 起抑制作用,Lou 等^[43]发现 miR-625 在 CRC 组织和细胞系中显著下调,多因素分析确定 miR-625 表达降低与肝转移呈正相关。Zhang 等^[44]过表达 miR-216a 抑制 KIAA1199 表达抑制 CRC 细胞迁移侵袭。Zhang 等^[45]发现原发性 CRC 组织中和已经发生肝转移结直肠组织中,肝转移组中 miR-320a 表达水平显著降低,即 miR-320a 抑制了 CRLM。郑璇^[46]发现过表达 miR-10a 会抑制肝星状细胞的活化抑制 CRLM。Li 等^[47]发现 miR-99b-5p 在 CRLM 表达图谱中比在原发性肿瘤中表达量更高,si-miR-99b-5p 促进 CRC 细胞迁移和 mTOR 上调,miR-99b-5p 靶向 mTOR 发挥肿瘤抑制作用,表明 miR-99b-5p 在原发性 CRC 和肝转移中表达方式不同,转移性 CRC 中具有肿瘤抑制性 miRNA 功能。Geng 等^[48]过表达 miR-192 对 CRLM 定植潜力起抑制作用,miR-192 下调 BCL-2 表达会增强细胞的凋亡、下调 Zeb2 表达,增强 E-Cadherin 表达、下调血管内皮生长因子-A 抑制体内血管生成,miR-192 通过减少体内血管生成而抑制 CRLM。Liu 等^[49]用 miR-140-3p 靶向 BCL-9/2 抑制 CRLM,si-BCL-9/2 降低 CRC 细胞增殖、迁移和侵袭能力,miR-140-3p 过表达抑制移植模型中肿瘤生长,减少裸鼠肝的转移性结节,miR-140-3p-BCL-9/2 轴应用于 miRNA 的治疗和 CRC 预后。曹丹^[50]沉默转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β 1)抑制结肠细胞成瘤,基因芯片分析 TGF- β 利用生物信息技术测定 miR-493-5p 通过调控靶基因 Srp2 和 Pumilio2 抑制 CRLM。Chen 等^[51]探究 CRLM 的机制,导入外源 miR-199b-5p 靶向 PIK3CD 激活 AKT/ β -catenin 信号通路促进 CRC 细胞侵袭转移能力。范梦静^[52]过表达 miR-30b-5p 在结直肠癌细胞系靶

向 Rap1b 抑制 CRC 迁移、侵袭、黏附能力,通过小鼠肝转移模型发现转染 miR-30b-5p 抑制 CRLM 发生。

2.2 miRNAs 与胃癌肝转移

消化系统恶性肿瘤中胃癌 (gastric cancer, GC) 发生具有较高的死亡率和发病率,相较其他恶性肿瘤的发生 GC 的发病很隐匿,GC 初期无显著的特征,导致大多数患者发病时癌性病变已经伤及肌层,甚至向远处转移,常见发生转移的脏器是肝,发生率为 5%~14%^[53],GC 细胞不断地生长过程也在不断地侵犯周围组织,GC 肝转移通过血管回流到静脉系统到达肝^[54]。胃癌患者中 miRNA 表达谱与正常人不同^[55],所以 miRNA 被选择作为诊断胃癌的标记物。

Xie 等^[56]发现 miR-582 在胃癌组织中高表达与胃癌肝转移息息相关,miR-582 通过激活 PI3K/Akt/Snail 信号通路促进 GC 细胞生长和转移。Qiu 等^[57]发现 GC 肝转移患者的血清外泌体 miR-519a-3p 比没有发生肝转移的 GC 组织表达水平高,GC 细胞中外泌体 miR-519a-3p 靶向 DUSP2 激活 MAPK/ERK 信号通路促进 M2 型巨噬细胞极化促进血管生成促进 GC 肝转移。张海洋^[58]发现表皮生长因子靶向 miR-26,下调 miR-26 表达激活肝细胞生长因子促进 GC 肝转移。Xie 等^[59]提取 GC 癌细胞外泌体来源 miR-151-3p 与肿瘤巨噬细胞共培养,miR-151-3p 通过影响肿瘤微环境促进巨噬细胞 M2 型极化促进肿瘤生长、促进 GC 肝转移。而 Li 等^[60]将 miR-151a-3p 包裹在小细胞外囊泡中,miR-151a-3p 靶向 YTHDF3 激活 TGF- β /Smad 信号通路促进 GC 肝转移。Zhang 等^[61]探究 GC 肝转移发现肝细胞生长因子在 GC 肝转移组织中表达,通过生物信息学锁定 miR-26a/b 靶向肝细胞生长因子,当 miR-26a/b 表达受到抑制上调肝细胞生长因子表达会促进 GC 肝转移。侯花屏等^[62]转染 miR-213 到 GC 细胞,miR-213 在 GC 组织中表达含量较低,miR-213 靶向 SRC 抑制 GC 细胞增殖、迁移。Liu 等^[63]发现 miR-27b、miR-101 和 miR-128 对 GC 迁移侵袭能力的抑制是通过靶向下调 VEGF-C 表达,VEGF-C 表达抑制进一步抑制静脉内皮细胞迁移、增殖活性,降低 GC 肝转移发生概率。miR-123 既可以促进机体血管的生成也可以调节细胞的分化,许晓飞等^[64]发现在 GC 组织中 miR-123 过表达会促进细胞凋亡,抑制 GC 细胞肝转移。李坚^[65]研究 miRNAs 对 GC 增殖影响利用生物信息学分析 miR-330-3p 靶向下调 CDC42

表达抑制 GC 细胞迁移。赵媛等^[66]发现 miR-34c-5p 影响 GC 细胞侵袭和迁移,GC 细胞中 miR-34c-5p 靶向调控 MAP2K1 表达,激活 ERK/MAPK 信号通路抑制 GC 细胞迁移。Feng 等^[67]通过 oncomine 和 Kaplan-meier 数据库发现 miR-27b 靶向 NR2F2,过表达 miR-27b 会促进 GC 细胞迁移和侵袭,抑制向肝转移。Zhang 等^[68]通过比对在 GC 组织和 GC 细胞系中 miRNA 含量发现 miR-48b-5p 表达下调,基于此项分析探究 miR-48b-5p 对 GC 增殖迁移侵袭能力影响,miR-48b-5p 靶向 ATP1F1 激活 TNF α -IL6-CSF1 轴,抑制 GC 细胞增殖和侵袭能力,在小鼠肝转移模型中进行相关的验证发现过表达 miR-48b-5p 会抑制 GC 肝转移。

2.3 miRNAs 与胰腺癌肝转移

国家炎症中心发布数据:2022 年中国有 13 万左右的新增胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 患者,PC 的发病率居总人群癌症发病率的第八位,死亡率居第六位^[69]。消化系统中 PC 属于高度恶性的肿瘤导致 PC 患者术后死亡原因是肝转移。相关实验数据表明 PC 发生肝转移的概率高达 32%~46%^[70],肝转移在 PC 患者中很常见,但是由于缺少早期诊断胰腺炎的方法许多患者错失手术最佳时期,miRNAs 可以作为诊断 PC 肝转移的辅助工具,主要是因为 miRNA 在 PC 的表达异常导致 PC 细胞增殖、诱导 EMT 和在化学耐药性中起重要作用^[71]。

Hu 等^[72]发现 miR-301a 靶向 SOCS5 激活 JAK/STAT3 信号通路促进 PC 肝转移。Chen 等^[73]下调 PC 细胞来源外泌体 miR-30b-5p 表达进而上调靶基因 GJA1 促进血管生成,导致胰腺癌向肝发生转移概率增加。孙健^[74]探究 miR-338-5p 对胰腺癌肝转移的抑制作用机制时过表达 miR-338-5p 磷酸化 ERK 抑制 EGFR 表达从而通过 EGFR/ERK 信号通路抑制 PC 细胞迁移。miR-652 抑制 PC 肝转移,Deng 等^[75]发现 miR-652 过表达明显延缓了肿瘤生长和肝转移,酸性微环境促进 EMT 是通过解除转录因子 ZEB1 抑制作用同时抑制 miR-652 表达,PC 细胞中 miR-652 和 ZEB1 表达呈拮抗作用,PC 中存在 miR-652/ZEB1/EMT 轴。探究 miR-29c 对 PC 肝转移影响时,邹永康^[76]对 miR-29c 在不同胰腺癌细胞株中表达、miR-29c 表达对胰腺癌细胞增殖能力影响以及检测 miR-29c 表达对 PC 细胞迁移能力影响,筛选 PC 肝转移细胞群是通过构建小鼠 PC 移植瘤模型,过表达 miR-29c 明显抑制裸鼠原位 PC 自

发性肝转移。胡勇军^[77]构建 miR-143 表达载体,体内实验和体外实验都证明 miR-143 表达抑制 PANC-1 迁移能力抑制 PC 肝转移。miR-1271 参与抑制肿瘤 EMT、诱导肿瘤细胞凋亡。李楠^[78]探究 miR-1271 对 PC 细胞发生 EMT 作用机制分为两个部分:通过细胞转染技术和 Western blot 检测 PC 细胞 EMT 标志蛋白含量;RT-qPCR 检测 mRNA 的水平;构建裸鼠 PC 肝转移模型验证,发现 miR-1271 对 PC 肝转移起抑制作用。喻超^[79]上调 miR-138-5p 通过抑制 G0/G1 期影响 PC 成瘤能力,miR-138-5p 靶向 FOXC1 抑制 PC 细胞增殖,靶向 VIM 抑制 PC 细胞侵袭转移,肝微转移灶中 PANC-1 形成被抑制,miR-138-5p 抑制 PC 肝转移。

2.4 miRNAs 与胆囊癌肝转移

胆道系统中胆囊癌(gallbladder cancer, GBC)主要通过肝或淋巴发生转移。不同 miRNA 在胆囊癌组织与癌旁组织中表达存在差异,Wu 等^[80]发现 hsa-miR-146b-5p 具有抑癌作用,Cai 等^[81]探究 has-miR-146b-5p 与胆囊癌关系发现相比于胆囊癌细胞系 has-miR-146b-5p 表达抑制细胞的生长。

Bao 等^[82]发现 miR-101 促进 GBC 肝转移通过降低 c-Raf/MEK/ERK1/2 磷酸化,通过 MAPK/ERK 和 Smad 信号通路促进 GBC 肝转移。张亦弛^[83]探究 miR-99a-5p 对 GBC 的侵袭转移作用是通过靶向 mTOR/SMARCA5 影响 PI3K/Akt 通路。基于脾注射肝转移模型,常颜信^[84]探究 miR-20a 和胆囊侵袭转移关系。miR-20a 促进 GBC 肝转移分子机制:Smad7 影响 β -catenin 的转录活性,miR-20a 促进 GBC 和下游基因的表达促进肝转移。Chang 等^[85]发现 GBC 患者 miR-20a 表达升高因为 TGF- β 1 水平显著升高。miR-20a 靶向 Smad7 的 3' UTR 诱导细胞体发生 EMT,促进 β -catenin 核易位,TGF- β 1 介导 miR-20a/Smad7/ β -catenin 轴激活 GBC 转移。Zhang 等^[86]抑制 miR-155 表达导致 GBC 细胞增殖和侵袭能力减弱,高表达 miR-155 影响肿瘤发展、淋巴结状态、肝转移、分化程度,miR-155 促进胆囊癌肝转移。唐津天等^[2]发现 miR-30 对 GBC 抑制作用通过靶向调控蛋白 Zeb2,影响 EMT 进程抑制胆囊癌的增殖迁移和侵袭能力。

3 总结与展望

miRNA 的深入探究为研究肿瘤发病机制提供新的思路。miRNA 可以用于肿瘤的恶性分级和预

后指标。对不同 miRNA 识别,可以更好地了解消化系统恶性肿瘤肝转移发生机制。

本文对 miRNA 对不同消化肿瘤肝转移的调节作用进行了总结。miRNA 种类繁多,随着人们对 miRNA 的不断探索,miRNA 的调控网络机制被一一揭开,通过 miRNA 为靶点可以调控发生肝转移的肿瘤相关下游基因的表达并以此为引物来设计不同的药物来抑制肿瘤的肝转移,进而提高肿瘤患者生存时间。

参考文献:

- [1] Chen L, Heikkinen L, Wang C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. Brief Bioinform, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [2] 唐津天,唐润娟. miR-30 靶向调控 Zeb2 相关通路抑制胆囊癌细胞 EMT 进程 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(9): 69-75.
- [3] Ramirez-Garrastacho M, Berge V, Linē A, et al. Potential of miRNAs in urinary extracellular vesicles for management of active surveillance in prostate cancer patients [J]. Br J Cancer, 2022, 126(3): 492-501.
- [4] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9): 597-610.
- [5] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): dmm047662.
- [6] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12.
- [7] 王江波,梁皓,陆允平. miR-218-5p 靶向 EGLN3 抑制肺腺癌增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 57-67.
- [8] Lai X, Schmitz U, Vera J. The role of microRNAs in cancer biology and therapy from a systems biology perspective [J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1385: 1-22.
- [9] Raimo M, Orso F, Grassi E, et al. miR-146a exerts differential effects on melanoma growth and metastatization [J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(6): 548-562.
- [10] Mastroianni J, Stickel N, Andrlrova H, et al. miR-146a controls immune response in the melanoma microenvironment [J]. Cancer Res, 2019, 79(1): 183-195.
- [11] 张百红,岳红云. 免疫微环境促进肿瘤发生发展的机制研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(6): 862-864.
- [12] 王斐,侯雨杉,杨冬. 肿瘤发生发展和转移过程中的分子进化机制 [J]. 中国科学:生命科学, 2020, 50(12): 1418-1426.
- [13] 万争艳,李宁,向玲玲,等. 精神分裂症模型大鼠前额叶皮质 PKA 和内皮细胞趋化因子-5 的表达变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 92-97.
- [14] 苏璇,朱晓斌,张俊萍. CXCR4 趋化因子受体 3 变体及其配体

- 在肿瘤微环境中作用的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(7): 728-731.
- [15] Lykoudis PM, O'Reilly D, Nastos K, et al. Systematic review of surgical management of synchronous colorectal liver metastases [J]. Br J Surg, 2014, 101(6): 605-612.
- [16] Lee JC, Mehdizadeh S, Smith J, et al. Regulatory T cell control of systemic immunity and immunotherapy response in liver metastasis [J]. Sci Immunol, 2020, 5(52): eaba0759.
- [17] 何威华. 基于肿瘤微环境中转移相关因子研究健脾消癌方抗结肠癌肝转移的作用机制 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [18] 陈颖. 肿瘤微环境中肝星状细胞促进结肠癌肝转移的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [19] 田莉, 胡月明, 崔海军, 等. OSTN-AS1/miR-330 调控前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 88-95.
- [20] 肖磊, 许丹媛, 段林立, 等. miR-573 调控神经导向因子 4 促进肺癌细胞上皮间质转化 [J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31(12): 2228-2234.
- [21] Umez T, Tadokoro H, Azuma K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1 [J]. Blood, 2014, 124(25): 3748-3757.
- [22] 俞巍, 邢颖, 张洪义. 结直肠癌肝转移的机制研究热点与展望 [J]. 中国临床医生杂志, 2019, 47(8): 901-904.
- [23] 李华驰, 熊治国, 谢敏, 等. 结肠癌肝转移裸鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 63-68.
- [24] Tian Q, Liang L, Ding J, et al. microRNA-550a acts as a pro-metastatic gene and directly targets cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 in hepatocellular carcinoma [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48958.
- [25] Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia [J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 6050-6054.
- [26] Ji D, Chen Z, Li M, et al. microRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1 [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 86.
- [27] Zhao S, Mi Y, Zheng B, et al. Highly-metastatic colorectal cancer cell released miR-181a-5p-rich extracellular vesicles promote liver metastasis by activating hepatic stellate cells and remodelling the tumour microenvironment [J]. J Extracell Vesicles, 2022, 11(1): e12186.
- [28] 黎文华, 冯赞, 马振增, 等. miR-454-3p 在结肠癌中的表达及其对结肠癌增殖、侵袭及肝转移能力的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(12): 1421-1426.
- [29] Takano Y, Masuda T, Iinuma H, et al. Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(45): 78598-78613.
- [30] Zhao S, Mi Y, Guan B, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 156.
- [31] Wang D, Wang X, Si M, et al. Exosome-encapsulated miRNAs contribute to CXCL12/CXCR4-Induced liver metastasis of colorectal cancer by enhancing M2 polarization of macrophages [J]. Cancer Lett, 2020, 474: 36-52.
- [32] Shao Y, Chen T, Zheng X, et al. Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(11): 1368-1379.
- [33] 周斯宁. microRNA-17/92 簇对于结直肠癌肝转移的机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [34] 符芳芳. 肠癌细胞分泌 miR-17 促进肠癌肝转移的作用及机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [35] Tian F, Wang P, Lin D, et al. Exosome-delivered miR-221/222 exacerbates tumor liver metastasis by targeting SPINT1 in colorectal cancer [J]. Cancer Sci, 2021, 112(9): 3744-3755.
- [36] Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al. microRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis [J]. Gut, 2013, 62(9): 1315-1326.
- [37] Chen DL, Wang ZQ, Zeng ZL, et al. Identification of microRNA-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis by way of regulation of fibroblast growth factor receptor 1 expression [J]. Hepatology, 2014, 60(2): 598-609.
- [38] 李佩, 鲁祖斌, 严庆波, 等. miR-122 与结直肠癌术后肝转移的关系 [J]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2020, 9(4): 385-388.
- [39] 李杰, 卢佳姝. miRNA-106-3p、miRNA-654-5p 与结直肠癌肝转移患者术后复发的关系研究 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2021, 13(6): 606-610.
- [40] Sun H, Meng Q, Shi C, et al. Hypoxia-inducible exosomes facilitate liver-tropic premetastatic niche in colorectal cancer [J]. Hepatology, 2021, 74(5): 2633-2651.
- [41] Ding M, Zhang T, Li S, et al. Correlation analysis between liver metastasis and serum levels of miR-200 and miR-141 in patients with colorectal cancer [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 7791-7795.
- [42] Arabsorkhi Z, Gharib E, Yaghmoorian Khojini J, et al. miR-298 plays a pivotal role in colon cancer invasiveness by targeting PTEN [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(5): 4335-4350.
- [43] Lou X, Qi X, Zhang Y, et al. Decreased expression of microRNA-625 is associated with tumor metastasis and poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2013, 108(4): 230-235.
- [44] Zhang D, Zhao L, Shen Q, et al. Down-regulation of KIAA1199/CEMIP by miR-216a suppresses tumor invasion and metastasis in colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2017, 140(10): 2298-2309.
- [45] Zhang YJ, He XJ, Liu Y, et al. microRNA-320a inhibits tumor invasion by targeting neuropilin1 and is associated with liver metastasis in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2012, 27(3): 685-694.

- [46] 郑璇. microRNA-10a 诱导肿瘤相关成纤维细胞抑制结肠癌肝转移的机制 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.
- [47] Li W, Chang J, Wang S, et al. miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 24448-24462.
- [48] Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, et al. microRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(46): 5332-5340.
- [49] Liu D, Chen C, Cui M, et al. miR-140-3p inhibits colorectal cancer progression and its liver metastasis by targeting BCL9 and BCL2 [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(10): 3358-3372.
- [50] 曹丹. 壳聚糖纳米粒介导 TGF- β 1/miR-493 靶向干预结直肠癌肝转移的作用及机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [51] Chen LY, Zhi Z, Wang L, et al. NSD2 circular RNA promotes metastasis of colorectal cancer by targeting miR-199b-5p-mediated DDR1 and JAG1 signalling [J]. *J Pathol*, 2019, 248(1): 103-115.
- [52] 范梦静. miR-30b 靶向 Rap1b 抑制结直肠癌肝转移的分子机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [53] Tang K, Zhang B, Dong L, et al. Radiofrequency ablation versus traditional liver resection and chemotherapy for liver metastases from gastric cancer [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(7): 300060520940509.
- [54] Bale R, Richter M, Dünser M, et al. Stereotactic radiofrequency ablation for breast cancer liver metastases [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2018, 29(2): 262-267.
- [55] Meng H, Li YY, Han D, et al. MiRNA-93-5p promotes the biological progression of gastric cancer cells via Hippo signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(11): 4763-4769.
- [56] Xie T, Wu D, Li S, et al. microRNA-582 potentiates liver and lung metastasis of gastric carcinoma cells through the FOXO₃⁻ Mediated PI3K/akt/snail pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 5201-5212.
- [57] Qiu S, Xie L, Lu C, et al. Gastric cancer-derived exosomal miR-519a-3p promotes liver metastasis by inducing intrahepatic M2-like macrophage-mediated angiogenesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 296.
- [58] 张海洋. 微囊泡介导的 EGFR 调控肝脏 miR-26-HGF 轴促进胃癌肝转移的机制研究 [D]. 天津: 天津市肿瘤医院, 2020.
- [59] Xie S, Zhu Y, Wang S, et al. miR-151-3p derived from gastric cancer exosomes induces M2-phenotype polarization of macrophages and promotes tumor growth [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2022, 38(7): 584-589.
- [60] Li B, Xia Y, Lv J, et al. miR-151a-3p-rich small extracellular vesicles derived from gastric cancer accelerate liver metastasis via initiating a hepatic stemness-enhancing niche [J]. *Oncogene*, 2021, 40(43): 6180-6194.
- [61] Zhang H, Deng T, Liu R, et al. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15016.
- [62] 侯花屏, 刘新奇, 石菲. miR-213 靶向 SRC 抑制胃癌细胞的增殖和迁徙 [J]. *海南医学*, 2022, 33(5): 545-549.
- [63] Liu HT, Xing AY, Chen X, et al. microRNA-27b, microRNA-101 and microRNA-128 inhibit angiogenesis by down-regulating vascular endothelial growth factor C expression in gastric cancers [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(35): 37458-37470.
- [64] 许晓飞, 李彬龙. miRNA-123 介导 mdm2-p53 通路调节胃癌细胞增殖与凋亡的作用研究 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2022, 29(3): 278-281.
- [65] 李坚. miR-330-3p 靶向调控 CDC42 抑制胃癌增殖和迁移的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [66] 赵媛, 李冰, 陶月佳, 等. miR-34c-5p 过表达抑制胃癌细胞侵袭和迁移 [J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(12): 1830-1835.
- [67] Feng Q, Wu X, Li F, et al. miR-27b inhibits gastric cancer metastasis by targeting NR2F₂ [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(2): 114-122.
- [68] Zhang Y, Huo W, Sun L, et al. Targeting miR-148b-5p inhibits immunity microenvironment and gastric cancer progression [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 590447.
- [69] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.
- [70] 刘畅. 长链非编码 RNA LINC01207 竞争性结合 miR-143-5p 调控 AGR2 影响胰腺癌细胞自噬与凋亡的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [71] 谢雨婷. 基于 microRNA 相关基因组学的胰腺癌肝转移预测模型的开发 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2022.
- [72] Hu H, Zhang Q, Chen W, et al. microRNA-301a promotes pancreatic cancer invasion and metastasis through the JAK/STAT3 signaling pathway by targeting SOCS₅ [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(4): 502-514.
- [73] Chen K, Wang Q, Liu X, et al. Hypoxic pancreatic cancer derived exosomal miR-30b-5p promotes tumor angiogenesis by inhibiting GJA1 expression [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(3): 1220-1237.
- [74] 孙健. Hsa-miR-338-5p 通过调控 EGFR/MAPK/ERK 途径抑制胰腺癌转移及机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [75] Deng S, Li X, Niu Y, et al. miR-652 inhibits acidic microenvironment-induced epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by targeting ZEB1 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(37): 39661-39675.
- [76] 邹永康. miR-29c 调控 MMP2 在胰腺癌转移中的作用 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
- [77] 胡勇军. miR-143 抑制胰腺癌的转移及其机制的初步研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [78] 李楠. 大黄素通过升高 miRNA-1271 抑制胰腺癌 EMT 作用机制的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2017.
- [79] 喻超. Hsa-microRNA-138-5p 靶向调控 FOXC1 和 Vimentin 抑制胰腺癌细胞增殖及侵袭转移 [D]. 贵阳: 贵阳医学

院, 2015.

[80] Wu PY, Zhang XD, Zhu J, et al. Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone [J]. Hum Pathol, 2014, 45(8): 1664–1673.

[81] Cai J, Xu L, Cai Z, et al. microRNA-146b-5p inhibits the growth of gallbladder carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1): 1549–1555.

[82] Bao RF, Shu YJ, Hu YP, et al. miR-101 targeting ZFX suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating the MAPK/Erk and Smad pathways in gallbladder carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22339–22354.

[83] 张亦弛. Hsa-miR-99a-5p 在胆囊癌中的功能与机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2017.

[84] 常颜信. 胆囊癌转移相关 miRNAs 的高内涵筛选及功能和机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.

[85] Chang Y, Liu C, Yang J, et al. miR-20a triggers metastasis of gallbladder carcinoma [J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 518–527.

[86] Zhang XL, Chen JH, Qin CK. microRNA-155 expression as a prognostic factor in patients with gallbladder carcinoma after surgical resection [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 21241–21246.

[收稿日期] 2023-04-12

SHARPIN 基因敲除叙利亚仓鼠的建立和特征分析

线性泛素链相关蛋白 SHARPIN 是一种高度保守的蛋白,表达于多种类型的细胞和组织。SHARPIN 主要由氨基端卷曲螺旋结构域、泛素样结构域和 NPL4 锌指结构域组成。这 3 种结构域使得 SHAPIN 能与靶蛋白结合并促进泛素介导的蛋白降解。SHARPIN 基因突变可能与阿尔茨海默病的发生有关,其功能缺失可诱导多器官嗜酸性粒细胞炎症,皮炎以及次级淋巴器官发育异常。叙利亚仓鼠是一种常用于生殖学、肿瘤学、心血管疾病以及感染性疾病研究的实验动物,具有繁殖能力强、易于操作等优点。

苗晋鑫团队利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和胚胎移植技术建立 SHARPIN 基因敲除的叙利亚仓鼠。该仓鼠的 SHARPIN 基因第 1 外显子因缺失 155 nt 造成移码突变并提前终止,最终使 SHARPIN 基因完全丧失功能。通过 PCR 扩增和 Sanger 测序排除潜在脱靶位点。SHARPIN^{-/-}仓鼠淋巴器官发育异常,组织病理学检查结果显示包括脾、肝、肺、小肠和食管等在内的多种器官和组织内嗜酸性粒细胞的浸润。然而,SHARPIN 缺失不影响脾脏 T 细胞、巨噬细胞、部分 B 细胞和 NK 细胞特异性基因表达。SHARPIN^{-/-}仓鼠食管趋化因子受体 CCR3 及其配体 CCL11 表达上调,同时 IL-4 和 IL-13 表达升高,而脑组织内 NF-κB 信号通路活性降低。SHARPIN 基因敲除叙利亚仓鼠是温和型的嗜酸性粒细胞增多食管炎模型,补充了嗜酸性粒细胞小鼠模型的应用。

总之,本研究成功构建了 SHARPIN 基因敲除的叙利亚仓鼠,为研究 SHARPIN 在调节炎症反应及其它感染性疾病中的作用提供可靠模型。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 Oct;6(5):489–498. doi: 10.1002/ame2.12265.)

杜清,岳彤彤,王贺. 淋巴管生成的调节及其在心肌梗死中的作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 126-132.
Du Q, Yue TT, Wang H. Research progress on regulation of lymphangiogenesis and its role in myocardial infarction [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 126-132.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.017

淋巴管生成的调节及其在心肌梗死中的作用研究进展

杜清,岳彤彤,王贺*

(河南中医药大学第一附属医院,心脏中心/国家区域(中医)心血管诊疗中心,郑州 450000)

【摘要】 淋巴管系统调节组织液内稳态、脂质代谢、免疫功能,在体内发挥着重要作用。心肌梗死后,增强淋巴管生成可加快清除浸润的免疫细胞,减少促炎细胞因子的生成,减少水肿、炎症和纤维化,促进受损心脏功能恢复。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-C 及血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)-3 是淋巴管生成通路的组成部分,在心脏损伤后维持组织液平衡和心肌功能方面具有至关重要的作用。淋巴管与免疫系统之间密切相关,不同的免疫细胞群对淋巴重塑产生刺激或抑制作用。巨噬细胞是广泛分布在器官和组织中的先天免疫细胞,在器官发育、宿主防御、急性和慢性炎症、组织稳态和重塑等多种生理和病理过程中发挥着重要作用。还需要确定淋巴管生成的更多机制,为临床刺激淋巴管生成治疗心脏疾病提供有效的靶点。本文综述了心肌梗死后心脏及淋巴管基本的病理变化、淋巴管生成的调控因素以及巨噬细胞对淋巴管生成的影响。

【关键词】 心肌梗死;淋巴管生成;巨噬细胞;VEGFC

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0126-07

Research progress on regulation of lymphangiogenesis and its role in myocardial infarction

DU Qing, YUE Tongtong, WANG He*

(the First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Heart Center/National Regional (Traditional Chinese Medicine) Cardiovascular Diagnosis and Treatment Center, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 The lymphatic system plays an important role in regulating interstitial fluid homeostasis, lipid metabolism, and immune functions. After myocardial infarction, enhanced lymphangiogenesis accelerates clearance of infiltrating immune cells, reduces production of proinflammatory cytokines, reduces edema, inflammation, and fibrosis, and promotes recovery of impaired heart functions. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptor, VEGFR-3, are components of the lymphangiogenesis pathway and play a critical role in maintaining the tissue fluid balance and myocardial functions after cardiac injury. Lymphatic vessels are closely related to the immune system. Various immune cell populations stimulate or inhibit lymphatic remodeling. Macrophages are congenital immune cells distributed widely in organs and tissues, play an important role in various physiological and pathological processes such as organ development, host defense, acute and chronic inflammation, and tissue homeostasis and remodeling. More mechanisms of lymphangiogenesis need to be clarified to provide effective targets for clinical stimulation of lymphangiogenesis to treat heart disease. This article reviews basic pathological changes of the heart and lymphatic vessels after myocardial infarction, the regulatory factors of lymphangiogenesis, and the influence of macrophages on lymphangiogenesis.

【Keywords】 myocardial infarction; lymphangiogenesis; macrophage; VEGFC

[基金项目] 国家自然科学基金(82274316,81603432);河南省中医药科学研究专项课题(2022JDZX037,2019ZY2139)。
[作者简介] 杜清(1997—),女,硕士研究生,研究方向:心血管疾病临床与实验。E-mail: duqing97@126.com
[通信作者] 王贺(1984—),女,副主任医师,博士,硕士生导师,研究方向:心力衰竭的中西医防治。E-mail: ewaller@163.com

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

淋巴系统是液体运输和细胞迁移的通道,淋巴网络在调节心肌细胞外体积和免疫细胞稳态中起关键作用。淋巴内皮细胞稳态是心脏生理功能正常发挥的前提,而淋巴管生成不足或功能障碍显著影响心肌梗死(myocardial infarction, MI)后病理性心脏重塑。VEGFC/VEGFR3 信号传导长期以来一直被认为是淋巴管生成的主要分子驱动因素。淋巴信号传导的神经网络是复杂的,目前已经发现淋巴管在肿瘤转移和心脏修复的免疫调节中起着至关重要的作用^[1]。而心脏淋巴管生成也被提出作为预防心肌梗死后心力衰竭的治疗靶点。虽然调节功能性淋巴管的分子机制尚不完全清楚,但淋巴管生成与免疫调节之间的相互作用已被探索。心肌梗死后,心脏淋巴管系统协调免疫反应和心脏重塑过程,尤其是巨噬细胞,通过受损心脏的淋巴管运输调节 MI 后的免疫应答和心脏修复。针对淋巴管生成的实验性治疗策略也显示出减少心肌炎症、水肿、纤维化以及改善心脏功能的前景。

淋巴管与免疫系统之间密不可分,了解二者的关系能更好地理解淋巴管与心肌梗死后炎症期之间的重要关系;了解心肌梗死后心脏及淋巴管基本的病理变化对疾病能有针对的治疗方向;了解淋巴管生成的调控,以及巨噬细胞对淋巴管生成和心脏修复的影响对疾病能找到更好的治疗靶点。对以上内容进行总结,希望对淋巴管系统在心肌梗死后影响疾病的发展方向有更好的理解,为免疫细胞和淋巴管在损伤后心脏修复中的相互联系提供了新见解,从而为临床刺激淋巴管生成治疗心脏疾病提供有效的依据。

1 淋巴管与免疫系统

淋巴系统由薄壁的初始淋巴管网络、预收集管、集合管以及与血液循环系统平行的节点组成。初始淋巴管是由单层淋巴内皮细胞(lymphoendothelial cells, LECs)形成的,通过锚定丝与间质相连,没有周细胞和平滑肌细胞的包裹,缺乏连续的基底膜,这一结构特征使毛细淋巴管壁具有高渗透性,能够通过被动引流吸收多余的间质液和大分子^[2]。被初始淋巴管吸收的液体和大分子统称为淋巴,它流入预收集淋巴管和集合淋巴管。预收集淋巴管和集合淋巴管由 LECs 组成,与初始淋巴管不同,LECs 以拉链状连接紧密连接,并覆盖

有平滑肌细胞和基底膜,以防止淋巴渗漏^[3]。集合淋巴管也包含管腔内阀,调节淋巴的单向流动^[4]。

成人心脏的淋巴网络密集于心室,稀疏于心房^[5]。心脏淋巴重塑(淋巴管生成)发生在许多以水肿和炎症为特征的心血管疾病中^[6],包括缺血性心脏病或晚期心力衰竭患者。水肿或渗透压升高刺激淋巴重塑,部分是通过巨噬细胞驱动的 VEGFC 产生。除了维持间质液稳态,淋巴管系统还通过调节免疫细胞、细胞因子和抗原组织清除来调节免疫反应。此外,淋巴管确保乳糜微粒摄取膳食脂质,并使胆固醇从组织逆向运输到肝^[7]。

淋巴管与免疫系统之间的相互作用关系复杂。许多促炎介质降低了淋巴管功能^[8],但免疫细胞的组织清除仍依赖于淋巴趋化因子的活跃表达来选择性地招募和排出不同的免疫细胞群。同时,不同的免疫细胞群对淋巴内皮细胞的生长和生存产生刺激或抑制作用,影响淋巴重塑^[9]。

2 心肌梗死后心室重构

心肌梗死后,如不干预会进展为心室重构进而发展为心衰。冠状动脉阻塞导致血流中断,心肌细胞立即死亡。死亡的心肌细胞释放细胞内蛋白质进入循环,并触发炎症反应,招募炎症细胞浸润组织,清除死亡的心肌细胞。炎症反应消失后,心肌成纤维细胞分泌的细胞外基质蛋白形成纤维化瘢痕。心肌细胞为应对壁应力的增加引起梗死边界区心肌细胞肥大、壁变薄和心室扩张。

在这一系列过程中,免疫细胞的浸润是一把双刃剑。缺血损伤后的心脏免疫反应以免疫细胞浸润为特征,不仅包括中性粒细胞、单核/巨噬细胞、树突状细胞(dendritic cells, DCs),还包括 B 和 T 淋巴细胞。这些细胞共同协调死亡心肌细胞的移除,参与疤痕稳定和成熟所需的肉芽组织形成,并通过分泌促血管生成介质、抗凋亡介质和抗炎介质来调节随后的心脏修复和炎症消退阶段^[10]。但是,由于低效炎症反应引起的心脏慢性炎症,通过诱导冠状动脉内皮功能障碍和有害的心脏重塑(心肌细胞肥大和间质纤维化),加重心功能障碍,导致慢性心力衰竭的发展^[11]。因此,改善心脏炎症是许多心血管疾病的治疗目标,治疗性淋巴管生成可以加速心肌梗死后心脏炎症的消退。

3 心肌梗死后淋巴管的变化及作用

成人中,淋巴管是静止的,但在病理条件下淋巴管生成被重新激活^[12]。MI 后淋巴管生成的增加与免疫细胞浸润的增加有关,这是由受损细胞、细胞碎片和邻近细胞的细胞因子释放的促凋亡信号所吸引的^[13]。心肌梗死后,心肌内毛细淋巴管生成增多,心外膜预收集淋巴管和集合淋巴管的减少,导致心脏淋巴管的转运能力降低,对梗死区和邻近非梗死区的液体和炎症排出产生负面影响,加重心功能障碍^[14]。临床上,心肌梗死后可检测到心肌水肿延伸到梗死区以外,这提示淋巴功能不足。对大鼠进行实验性的心肌梗死^[14],在心脏的梗死区以及边界区观察到了淋巴管生成,增加的淋巴管生成可以通过促进免疫细胞清除和液体运输来减缓或逆转病理进展。这一内源性淋巴管生成反应,主要由心肌缺血后 VEGF-C 和 VEGF-D 表达增加所驱动。虽然在梗死瘢痕处部分的毛细淋巴管扩张,但是并不能满足心脏修复的需要。

有研究使用缺乏 VEGF-C、VEGF-D 或 VEGFR3 的小鼠来阻断淋巴管生成,结果显示不会损害心肌梗死后 2 周小鼠的心功能^[15]。虽然心脏淋巴管的减少不影响初始损伤后的心功能恢复,但增强淋巴管生成除了在急性恢复期外,还在慢性恢复期抑制心脏组织损伤^[9]。在小鼠中,通过激活 VEGFR3 信号增强的淋巴管生成可以改善心功能并促进心肌梗死后的恢复,这表明增强淋巴管生成对心脏修复的治疗潜力^[16],通过淋巴管生成来维持正常的淋巴功能在长期内是必要的。

4 淋巴管生成的调控因素

在成人体内淋巴管生成主要发生在已存在的血管中。在胚胎时期,淋巴管是在心血管系统建立并具有功能后出现的。小鼠的遗传实验已经证实哺乳动物的淋巴管起源于胚胎静脉^[17]。淋巴管向成熟淋巴网络的发展依赖于 VEGF-C、VEGFR-3、淋巴管内皮透明质酸受体 (LYVE-1)、同源盒基因转录因子 1 (Prox1) 与 Podoplanin (PDPN) 等的相互作用^[18]。

4.1 Prox1

Prox1 启动了 LECs 的早期发育^[19],是淋巴内皮发育过程中的特异性转录因子,影响着 VEGFR-3 的表达^[20]。Prox1 已被证明可以通过 Prox1-VEGFR-3

反馈循环维持 LECs 的表型^[21]。Prox-1 不仅编程 LECs,且在细胞分化中起着重要作用^[18]。缺乏 Prox1 的内皮细胞不能表达淋巴内皮标记物,而是保留其血管内皮表型。Prox1 阳性内皮细胞从静脉中萌发并以极化方式迁移形成淋巴囊。Prox1 敲除胚胎缺乏淋巴囊和淋巴管,表明 Prox1 不仅是 LECs 规范所必需的,也是淋巴管生成所必需的^[18]。

4.2 VEGF 家族

VEGF 属于血小板衍生的生长因子表基因家族,调节血管以及淋巴管生成。VEGFR-2 在血管内皮细胞中高度表达,对血管生成至关重要。VEGFR-3 是淋巴管发育所必需的。在发育的早期阶段,VEGFR-3 广泛表达于内皮细胞中,随着淋巴管系统的开始发育,VEGFR-3 的表达几乎只局限于 LECs^[18]。VEGF-C 的完全缺失会导致 LEC 无法迁移出主静脉,淋巴形成出现严重缺陷,从而导致水肿和产前死亡^[22]。VEGF-C 在大多数组织中通过多种细胞类型(包括心肌细胞)低水平表达。VEGF-C 水平在炎症期间升高^[5]。

在成年淋巴管系统的维持中并不需要 VEGF-C/VEGFR-3 信号通路^[23],但过表达 VEGF-C 或 VEGF-D 可以诱导内皮细胞增殖、迁移和存活,刺激淋巴管生成。心肌缺血后用 VEGF-C 治疗,促进了心脏淋巴管生成,可以通过增加多余蛋白质(如促炎介质)、免疫细胞和液体的淋巴引流能力,最终改善心功能^[9]。VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 通过激活淋巴管生成中的 AKT/ERK1/2 和钙调磷酸酶/NFATC1/FOXC2 通路,是缺血损伤后维持组织液平衡和心肌功能的关键^[24]。

4.3 PDPN

Podoplanin 是一种小跨膜蛋白。研究表明,PDPN 敲除小鼠具有淋巴/血管分离缺陷^[25],并表现出淋巴管扩张和功能障碍以及淋巴水肿。心肌梗死后 PDPN 阳性细胞与免疫细胞之间的相互作用调节有助于免疫细胞的募集。因此,PDPN 也被认为是 MI 后增强心脏修复和恢复心功能的新的治疗靶点^[26]。

4.4 FOXC2

FOXC2 在成人发育中的淋巴管和淋巴管瓣膜中高度表达。FOXC2 缺失会使集合淋巴管缺少瓣膜,淋巴异常回流,毛细淋巴管被基底膜成分和平滑肌细胞异位覆盖^[27],这表明 FOXC2 控制着负责淋巴管规范和集合淋巴管表型的遗传程序。FOXC2

还在 LEC 静止过程中调节连接蛋白 37 (Connexin 37, Cx37) 和钙调磷酸酶/活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activating T, NFAT) 信号^[28], 所以 FOXC2 对于淋巴管的成熟和维持是必要的。FOXC2 还被证明可以通过限制 Hippo 通路转录共激活因子具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (TAZ) 介导的增殖来调节 LEC 连通性的完整性, 并维持 LEC 细胞在受干扰流动区域的静止, 而 TAZ 对维持淋巴瓣膜功能至关重要^[28]。FOXC2 也被证明与 VEGFR-3 一起调节 LECs 中的 RAS/ERK 信号通路, 这也表明它可以调节淋巴管生成^[29]。

4.5 LYVE-1

LYVE-1 是最特异性的 LEC 标志物, 被广泛用于评估心肌梗死后的心脏淋巴管生成, 其在淋巴细胞、造血细胞和血管内皮细胞中不表达^[30]。在成人中, LYVE-1 在毛细淋巴管中保持高表达, 在集合淋巴管中的表达减少^[23]。

4.6 血管内皮钙黏蛋白 (VE-cadherin)

VE-cadherin 是一种位于细胞连接之间的内皮粘附分子, 在调节细胞增殖、凋亡、机械信号转导和内皮生长因子受体功能中发挥重要作用。VE-cadherin 既是血管发育不可缺少的, 也是淋巴组织中发展和维持心脏淋巴网络所必需的^[31]。在 LECs 中, VE-cadherin 通过形成可渗透的纽扣状连接或很大程度上不渗透的拉链状连接, 来调节内皮细胞的通透性, 并选择性地定位于整个淋巴血管系统, 以调节淋巴管内液体的进入和运输。VE-cadherin 稳定质膜上的 VEGFR3, 为 VEGF-C 的典型激活奠定了基础, 从而建立了心脏淋巴维持所需的功能性淋巴信号节点。VE-cadherin 还通过作为内皮机械感觉复合体的中心成分, 控制 β -连环蛋白 (β -catenin) 和 LECs 转录因子的表达, 并诱导 VEGFR2/VEGFR3-AKT 信号通路, 对 LECs 施加各种间接影响^[32]。研究证明 VE-cadherin 的淋巴表达是胚胎期和出生后心脏淋巴系统的发育及其在成年期的维持的要求。尽管 VE-cadherin 的 LEC 特异性损失小鼠会导致受伤心脏的淋巴管退化, 但是在心肌梗死前后并没有明显损害心功能。然而, VE-cadherin 缺乏小鼠心肌梗死后心肌梗死面积和纤维化增加, 提示淋巴血管受损可能会影响心肌梗死后的长期心功能并加重心力衰竭^[31]。

4.7 血管生成素 (Ang)

Ang 生长因子与受体酪氨酸激酶 2 (Tie2) 结合,

并调节内皮细胞和壁细胞之间的相互作用。Ang2 敲除小鼠表现出淋巴管成熟缺陷, 包括平滑肌细胞向集合管的招募受损和毛细淋巴管发育不良, 表明淋巴管稳定需要 Ang2^[23]。

4.8 细胞外基质 (ECM)

毛细淋巴管的 LECs 不是附着在像血管一样的基底膜上, 而是通过由纤维蛋白和人弹性蛋白微纤维界面蛋白 1 (emilin-1) 组成的弹性锚定丝附着在周围的 ECM 如 I 型胶原蛋白和纤维连接蛋白上。水肿期间, 扭曲的 ECM 成分对锚定丝的拉力增加, 使毛细淋巴管保持开放, 增加组织液吸收^[12]。对犬的研究表明, 心脏淋巴转运的大幅增加是心脏对心肌缺血或心脏停搏引起的急性心肌水肿的反应的代偿机制^[33]。然而在炎症期间, 浸润的中性粒细胞释放中性粒细胞弹性蛋白酶, 降解 emilin-1 锚定丝, 导致细胞间连接减弱和淋巴管崩溃, 结果淋巴运输不良水肿形成。组织水肿可能通过 ECM 释放介质进一步诱导淋巴管生成, 糖胺聚糖透明质酸被透明质酸酶降解为具有生物活性的促淋巴管生成片段, 作用于 LYVE-1, 与 VEGF-C 协同刺激 LEC 增殖和迁移^[34]。此外, ECM-整合素信号也在调节淋巴重构中的发挥重要作用。间质液压力 (IFP) 增大时, ECM 中纤维连接蛋白通过 β 1 整合素直接与 VEGFR3 结合向 LECs 发出信号, 放大 VEGF-C 信号^[35]。然而功能性淋巴管生成是一复杂的过程, 受局部微环境的影响, 由于水肿通常伴有炎症, 会对 LEC 连接和屏障功能产生不利影响^[36]。

5 免疫细胞对淋巴管生成和心脏修复的影响

5.1 巨噬细胞对淋巴管生成和心脏修复的影响

巨噬细胞可以分为两个亚类: M1 为经典激活的巨噬细胞^[37], 由脂多糖 (LPS) 和干扰素 (IFN)-C 诱导, 产生高水平的促炎细胞因子介导组织损伤并损害伤口愈合。M2 为交替激活的巨噬细胞, 可进一步极化为 M2a、M2b 和 M2c 巨噬细胞^[38]。M2a 和 M2c 巨噬细胞分泌大量促纤维化转化生长因子 (TGF)- β , 诱导组织纤维化。M2b 巨噬细胞也称为调控巨噬细胞, 维持促炎和抗炎功能之间的平衡, 研究表明 M2b 巨噬细胞可以减轻心肌缺血再灌注损伤 (myocardial Ischemia reperfusion injury, MI/RI) 的影响^[39]。

心肌梗死后, 尤其是巨噬细胞的聚集及其对死亡细胞的吞噬清除, 即胞葬作用, 是心脏修复的必

要的初始步骤。以往研究表明,胞葬作用缺陷会加速心力衰竭^[40]。心肌梗死诱导促淋巴管生成因子 VEGFC 的表达,触发心脏淋巴管生成,缓解炎症,从而改善心脏功能^[16]。巨噬细胞炎症期间分泌 VEGFC 并促进淋巴管生成^[41]。

Tammela 等^[23]报道实验性心肌梗死后巨噬细胞胞葬作用缺陷导致心脏淋巴管生成和 VEGFC 表达减少。以及在培养的原代巨噬细胞中添加凋亡细胞后,发现胞葬作用诱导 VEGFC 的细胞内证据。心肌梗死小鼠模型中观察到,心脏巨噬细胞升高了 VEGFC 表达水平,髓系 VEGFC 缺乏的小鼠表现出急性梗死面积的增加、心室收缩能力受损、不良组织重塑和淋巴管生成减少^[23]。同时细胞实验分析显示髓系 VEGFC 缺乏也以炎症反应缺陷为特征,巨噬细胞产生的 VEGFC 有直接抑制促炎巨噬细胞激活的作用。因此,这些结果表明,心脏巨噬细胞通过胞葬作用产生 VEGFC 除了促进心脏淋巴管生成和进行抗原清除,还能直接抑制巨噬细胞过度分泌促炎细胞因子改善心脏修复,促进心脏愈合。

Wang 等^[42]在大鼠体内的研究表明,M2b 巨噬细胞促进淋巴管生成,减少心肌纤维化,改善心脏功能,减少心脏重构。M2b 巨噬细胞移植后 VEGFC 和 VEGFR3 表达上调。体外实验表明,M2b 巨噬细胞可刺激 LECs 的增殖、迁移和管状形成。此外,与未分化(M0)巨噬细胞相比,M2b 巨噬细胞中 VEGFC 的表达上调。且 M2b 巨噬细胞上清培养的 LECs 中 VEGFR3 的表达也上调。因此,M2b 巨噬细胞可以被运用到心肌保护疗法中。

5.2 T 淋巴细胞对淋巴管生成和心脏修复的影响

Houssari 等^[9]对心肌梗死后心脏招募 T 细胞在淋巴重塑中的作用进行研究,发现使用 VEGF-C/VEGF-D trap(可溶性 VEGFR3)治疗限制 T 细胞招募到梗死区,导致左心室壁变薄减少延迟瘢痕重塑,并减少心肌梗死后的心功能障碍。进一步研究证实心脏浸润 T 细胞(包括 CD4⁺和 CD8⁺亚群)在心肌梗死后对心脏淋巴系统产生有害影响,并在一定程度上通过 IFN- γ 导致心肌梗死后急性期淋巴毛细血管和预收集器的稀疏。

6 治疗性淋巴管生成

有研究通过抑制 VEGF-C 和 VEGFR3 对心肌缺血模型小鼠进行研究^[43],结果发现,抑制内源性淋

巴管生成增加了梗死瘢痕大小,增加了心室肥厚,增加了左心室扩张,并降低了左心室功能。相反,有选择性地刺激心脏淋巴管生成,改善预收集淋巴管和集合淋巴管的重构,使心脏淋巴管运输能力加快,足以减轻大鼠心肌梗死后的心肌水肿、炎症和纤维化,从而减少病理性重构,改善心功能,部分预防心衰发展。另外 LEC 分泌的细胞因子可以促进心肌细胞增殖存活,减少心肌细胞凋亡,为心肌梗死后心脏提供保护^[44]。

Hartikainen 等^[45]在对小鼠心梗模型的研究中发现,通过腺相关病毒载体实现持续的 VEGF-CC156 S 治疗,才能有效增加心脏淋巴管生成,并减少心肌梗死后 3 周心脏炎症和功能障碍。在一项随访 1 年研究中,促进淋巴管生成和血管生成的基因治疗增加了难治性心绞痛患者的心肌灌注储备^[46]。因此淋巴管生成疗法可能是治疗心血管疾病的一种有前途的方法。

7 小结

心血管疾病的心肌改变包括心肌细胞和非心肌细胞的细胞群以及 ECM 的改变。对于心肌梗死以及其他心脏疾病的治疗要考虑多种细胞及 ECM 中的靶点。淋巴管生成不足或功能障碍在 MI 和非缺血性心脏病的心肌重塑和心功能障碍中起着病理生理作用。心脏淋巴功能受损导致心肌水肿和免疫炎症延迟消退,而慢性水肿和炎症都可以诱导心肌间质纤维化。为了改善心肌梗死后的心功能,减少心肌水肿、炎症和纤维化,治疗性淋巴管生成已经成为一种有前途的新方法。其中与淋巴管密切相关的免疫巨噬细胞在急慢性炎症、组织稳态和重塑等多种生理和病理过程中发挥重要作用。VEGFC-VEGFR3 是主要的淋巴管生成通路,巨噬细胞通过胞葬作用产生的 VEGFC 可以促进心脏淋巴管生成,不仅能清除抗原,同时抑制促炎细胞因子的过度分泌,改善心脏修复(见图 1)。但考虑到,VEGF-C 可以与内皮细胞上的 VEGFR2 受体结合刺激血管生成,同时也刺激血管渗漏^[12],VEGFR3 也在心肌细胞和肌成纤维细胞上表达,VEGF-C 治疗可能直接影响心肌细胞和重塑期成纤维细胞的信号转导。因此未来的研究仍需充分了解不同类型细胞中的 VEGF-C 和 VEGFR3 信号如何影响 MI 后淋巴管生成及心肌生理病理变化。

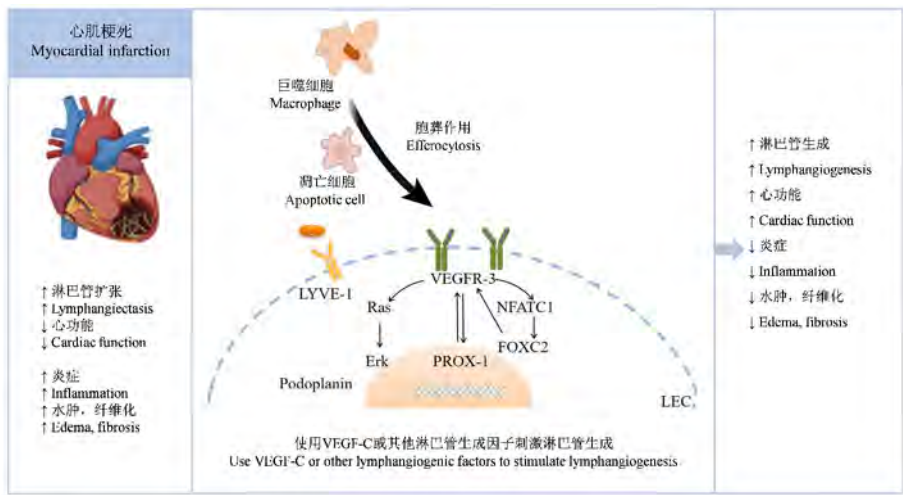


图 1 淋巴管生成的调节及其在心肌梗死中的作用

Note. LEC, Lymphoendothelial cell. VEGF-C, Vascular endothelial growth factor C. VEGF-D, Vascular endothelial growth factor D. VEGFR-3, Vascular endothelial growth factor receptor 3. HA, Hyaluronic acid. LYVE-1, Lymphatic endothelial hyaluronic acid receptor. Podoplanin, Membrane mucin. NFATC1, Activated T-nuclear factor 1. FOXC2, Forkhead frame C2. PROX-1, Homeobox gene transcription factor 1. Erk, Extracellular regulated protein kinase.

Figure 1 Regulation of lymphangiogenesis and its role in myocardial infarction

参考文献:

[1] Deng H, Zhang J, Wu F, et al. Current status of lymphangiogenesis: molecular mechanism, immune tolerance, and application prospect [J]. Cancers (Basel), 2023, 15 (4): 1169.

[2] Oliver G, Kipnis J, Randolph GJ, et al. The lymphatic vasculature in the 21st century: novel functional roles in homeostasis and disease [J]. Cell, 2020, 182(2): 270–296.

[3] Liu X, Cui K, Wu H, et al. Promoting lymphangiogenesis and lymphatic growth and remodeling to treat cardiovascular and metabolic diseases [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2023, 43(1): e1–e10.

[4] Sabine A, Saygili Demir C, Petrova TV. Endothelial cell responses to biomechanical forces in lymphatic vessels [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(7): 451–465.

[5] Glington KE, Ma W, Lantz C, et al. Macrophage-produced VEGFC is induced by efferocytosis to ameliorate cardiac injury and inflammation [J]. J Clin Invest, 2022, 132(9): e140685.

[6] Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(1): 56–68.

[7] Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, et al. The lymphatic system: integral roles in immunity [J]. Annu Rev Immunol, 2017, 35: 31–52.

[8] Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, et al. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction [J]. J Physiol, 2016, 594(20): 5749–5768.

[9] Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, et al. Lymphatic and immune cell cross-talk regulates cardiac recovery after experimental myocardial infarction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(7): 1722–1737.

[10] DeBerge M, Yu S, Dehn S, et al. Monocytes prime autoreactive T cells after myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 318(1): H116–H123.

[11] Dick SA, Macklin JA, Nejat S, et al. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction [J]. Nat Immunol, 2019, 20(1): 29–39.

[12] Brakenhielm E, González A, Díez J. Role of cardiac lymphatics in myocardial edema and fibrosis [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(6): 735–744.

[13] Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction [J]. J Clin Invest, 2018, 128(8): 3402–3412.

[14] Henri O, Pouche C, Houssari M, et al. Selective stimulation of cardiac lymphangiogenesis reduces myocardial edema and fibrosis leading to improved cardiac function following myocardial infarction [J]. Circulation, 2016, 133(15): 1484–1497.

[15] Keller TCS, Lim L, Shewale SV, et al. Genetic blockade of lymphangiogenesis does not impair cardiac function after myocardial infarction [J]. J Clin Invest, 2021, 131(20): e147070.

[16] Klotz L, Norman S, Vieira JM, et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury [J]. Nature, 2015, 522(7554): 62–67.

- [17] Kazenwadel J, Harvey NL. Lymphatic endothelial progenitor cells; origins and roles in lymphangiogenesis [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 53: 81–87.
- [18] Wang YC, Meng WT, Zhang HF, et al. Lymphangiogenesis, a potential treatment target for myocardial injury [J]. *Microvasc Res*, 2023, 145: 104442.
- [19] Meng FW, Jing XN, Song GH, et al. Prox1 induces new lymphatic vessel formation and promotes nerve reconstruction in a mouse model of sciatic nerve crush injury [J]. *J Anat*, 2020, 237(5): 933–940.
- [20] Driessen F, Cushing T, Baines SJ. Retroperitoneal lymphatic malformation in a dog [J]. *Acta Vet Scand*, 2020, 62(1): 8.
- [21] Srinivasan RS, Escobedo N, Yang Y, et al. The Prox1-Vegfr3 feedback loop maintains the identity and the number of lymphatic endothelial cell progenitors [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(19): 2175–2187.
- [22] Hägerling R, Hoppe E, Dierkes C, et al. Distinct roles of VE-cadherin for development and maintenance of specific lymph vessel beds [J]. *EMBO J*, 2018, 37(22): e98271.
- [23] Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise [J]. *Cell*, 2010, 140(4): 460–476.
- [24] Lin QY, Zhang YL, Bai J, et al. VEGF-C/VEGFR-3 axis protects against pressure-overload induced cardiac dysfunction through regulation of lymphangiogenesis [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(3): e374.
- [25] Welsh JD, Kahn ML, Sweet DT. Lymphovenous hemostasis and the role of platelets in regulating lymphatic flow and lymphatic vessel maturation [J]. *Blood*, 2016, 128(9): 1169–1173.
- [26] Cimini M, Garikipati VNS, de Lucia C, et al. Podoplanin neutralization improves cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction [J]. *JCI Insight*, 2019, 5(15): e126967.
- [27] Norden PR, Sabine A, Wang Y, et al. Shear stimulation of FOXC1 and FOXC2 differentially regulates cytoskeletal activity during lymphatic valve maturation [J]. *Elife*, 2020, 9: e53814.
- [28] Geng X, Ho YC, Srinivasan RS. Biochemical and mechanical signals in the lymphatic vasculature [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(16): 5903–5923.
- [29] Jiang L, Ren W, Xie C, et al. Genetic landscape of FOXC2 mutations in lymphedema-distichiasis syndrome: different mechanism of pathogenicity for mutations in different domains [J]. *Exp Eye Res*, 2022, 222: 109136.
- [30] Ge Q, Zhao L, Liu C, et al. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, improves cardiac hypertrophy and fibrosis and cardiac lymphatic remodeling in transverse aortic constriction model mice [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7256862.
- [31] Harris NR, Nielsen NR, Pawlak JB, et al. VE-cadherin is required for cardiac lymphatic maintenance and signaling [J]. *Circ Res*, 2022, 130(1): 5–23.
- [32] Yang Y, Cha B, Motawe ZY, et al. VE-cadherin is required for lymphatic valve formation and maintenance [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(9): 2397–2412.
- [33] Mehlhorn U, Geissler HJ, Laine GA, Allen SJ. Myocardial fluid balance [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001, 20(6): 1220–1230.
- [34] Wu M, Du Y, Liu Y, et al. Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92857.
- [35] Urner S, Planas-Paz L, Hilger LS, et al. Identification of ILK as a critical regulator of VEGFR3 signalling and lymphatic vascular growth [J]. *EMBO J*, 2019, 38(2): e99322.
- [36] Bai J, Yin L, Yu WJ, et al. Angiotensin II induces cardiac edema and hypertrophic remodeling through lymphatic-dependent mechanisms [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 5044046.
- [37] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425–6440.
- [38] Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(2): 345–358.
- [39] Yue Y, Yang X, Feng K, et al. M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: a predominant role of inhibiting apoptosis via A20 [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 245: 228–235.
- [40] Howangyin KY, Zlatanova I, Pinto C, et al. Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase and milk fat globule epidermal growth factor 8 coordinately improve remodeling after myocardial infarction via local delivery of vascular endothelial growth factor [J]. *Circulation*, 2016, 133(9): 826–839.
- [41] Cimpean AM, Raica M. Lymphangiogenesis and inflammation—looking for the “missing pieces” of the puzzle [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2015, 63(6): 415–426.
- [42] Wang C, Yue Y, Huang S, et al. M2b macrophages stimulate lymphangiogenesis to reduce myocardial fibrosis after myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 384–393.
- [43] Shimizu Y, Polavarapu R, Eskla KL, et al. Impact of lymphangiogenesis on cardiac remodeling after ischemia and reperfusion injury [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(19): e009565.
- [44] Liu X, De la Cruz E, Gu X, et al. Lymphoangiocrine signals promote cardiac growth and repair [J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 705–711.
- [45] Hartikainen J, Hassinen I, Hedman A, et al. Adenoviral intramyocardial VEGF-D Δ NAC gene transfer increases myocardial perfusion reserve in refractory angina patients: a phase I/IIa study with 1-year follow-up [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(33): 2547–2555.
- [46] Hartikainen J, Hassinen I, Hedman A, et al. Corrigendum to: Adenoviral intramyocardial VEGF-D Δ NAC gene transfer increases myocardial perfusion reserve in refractory angina patients: a phase I/IIa study with 1-year follow-up [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(18): 1652.

包容. 猴痘病毒的感染与猴痘的动物模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 133-141.
Bao R. Monkeypox virus infection and the animal model of monkeypox [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 133-141.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.018

猴痘病毒的感染与猴痘的动物模型

包 容

(武汉大学动物实验中心/ABSL-3 实验室, 武汉 430071)

【摘要】 猴痘是猴痘病毒(monkeypox virus,MPXV)感染引起的传染性疾病。猴痘病毒的宿主依然没有完全明确,啮齿类与非人灵长类动物被认为是潜在的宿主。猴痘正在全世界范围内逐渐扩散,但我国一直以来并未开展猴痘的动物模型的研究。作为一种严重危害人类健康的病原体,猴痘病毒有多种感染类型;其在人群中的传播呈现新的特点。因此本文论述了猴痘病毒发现的经过与早期疫情、不同的感染类型和共感染。此外,本文还介绍了啮齿类和非人灵长类动物的实验性感染与猴痘动物模型。

【关键词】 猴痘;猴痘病毒;痘病毒;动物模型;模式动物
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0133-09

Monkeypox virus infection and the animal model of monkeypox

BAO Rong

(the Center for Animal Experiment/Animal Biosafety Level-3 Laboratory, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

【Abstract】 Monkeypox is an infectious disease caused by monkeypox virus (MPXV) infection. The host of MPXV remains unclear, and rodents and non-human primates are considered to be potential hosts. Monkeypox is rapidly spreading worldwide. However, animal models of monkeypox have not been established in China. MPXV is a pathogen that seriously threatens human health. Its transmission among the population has presented new characteristics. Therefore, this article describes the discovery of MPXV and the early epidemic, different types of infection, and coinfection. Additionally, experimental infection and animal models of monkeypox in rodents and non-human primates are expounded.

【Keywords】 monkeypox; MPXV; mpox; animal model; model animal
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

猴痘病毒(monkeypox virus,MPXV)属正痘病毒(*Orthopoxvirus*, OPXV)科成员。在该病毒家族中,有十多个成员,但只有天花病毒、牛痘病毒、猴痘病毒等四种可感染人类。在天花消灭之后,一种类似天花的疾病继续在刚果(金)农村流行^[1]。1970 年当地儿童出现天花样症状,猴痘病毒随即从人痘疹标本中分离,该病毒对人致病的事实也得到确认^[1]。现在这种病毒正逐渐扩散到非洲以外的大洲,被感染的人群正逐渐扩大。非人灵长类(non-human primates,NHPs)被认为是偶然的宿主;啮齿类的非洲松鼠、非洲睡鼠是更可能的宿主,但并未

完全确定。以前的感染一般由密切接触染病的野生动物或者宠物而引发;最近的猴痘病毒的传播与感染对象呈现新的特点,同性恋和双性恋成了猴痘病毒感染的主要群体,其致病性也正发生变化。MPXV 的感染因为动物种类、感染途径、感染剂量、毒株等多种因素不同而有较大差异。我国面临境外猴痘病毒传入的风险,因此有必要全面了解猴痘病毒的感染特点,并建立相应的动物模型。本文论述了猴痘病毒的发现经过、流行与感染类型和多种动物的感染模型,并总结了多种啮齿类、非人灵长类的感染以及多种类型的感染,如自然感染、隐性

【基金项目】“十四五”国家重点研发计划重点专项(2021YFF0702002)。
【作者简介】包容(1979—),男,博士,研究方向:病原微生物感染与动物模型。E-mail:baorongxiao@whu.edu.cn

感染、显性感染、共感染等;还介绍了各种实验性感染与动物模型特点,包括动物对病毒的敏感性、病毒的组织嗜性,不同途径的感染、不同毒株的感染等;希望对构建猴痘动物模型提供更多的认识。

1 猴痘病毒发现的经过与早期疫情

1958 年,来自马来(西)亚的食蟹猴运输到丹麦哥本哈根国家血清研究所后暴发两次疫情。部分猴出现痘疹,疑在运输途中被感染。曾发现缺损病毒的干扰现象的 Von Magnus 分离出病原体,并鉴定为猴痘病毒^[2]。1964 年 12 月,荷兰鹿特丹动物园 23 只动物被感染,11 只动物死亡。疫情引发外界关注,1967 年 WHO 调查欧美 26 个灵长类机构,发现 9 个(分别来自丹麦、荷兰和美国)都曾暴发过猴痘或类似病情,其中 5 次被病毒分离证实。次年巴黎也暴发猴痘疫情,2 只来自塞拉利昂的黑猩猩出现广泛性皮疹^[2]。在这些疫情中,被感染的主要是东南亚的食蟹猕猴(食蟹猴)和亚洲的普通猕猴(恒河猴),但是这些猴的老家并未发生类似疫情。

这被后来的病毒基因测序与序列分析所证实,以往多个 MPXV 流行株都是西非来源,包括 1958 年的丹麦哥本哈根株、1962 年的 Walter-Reed 陆军研究所株、1964 年的荷兰鹿特丹株、1968 年巴黎株以及 2003 年的美国株等^[3]。不确定疫情是否全部与动物有关,可以肯定的是欧美国家众多动物园与实验机构的黑猩猩、多种非洲猴、狒狒均来源于非洲国家。这也说明,说明猴痘与天花曾经同时在非洲和欧洲流行;所谓的小天花、类天花也可能是猴痘。另外,在 MPXV 分离鉴定之前,野生猴群中也发生过类似天花的疫情^[4]。

2 非人灵长类与啮齿类动物的自然感染

2.1 非人灵长类的自然感染

在丹麦猴痘疫情之后,亚洲猴首先被怀疑是可能的天然宿主。1969~1970 年,1200 份亚洲猴血清检测发现抗痘病毒抗体均为阴性,随后更多的来自非洲稀树草原的猴血清标本也未检测到阳性^[5]。从 1969 年开始,多种西非的赤猴、狒狒的血清标本抗牛痘血凝抑制试验(HI)检测到阳性^[6],1973~1974 年,对 206 只西非 NHP 的血清调查发现 8% 的样本 HI 阳性,21% 样本中和抗体阳性,包括以前被归为长尾猴属的非洲绿猴(*C. aethiops*)、西非红疣猴和多种长尾猴。此外,还在 4 份 NHPs 血清标本中

发现 3 份特异性抗体阳性^[7]。随后在 13 只野生猴中发现 4 只抗 MPXV 特异性抗体阳性^[8]。1979 年,在刚果进行的大规模的血清抗体检测显示,在 43 种动物包括啮齿类、非人灵长类等动物中有 2%~70% 的抗 OPXV 抗体阳性^[5]。1986 年刚果(金)北部的一项调查,发现 39 只从原始森林捕获的 NHPs 中,3 只长尾猴特异性抗体阳性^[9]。1988 年大规模的调查发现,在刚果(金)的两个地区的 NHPs(主要是红尾长尾猴)中,7.8% 的标本特异性抗体阳性^[10]。这些针对 NHPs 的大规模的调查是 50 年前 WHO 为消灭天花而组织的国际合作的一部分,NHPs 的感染后来也有零星的报道。

2012 年科特迪瓦 Taï 国家公园一只死亡的野生白枕白眉猴(sooty mangabey, SM)幼体被发现,有典型皮疹。检测发现 MPXV 阳性,皮肤、咽拭子、胸腺病毒载量非常高^[11]。2017 年该公园 3 个相邻黑猩猩群体出现猴痘疫情,发病的主要是幼龄个体,猩猩有呼吸道症状;分离出的 3 个毒株与死亡的 SM 毒株的有非常近的遗传距离^[12]。2014 年喀麦隆中部 NHPs 收容所的黑猩猩暴发猴痘疫情。72 只中至少 6 只检测出 MPXV DNA 阳性。2016 年黑猩猩再次发生疫情,同样未找到传染源^[13]。

总之,MPXV 感染的 NHPs 种类很多,包括多种猩猩^[14]、新大陆猴;也包括旧大陆猴中常见的亚洲猕猴和非洲猴^[1,15]。在最近的暴发中,宿主或主要载体的身份仍未确定,NHPs 被认为只是偶然的宿主;这也可能是缺乏持续更新的血清调查数据。基于动物伦理、动物保护和生物安全的考虑,现在已经不可能像当年研究天花一样深入非洲丛林。

2.2 啮齿类动物的自然感染

1970 年在人猴痘病例出现后,收集动物样本的地理范围缩小到刚果的热带雨林。1985 年从西非松鼠体内分离出猴痘病毒,被捕获的松鼠体表有明显的皮疹^[5]。1986 年在刚果(金)的大规模调查发现,24.7% 的西非松鼠、16.2% 的红腿太阳松鼠有特异性抗体;松鼠也是当地唯一一种常被人捕捉的动物^[9]。包含这项研究的更大规模的生态学调查发现 23.7% 非洲松鼠(属)、14.9% 的太阳松鼠(属)特异性抗体阳性,而超 1000 例其他啮齿类与食虫类则未检出^[10]。1996~1997 年的调查发现,25% 的野生动物(以松鼠为主)检出抗 OPXV 中和抗体。病毒蚀斑减少中和抗体试验显示,刚果(金)一地区 59 只动物中 15 只阳性,包括冈比亚颊囊鼠、四趾岩象

鼯、西非松鼠、库氏非洲松鼠、太阳松鼠等^[16]。

2003 年美国发生猴痘疫情, 传染源被确定为运输途中 3 种从非洲进口的啮齿类动物。包括 1 只冈比亚颊囊鼠、3 只非洲睡鼠和 2 只绳松鼠; 与冈比亚颊囊鼠密切接触的(北美)草原犬鼠被感染并将病毒传播给人类^[2]。尽管这些动物受到普遍关注, 但 2012~2015 年在刚果(金)捕获的 353 只动物中阳性率很低; 仅 7 只有抗 OPXV 的 IgG 阳性, 种类包括非洲松鼠、红腿太阳松鼠、扎伊尔颊囊鼠、扎伊尔睡鼠、四趾岩象鼯、褐鼻鼠^[17]。2017 年刚果(布)的调查发现, 在啮齿类 105 只动物中仅 2 只非洲巨颊囊鼠抗 OPXV 的 IgG 抗体阳性^[18]。2018 年调查发现, 西非(主要是刚果)的猴痘疫源地与非洲松鼠属的分布高度重叠, 包括西非松鼠、高山非洲松鼠、库氏非洲松鼠、饰纹非洲松鼠、红足非洲松鼠等^[19]。

非洲啮齿动物被认为是最可能的宿主, 既包括松鼠科的非洲松鼠(绳松鼠)、太阳松鼠, 也包括其他啮齿类动物如非洲睡鼠、冈比亚颊囊鼠、非洲跳鼠、非洲帚尾豪猪等; 还包括其他非啮齿类动物, 如象鼯、非洲刺猬等。除此之外, 其他大洲的动物也能被病毒感染, 如旱獭(*Marmota bobak*)、草原犬鼠、(美洲)负鼠、大食蚁兽等^[1,15]。

3 猴痘病毒的隐性感染与显性感染

3.1 猴痘病毒的隐性感染

动物的 MKXV 自然感染, 部分是隐性感染。1959 年美国宾夕法尼亚州默沙东实验室的食蟹猴和恒河猴因为与非洲绿猴共用笼舍而感染, 大约 5% 非洲绿猴被感染而没有症状^[2]。1962 年, 美国 Walter-Reed 陆军研究所报告 27 只食蟹猴中 3 只出现猴痘症状。其余的食蟹猴、恒河猴、非洲绿猴群 HI 抗体呈不同程度阳性^[4]。当时普遍接种天花疫苗, 工作人员未见感染^[4]。

野外的成年黑猩猩可以表现为隐性感染, 既无症状也无皮疹, 也有少数青少年或更小的黑猩猩表现为隐性感染^[12], 个别成年黑猩猩偶发咳嗽。自然感染的非洲巨颊囊鼠也可以表现为隐性感染, 外表无异常, 仅性腺检出病毒 DNA, 且抗体阳性^[20]。

MPXV 的实验性感染也可表现为隐性感染。食蟹猴和某些新大陆猴在 MPXV 滴鼻感染后无症状, 而抗牛痘的 HI 抗体阳性^[6]。冈比亚颊囊鼠滴鼻感染后没有明显临床症状, 病毒载量升高不明显, 体液可检测到活病毒^[21]。

隐性感染在非洲当地人群中广泛存在。如 49.1% 刚果(布)北部人群(≤ 25 岁)和 37% 的加纳年轻人(< 23 岁)抗 OPXV 抗体阳性。更具有说服力的是针对喀麦隆黑猩猩收容所疫情的调查报告。在受访的 63 人中(未接种天花疫苗), 4 人(1 个饲养员和 3 个附近的村民)血清抗 OPXV 抗体 IgG 阳性而从未出现过猴痘症状^[13]。

临床病例也可见隐性感染。有报道发现 224 例临床男性肛肠标本中 3 例猴痘 PCR 阳性。他们在采样前后的几周内都没有出现过任何症状。采样后 21~37 d, 标本检测不到病毒 DNA^[22]。98% 的感染者是同性恋或双性恋男性^[23]的事实也说明非肛交途径感染如呼吸道途径、接吻等途径感染极少出现症状, 而表现为隐性感染。

3.2 猴痘病毒的显性感染

啮齿类动物一般表现为显性感染。这些敏感动物的种类很多, 但只有部分感染后出现皮疹, 如西非松鼠、草原犬鼠^[24]、旱獭^[25]、非洲巨颊囊鼠^[21,26]等, 其他动物感染后即使死亡也未见皮疹或者尚未发皮疹。睡鼠、松鼠猴等多种动物感染后不一定出现皮疹^[20]。

非人灵长类的显性感染: NHPs 的显性感染最经典案例是荷兰鹿特丹动物园的疫情。大食蚁兽首先发病, 并出现典型症状后死亡, 接着红毛猩猩、黑猩猩、大猩猩、枭面长尾猴、亚洲猕猴、长臂猿、松鼠猴、狨被感染并出现类似皮疹。半圈养的黑猩猩感染后食欲不振, 前肢出现渐进性小疱和皮肤结节样突起, 并有 1 只死亡^[13]。在野外, 部分自然感染的幼龄黑猩猩发病, 呼吸道症状明显, 如呼吸困难、咳嗽等; 可伴发疹, 而不一定是弥漫性的痘疹; 但是成年个体一般无症状^[12]; 病情与年龄相关的原因不明。监测表明, 该地区的 MPXV 是突然出现的, 这意味着成年个体不是因为长期在环境中接触过该病毒的抗原而获得了免疫力。

人类的显性感染: 人类的显性感染至少有 3 种类型。第一类是典型的天花样病变, 如刚果(金)1970~1983 年的病例, 有发疹、淋巴结肿大等体征, 约 60% 的患者皮疹超过 100 个。这些症状、体征都无法与天花区分。第二类是 2003 年美国猴痘疫情, 与患病的草原犬鼠的密切接触者出现多种症状。非侵入性感染者病情较轻, 相应症状和体征出现比例更少^[27]。复杂途径感染者潜伏期更短, 前驱期无发热而直接出现皮疹, 短暂的皮疹期之后有长的发

热期^[27]。第三类是非典型症状的猴痘感染,如 2022 年新出现的肛交感染群体,其中包括部分人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者,这类感染者缺乏呼吸道病变症状,如咳嗽等,皮疹也很少,大部分人只有数个^[23]。

4 猴痘病毒与 HIV 的共感染

最近,同性恋和双性恋群体因肛交(肛门直肠粘膜感染)而成为 MPXV 感染的主要群体,该群体也是 HIV 感染的高发群体。大型病例分析发现, HIV 感染的猴痘患者比例很高。英国 26% 的已知猴痘病例是 HIV 感染者,而欧洲国家这一比例为 37%;美国 41% 的 MPXV 感染者同时也是 HIV 感染者;西班牙的两个大城市,40% 感染者 HIV 阳性^[23]。

西非近年来出现的猴痘患者的死亡被认为与未经治疗的 HIV 感染有关。尼日利亚 40 名 MPXV 感染者中 5 人死亡;合并 HIV 的感染患者 9 人,其中 2 人死亡。与 MPXV 单感染相比,共感染患者病程更长,痘疹更大,继发性细菌皮肤感染和生殖器溃疡的比例更高^[28];这与欧美的发病率有较大差距。尼日利亚 5 名共感染患者均有继发性感染,而 MPXV 单感染患者继发性感染不到 1/3,这说明这些共感染患者的病毒载量没有得到控制,有免疫缺陷而无法控制感染,因此死亡风险较高。欧美共感染患者的病毒载量控制在非常低的水平,CD4⁺T 细胞数量也大致在正常水平^[23],这应该是欧美共感染极少出现死亡病例的原因。最近几年的调查也显示,刚果(金)HIV 的实际上的感染率为 11%,这远超过先前的估计的 2.86%^[29]。动物实验也证实, SIV 感染的恒河猴进入艾滋病阶段后即使用天花疫苗免疫,MPXV 攻毒的恒河猴也会很快死亡^[30]。

还有部分非洲猴痘患者死亡与 HIV-1 共感染无关,当地的猴痘病毒有较高的致病性。尼日利亚 MPXV 单感染患者中,3/31 死亡,3/5 的患者皮疹数在 100 个以上^[28]。2003 年美国疫情患者中,约半数以上患者皮疹少于 25 个^[27],而 2022 年的欧美同性恋群体中接近 40% 的患者皮疹不到 5 个,且尚未出现死亡病例。这说明非洲当地的猴痘感染的病情比其他地区更严重。

除了 HIV,猴免疫缺陷病毒(SIV)可能是另外一种共感染的病原体。喀麦隆的调查发现,猎人(高暴露群体)的 SIV 阳性率为 17.1%,而这些人同时也是猴痘的高发人群^[31]。

非洲当地的 NHP 也存在共感染。西非和中非是 SIV 的疫源地, SIV 的自然宿主主要是携带 SIVsmm 的白枕白眉猴和携带 SIVcpz 的黑猩猩,也包括非洲绿猴、疣猴和狒狒等。另外,猴痘病毒宿主与 SIV 灵长类自然宿主的种类与分布地域重合。

5 实验性感染与动物模型

5.1 不同毒株的实验性感染

WHO 将 MPXV 分为两个演化支。包括刚果盆地支和西非支。前者感染病死率约为 10%,后者感染较轻,致死率低。刚果支(中非支)可以继续细分为 I ~ V 组^[3]。一种新的分类方法将刚果支命名为 Clade 1,将西非支进一步分为 Clade 2 和 Clade 3;演化支 Clade 3 基本上都是人源性毒株^[32];也有分类方法直接将人人传播的所有毒株归属于 Clade 3^[33]。

刚果株(Zr-599)比西非株(Liberia)病毒致病性更强。从食蟹猴的实验性感染看,不管是皮下注射还是滴鼻感染,刚果株感染后,猴呼吸道、泌尿生殖系统和胃肠道病变更严重,刚果株感染猴的血液病毒载量比利比亚株高约 10 倍。刚果株感染比西非株有更多的皮疹数量和更严重的溃疡性病灶^[34]。

小鼠(CAST/EiJ)的滴鼻的实验发现,刚果株(Z79-CB2)感染的存活率更低,10 PFU 腹腔注射可导致半数死亡,但动物体重并未见下降;滴鼻感染时,半数致死剂量(LD₅₀)比西非株感染至少低一个数量级。刚果株滴鼻感染的小鼠以肺组织病毒滴度最高,达 10⁹ PFU/g,肝、脾的病毒滴度明显偏低;腹腔注射时,脾、肝、肺病毒载量都很高,而脾最高。西非株(USA-C1)滴鼻感染时,感染剂量达到 10⁴ 时才出现半数死亡率。肺、卵巢、脾都有较高滴度病毒;感染剂量与组织中的病毒滴度峰值缺乏相关性^[35]。这说明不同毒株在小鼠组织器官中增殖与感染途径和剂量有关。

最近发现,加拿大的分离株 Clade 1(刚果株 V79-1)和 Clade 2(西非株 SP2833)对 CAST/EiJ 并未显示强的致病性,甚至 10⁴ PFU 滴鼻感染未见死亡^[36],这说明该小鼠模型还有进一步优化的必要。

5.2 啮齿类的实验性感染与动物模型

豚鼠、仓鼠对 MPXV 不敏感,无皮疹,实验性感染无死亡。成年兔和成年大白鼠感染后不易死亡,但幼龄的兔和大鼠很易死亡。棉鼠、欧亚红松鼠、非洲松鼠、十三纹地松鼠、草原犬鼠、CAST/EiJ 小

鼠、睡鼠均非常敏感,攻毒易导致死亡。死亡也与感染途径有关,如小鼠、草原犬鼠滴鼻感染的死亡率比静脉注射的死亡率少 50%^[24]。

早獭模型:早獭低剂量滴鼻感染显示,病毒首先在气管、肺组织复制,然后是鼻甲、结肠、皮肤等处。中高剂量皮下注射感染时,除了气管、支气管和肺,皮疹、鼻粘膜、睾丸/卵巢、腹股沟淋巴结、肾、脑等组织器官病毒滴度也很高^[25]。肝并未检出高滴度的病毒,这有别于草原犬鼠等其他动物。睾丸与脑组织中检出一定量的病毒,这说明病毒能通过脑屏障和血睾屏障,可能出现神经病变。实际上早獭容易出现生殖系统病变。两种不同剂量的攻毒实验发现,在多种组织器官中,睾丸甚至与皮疹有同样高的病毒滴度^[25]。这与同为地松鼠族的草原犬鼠有较大差异。天花疫苗免疫过的早獭能预防 MPXV 感染的动物发病,而未免疫组全部动物发病,半数动物死亡。这说明早獭合适作为猴痘疫苗有效性评价的模式动物^[25]。

草原犬鼠模型:野外捕捉的黑尾草原犬鼠在荧光素酶基因的重组病毒(西非株 USA-2003)腹腔注射($10^{5.1}$ PFU)感染后,所有动物在 11 d 内全部死亡。尸检发现,肝、脾、肺、肾的病毒滴度较高。病理染色可见肝、脾有小灶性坏死,肺内轻度炎性改变。滴鼻途径感染的主要病理改变在肺和胸膜腔;因为胸膜腔纤维素渗出而有胸膜和肺的轻度粘连。3/5 的动物死亡,死亡动物中,仅 1 只肺检出高滴度病毒。动物的嘴唇、舌和颊黏膜上也有溃疡性改变^[37]。腹腔注射与滴鼻感染的死亡率和生存时间差异较大,这说明感染部位或攻毒方式对感染结局影响较大。通过活体成像技术检测动物的病毒载量也是一种非常直观的方法,如用荧光素酶基因的重组 MPXV(西非株)和野生型毒株(5×10^4 PFU)滴鼻感染(德克萨斯州)野外捕捉的黑尾草原犬鼠。该方法的局限性是组织器官的病毒量检测需要离体标本。感染第 6 天,肝的荧光强度最高,个别肠段、下颌淋巴结荧光强度较高,心、肺较低;感染第 9 天病毒载量较低。感染后 6~17 d,皮疹的病毒滴度最高,其次是舌;其他组织如鼻甲和颌下淋巴结也较高^[38]。

免疫组化染色发现,病毒抗原在有皮疹、舌鳞状上皮细胞和细支气管粘膜上皮细胞质中含量很丰富^[39]。局部病毒富集引起了组织病变,如水肿、渗出、坏死,出现了脓疱、溃疡。

十三纹地松鼠(学名多纹黄鼠)在 $10^{5.1}$ PFU (USA-03 毒株)腹腔注射和滴鼻途径后,所有动物都出现暴发性感染,并在感染后 6~9 d 后死亡,腹腔注射比滴鼻感染生存时间更短。死亡前数天的血液和口咽分泌物可通过培养分离到活病毒;尸检发现器官的病毒滴度从高到低依次为肝、脾、肺、肾、心、脑;但两种途径感染后组织器官的病毒载量几乎无差异。肝、脾病毒抗原阳性表达明显,HE 染色可见明显肺间质增宽^[40]。肺间质增宽是病毒性肺炎的病理改变,是呼吸系统应该关注的病变类型。

西非松鼠模型:刚果(金)当地的西非松鼠用荧光素酶标记的 MKXV 刚果株用 10^6 PFU 滴鼻感染后,排毒以口腔拭子滴度最高,鼻拭子样滴度稍低;肛门排毒持续时间最短。皮内感染后,口拭子、肛拭子病毒滴度峰值稍高于眼、鼻拭子;口、鼻、眼的排毒持续时间基本相同。两者比较,滴鼻感染的体外排毒期短,而病毒滴度峰值稍高。从体内病毒复制看,滴鼻途径的荧光强度稍高,而两者病毒增殖的趋势基本相同。总体上,滴鼻组 3/4 的动物死亡,皮内组 2/4 的动物死亡;但取材后仅在唇、舌、皮疹等处检测到高病毒载量^[41]。这对于猴痘感染疑似人群的筛查有指导意义。

冈比亚颊囊鼠模型:美国佛罗里达州野外捕捉的冈比亚颊囊鼠,用带荧光素酶基因的重组病毒(中非株) 10^6 PFU 经皮内注射感染,通过荧光值估计病毒载量,3 只动物病毒载量在第 8~14 天达到峰值,21 d 后恢复到背景水平。病鼠可见角膜炎、牙龈炎;皮肤有突起,但无溃疡^[21]。同样地点捕捉的冈比亚颊囊鼠(或为扎伊尔颊囊鼠)用刚果株和西非株(4×10^4 PFU)皮下接种后,体温显著升高,活动减少,体重下降。西非株感染后病毒载量最高的组织是肠系膜淋巴结,其次是接皮肤接种点;其他组织器官如皮肤、脾、肾、心、肺、肝等病毒载量也较高。皮肤、舌面可见皮疹,但不同毒株组未见差异。总体上,西非株感染组排毒量更高,口腔拭子的病毒载量峰值比鼻拭子高 2 个数量级以上,肛拭子载量最低。刚果株感染后排毒非常早,无死亡。两毒株活病毒排毒持续时间基本相同,但拭子 PCR 检测发现,西非株的阳性持续时间更长^[26]。

非洲睡鼠模型:非洲睡鼠对 MPXV 十分敏感,5 PFU 滴鼻即可导致 20% 的死亡^[35];还有研究显示 2 PFU 滴鼻感染即可引起 >1/3 的睡鼠死亡。 10^4 PFU 滴鼻感染后组织器官的病毒滴度在 2~5 d 内逐渐

升高;滴度最高的是肝,其次是脾和肺,再次为鼻洗液和血液。睡鼠感染后可见消瘦和结膜炎、鼻黏膜坏死性炎,未见皮疹;但内脏病变十分明显。病变包括坏死性改变,如呼吸道黏膜柱状上皮细胞层坏死、肝内点状坏死、淋巴结与脾中淋巴细胞减少,特别是部分淋巴结中淋巴细胞明显减少;还可见出血性改变,如脑出血、胆管的粘膜下出血^[42]。非洲睡鼠在低剂量滴鼻感染带荧光素酶的重组病毒后,活体成像显示睡鼠腹部、口鼻部和胸部荧光强度非常高;组织器官中肝的病毒滴度最高($>10^9$ PFU);其次为脾、肺、鼻甲等,而卵巢载量较低^[43]。自然感染的睡鼠,病毒载量最高的器官也是肝,其次为脾和肺^[20]。总之,非洲睡鼠滴鼻感染 MPXV 后,肝的病毒载量^[20]或滴度最高^[42-43],其滴度甚至明显高于其他器官^[42]。非洲睡鼠自然感染的途径不明,气溶胶吸入、唾液吞食或抓咬伤等都有可能。用该模型检验天花疫苗 Dryvax 或药物 Cidofovir 的有效性,发现 Cidofovir 能明显降低滴鼻感染的死亡率,而 Dryvax 接种对猴痘也有很好的保护效果^[42]。

小鼠模型:小鼠属各品种、品系对 MPXV 敏感性的差异非常大。常见的近交系小鼠 BALB/c 和 C57BL/6 对 MPXV 有很强的抵抗力;而野生近交系小鼠,如 CAST/EiJ、MOLF/EiJ、PERA/EiJ 等在低剂量 MPXV 刚果株感染后会发病并死亡。CAST/EiJ 小鼠的腹腔注射感染比滴鼻感染病变更严重,半数致死量(LD₅₀)更小。腹腔注射(10^4 PFU)感染的小鼠脾、肝、肺病毒滴度都高,而滴鼻感染的肺病毒滴度很高,其他器官较低^[35];另一实验也证实,CAST/EiJ 小鼠滴鼻感染($2\times 10^4\sim 2\times 10^5$ PFU) Z06 毒株后,病毒主要聚集在口鼻部位,内脏中肺的病毒滴度最高,其他组织如肝、脾、脑、卵巢病毒载量比肺低两个数量级以上^[43]。CAST/EiJ 小鼠滴鼻感染($10^2\sim 10^6$ PFU) Z79 毒株后,组织器官的病毒滴度以肺为最高,明显高于肝、脾、脑、肾等,另外肺病毒滴度持续时间也更长^[44]。

CAST/EiJ 小鼠模型也被用于药物的有效性评价,如细胞因子 IL-15 注射被证实对 MPXV 的腹腔感染有明显的保护作用^[45]。也有研究表明,CAST/EiJ 对 MPXV 并不是很敏感, 10^4 PFU 的病毒滴鼻感染后,小鼠无死亡^[36]。病毒在小鼠呼吸道中能有效复制,每日口服 TPOXX 治疗可显著降低感染后 1 周和 2 周组织中的病毒滴度^[36]。另外,干扰素及其受体基因缺陷,如 C57BL/6 小鼠 *IFN γ* 和 *IFN γ R* 基因

缺失在一定程度上影响感染的结局^[44]。干扰素通路相关基因缺失也会影响感染结局,如 C57BL/6 *stat1*^{-/-} 小鼠,相对低剂量的鼻内感染后 10 d 内全部死亡,而 C57BL/6 小鼠用更高剂量感染也不死亡。基因缺陷对病毒感染的影响还与动物背景有关,如刚果株滴鼻感染, C57BL/6 *stat1*^{-/-} 比 129 *stat1*^{-/-} 小鼠病变更严重,甚至出现神经病变。免疫缺陷小鼠 SCID 比 *IFN- α/β R*^{-/-} 和 *IFN- γ R*^{-/-} 小鼠更敏感,低剂量滴鼻也会出现死亡^[46]。总体上,体重变化和死亡率等与毒株、感染剂量和感染途径有关。

BALB/c 小鼠对 MPXV 不敏感,滴鼻感染时病毒复制主要局限于肺部^[44],可以用作轻症模型。

总之,动物种类、感染方式和感染剂量对病毒的组织嗜性有较大影响。滴鼻途径感染时,病毒更倾向于在肺组织中复制。对草原犬鼠、十三纹地松鼠和非洲睡鼠而言,MPXV 有更明显的嗜肝性,这可能是这些动物比其他敏感动物更容易死亡的原因。

5.3 非人灵长类的实验性感染与动物模型

黑猩猩对天花病毒很敏感,是理想的模式动物。后来发现黑猩猩对猴痘病毒也很敏感,黑猩猩也因此一度作为猴痘的模式动物。

美洲的普通狨(*Callithrix jacchus*)对猴痘病毒也十分敏感,病毒血症出现早。狨猴模型与睡鼠模型均有严重的出血症状,与出血型天花类似。极低剂量即可导致动物死亡,因此是非常合适的重症感染模型^[47]。

食蟹猴与恒河猴是抗猴痘病毒药物与疫苗有效性评价最常用的模式动物。与黑猩猩和狨猴相比,这两种旧大陆猴对 MPXV 的相对不敏感性,但中高剂量病毒感染后也会导致动物死亡^[2]。气溶胶雾化吸入感染实验猴是最常用的方法之一,在以前被认为是最接近人类自然感染的攻毒方法,静脉注射病毒也是较常用的方法,但不是自然感染。气管内滴注也是一种模拟自然感染的方法,病毒液会进入某个肺叶,这样可能会出现某个肺叶病变严重而其他肺叶病变轻或无病变的情况。还有一种支气管镜深入支气管分叉处喷雾的方法,有别于普通的气管内滴注^[48]。同样剂量的病毒通过呼吸道途径感染时,感染方式不同(如气溶胶、气管内滴注、支气管内滴注、经支气管喷雾等),实验猴的症状、体征、病毒血症持续时间及生存时间也会有一定差异。这些也因动物种类不同而有所差异,如食蟹猴与恒河猴静脉注射相同剂量刚果株(Z79),恒河猴

血中病毒载量出现更早,而皮疹和死亡出现稍晚^[2]。食蟹猴感染后血液的病毒载量呈一过性升高,然后回落到基线,没有平台期。攻毒剂大时动物容易死亡,而血液病毒载量过高也容易导致动物死亡,但病猴死亡时血液病毒载量不一定很高^[48]。

食蟹猴在气溶胶感染后的大体病变以肺/支气管炎、皮疹及口腔、舌黏膜炎症为主,镜下病变以呼吸系统(包括气管/支气管、肺、咽喉等)和淋巴结炎性改变为主,少见肝受累^[49]。支气管喷雾攻毒(Zr-79)可以导致部分食蟹猴死亡。病肺离体后保持膨胀状态。镜下呈小叶性肺炎改变,细小支气管内有大量炎性坏死性物质,伴肺水肿,管腔周边肺泡中可见大量液体渗出,这可以导致肺泡丧失气体交换功能。此外还可见肺充血和肺间质增宽,偶见肾小球血栓形成^[48]。另一项实验显示不同的感染途径结果差异较大。皮下感染比滴鼻感染病变更重,刚果株(Zr-599)皮下感染后组织器官普遍有病毒增殖,甚至胃粘膜表面也出现密集痘疹,而滴鼻感染后病变以淋巴结、皮疹为主。皮下感染比滴鼻感染的猴进食更少,体重减少更多,体温升高、病毒载量更高、急性期蛋白水平更高,总之,后果更严重^[34]。

气溶胶实验性感染的食蟹猴,免疫组化染色可见病毒抗原集中在鳞状上皮层表达,与周围组织界限分明,或在细支气管上皮细胞,其他管周细胞与渗出的炎性细胞也有表达。食蟹猴呼吸道感染的动物,下呼吸道上皮是原发性感染的主要靶点之一^[48-49]。不同巨噬细胞与单核细胞、DC 细胞有阳性表达。随着病程延长,病毒会随细胞从基底层迁移到更浅的鳞状上皮层,淋巴结皮质也有表达^[49]。

食蟹猴气管内或者静脉途径感染 Z79 后,急性期睾丸组织可见出炎症和坏死,睾丸间质细胞、精管和附睾管腔中检测到 MPXV。在恢复期,病毒已从大多数组织器官中清除,但睾丸中依然可以检测到病毒,病毒滞留时间长达 37 d。这说明 MPXV 通过性途径传播的可能性是很大的^[50]。

5.4 当前动物模型的问题

尽管敏感的动物很多,但理想的模式动物依然很少。现有的模式动物主要是松鼠科,体型偏大,使用很少,也非 SPF 级实验动物。现有的模型中,小鼠模型非常少,这不利于猴痘的动物实验开展。

现在已经有多种感染途径的动物模型,但是缺乏模拟近阶段人类自然途径感染的动物模型,如肛门、直肠途径甚至口咽途径(口交)感染的动物模

型。由于部分感染者是双性恋,女性可能通过性途径感染,包括生殖道黏膜的局部感染与上行感染,如阴道、宫颈、子宫甚至卵巢的急性炎症,因此需要建立经生殖道感染的动物模型。现有病人中,HIV 感染者占很大比例,因此需要利用免疫缺陷小鼠建立猴痘动物模型,如 SCID 小鼠、裸鼠、NSG 小鼠。

现有的动物模型以重症模型为主,发病动物的体征与症状非常明显,但是现阶段的猴痘病例中,严重病例非常少。因此,有必要建立轻症的动物模型或者隐性感染的动物模型。现有的动物模型一般使用成年动物,缺少婴幼儿个体等未成年动物模型,同时也缺少母婴传播的动物模型。

6 结语

猴痘疫情的暴发的原因是复杂的。除了常见的当地的丛林捕猎、丛林动物肉类交易和林地垦殖;也有我们忽略的原因,如丛林生态游、高端狩猎等;还有不为人知原因,如野生动物活体的非法贸易、饲养与肉类走私^[14]。

构建动物模型是非常必要的,如气溶胶/飞沫等呼吸道途径感染的模拟;孕妇感染后垂直传播模型的验证;抗猴痘疫苗与药物的有效性和安全性的评价;猴痘包括相关合并症、并发症等治疗方案的优化。构建不同病变程度的动物模型,如轻症模型、重症模型,不同组织器官的损伤模型,如呼吸道病变模型、肛肠粘膜病变模型和神经病变模型也是非常必要的。

构建动物模型也是非常紧迫的。MPXV 的暴发呈现新的特点,可能再次暴发并广泛传播,可能会发生重组与变异,出现高致病性毒株的流行。虽然猴痘病毒感的体征不严重,但患者主观上感受到剧烈持久的疼痛。这严重影响了患者的生活质量,也违背了生命伦理。因此我们应该及时构建动物模型控制这种疾病。

建议与措施:应尽快构建适合当前疫情的动物模型,特别是肛肠途径感染的动物模型和免疫功能缺陷的动物模型;应尽快构建适合抗猴痘疫苗与药物评价的动物模型,特别是杀精剂、抗病毒凝胶等外用药物;应尽快构建简便实用的小动物模型,特别是小鼠模型。2022 年 6 月,中国实验动物学会的第一届猴痘病毒在线学术沙龙呼吁从 5 个方面应对猴痘病毒的流行,包括加强基础研究、研发疫苗、加强生物安全管理、对公众普及猴痘的科学知识、加

强国际合作等^[51]。生物安全专家魏强教授也对此给出了类似的更详细的建议^[52]。

人类、动物与自然环境是一个利害关联的整体,并拥有一个共同的命运。MPXV 的传播不是一个孤立的事件,而是一个危害这一整体健康(One Health)的人兽共患病,因此我们应加强合作与联系,共同应对这种流行^[53]。截至 2023 年 6 月,中国内地新增猴痘确诊病例达 106 例。这存在大流行的可能性,已经构成了严重的公共卫生问题^[54]。用不同种类的动物,建立感染与疾病模型,或者建立不同感染途径的动物模型、不同病变类型的动物模型或者不同毒株感染的动物模型是非常必要的,这可以更深入的研究猴痘的致病特点,更有利于预防与治疗猴痘病毒的感染,更有利于人类卫生健康共同体的构建。

参考文献:

- [1] Alakunle E, Moens U, Nchinda G, et al. Monkeypox virus in Nigeria; infection biology, epidemiology, and evolution [J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1257.
- [2] Parker S, Buller RM. A review of experimental and natural infections of animals with monkeypox virus between 1958 and 2012 [J]. *Future Virol*, 2013, 8(2): 129–157.
- [3] Berthet N, Descorps-Declère S, Besombes C, et al. Genomic history of human monkey pox infections in the Central African Republic between 2001 and 2018 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13085.
- [4] Arita I, Henderson DA. Smallpox and monkeypox in non-human Primates [J]. *Bull World Health Organ*, 1968, 39(2): 277–283.
- [5] Khodakevich L, Jezek Z, Kinzanzka K. Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature [J]. *Lancet*, 1986, 1(8472): 98–99.
- [6] Noble J Jr. A study of New and Old World monkeys to determine the likelihood of a Simian Reservoir of smallpox [J]. *Bull World Health Organ*, 1970, 42(4): 509–514.
- [7] Breman JG, Bernadou J, Nakano JH. Poxvirus in West African nonhuman Primates; serological survey results [J]. *Bull World Health Organ*, 1977, 55(5): 605–612.
- [8] Gispén R, Brand-Saathof BB, Hekker AC. Monkeypox-specific antibodies in human and simian sera from the Ivory Coast and Nigeria [J]. *Bull World Health Organ*, 1976, 53(4): 355–360.
- [9] Khodakevich L, Szczeniowski M, Manbu-ma-Disu, et al. The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission [J]. *Trop Geogr Med*, 1987, 39(2): 115–122.
- [10] Khodakevich L, Jezek Z, Messinger D. Monkeypox virus; ecology and public health significance [J]. *Bull World Health Organ*, 1988, 66(6): 747–752.
- [11] Radonić A, Metzger S, Dabrowski PW, et al. Fatal monkeypox in wild-living sooty mangabey, Côte d'Ivoire, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(6): 1009–1011.
- [12] Patrono LV, Pléh K, Samuni L, et al. Monkeypox virus emergence in wild chimpanzees reveals distinct clinical outcomes and viral diversity [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(7): 955–965.
- [13] Guagliardo SAJ, Monroe B, Moundjao C, et al. Asymptomatic orthopoxvirus circulation in humans in the wake of a monkeypox outbreak among chimpanzees in Cameroon [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2020, 102(1): 206–212.
- [14] Devaux CA, Mediannikov O, Medkour H, et al. Infectious disease risk across the growing human-non human primate interface: a review of the evidence [J]. *Front Public Health*, 2019, 7: 305.
- [15] Reynolds MG, Doty JB, McCollum AM, et al. Monkeypox re-emergence in Africa; a call to expand the concept and practice of One Health [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2019, 17(2): 129–139.
- [16] Hutin YJ, Williams RJ, Malfait P, et al. Outbreak of human monkeypox, democratic republic of Congo, 1996 to 1997 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3): 434–438.
- [17] Doty JB, Malekani JM, Kalembo LN, et al. Assessing monkeypox virus prevalence in small mammals at the human-animal interface in the democratic republic of the Congo [J]. *Viruses*, 2017, 9(10): 283.
- [18] Doshi RH, Guagliardo SAJ, Doty JB, et al. Epidemiologic and ecologic investigations of monkeypox, likouala department, republic of the Congo, 2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(2): 281–289.
- [19] Tiee MS, Harrigan RJ, Thomassen HA, et al. Ghosts of infections past; using archival samples to understand a century of monkeypox virus prevalence among host communities across space and time [J]. *R Soc Open Sci*, 2018, 5(1): 171089.
- [20] Hutson CL, Lee KN, Abel J, et al. Monkeypox zoonotic associations: insights from laboratory evaluation of animals associated with the multi-state US outbreak [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76(4): 757–768.
- [21] Falendysz EA, Lopera JG, Lorenzsonn F, et al. Further assessment of monkeypox virus infection in Gambian pouched rats (*Cricetomys gambianus*) using *in vivo* bioluminescent imaging [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(10): e0004130.
- [22] De Baetselier I, Van Dijk C, Kenyon C, et al. Retrospective detection of a symptomatic monkeypox virus infections among male sexual health clinic attendees in Belgium [J]. *Nat Med*, 2022, 28(11): 2288–2292.
- [23] Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, et al. Monkeypox virus infection in humans across 16 countries-April-June 2022 [J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(8): 679–691.
- [24] Hutson CL, Damon IK. Monkeypox virus infections in small animal models for evaluation of anti-poxvirus agents [J]. *Viruses*, 2010, 2(12): 2763–2776.
- [25] Sergeev AA, Kabanov AS, Bulychev LE, et al. Using the ground squirrel (*Marmota bobak*) as an animal model to assess monkeypox drug efficacy [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2017, 64

- (1): 226–236.
- [26] Hutson CL, Nakazawa YJ, Self J, et al. Laboratory investigations of African pouched rats (*Cricetomys gambianus*) as a potential reservoir host species for monkeypox virus [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(10): e0004013.
 - [27] Reynolds MG, Yorita KL, Kuehnert MJ, et al. Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection [J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(6): 773–780.
 - [28] Ogoina D, Iroezindu M, James HI, et al. Clinical course and outcome of human monkeypox in Nigeria [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(8): e210–e214.
 - [29] Berg MG, Olivo A, Harris BJ, et al. A high prevalence of potential HIV elite controllers identified over 30 years in Democratic Republic of Congo [J]. *EBioMedicine*, 2021, 65: 103258.
 - [30] Edghill-Smith Y, Bray M, Whitehouse CA, et al. Smallpox vaccine does not protect macaques with AIDS from a lethal monkeypox virus challenge [J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(3): 372–381.
 - [31] Kalish ML, Wolfe ND, Ndongmo CB, et al. Central African hunters exposed to simian immunodeficiency virus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(12): 1928–1930.
 - [32] Focosi D, Novazzi F, Baj A, et al. Monkeypox: an international epidemic [J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(6): e2392.
 - [33] Harapan H, Ophinni Y, Megawati D, et al. Monkeypox: a comprehensive review [J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2155.
 - [34] Saijo M, Ami Y, Suzuki Y, et al. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates [J]. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 9): 2266–2271.
 - [35] Americo JL, Moss B, Earl PL. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models [J]. *J Virol*, 2010, 84(16): 8172–8180.
 - [36] Warner BM, Klassen L, Sloan A, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of tecovirimat against a recently emerged 2022 monkeypox virus isolate [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(673): eade7646.
 - [37] Xiao SY, Sbrana E, Watts DM, et al. Experimental infection of prairie dogs with monkeypox virus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(4): 539–545.
 - [38] Weiner ZP, Salzer JS, LeMasters E, et al. Characterization of Monkeypox virus dissemination in the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) through *in vivo* bioluminescent imaging [J]. *PLoS One*, 2019, 14(9): e0222612.
 - [39] Guarner J, Johnson BJ, Paddock CD, et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(3): 426–431.
 - [40] Tesh RB, Watts DM, Sbrana E, et al. Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus [J]. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(9): 1563–1567.
 - [41] Falendysz EA, Lopera JG, Doty JB, et al. Characterization of Monkeypox virus infection in African rope squirrels (*Funisciurus* sp.) [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(8): e0005809.
 - [42] Schultz DA, Sagartz JE, Huso DL, et al. Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus [J]. *Virology*, 2009, 383(1): 86–92.
 - [43] Earl PL, Americo JL, Cotter CA, et al. Comparative live bioluminescence imaging of monkeypox virus dissemination in a wild-derived inbred mouse (*Mus musculus castaneus*) and outbred African dormouse (*Graphiurus kelleni*) [J]. *Virology*, 2015, 475: 150–158.
 - [44] Earl PL, Americo JL, Moss B. Natural killer cells expanded *in vivo* or *ex vivo* with IL-15 overcomes the inherent susceptibility of CAST mice to lethal infection with orthopoxviruses [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(4): e1008505.
 - [45] Earl PL, Americo JL, Moss B. Lethal monkeypox virus infection of CAST/EiJ mice is associated with a deficient gamma interferon response [J]. *J Virol*, 2012, 86(17): 9105–9112.
 - [46] Stabenow J, Buller RM, Schriewer J, et al. A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against Monkeypox virus [J]. *J Virol*, 2010, 84(8): 3909–3920.
 - [47] Mucker EM, Chapman J, Huzella LM, et al. Susceptibility of marmosets (*Callithrix jacchus*) to monkeypox virus; a low dose prospective model for monkeypox and smallpox disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131742.
 - [48] Goff AJ, Chapman J, Foster C, et al. A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques [J]. *J Virol*, 2011, 85(10): 4898–4909.
 - [49] Zaucha GM, Jahrling PB, Geisbert TW, et al. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. *Lab Invest*, 2001, 81(12): 1581–1600.
 - [50] Liu J, Mucker EM, Chapman JL, et al. Retrospective detection of monkeypox virus in the testes of nonhuman primate survivors [J]. *Nat Microbiol*, 2022, 7(12): 1980–1986.
 - [51] AMEM Editorial Office. The 1st online academic salon on monkeypox virus by Chinese Association for Laboratory Animal Sciences (2022, June 10th, Beijing, China) [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 399–400.
 - [52] Wei Q. Is China ready for monkeypox? [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(4): 397–398.
 - [53] AMEM Editorial Office. One health, monkeypox prevention, and treatment: the second online academic salon on monkeypox virus by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences (August 26, 2022, Beijing, China) [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(5): 487–488.
 - [54] Keabayoon A, Mungmunpuntipantip R, Wiwanitkit V. China and monkeypox: correspondence [J]. *Animal Model Exp Med*, 2022, 5(5): 485–486.

胡鑫,汪蓓,张晨曦,等. 小胶质细胞-星形胶质细胞的交互作用及其介导的神经炎症在阿尔茨海默病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 142-149.

Hu X, Wang Q, Zhang CX, et al. Progress in microglia-astrocyte interactions and their mediation of neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 142-149.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.019

小胶质细胞-星形胶质细胞的交互作用及其介导的神经炎症在阿尔茨海默病中的研究进展

胡鑫,汪蓓,张晨曦,郑慧慧,李鹏洋,赵红晔*,邓凤春*

(齐齐哈尔医学院基础医学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种侵袭性神经退行性疾病,其发病原因迄今未清。神经炎症是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中由小胶质细胞和星形胶质细胞激活的一种慢性炎症反应,与多种炎症因子的释放和血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的破坏密切相关。研究表明,神经炎症是继 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β protein, A β) 沉积和神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs) 后 AD 的第三大病理改变。本文总结了小胶质细胞-星形胶质细胞的交互作用,并对其在神经炎症和 AD 中的作用进行整理和讨论,以期 AD 的发病机制及防治研究提供理论支持和实验参考。

【关键词】 神经炎症;小胶质细胞;星形胶质细胞;阿尔茨海默病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0142-08

Progress in microglia-astrocyte interactions and their mediation of neuroinflammation in Alzheimer's disease

HU Xin, WANG Qian, ZHANG Chenxi, ZHENG Huihui, LI Pengyang, ZHAO Hongye*, DENG Fengchun*

(School of Basic Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is an invasive neurodegenerative disease, the cause of which is still unknown. Neuroinflammation is a chronic inflammatory response activated by microglia and astrocytes in the central nervous system that is closely related to the release of many inflammatory factors and the destruction of the blood-brain barrier. Studies have shown that neuroinflammation is the third largest pathological change in AD after β -amyloid deposition and neurofibrillary tangles. In this paper, the information available on microglia, astrocytes and their interactions is summarized. The roles of these cells in neuroinflammation and AD are presented and discussed to provide a theoretical and experimental reference for the pathogenesis, prevention, and treatment of AD.

【Keywords】 neuroinflammation; microglia; astrocytes; Alzheimer's disease

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

[基金项目] 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202211230063)。

[作者简介] 胡鑫 (2001—), 男, 学士, 研究方向: 阿尔茨海默病机制。E-mail: 2322284711@qq.com

[通信作者] 赵红晔 (1977—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 心脑血管疾病发病机制与防治。E-mail: 784911653@qq.com

邓凤春 (1975—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 心脑血管疾病发病机制与防治。E-mail: 16964089@qq.com

* 共同通信作者

神经胶质细胞,尤其是相互独立而又紧密联系的小胶质细胞和星形胶质细胞维护着大脑的先天免疫系统和微环境的稳态。研究表明,活化的小胶质细胞和星形胶质细胞在诱导神经炎症反应通路中扮演着重要角色^[1-3]。不仅如此,小胶质细胞和星形胶质细胞还可通过细胞因子、趋化因子、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、补体蛋白和生长因子等可溶性因子来调控彼此的功能^[4],而失衡的交互作用是神经退行性疾病发生的基础^[4]。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性认知功能障碍和记忆障碍的神经退行性疾病,常伴有情绪冷漠、焦虑和抑郁^[5]。研究证明,神经炎症在推动 AD 进展的 β -淀粉样蛋白(amyloid- β protein, A β)积累、神经元损伤和认知缺陷等致病事件中起内在作用^[6-7]。

在 AD 早期,小胶质细胞和星形胶质细胞发挥神经保护作用,但小胶质细胞和星形胶质细胞的过度激活产生的大量促炎因子则会导致神经炎症和神经毒性反应。值得注意的是,在 AD 患者的老年斑附近发现了大量活化的小胶质细胞和星形胶质细胞,进一步证实它们在 AD 发病机制中起着至关重要的作用^[8]。

1 小胶质细胞-星形胶质细胞的生理功能及其交互作用

1.1 小胶质细胞

小胶质细胞不仅是大脑主要的先天免疫细胞,也是大脑病理损伤的第一反应者。在正常条件下,小胶质细胞以静止状态存在,在中枢神经系统损伤和病原体防御等反应中发挥着“免疫监视”功能^[9-10]。在病理状态下,脑内微环境受到不同干扰时,小胶质细胞被迅速激活为 M1 促炎表型或 M2 抗炎表型。M1 表型小胶质细胞通过释放促炎因子和毒性物质来杀灭病原体,而 M2 表型小胶质细胞则可以促进神经元的存活和神经系统的发育来实现对中枢神经系统的保护作用^[11]。此外,小胶质细胞还通过吞噬和清除细胞碎片参与突触修剪和神经回路的发育^[12]。在 AD 早期,活化的小胶质细胞能够通过增强其自身吞噬作用来清除和降解 A β 的聚集。而过度活化的小胶质细胞则能够释放肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和一氧化氮(nitric oxide, NO)等促炎因子激活核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B),NF- κ B 又是活化 M1 表型小胶质

细胞相关的关键转录因子,该途径的启动会促进一系列毒性细胞因子的释放,并最终导致 AD 的持久慢性神经炎症环境^[13-14]。

1.2 星形胶质细胞

星形胶质细胞是大脑中最常见的神经胶质细胞,最初被认作是支持细胞。研究表明,星形胶质细胞在维持神经元代谢、特定转运蛋白对谷氨酸和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的摄取以及脑稳态中发挥重要作用^[15-18]。星形胶质细胞还可通过促进胶质递质的释放来参与突触发生和神经元回路的发育,这表明星形胶质细胞与神经元的相互作用在突触形成和生长过程中起首要作用^[19]。在 APP/PS1 AD 小鼠模型中,胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的消耗减弱了星形胶质细胞对 A β 的吞噬作用,从而加重 A β 负荷^[20];而星形胶质细胞吞噬作用的提高则可改善神经损伤、炎症反应和 A β 介导的病理反应^[21]。此外,星形胶质细胞的损伤会影响其对谷氨酸水平升高的感知能力,破坏神经元周围的微环境,导致 N-甲基 D-天冬氨酸(N-Methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体被过度刺激,继而引发谷氨酸的过度激活,最终导致神经元受到兴奋性毒性损伤^[22]。现已证明,星形胶质细胞可由 Janus 激酶(Janus kinases, JAK)/转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)、钙调神经磷酸酶(calcineurin, CN)/活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)、NF- κ B 和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)四种信号通路激活^[23]。与被激活的小胶质细胞相似,星形胶质细胞的激活会促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子的产生,从而引发有害的级联反应,最终导致神经元功能受损^[24]。

1.3 小胶质细胞-星形胶质细胞的交互作用

小胶质细胞和星形胶质细胞是 CNS 的关键细胞,两者之间的交互作用不仅共同完成中枢神经系统的调节功能,而且对于脑稳态的维持和神经元的生存也是必要的。在脑内微环境遭受干扰时,两者独立而又协同的作用也是保障中枢神经系统健康的重要特征。研究表明,在大脑发育过程中星形胶质细胞产生的 IL-33 可增强小胶质细胞的吞噬能力、促进神经回路的发育和突触重塑^[25]。小胶质细胞还可通过释放 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等细胞因子来促进星形胶质细胞的神经保护反应^[26]。小胶质

细胞可决定星形胶质细胞的神经保护或神经毒性功能,而星形胶质细胞则可通过其分泌的各种分子调节小胶质细胞的表型和功能。因此,小胶质细胞与星形胶质细胞的交互作用对于维持脑内微环境的稳态是至关重要的。

2 神经炎症中小胶质细胞与星形胶质细胞的交互作用

2.1 小胶质细胞对星形胶质细胞的调节作用

在神经炎症前期,小胶质细胞分泌的 IL-10 驱动星形胶质细胞产生转化生长因子 (transforming growth factor beta, TGF- β), 以此对抗神经炎症的继续发展。然而,当炎症持续存在,则会刺激小胶质细胞过度激活,进而释放 C1q、TNF- α 和 IL-1 β 诱导星形胶质细胞产生更多的促炎因子,进一步加重神经炎症的发展^[27-28]。研究表明,由肠道菌群产生的色氨酸代谢物作用于小胶质细胞产生的血管内皮生长因子- β (vascular endothelial growth factor- β , VEGF- β) 和 TGF- α , 在神经退行性疾病和神经炎症过程中影响星形胶质细胞促炎因子的表达^[29]。此外,在 ATP 刺激下,小胶质细胞释放的细胞外囊泡可以上调星形胶质细胞中 IL-6 与 IL-10 的表达水平,以减少促炎因子的释放,进而改善神经炎症的发展^[30]。星形胶质细胞还通过小胶质细胞依赖的 toll 样受体参与 CNS 中免疫反应的调节,表明小胶质细胞在星形胶质细胞的激活中起着重要作用。

2.2 星形胶质细胞对小胶质细胞的调节作用

CN/NFAT 不仅是 M1 表型小胶质细胞的主要调节因子,而且可以激活星形胶质细胞^[31]。在 APP/PS1 AD 小鼠模型中,抑制星形胶质细胞中的 CN/NFAT 信号通路可以调节小胶质细胞的激活。炎症条件下,星形胶质细胞释放的纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 可以通过低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)-1/JAK/STAT1 轴调节小胶质细胞迁移和吞噬作用^[32]。同样,PAI-1 也依赖于玻连蛋白 (vitronectin) 和 toll 样受体的方式调节小胶质细胞的吞噬活性^[33]。钙稳定调节蛋白 Calhm2 在 $[Ca^{2+}]_o$ (细胞外钙离子浓度) 升高时被激活,调节星形胶质细胞中 ATP 的释放,进而与小胶质细胞表面的 P2Y12 和 P2Y6 相结合,促进小胶质细胞的吞噬作用和促炎因子的产生,从而进一步加重神经炎症的发展^[34-36]。研究证明,在星形胶质细胞中,诱导型一氧化氮合酶 (inducible

nitric oxide synthase, iNOS)、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 诱导 NO 的产生,从而使兰尼碱受体 (ryanodine receptor, RyR) 介导的 Ca^{2+} 进一步在细胞/亚细胞区室中释放^[37-40]。 $[Ca^{2+}]_i$ (细胞内钙离子浓度) 升高可促进星形胶质细胞释放心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP), ANP 又可促进小胶质细胞产生环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP), 使小胶质细胞产生抗炎或促炎的作用^[37-40]。

3 不同途径调控小胶质细胞-星形胶质细胞失衡的交互作用与 AD

作为大脑中最主要的神经胶质细胞,小胶质细胞和星形胶质细胞在调节大脑神经炎症方面发挥着重要作用。两者之间失调的交互作用在 AD 和帕金森等神经退行性疾病的发生发展中表现出密切的关系 (图 1)。

3.1 铁离子调控小胶质细胞-星形胶质细胞异常的交互作用与 AD

铁调节蛋白 (iron regulatory protein, IRP)/铁反应元件 (iron responsive element, IRE) 是机体铁稳态的重要调控系统,IRP 与 IRE 的结合可以调节淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的加工。体外研究表明,APP 的消减会明显诱导细胞中的铁滞留,而 APP 过表达则会促进铁的清除^[41]。在 APP mRNA 的 5'-UTR 拥有一个功能性的 IRE 干环,位于 IL-1 β 反应盒域的上游^[42]。当铁水平降低时,游离铁与 IRP1 解离,允许 IRP1 与 APP 5'-UTR IRE 结合并抑制 APP 的翻译。IL-1 可通过炎症级联间接参与铁稳态。IL-1 可通过增加 IRP 的募集,从而增加与 APP 5'-UTR IRE 的结合,进而减少 APP 的表达^[43]。如前所述,神经炎症中 IL-1 的过度释放可能会使铁发生积蓄,从而导致铁负荷。处于铁负荷时,铁可能通过 NF- κ B 介导促炎因子的释放而激活小胶质细胞,使其表达更多的铁蛋白以清除细胞外的铁,导致细胞内铁滞留和 TNF- α 表达增加,并最终被 A β 斑块浸润。A β 的形成可诱导小胶质细胞和星形胶质细胞在高铁环境中表达更多的促炎因子,正反馈加剧脑部铁积累和神经炎症作用。此外,星形胶质细胞分泌的铁调素可以调节脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMVECs) 上的膜铁转运蛋白 (ferroportin 1,

FPN1), 诱导 FPN1 的内化和降解, 从而调控铁的转运^[44]。IL-6 是激活 JAK/STAT3 途径表达铁调素 mRNA 的最强正向调节因子之一。活化的小胶质细胞释放的 IL-6 通过启动细胞间级联反应, 刺激星形胶质细胞释放铁调素, 再经过铁调素-FPN1 轴向神经元发出信号, 以防止铁的释放。因此, 脑内铁负荷将通过铁转运蛋白-铁调素复合物的内化而增强^[45]。另外, 用携带铁调素基因的重组腺病毒治疗可减少大脑中的铁滞留和氧化应激^[46]。这些研究证明了铁调素在治疗 AD 中的出色作用, 但铁调素是否可以作为治疗 AD 的潜在靶点需要更深入的研究。而运用铁螯合则是减少大脑对铁吸收的最直接方法, 这在一定程度上可以改善因铁积蓄而引起的 AD 症状, 但也会对人体产生过敏反应、肝肾衰竭等毒性作用^[47-48]。如何联合其他方法以降低铁螯合的毒性作用来治疗 AD 是一个值得研究的方向。

3.2 外周免疫细胞调控小胶质细胞-星形胶质细胞异常的交互作用

在神经炎症的背景下, 星形胶质细胞衍生的 VEGF-A 与内皮细胞的相互作用增加了血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 的通透性, 并允许外周免疫细胞浸润^[49]; 而 VEGF-A 的产生会随着被激活的小胶质细胞分泌的 IL-1 β 而表达上调^[50]。迁移到 AD 大脑的 T 细胞所产生 IL-17 和 IFN- γ , 可加剧中枢神经系统的炎症反应^[51-52]。一方面, IL-17 可与星形胶质细胞表达的 IL-17 受体相结合, 从而激活 JAK2-STAT1/3 信号传导, 进而诱导星形胶质细胞的增殖、VEGF 表达上调和促炎转录程序的激活^[53]。另一方面, IFN- γ 可以刺激小胶质细胞中主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex type 2, MHC II) 类分子、CD40、CD86 的表达和诱导趋化因子 CXCL10、CCL2 和 CCL5 的分泌, 进而增强 T 细胞的活化和募集^[54-55]。而 CCL2 的水平升高可加速 AD 的临床恶化, 特别是在痴呆前阶段^[56]。此外, IFN- γ 可增强小胶质细胞的运动性和吞噬活性, 以此对抗神经炎症的发展^[57]。研究表明, 星形胶质细胞在受到 IFN- γ 刺激后, 可以上调 MHC II 类分子的表达, 使其成为非特异性抗原提呈细胞, 进而刺激 T 细胞的活化^[58]。因此, T 细胞可通过与小胶质细胞和星形胶质细胞的交互作用而驱动 AD 的发展, 从而使慢性炎症持续存在。在 AD 动物模型中, IL-17 的消耗被证明可以预防认知障碍、突触功能障碍和挽救神经炎症^[59-60]。不仅如此, 在 AD 早期, B 细胞

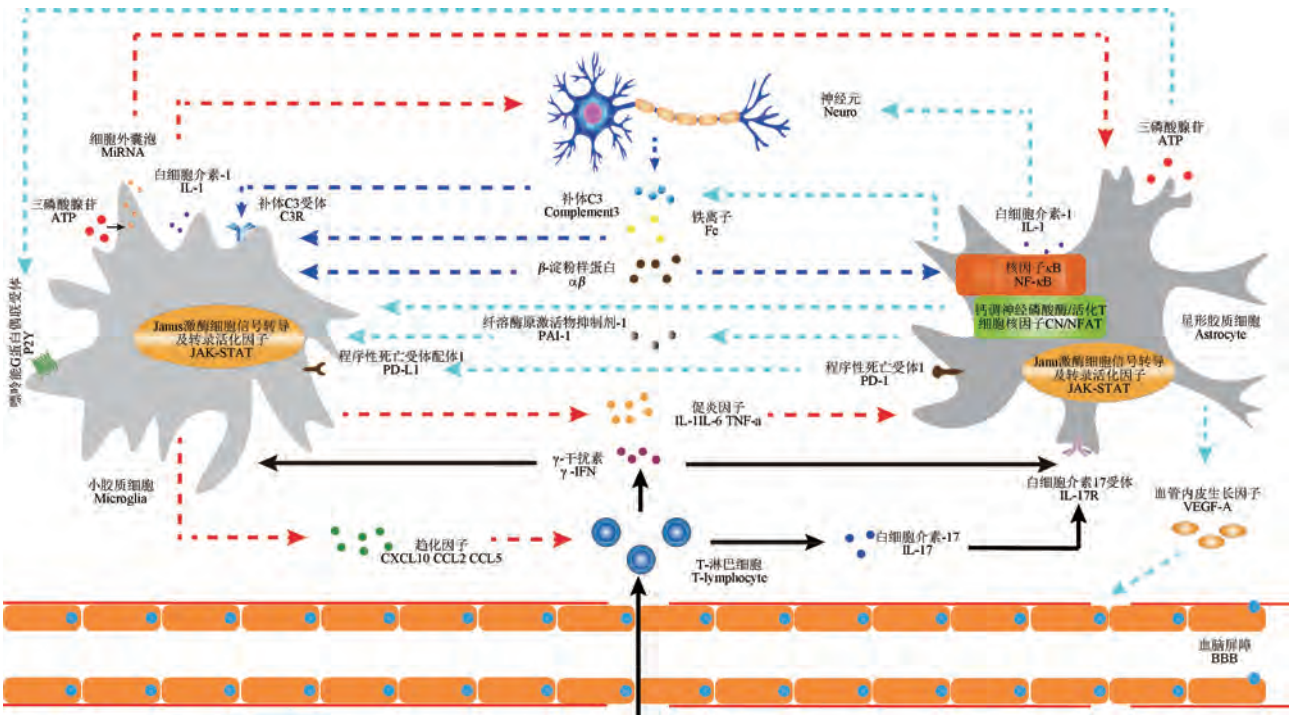
的减少也会改善记忆缺失, 减轻 A β 负荷以延缓 AD 的发展^[61]。因此, 有必要对外周免疫细胞进行靶向治疗, 通过免疫疗法或联合其他策略来治疗和防治 AD。同时, 维持 BBB 的完整性以防止 T 细胞迁移或阻断 IL-17 的释放可能是治疗 AD 的重要途径。

3.3 miRNA 调控小胶质细胞-星形胶质细胞失调的交互作用与 AD

值得注意的是, miRNA 参与多种神经退行性疾病的发生。在 AD 中, miRNA 通过调节各类途径的表达, 特别是神经炎症机制, 在 AD 的发病机制中起关键作用。研究表明, A β 会降低雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 活性以此抑制 Argonaute (Ago2) 蛋白磷酸化从而降低 miRNA 活性, 而 Ago2 磷酸化的抑制会使星形胶质细胞中积聚无活性的微核糖核蛋白 (miRNA-containing ribonucleic protein, miRNP), 进而限制与靶 mRNA 的结合, 增加促炎因子的产生, 最终加重神经炎症的发展。而 mTORC1 的重新表达会激活 miR-146 以此减少炎症因子的产生, 但 miR-146a 表达升高会增加小胶质细胞对 A β 耐受性, 导致 A β 清除降低^[62-63]。因此, 如何平衡两者之间关系, 以达到最大化的治疗效果是值得深思的问题。此外, 星形胶质细胞分泌的 miR-873a-5p 通过抑制细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 和 NF- κ B 信号通路的磷酸化来调控 M2 表型小胶质细胞的转化以及减少促炎因子的产生^[64]。随着纳米技术的快速发展, 我们是否可以以纳米材料为载体靶向运输 miRNA 来改善疾病进展是未来开发新靶向药物治疗 AD 的研究方向之一。

3.4 其他途径调控小胶质细胞-星形胶质细胞失调的交互作用与 AD

作为小胶质细胞和星形胶质细胞交互作用的关键介质, IL-3 是 AD 治疗干预的一个关键节点。A β 刺激星形胶质细胞释放的 IL-3 与小胶质细胞上的 IL-3 受体结合, 可增强小胶质细胞吞噬 A β 的能力^[65]。从而降低 A β 对小胶质细胞和星形胶质细胞中 NF- κ B 的激活, 减少促炎因子的释放, 进而改善 AD 的病理学特征^[65]。病理状态下, 神经元过度产生的 A β 会刺激星形胶质细胞中 NF- κ B 的激活与补体 C3 的释放, 从而与小胶质细胞和神经元上的 C3a 受体相结合, 以此诱导小胶质细胞中 IL-1 α 的分泌, 进而正反馈活化星形胶质细胞, 并加重 A β 的沉积^[66]。在 AD 的炎症环境中, 小胶质细胞、星形



注:ATP:三磷酸腺苷;C3R:补体 C3 受体;C3:补体 C3;PD-L1:抑制程序性死亡受体-配体 1;PD-1:程序性死亡受体 1;IFN- γ : γ 干扰素;VEGF-A:血管内皮生长因子;IL-1:白细胞介素-1;IL-6:白细胞介素-6;TNF- α :肿瘤坏死因子 α ;CXCL10:C-X-C 基序 趋化因子 10;CCL2:趋化因子配体 2;CCL5:趋化因子配体 5;IL-17:白细胞介素-17;IL-17R:白细胞介素-17 受体;PAI-1:纤溶酶原激活物抑制剂-1;NF- κ B:核因子 κ B;JAK-STAT:Janus 激酶细胞信号转导及转录活化因子;CN/NFAT:钙调神经磷酸酶/活化 T 细胞核因子; $\text{A}\beta$: β -淀粉样蛋白。

图 1 小胶质细胞与星形胶质细胞异常的交互作用

Note. ATP, Adenosine triphosphate. C3R, Complement C3 receptor. C3, Complement C3. PD-L1, Inhibition of programmed death receptor-ligand 1. PD-1, Programmed death receptor 1. IFN- γ , Interferon- γ . VEGF-A, Vascular endothelial growth factor. IL-1, Interleukin-1. IL-6, Interleukin-6. TNF- α , Tumor necrosis factor α . CXCL10, C-X-C motif chemokine 10. CCL2, Chemokine ligand 2. CCL5, Chemokine ligand 5. IL-17, Interleukin-17. IL-17R, Interleukin-17 receptor. PAI-1, Plasminogen activator inhibitor-1. NF- κ B, Nuclear factor- κ B. JAK-STAT, Janus cell signal transduction and transcriptional activation factor. CN/NFAT, Calcineurin/activated T cell factor. $\text{A}\beta$, amyloid- β protein.

Figure 1 Abnormal interaction of microglia with astrocyte

胶质细胞与神经元之间的交互作用形成正反馈作用,最终导致神经系统紊乱和自我放大的炎症反应。研究表明,抑制程序性死亡受体-配体 1 (programmed death ligand 1,PD-L1)/程序性死亡受体 1(programmed cell death 1,PD-1)也可以改善小胶质细胞的炎症反应^[67]。在 APP/PS1 AD 小鼠中,星形胶质细胞表达 PD-L1 而小胶质细胞表达 PD-1,星形胶质细胞 PD-L1 和小胶质细胞 PD-1 的协同作用对于去除 APP/PS1 AD 小鼠中 $\text{A}\beta$ 负荷至关重要,其中 PD-1 调节 AD 中由 IL-1 β 介导的炎症反应以及补体的释放。因此,预防 PD-L1 的分泌以及应用 PD-1 阻断抗体可以作为一种有效的治疗策略^[68]。炎症条件下,星形胶质细胞分泌的氨基肽酶 N (aminopeptidases, ANPEP) 诱导血管紧张素 IV (angiotensin type 4,Ang IV) 生成增加,从而与小胶质细胞上的血管紧张素 I 型受体 (angiotensin type 1

receptor,AT1R) 相互作用而加剧神经炎症^[69]。而目前针对 ANPEP 改善 AD 的研究在国内外鲜见,因此,ANPEP 有着可作为治疗 AD 神经炎症靶点的潜力。

4 展望

神经炎症在 AD 的发生发展中发挥着重要作用,目前已有证据表明小胶质细胞和星形胶质细胞的交互作用是相互依存的,但小胶质细胞与星形胶质细胞过度活化所表现的交互作用可能会导致神经炎症。因此,解析小胶质细胞与星形胶质细胞的交互作用对于理解 AD 发生发展至关重要。目前国内对于小胶质细胞与星形胶质细胞交互作用的研究鲜见,是一个值得深入探讨治疗神经退行性疾病的潜在方向。针对 AD 的神经病理学特征和调节神经炎症的联合治疗策略可能是显著改善 AD 进展的

一种方法。因此,需要更多的研究来证实 AD 中神经炎症信号及其分子基础。同时,中药药理作用广泛、资源丰富,在治疗和改善 AD 的研究中也发挥着重要的作用^[70-72]。目前,神经炎症的改善大多通过小胶质细胞表型的转换而实现,但靶向小胶质细胞的治疗方法是否能够以有益的方式改变星形胶质细胞表型是值得深思的问题。

参考文献:

- [1] Wang WY, Tan MS, Yu JT, et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease [J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(10): 136.
- [2] Singh D. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 206.
- [3] Gotoh M, Miyamoto Y, Ikeshima-Kataoka H. Astrocytic neuroimmunological roles interacting with microglial cells in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1599.
- [4] Matejuk A, Ransohoff RM. Crosstalk between astrocytes and microglia; an overview [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1416.
- [5] Wang M, Feng LR, Li ZL, et al. Thymosin β 4 reverses phenotypic polarization of glial cells and cognitive impairment via negative regulation of NF- κ B signaling axis in APP/PS1 mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 146.
- [6] Cai M, Lee JH, Yang EJ. Electroacupuncture attenuates cognition impairment via anti-neuroinflammation in an Alzheimer's disease animal model [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 264.
- [7] Tejera D, Mercan D, Sanchez-Caro JM, et al. Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome [J]. *EMBO J*, 2019, 38(17): e101064.
- [8] Jung S, Schwartz M. Non-identical twins-microglia and monocyte-derived macrophages in acute injury and autoimmune inflammation [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 89.
- [9] Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration [J]. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35: 441-468.
- [10] Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 367-402.
- [11] Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(2): 459-472.
- [12] Frost JL, Schafer DP. Microglia: architects of the developing nervous system [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(8): 587-597.
- [13] Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 815347.
- [14] Zhang G, Wang Z, Hu H, et al. Microglia in Alzheimer's disease; a target for therapeutic intervention [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 749587.

- [15] Bouzier-Sore AK, Pellerin L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 179.
- [16] Goubard V, Fino E, Venance L. Contribution of astrocytic glutamate and GABA uptake to corticostriatal information processing [J]. *J Physiol*, 2011, 589(Pt 9): 2301-2319.
- [17] Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(1): 41-53.
- [18] Oksanen M, Lehtonen S, Jaronen M, et al. Astrocyte alterations in neurodegenerative pathologies and their modeling in human induced pluripotent stem cell platforms [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(14): 2739-2760.
- [19] Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain [J]. *Front Neurosci*, 2015, 9: 499.
- [20] Kraft AW, Hu X, Yoon H, et al. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice [J]. *FASEB J*, 2013, 27(1): 187-198.
- [21] Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, et al. Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease [J]. *Glia*, 2018, 66(3): 637-653.
- [22] Finsterwald C, Magistretti PJ, Lengacher S. Astrocytes: new targets for the treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(25): 3570-3581.
- [23] Perez-Nievas Beatriz G, Alberto SP. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 114.
- [24] González-Reyes RE, Nava-Mesa MO, Vargas-Sánchez K, et al. Involvement of astrocytes in Alzheimer's disease from a neuroinflammatory and oxidative stress perspective [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 427.
- [25] Vainchtein ID, Chin G, Cho FS, et al. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development [J]. *Science*, 2018, 359(6381): 1269-1273.
- [26] Shinozaki Y, Shibata K, Yoshida K, et al. Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y₁ receptor downregulation [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(6): 1151-1164.
- [27] Diniz LP, Tortelli V, Matias I, et al. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against a β oligomers in Alzheimer's disease model [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(28): 6797-6809.
- [28] Li K, Li J, Zheng J, et al. Reactive astrocytes in neurodegenerative diseases [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(3): 664-675.
- [29] Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites [J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 724-728.
- [30] Drago F, Lombardi M, Prada I, et al. ATP modifies the proteome of extracellular vesicles released by microglia and

- influences their action on astrocytes [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8; 910.
- [31] Nagamoto-Combs K, Combs CK. Microglial phenotype is regulated by activity of the transcription factor, NFAT (nuclear factor of activated T cells) [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(28): 9641–9646.
- [32] Jeon H, Kim JH, Kim JH, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 regulates microglial motility and phagocytic activity [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9; 149.
- [33] Kim JW, Lee SH, Ko HM, et al. Biphasic regulation of tissue plasminogen activator activity in ischemic rat brain and in cultured neural cells; essential role of astrocyte-derived plasminogen activator inhibitor-1 [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(3): 423–433.
- [34] Liu PW, Yue MX, Zhou R, et al. P2Y₁₂ and P2Y₁₃ receptors involved in ADPBetas induced the release of IL-1 β , IL-6 and TNF- α from cultured dorsal horn microglia [J]. *J Pain Res*, 2017, 10; 1755–1767.
- [35] Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, et al. UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis [J]. *Nature*, 2007, 446(7139): 1091–1095.
- [36] Jun M, Xiaolong Q, Chaojuan Y, et al. Calhm2 governs astrocytic ATP releasing in the development of depression-like behaviors [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(4): 1091.
- [37] Correia SS, Liu G, Jacobson S, et al. The CNS-penetrant soluble guanylate cyclase stimulator CYR119 attenuates markers of inflammation in the central nervous system [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 213.
- [38] Roy A, Fung YK, Liu X, et al. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14971–14980.
- [39] Krzan M, Stenovec M, Kreft M, et al. Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(5): 1580–1583.
- [40] Teunissen CE, Steinbusch HWM, Markerink-van Ittersum M, et al. Whole brain spheroid cultures as a model to study the development of nitric oxide synthase-guanylate cyclase signal transduction [J]. *Dev Brain Res*, 2000, 125(1–2): 99–115.
- [41] Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, et al. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2010, 142(6): 857–867.
- [42] Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, et al. An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45518–45528.
- [43] Long JM, Maloney B, Rogers JT, et al. Novel upregulation of amyloid- β precursor protein (APP) by microRNA-346 via targeting of APP mRNA 5'-untranslated region; implications in Alzheimer's disease [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(3): 345–363.
- [44] Xu Y, Zhang Y, Zhang JH, et al. Astrocyte hepcidin ameliorates neuronal loss through attenuating brain iron deposition and oxidative stress in APP/PS1 mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 158; 84–95.
- [45] Ward RJ, Dexter DT, Crichton RR. Iron, neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7267.
- [46] Gong J, Du F, Qian ZM, et al. Pre-treatment of rats with ad-hepcidin prevents iron-induced oxidative stress in the brain [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 90; 126–132.
- [47] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: an intimate relationship [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118535.
- [48] Kontoghiorghes CN, Kontoghiorghes GJ. New developments and controversies in iron metabolism and iron chelation therapy [J]. *World J Methodol*, 2016, 6(1): 1–19.
- [49] Sofroniew MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(5): 249–263.
- [50] Argaw AT, Asp L, Zhang J, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2454–2468.
- [51] Zhang J, Ke KF, Liu Z, et al. Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of a β 1-42-Induced Alzheimer's disease model rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75786.
- [52] Ashtari F, Madanian R, Shaygannejad V, et al. Serum levels of IL-6 and IL-17 in multiple sclerosis, neuromyelitis optica patients and healthy subjects [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2019, 11(6): 267–273.
- [53] You T, Bi Y, Li J, et al. IL-17 induces reactive astrocytes and up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) through JAK/STAT signaling [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41779.
- [54] Rock RB, Hu S, Deshpande A, et al. Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma [J]. *Genes Immun*, 2005, 6(8): 712–719.
- [55] McQuillan K, Lynch MA, Mills KH. Activation of mixed glia by Abeta-specific Th1 and Th17 cells and its regulation by Th2 cells [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(4): 598–607.
- [56] Pillai JA, Bena J, Bebek G, et al. Inflammatory pathway analytes predicting rapid cognitive decline in MCI stage of Alzheimer's disease [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7(7): 1225–1239.
- [57] Fisher Y, Nemirovsky A, Baron R, et al. T cells specifically targeted to amyloid plaques enhance plaque clearance in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10830.
- [58] McManus RM, Mills KHG, Lynch MA. T cells—protective or pathogenic in Alzheimer's disease? [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2015, 10(4): 547–560.
- [59] Brigas HC, Ribeiro M, Coelho JE, et al. IL-17 triggers the onset of cognitive and synaptic deficits in early stages of Alzheimer's disease [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(9): 109574.
- [60] Cristiano C, Volpicelli F, Lippello P, et al. Neutralization of IL-17 rescues amyloid- β -Induced neuroinflammation and memory

- impairment [J]. Br J Pharmacol, 2019, 176 (18): 3544–3557.
- [61] Kim K, Wang X, Ragonnaud E, et al. Therapeutic B-cell depletion reverses progression of Alzheimer's disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2185.
- [62] De D, Mukherjee I, Guha S, et al. Rheb-mTOR activation rescues A β -Induced cognitive impairment and memory function by restoring miR-146 activity in glial cells [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 24: 868–887.
- [63] Yang J, Malone F, Go M, et al. Lipopolysaccharide-induced exosomal miR-146a is involved in altered expression of Alzheimer's risk genes via suppression of TLR4 signaling [J]. J Mol Neurosci, 2021, 71(6): 1245–1255.
- [64] Long X, Yao X, Jiang Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 89.
- [65] McAlpine CS, Park J, Griciuc A, et al. Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease [J]. Nature, 2021, 595(7869): 701–706.
- [66] Lian H, Yang L, Cole A, et al. NF- κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease [J]. Neuron, 2015, 85(1): 101–115.
- [67] Schachtele SJ, Hu S, Sheng WS, et al. Glial cells suppress postencephalitic CD8⁺ T lymphocytes through PD-L1 [J]. Glia, 2014, 62(10): 1582–1594.
- [68] Kummer MP, Ising C, Kummer C, et al. Microglial PD-1 stimulation by astrocytic PD-L1 suppresses neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology [J]. EMBO J, 2021, 40 (24): e108662.
- [69] Kim JH, Afridi R, Cho E, et al. Soluble ANPEP released from human astrocytes as a positive regulator of microglial activation and neuroinflammation; brain renin-angiotensin system in astrocyte-microglia crosstalk [J]. Mol Cell Proteomics, 2022, 21(11): 100424.
- [70] 张晨曦, 董承瑜, 胡鑫, 等. 中药治疗阿尔茨海默病分子作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53 (13): 4132–4145.
- [71] Fang Z, Tang Y, Ying J, et al. Traditional Chinese medicine for anti-Alzheimer's disease: berberine and evodiamine from *Evodia rutaecarpa* [J]. Chin Med, 2020, 15: 82.
- [72] Meng Z, Chen H, Deng C, et al. Multiple roles of paeoniflorin in Alzheimer's disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2464163.

[收稿日期]2023-04-14

(上接第 32 页)

- [18] Terje S, Borgå EJ. Rat models of ADHD [J]. Curr Top Behav Neurosci, 2012, 9: 301–315.
- [19] Harvey RC, Sen S, Deaciuc A, et al. Methylphenidate treatment in adolescent rats with an attention deficit/hyperactivity disorder phenotype: cocaine addiction vulnerability and dopamine transporter function [J]. Neuropsychopharmacology, 2011, 36 (4): 837–847.
- [20] Gupta S, Sharma B. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2014, 122: 122–135.
- [21] 周荣易, 韩新民, 王娇娇, 等. 黄芩苷对注意缺陷多动障碍模型大鼠行为学特征的影响研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(8): 930–937.
- [22] Nakashima A, Hayashi N, Kaneko YS, et al. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines [J]. J Neural Transm, 2009, 116(11): 1355–1362.
- [23] 金国章. 脑内多巴胺 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2010.
- [24] Yang MT, Lu DH, Chen JC, et al. Inhibition of hyperactivity and impulsivity by carbonic anhydrase inhibitors in spontaneously hypertensive rats, an animal model of ADHD [J]. Psychopharmacology, 2015, 232(20): 3763–3772.
- [25] Liu LL, Yang J, Lei GF, et al. Atomoxetine increases histamine release and improves learning deficits in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2008, 102 (6): 527–532.
- [26] Hong Q, Wang YP, Zhang M, et al. Homer expression in the hippocampus of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder [J]. Mol Med Rep, 2011, 4(4): 705–712.
- [27] Swanson JM, Volkow ND. Serum and brain concentrations of methylphenidate: implications for use and abuse [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2003, 27(7): 615–621.
- [28] 杨君义, 张立菊. 治疗亨廷顿舞蹈症和迟发性运动障碍新药: deutetrabenazine [J]. 中国新药与临床杂志, 2019, 38 (3): 140–143.

[收稿日期]2023-01-05

袁和锐,郭鹏翔. HBV 感染 DLBCL 患者的分子机制及预后研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(11): 150–154.
Yuan HR, Guo PX. Molecular mechanism and prognosis of HBV-infected patients with DLBCL [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(11): 150–154.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.11.020

HBV 感染 DLBCL 患者的分子机制及预后研究

袁和锐¹, 郭鹏翔^{2*}

(1.贵州医科大学, 贵阳 550002; 2.贵州医科大学附属人民医院, 贵阳 550002)

【摘要】 近年来乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染者患弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 的概率呈上升趋势, 且其病因复杂, 治疗棘手, 因此受到国内外学者的广泛关注。本文在回顾分析国内外学者研究的基础上, 进一步探讨了 HBV 感染致 DLBCL 发生、发展的机制及相关患者的临床预后情况, 最终发现在基因组、转录组层面, HBV 可能主要通过诱导 *BCL6*、*FOXO1*、*ZFP36L1* 等基因的改变, 以及通过 HBV 的 X 蛋白激活各种调控基因, 从而诱导淋巴细胞克隆性增生, 最终形成淋巴瘤; 而针对患者的临床预后评估, 主要通过分析比较患者发病年龄、性别、脏器受累情况、国际预后指数 (IPI)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平、增殖指数 (Ki-67)、*bcl-2*、*bcl-6*、炎症指标等因素, 旨在为 DLBCL 的临床诊治及基础研究提出理论依据。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤; HBX; 基因突变; 预后

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 11-0150-05

Molecular mechanism and prognosis of HBV-infected patients with DLBCL

YUAN Herui¹, GUO Pengxiang^{2*}

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550002, China.
2. Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550002)

【Abstract】 In recent years, hepatitis B virus (HBV)-Infected patients with diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) have increased. Its etiology is complex and treatment is difficult. Therefore, it has received extensive research attention. By reviewing and analyzing the studies of domestic and foreign researchers, this article discusses the mechanism of the occurrence and development of DLBCL caused by HBV infection and the clinical prognosis of patients. The findings suggest that, at genomic and transcriptome levels, HBV mainly induces changes in the expression of *BCL6*, *FOXO1*, *ZFP36L1* and other genes, and activate various regulatory genes through the HBV X protein, thereby inducing clonal proliferation of lymphocytes and eventually forming lymphoma. The prognostic assessment mainly analyzes and compares the patient age of onset, sex, organ involvement, international prognostic index, lactate dehydrogenase level, proliferation index (Ki-67), *bcl-2*, *bcl-6*, inflammatory index, and other factors, to propose a theoretical basis for clinical diagnosis and treatment of DLBCL and basic research.

【Keywords】 hepatitis B virus; diffuse large B-cell lymphoma; HBX; genetic mutations; prognosis

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

乙肝病毒感染在全世界始终是一个重大的公共卫生问题, HBV 感染后可以导致多种肝疾病, 包

括各型肝炎、肝硬化以及终末期的肝细胞癌等^[1]。目前估计约有 2.57 亿乙肝表面抗原携带者, 但是

【基金项目】 吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金 (320.6750.2020-19-16)。

【作者简介】 袁和锐 (1999—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 血液恶性肿瘤的诊断与治疗。E-mail: 945392400@qq.com

【通信作者】 郭鹏翔 (1971—), 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 血液恶性肿瘤的诊断与治疗。E-mail: gygpx118@sina.com

HBV 在不同的区域国家的感染率不尽相同,在非洲和西太平洋地区呈现高水平(>8%)的流行率,在欧洲和亚洲具有中间水平(2%~7%)的流行率,在美国具有低水平的流行率(<2%),而中国地区乙肝表面抗原携带者比例估计为 7.2%^[2]。

病毒感染的危害极大,已经成为多种疾病,尤其是许多癌症的关键诱因^[3],非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma, NHL)是最常见的癌症之一,占所有癌症的 4%~5%,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤则是 NHL 中最常见的病理类型,占 30%~40%^[4]。

目前对于 DLBCL 的病因及发病机制尚不完全清楚,但已有研究证实了 HBV 与 DLBCL 之间存在密切的关系^[5]。然而,目前为止很少有文献系统地研究 DLBCL 合并乙肝病毒感染的临床病理特征和不良预后因素,且由于 HBV 感染在我国十分常见,因此了解其对接治疗的 DLBCL 患者临床病理特征及预后的影响具有重要意义,本文就 HBV 可能导致 DLBCL 发生的机制以及相关患者的临床预后情况进行综述,以期临床诊疗带来新的思路。

1 分子机制研究

1.1 基因突变的影响

研究发现不同种族地区存在着不同的基因突变谱,一些潜在的癌症驱动基因在中国 DLBCL 患者中的突变频率较高,基因组变化也可能受到患者年龄、DNA 修复基因的改变、不同病因的暴露、自身免疫/炎症免疫反应的影响。基于队列数据分析,一些基因在 HBsAg(+)组中的突变显著增加,有学者在 HBsAg(+)组中首先确认了 14 个优先突变基因,包括 *KLF2*、*TMSB4X* 等,其中 11 个基因是活化诱导胞嘧啶脱氨酶(activation induced cytosine deaminase, AID)的潜在脱靶基因。其次,DLBCL 中已知的突变靶点,在 HBsAg(+)肿瘤中发生突变的频率较低。综上所述,这些数据显示 HBsAg(+)DLBCL 中存在一组独特的突变基因,影响了涉及淋巴瘤发生的多个关键通路^[6]。AID 活性介导的异常体细胞高频突变可能是导致 HBsAg(+)型 DLBCL 中部分高突变基因发生突变的原因。

另外,通过转录组分析进一步表明 HBV 相关的基因表达信号是由 *BCL6*、*FOXO1* 和 *ZFP36L1* 调控的基因富集贡献的。*BCL6* 是参与 B 细胞淋巴瘤发生发展的已知原癌基因,编码生发中心反应所需的转录抑制因子^[7-8]。综上所述,*BCL6* 基因改变在

HBsAg(+)型 DLBCLs 中显著富集,提示 *BCL6* 失调在 HBV 相关 DLBCL 发生发展中的关键作用。

最近有研究表明,*KLF2* 编码一个转录因子,对维持滤泡 B 细胞的特性非常重要,在小鼠中的缺失可导致边缘区 B 细胞的扩增^[9]。在脾边缘区淋巴瘤中高度突变,但在 DLBCL 中发现并不经常突变,或以较低的频率突变^[10-13]。*KLF2* 可被信使 RNA 衰减激活蛋白 *ZFP36L1* 直接调控,*ZFP36L1* 是边缘区 B 细胞区室发育和维持所必需的^[14]。然而,在脾边缘区淋巴瘤或 DLBCL 中,*ZFP36L1* 的显著突变频率尚未见报道。这表明 *KLF2* 和 *ZFP36L1* 在淋巴瘤发生中存在功能上的联系,这些分子的突变可能会影响一个共同的过程或通路。另外也有学者指出,HBV 能通过 NF- κ B 途径来促进造血系统生长因子的生成、释放与表达,从而引起淋巴细胞的克隆性增殖^[15]。

1.2 乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBX)在 DLBCL 发生发展中的作用

HBV 可通过激活原癌基因和抑制抑癌基因等机制引起淋巴细胞恶性增殖,最终导致淋巴瘤的形成。HBV 的 X 蛋白是诱导淋巴细胞克隆性增生的关键,具有反式激活作用,能激活多种调控基因,从而导致细胞周期改变、细胞凋亡、DNA 损伤修复和其他表型的变化^[2,16]。某项研究中发现 48.9% 的 HBsAg(+)DLBCL 患者中可检测到 HBX 抗原,并且其可能通过参与 *myc* 信号通路介导淋巴瘤的发生,*myc* 作为重要的转录因子之一,具有调节多种细胞的功能,包括增殖、生长和凋亡^[17-18]。*myc* 蛋白在淋巴瘤患者中常因功能获得性突变、基因扩增或染色体易位、通路失调而表达失调;*myc* 基因重排在 HBV(+)DLBCL 中的频率明显高于 HBV(-)组。研究发现 HBX 抗原可与 F-Box 蛋白 Skp2 结合并抑制 *myc* 的泛素化和蛋白酶体降解^[19]。pre-S2 与 pre-S1 和 SHBs 抗原结合形成 Dane 颗粒包膜,Dane 颗粒包膜在 HBV 病毒吸附宿主细胞中发挥重要作用,在 B 细胞淋巴瘤中,pre-S2 可能作为初始感染步骤特异性地附着在 B 细胞上^[17,20]。有学者指出 HBV 感染 B 细胞后可以通过 AID 与人体中载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like, APOBEC)家族共同作用来发挥效应,介导异常体细胞高频突变,改变信号通路靶基因来达到致癌效应^[21]。另外通过靶向测序可以观察到 HBsAg(+)DLBCL 基因组中突变

率的增加和一组不同的突变靶点,可以部分地由 APOBEC 和激活诱导的胞苷脱氨酶的活性来解释。综上所述,HBV 感染与 B 细胞恶性肿瘤之间存在相应的联系。

1.3 HBX 通过调控 ATM/CHK2 信号通路产生化疗药物耐药性

Zhao 等^[3]指出 X 蛋白可抑制 DNA 损伤反应蛋白 CHK2 的激活,引发细胞周期中 S 期的停止以达到减弱阻滞药物的抑制作用,使 DLBCL 细胞对化疗药物甲氨蝶呤、阿糖胞苷等产生耐受,而该作用是通过影响 ATM/CHK2 信号通路实现的,其中 *LncNBAT1/APOBEC3A* 是 HBX 发挥作用的关键介质;*LncNBAT1* 的上调与下调可明显改变 DLBCL 细胞对化疗药物的敏感性,*lncNBAT1* 通过与下游信号分子 *STAT1* 相耦联,抑制 *APOBEC3A* 的表达,最终产生调控作用^[22]。

2 临床预后评估

2.1 基因突变对预后的影响

前文所述 HBV 感染组 *myc* 基因重排的发生率高于无 HBV 感染组,在某项研究中数据显示,HBV 感染组 *myc* 基因重排率为 20.0%,高于无 HBV 感染组的 3.9%,差异具有统计学意义;另外多因素分析显示 *myc* 基因重排是 DLBCL 患者独立的不良预后因素^[23]。研究认为 HBV 感染可能显著促进 *myc* 基因重排,Aukema 等^[24]研究了 *myc* 基因重排对 DLBCL 患者预后的影响,结果表明,与无 *myc* 基因重排的患者相比,有 *myc* 基因重排的患者预后较差。另外,关于 *BCL2* 基因重排对 DLBCL 患者预后的影响也进行了相关性的研究,但两者的关系仍存在较大争议。Tibiletti 等^[25]报道 DLBCL 患者中 *BCL2* 基因重排的比例为 20%~30%,而其他不同研究关于 *BCL2* 基因重排对 DLBCL 患者生存时间的影响存在着不同结果;另外多因素分析显示 *BCL2* 基因重排不是 DLBCL 患者独立的不良预后因素^[23,26]。综上所述,HBV 感染的 DLBCL 患者中普遍存在 *myc* 和 *BCL2* 基因重排,但基因重排同患者预后的相关性尚需大规模多中心临床研究来验证。

2.2 临床指标的比较

经分析比较发现 HBsAg 阳性组患者发病年龄中位数明显小于 HBsAg 阴性组,主要表现为年龄超过 60 岁的患者较少;阳性组脾受累多见,且其临床分期较晚(Ⅲ~Ⅳ期),但患者肠道淋巴受累不明显。

感染组患者 2 年和 5 年的 OS 和 PFS 较差,明显低于无感染组的患者。此外,两组在性别、IPI 评分、LDH 水平、Ki-67、*bcl-2* 和 *bcl-6* 的表达、放化疗治疗的有效率方面差异均无统计学意义^[27-33]。但是有部分学者通过分析指出,两组患者中 LDH 水平高低具有统计学意义,阳性组患者较容易出现高水平 LDH,且与其预后不佳有关。针对这一结果出现的原因可能与样本量较小有关,需增加样本数再次验证。

2.3 炎症指标的比较

在其他研究中,炎症指标对于分析肿瘤的发生发展起着越来越重要的作用。通常在肿瘤的形成过程中,往往伴随着炎症的发生,且一般于肿瘤形成初期就已存在。因此,一些反映炎症的指标参数很可能与肿瘤的预后相关,其中被证实的包括中性粒细胞/淋巴细胞比值(NLR)和淋巴细胞/单核细胞比值(LMR)等^[34-35]。在入组的患者数据研究中显示,与 NLR 较低的患者相比,治疗前 NLR 较高的患者总生存期(overall survival,OS)和无进展生存期(progression-free survival,PFS)较差。多因素 Cox 比例风险模型分析进一步显示,高 NLR 是不良 OS 和 PFS 的独立预测因素。还有研究发现高 NLR 可能与 Ann Arbor 分期晚、B 症状发生率高、骨髓受累多、LDH 升高存在相关性,因此治疗前 NLR 是判断 DLBCL 患者预后的重要临床指标^[36-37]。另外既往有研究发现外周血 LMR 是可靠的预后标志物,多项研究结果显示,与高 LMR 的 DLBCL 患者相比,低 LMR 的 DLBCL 患者的 OS 和 PFS 显著降低。此外,LMR 与临床病理特征分析发现,低 LMR 与更高的 LDH、IPI 评分和肿瘤分期相关,LDH 提示淋巴瘤负荷,高 IPI 评分和晚期肿瘤分期与不良预后相关^[38-41]。综上所述,低 LMR 可能是 DLBCL 患者的不良预后因素,LMR 降低对 DLBCL 患者表现出不利影响,因此可帮助临床医生对患者进行分层,选择个体化的治疗策略。

3 小结与展望

HBV 是影响人类健康的重大危害之一,而 DLBCL 是 NHL 中最常见的一种类型,HBV 可能通过 HBX 蛋白调控信号通路,从而引起下游信号分子的错误表达,又或者通过直接感染淋巴细胞等方式,导致淋巴细胞克隆性增生,最终发生发展成为淋巴瘤。对于 HBV 感染的 DLBCL 患者,其临床指

标及预后情况均可提示 HBV 感染所带来的巨大风险;而对于反应炎症指标的参数,由于这些指标的非特异性,因此尚未列入临床指南,故在后续研究中可进行深入探讨。综上所述,尽管 HBV 和 DLBCL 的相关性研究已有部分进展,但有限的研究所取得的结果也不尽相同,这可能与总体样本量较小、患者个体差异表达以及医疗技术水平提高致 HBV 检出率增加相关。因此在后续研究中需要深入研究 DLBCL 的致病机制,寻找新的治疗靶点以及预防相关并发症所产生的严重后果,从而制定合理且正确的治疗方案。

参考文献:

- [1] Liang TJ. Hepatitis B; the virus and disease [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): S13-S21.
- [2] Wang Y, Wang H, Pan S, et al. Capable infection of hepatitis B virus in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Cancer*, 2018, 9 (9): 1575-1581.
- [3] Zhao X, Guo X, Xing L, et al. HBV infection potentiates resistance to S-phase arrest-inducing chemotherapeutics by inhibiting CHK2 pathway in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 61.
- [4] Rong X, Wang H, Ma J, et al. Chronic hepatitis B virus infection is associated with a poorer prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis and systemic review [J]. *J Cancer*, 2019, 10(15): 3450-3458.
- [5] Guo YF, Pan JX, Zhuang W. Concurrent and reactivation of hepatitis B virus infection in diffuse large B-cell lymphoma: risk factors and survival outcome [J]. *Infect Agent Cancer*, 2018, 13 (1): 40.
- [6] Ren W, Ye X, Su H, et Al. Genetic landscape of hepatitis B virus-associated diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2019, 133(6): 2670-2681.
- [7] Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, et al. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2003, 101 (8): 2914 -2923.
- [8] Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells [J]. *Immunol Rev*, 2012, 247(1): 172-183.
- [9] Hart GT, Wang X, Hogquist KA, et al. Krüppel-like factor 2 (KLF2) regulates B-cell reactivity, subset differentiation, and trafficking molecule expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2): 716-721.
- [10] Clipson A, Wang M, de Leval L, et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype [J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1177-1185.
- [11] Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent

mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma [J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 298-303.

- [12] Novak AJ, Asmann YW, Maurer MJ, et al. Whole-exome analysis reveals novel somatic genomic alterations associated with outcome in immunochemotherapy-treated diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood Cancer J*, 2015, 5(8): e346.
- [13] de Miranda NF, Georgiou K, Chen L, et al. Exome sequencing reveals novel mutation targets in diffuse large B-cell lymphomas derived from Chinese patients [J]. *Blood*, 2014, 124 (16): 2544-2553.
- [14] Newman R, Ahlfors H, Saveliev A, et al. Maintenance of the marginal-zone B cell compartment specifically requires the RNA-binding protein ZFP36L1 [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(6): 683-693.
- [15] 任丽影, 孟春, 吕凤侠, 等. 乙型肝炎病毒感染与弥漫大 B 细胞淋巴瘤临床病理的相关性探讨 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(28): 84, 86.
- [16] Li M, Gan Y, Fan C, et al. Hepatitis B virus and risk of non-Hodgkin lymphoma: an updated meta-analysis of 58 studies [J]. *J Viral Hepat*, 2018, 25(8): 894-903.
- [17] Huang X, Young KH, Guo W, et al. Identification of hepatitis B virus aetiologic antigens, HB_s and Pre-S2, in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(9): 948-950.
- [18] Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects [J]. *Genes*, 2017, 8(4): 116.
- [19] Kalra N, Kumar V. The X protein of hepatitis B virus binds to the F box protein Skp2 and inhibits the ubiquitination and proteasomal degradation of c-Myc [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580 (2): 431-436.
- [20] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus [J]. *eLife*, 2012, 1: e00049.
- [21] 陈宏森, 何奕达, 李子帅, 等. 乙型肝炎病毒在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤发生发展中的作用 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2022, 14(4): 445-452.
- [22] Li J, Chen Y, Guo X, et al. lncNBAT1/APOBEC3A is a mediator of HBX-induced chemoresistance in diffuse large B cell lymphoma cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 27: 1064-1077.
- [23] Liu Z, Li S, Guo W, et al. MYC gene rearrangements are closely associated with poor survival of diffuse large B cell lymphoma with hepatitis B virus infection [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 1967648.
- [24] Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma [J]. *Haematologica*, 2014, 99(4): 726-735.
- [25] Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, et al. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent *in situ* hybridization probes and correlation with

- clinical outcome [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(5): 645–652.
- [26] Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya J, et al. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6, and c-myc in diffuse large B-cell lymphomas [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42(5): 1099–1106.
- [27] Chen DG, Chen G, Wang C, et al. Clinicopathological and prognostic features of hepatitis B virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: a single-center retrospective study in China [J]. *Infect Agent Cancer*, 2021, 16(1): 57.
- [28] Cheng CL, Huang SC, Chen JH, et al. Hepatitis B surface antigen positivity is an independent unfavorable prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era [J]. *Oncologist*, 2020, 25(9): 793–802.
- [29] Wang F, Xu RH, Luo HY, et al. Clinical and prognostic analysis of hepatitis B virus infection in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 115.
- [30] 黄燕华, 杨晟, 石远凯, 等. 感染 HBV 的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者临床特征与预后分析 [J]. *癌症进展*, 2012, 10(3): 289–295.
- [31] 李蔚冰, 林英城, 林雯, 等. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤携带乙型肝炎病毒患者的临床特点 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(11): 986–990.
- [32] 白洋禄, 岑洪, 谭晓虹. 乙型肝炎病毒感染与淋巴瘤关系的研究 [A]. *中华医学会肿瘤学分会、中国抗癌协会论文汇编* [C]; 2014.
- [33] 孙媛媛, 张明智. 乙型肝炎病毒感染的弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者临床特点及预后分析 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(3): 253–257.
- [34] Kang X, Bai L, Han C, et al. Clinical analysis and prognostic significance of hepatitis B virus infections with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 2839–2851.
- [35] Mandaliya H, Jones M, Oldmeadow C, et al. Prognostic biomarkers in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC): neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte to monocyte ratio (LMR), platelet to lymphocyte ratio (PLR) and advanced lung cancer inflammation index (ALI) [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(6): 886–894.
- [36] Stefaniuk P, Szymczyk A, Podhorecka M. The neutrophil to lymphocyte and lymphocyte to monocyte ratios as new prognostic factors in hematological malignancies-a narrative review [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 2961–2977.
- [37] Wang J, Zhou M, Xu JY, et al. Prognostic role of pretreatment neutrophil-lymphocyte ratio in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with RCHOP [J]. *Medicine*, 2016, 95(38): e4893.
- [38] Koh YW, Park CS, Yoon DH, et al. Should the cut-off values of the lymphocyte to monocyte ratio for prediction of prognosis in diffuse large B-cell lymphoma be changed in elderly patients? [J]. *Eur J Haematol*, 2014, 93(4): 340–348.
- [39] Lin B, Chen C, Qian Y, et al. Prognostic role of peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(9): 2563–2568.
- [40] Cencini E, Fabbri A, Schiattone L, et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophages, lymphocyte-to-monocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratio in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Am J Blood Res*, 2020, 10(4): 97–108.
- [41] Gao F, Hu J, Zhang J, et al. Prognostic value of peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio in lymphoma [J]. *J Cancer*, 2021, 12(12): 3407–3417.

[收稿日期]2023-03-30