

陈思源,王思雨,祁明媛,等. 蛹虫草提取物对肾阳虚模型大鼠睾丸 CYP19/CaM/CaMK II 信号的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 1-8.

Chen SY, Wang SY, Qi MY, et al. Effect of *Cordyceps militaris* extract on CYP19/CaM/CaMK II signaling in testes of kidney yang deficiency model rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.001

蛹虫草提取物对肾阳虚模型大鼠睾丸 CYP19/CaM/CaMK II 信号的影响

陈思源¹,王思雨¹,祁明媛²,李奎坡¹,徐仪昕¹,张 婷¹,姚紫研¹,赵洪庆^{1*}

(1.湖南中医药大学,长沙 410208;2.湖南炎帝生物工程有限公司,湖南 株洲 412000)

【摘要】 目的 明确蛹虫草提取物补肾阳的功效及潜在作用机理。方法 60 只 SD 大鼠分为正常组、模型组、睾丸片组(0.216 g/kg)、蛹虫草提取物高、中、低剂量组(0.72、0.36、0.18 g/kg),每组 10 只。除正常组外,其余组均采用腺嘌呤(200 mg/kg)灌胃的方法建立肾阳虚大鼠模型,于造模第 15 天起开始给予受试药,连续 28 d。采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清促性腺激素释放激素(GnRH)、黄体生成素(LH)、睾酮(T)、雌二醇(E2)水平,HE 染色观察肾、睾丸、附睾、精囊腺的组织形态,免疫组化和 Western blot 法检测睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 表达,RT-qPCR 检测睾丸 CYP19 mRNA 表达。结果 与正常组相比,模型组大鼠血清 GnRH、LH、T 水平均显著降低($P<0.05$),肾、睾丸、附睾、精囊腺组织均有明显损伤,睾丸 CYP19 表达降低($P<0.01$)、CaM 和 CaMK II 表达显著增加($P<0.01$),CYP19 mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组 GnRH、LH、T 含量均升高($P<0.05$),组织损伤缓解,睾丸 CYP19 表达增加($P<0.05$),CaM 和 CaMK II 降低($P<0.05$),CYP19 mRNA 水平增加($P<0.05$)。结论 蛹虫草提取物通过调控 CYP19/CaM/CaMK II 信号发挥补肾阳功效。

【关键词】 蛹虫草;肾阳虚;提取物;睾丸;CYP19

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0001-08

Effect of *Cordyceps militaris* extract on CYP19/CaM/CaMK II signaling in testes of kidney yang deficiency model rats

CHEN Siyuan¹, WANG Siyu¹, QI Mingyuan², LI Longpo¹, XU Yixin¹, ZHANG Ting¹, YAO Ziyang¹, ZHAO Hongqing^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China.

2. Hunan Yandi Biological Engineering Co., Ltd., Zhuzhou 412000)

【Abstract】 Objective To clarify the efficacy and potential mechanism of *Cordyceps militaris* extract to nourish kidney yang. **Methods** SD rats were divided into normal, model, testicular tablet (0.216 g/kg), and *Cordyceps militaris* extract high, medium, and low dose groups (0.72, 0.36 and 0.18 g/kg, respectively) with 10 per group. Except for the normal group, all other groups were administered adenine (200 mg/kg) by gavage to establish a kidney yang deficiency rat model. Test drug administration was started on day 15 of model establishment for 28 consecutive days. ELISA were used to measure rat serum gonadotropin releasing hormone (GnRH), luteinizing hormone (LH), testosterone (T) and estradiol (E2) levels. HE staining was used to observe the morphology of kidneys, testes, epididymis, and seminal vesicle glands. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect CYP19, CaM and CaMK II expression in testes. CYP19 mRNA expression was detected in testes by RT-qPCR. **Results** Compared with the normal group, serum GnRH, LH and T levels of the model group were significantly reduced ($P<0.05$), kidney, testis, epididymis and seminal vesicle gland

【基金项目】 国家自然科学基金(82104836);湖南中医药大学产学研合作项目(2020430102003711)。

【作者简介】 陈思源(1986—),女,助理实验师,研究方向:中药药理研究。E-mail: 905315440@qq.com

【通信作者】 赵洪庆(1992—),男,博士,助理研究员,研究方向:中药药理与创新药物研究。E-mail: 516005398@qq.com

tissues were all significantly damaged, and CYP19 expression in testes was reduced ($P < 0.01$). CaMK II expression was increased significantly ($P < 0.01$). CYP19 mRNA expression was decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, GnRH, LH and T contents in the high-dose *Cordyceps militaris* extract group were increased ($P < 0.05$), tissue damage was relieved, CYP19 expression in testis was increased ($P < 0.05$), CaM and CaMK II were decreased ($P < 0.05$), and the CYP19 mRNA level was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** *Cordyceps militaris* extract exerts a kidney yang effect by regulating CYP19/CaM/CaMK II signaling.

【Keywords】 *Cordyceps militaris*; kidney yang deficiency; extract; testis; CYP19

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

肾阳虚是临床最为常见的证型之一,由于患者素体阳虚、年老肾亏、久病伤肾等因素引起肾阳气衰竭,以腰膝酸软、畏寒肢冷、夜尿频多、精神萎靡、性欲减退等为主要特征,严重影响患者的生活质量。西医针对单一症状进行治疗,存在副作用多、依赖性、成瘾性及停药复发等缺点,中医药立足整体,辨证论治,能够系统调节机体肾阳虚相关症状,疗效独特,从天然产物中开发安全有效的补肾阳产品,将具有重要的临床价值及广阔的市场前景。

蛹虫草又名北冬虫夏草、北虫草,为麦角菌科、虫草属真菌,是由子实体与菌核组成的复合体,其性平味甘,具有补肺益肾、止血化痰、延缓衰老的功效^[1]。现代药理研究表明,蛹虫草的活性成分主要包括虫草素、虫草酸、甾醇类及虫草多糖,具有增强免疫力、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、神经保护、性功能保护等作用,因其与冬虫夏草具有类似的活性成分与临床疗效,能够改善患者的肺肾气虚证及疲劳综合征,补肾壮阳,且蛹虫草易于培育,成本相对较低,近年来已逐渐成为冬虫夏草的替代品,应用广泛,具有很强的开发价值^[2-3]。然而,目前关于蛹虫草的基础研究较少,其能否改善肾阳虚模型大鼠的肾阳虚状态,相关机制如何,尚未有相关报道,需要进一步的相关基础研究进行深入探讨。

芳香化酶基因 CYP19 是细胞色素 P450 超基因家族中的重要成员,主要分布于中枢神经系统及卵巢、睾丸等生殖系统相关组织中。研究表明,CYP19 能够通过调控下游信号编码芳香化酶 P450arom 基因,后者能够催化睾酮转化为雌激素,是雌激素体内合成的关键酶和限速酶,与下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPG)轴功能密切相关^[4-5]。钙调蛋白/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calmodulin/calmodulin kinase II, CaM/CaMK II) 是 CYP19 潜在的下游信号,能够调节 HPG 轴功能,并与睾丸间质细胞的完整性密切相关^[6]。本研究拟建立肾阳虚大鼠模型,明确蛹虫草通过增加体内 CYP19 的表达,进而抑制 CaM/CaMK II 激活,从而

调控 HPG 轴发挥补肾阳功效的作用机理。该机制的证实将首次明确 CYP19/CaM/CaMK II 信号介导大鼠肾阳虚病理状态及蛹虫草的功效特点与潜在机制,将为蛹虫草的开发应用提供重要理论支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 60 只,雄性,SPF 级,7 周龄,体重 200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004],质量合格证号(430727201101573875),饲养于湖南中医药大学实验动物中心[SYXK(湘)2019-0009]。动物饲养室温度(22 ± 2)℃,湿度(60 ± 5)%,12 h 明暗交替,适应性喂养 3 d 后开始实验。实验过程均符合实验动物 3R 原则,经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过(LLBH-202009140001)。

1.2 主要试剂与仪器

蛹虫草由湖南炎帝生物工程有限公司提供,将蛹虫草粉末用 10 倍量水浸泡 30 min,提取两次,第一次 100℃ 浸提 120 min,提取液过 200 目筛,药渣继续加水浸提 60 min 后过 200 目筛,合并滤液,于 60~80℃ 减压浓缩至相对密度 1.18~1.25,冷冻干燥 48 h 得蛹虫草提取物;睾酮片由江西泽众制药股份有限公司生产,国药准字 H36022006,生产批号:20200103,规格:36 片(每片 0.2 g),人用剂量为 2.4 g/d;腺嘌呤(北京索莱宝科技公司,批号:20200514);大鼠促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone, T)、雌二醇(estradiol, E2)ELISA 试剂盒(江苏菲亚生物科技公司,批号:FY3396-A、FY3676-A、FY3452-A、FY3450-A);CYP19、CaM、CaMK II 一抗(英国 Abcam 公司,批号:ab106168、ab134901、ab134041); β -tubulin 一抗(美国 Proteintech 公司,批号:10094-1-AP);BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 组织裂解液、RNA 提取液(武汉赛维尔生物科技公司,批号:G2026、G2002、

G3013);DAB 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:AR1022、MK1613)。

ME204 型万分之一精密天平购自瑞士梅特勒托利多公司;OML-QPA 型生物组织切片机购自湖北欧美莱科技公司;NP-B1 型全自动生物组织包埋机、NP-P3 型组织摊烤片机购自孝感市诺普电子科技有限公司;NanoDrop One 超微量分光光度计、MK3 型全自动酶标仪购自美国 Thermo 公司;Primo Star 型光学显微镜购自德国 Zeiss 公司;Gel Doc XR⁺型凝胶成像分析仪、CFX 型荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物处理

根据动物体重将 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、蛹虫草提取物高剂量组、蛹虫草提取物中剂量组、蛹虫草提取物低剂量组、睾丸片组,每组 10 只。除正常组外,其余组均采用腺嘌呤(200 mg/kg)灌胃的方法建立肾虚大鼠模型^[7-8],连续 42 d,正常组灌胃等体积蒸馏水。从造模第 15 天起开始给予受试药,依据《中药药理研究方法学(第 3 版)》中人与大鼠体表面积系数换算大鼠用药剂量^[9],蛹虫草提取物高、中、低剂量组给药剂量分别为 0.72、0.36、0.18 g/kg(临床等效 2、1、0.5 倍剂量),睾丸片组灌胃给予睾丸片水溶液,给药剂量为 0.216 g/kg(临床等效剂量),正常组和模型组给予等体积蒸馏水,灌胃体积均为 10 mL/kg,每天给药 1 次,连续 28 d。末次给药后,检测大鼠在体功能指标,完成后麻醉大鼠,剪开腹腔,游离腹主动脉进行采血,解剖分离双肾、睾丸、附睾、精囊腺组织,万分之一精密天平称重,保存于 4%多聚甲醛溶液中,其中睾丸组织保存于特定睾丸组织固定液中,用于分子生物学实验的睾丸组织置于液氮中冷冻保存。

1.3.2 指标检测

(1)一般指标观察

观察各组大鼠行为状态、毛发、二便、饮水饮食、垫料潮湿等情况,称重,检测体温,并采用旷场箱(80 cm×80 cm×40 cm)评价动物的自主活动情况,旷场箱底部均匀划分为 25 个方格,动物从中心放入,其自由活动 30 s 后记录 4 min 内水平跨格数及垂直站立数的总和。

(2)脏器指数

将组织分离后于万分之一分析天平上称重,计算脏器指数=脏器重量(mg)/体重(g)。

(3)ELISA 实验

采血后将血液静置 1 h,3000 r/min 离心 15

min,取上清液,得到血清样本。采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清 GnRH、LH、T、E2 水平,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。根据标准曲线计算各组样本中目的因子的含量。

(4)HE 染色

组织充分固定后,石蜡包埋,以 5 μm 厚度连续切片,梯度乙醇脱水、浸蜡、水化、冲洗,采用苏木精-伊红进行染色,完成后将切片固定,中性树脂封片,显微镜下进行图像采集,观察各组大鼠肾、睾丸、附睾、精囊腺的病理形态并进行拍照分析。

(5)免疫组化染色

取充分固定的睾丸组织,石蜡包埋,切片、脱水、浸蜡、水化、冲洗,滴加山羊血清于 37℃封闭 30 min,按说明书对一抗进行稀释,采用稀释后的一抗 4℃孵育过夜;次日采用 PBS 缓冲液洗涤切片 3 次,反应增强液孵育 10 min 后用二抗继续孵育 15 min;洗涤 3 次,DAB 显色液显色 5 min 后用苏木精复染 15 s,脱水,透明,封片。于显微镜下选取视野进行拍摄,应用 Image J 软件分析目的蛋白的积分光密度(IOD)值。

(6)Western blot 实验

切取 100 mg 睾丸组织,加入 1 mL 组织裂解液冰上充分匀浆,离心取上清液,检测上清液中总蛋白含量。制备分离胶和浓缩胶,将蛋白煮沸变性后上样,上样量为 50 μg,80 V 恒压电泳,转膜,脱脂奶粉封闭 2 h,加入按说明书稀释后的一抗,4℃孵育过夜。次日用 TBST 液洗涤条带 3 次,每次 15 min,加入二抗继续孵育 4 h,洗涤条带 3 次,滴加混合显影液,将条带置于凝胶成像仪中显影。应用 Image J 软件分析条带灰度值,目的蛋白的相对表达量为目的蛋白条带灰度值除以内参蛋白(β-tubulin)灰度值。

(7)RT-qPCR 实验

切取 100 mg 睾丸组织,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取组织总 RNA,以 mRNA 为模板,利用逆转录酶将 RNA 逆转录成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:95℃、10 min 预变性,95℃、15 s 变性,60℃、30 s 退火延伸,40 个循环。采用经典 2^{-ΔΔCT} 法(Liva 法)根据内参基因 GAPDH 的表达分析目的基因 mRNA 的表达水平。引物由武汉赛维尔公司合成,其中 CYP19 引物序列(NM_017085.2):上游 5'-GCTGGACACTTCTAACACGCTCTT-3',下游 5'-CTCCTTTGTCAGGTCTCCACGT-3',片段长度 298 bp;GAPDH 引物序列(NM_017008.4):上游 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3',下游 5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-

3', 片段长度 138 bp。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。本研究实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,多重比较方差齐时用 LSD 检验法,方差不齐时用 Tamhane's T 检验法, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 蛹虫草提取物对模型大鼠一般指标的影响

正常组大鼠行为活动、饮水摄食均正常,有明显的探索欲,毛色光亮整洁,垫料较干净,大便成形;模型组大鼠外形消瘦,垫料明显潮湿,大便稀薄不成形,体温降低($P<0.01$),自主活动次数显著减少($P<0.01$);蛹虫草提取物组大鼠行为活动较正常,毛色亮洁,垫料较脏,潮湿程度一般,大便基本成形,高剂量组体温升高($P<0.05$),自主活动次数增加($P<0.05$)。见表 1。

2.2 蛹虫草提取物对模型大鼠脏器指数的影响

与正常组相比,模型组大鼠肾脏指数、睾丸指数显著增加($P<0.01$),精囊腺指数降低($P<0.01$);与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组肾脏指数与睾丸指数显著降低($P<0.05$),精囊腺指数增加($P<$

0.05),同时,中剂量组与低剂量组肾脏指数均显著降低($P<0.05$)。见表 2。

2.3 蛹虫草提取物对模型大鼠血清因子水平的影响

与正常组相比,模型组血清 GnRH、LH、T 含量均显著降低($P<0.01$),E2 含量无显著变化;与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组 GnRH、LH、T 含量均升高($P<0.05$),睾丸片组仅睾酮含量显著升高($P<0.01$)。见表 3。

2.4 蛹虫草提取物对模型大鼠组织病理形态的影响

正常组大鼠肾组织肾小球形状规则,轮廓清晰,未观察到炎症细胞的浸润;睾丸生精小管基膜完整且厚,基膜内可见排列整齐、致密且结构正常的生精细胞及支持细胞,生精小管管腔内可见大量精子;附睾管腔结构清晰,管壁细胞排列紧密整齐,管壁较厚;精囊腺腺腔内有许多皱襞,表面为假复层柱状上皮,内含有丰富的分泌颗粒、脂肪滴及脂褐素;模型组肾小球体积增大,基底膜明显扩张,通透性增加,伴有大量炎症细胞的浸润,部分大鼠可见明显的腺嘌呤代谢物结晶累积;睾丸生精小管基膜变薄,基膜内生精细胞排列紊乱,数量减少,生精小管腔内间隙增大,精子数量减少;附睾部分管腔

表 1 蛹虫草提取物对模型大鼠体重、体温及自主活动次数的影响 ($n=10$)

Table 1 Effects of *Cordyceps militaris* extract on body weight, body temperature and the number of voluntary activities in model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	体重(g) Weight	体温(℃) Body temperature	自主活动次数(次) Number of activities
正常组 Normal group	/	444.21 $\pm$ 22.92	37.63 $\pm$ 0.14	67.56 $\pm$ 26.80
模型组 Model group	/	309.55 $\pm$ 27.11 ^{**}	37.33 $\pm$ 0.20 ^{**}	36.22 $\pm$ 11.69 ^{**}
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	334.29 $\pm$ 12.93 [#]	37.46 $\pm$ 0.18	54.57 $\pm$ 20.16 [#]
	0.720	347.57 $\pm$ 21.18 ^{##}	37.53 $\pm$ 0.21 [#]	62.57 $\pm$ 37.32 [#]
蛹虫草提取物组 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	338.18 $\pm$ 32.85 [#]	37.40 $\pm$ 0.27	45.32 $\pm$ 15.24
	0.180	328.01 $\pm$ 26.29	37.42 $\pm$ 0.17	39.33 $\pm$ 11.05

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

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

表 2 蛹虫草提取物对模型大鼠脏器指数的影响 (mg/g, $n=10$)

Table 2 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the organ index of model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	肾脏指数 Kidney index	睾丸指数 Testis index	附睾指数 Epididymal index	精囊腺指数 Seminal vesicle index
正常组 Normal group	/	6.62 $\pm$ 0.55	8.14 $\pm$ 0.68	2.89 $\pm$ 0.25	3.12 $\pm$ 0.55
模型组 Model group	/	35.22 $\pm$ 4.26 ^{**}	9.84 $\pm$ 0.59 ^{**}	2.98 $\pm$ 0.29	1.81 $\pm$ 0.83 ^{**}
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	26.54 $\pm$ 4.91 ^{##}	9.19 $\pm$ 0.77 [#]	3.10 $\pm$ 0.35	2.54 $\pm$ 0.65 [#]
	0.720	24.99 $\pm$ 3.94 ^{##}	9.18 $\pm$ 0.63 [#]	3.07 $\pm$ 0.35	2.68 $\pm$ 0.68 [#]
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	27.95 $\pm$ 5.75 [#]	9.27 $\pm$ 0.91	3.14 $\pm$ 0.31	2.42 $\pm$ 0.51
	0.180	29.76 $\pm$ 5.71 [#]	9.28 $\pm$ 0.49	3.23 $\pm$ 0.32	2.02 $\pm$ 0.72

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

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

拉伸变形,管壁变薄,部分管壁破裂,偶可见碎片,管腔内精子数量下降;精囊腺腺腔皱襞萎缩变薄,通透性增加,内含物丰度减少。经药物治疗后,各脏器损伤有不同程度的缓解,以蛹虫草提取物高剂量组效果最佳。见图 1。

2.5 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 阳性表达的影响

与正常组相比,模型组睾丸组织 CYP19 平均光密度值显著下降($P<0.01$),CaM、CaMK II 显著增加($P<0.01$);与模型组相比,蛹虫草提取物高剂量组 CYP19 平均光密度值升高($P<0.01$),CaM、CaMK II 降低($P<0.01$),中剂量组 CYP19 表达增加($P<0.05$),CaM 降低($P<0.01$)。见图 2、表 4。

2.6 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠睾丸 CYP19 蛋白表达显著降低($P<0.01$),CaM、CaMK II 显著增加($P<0.01$);经睾丸片或高剂量蛹虫草提取物干预治疗后,模型大鼠 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白表达均得到有效逆转($P<0.01$ 、 $P<0.05$),中剂量组对 CYP19、CaMK II 表达也有显著作用($P<0.05$)。见图 3、表 5。

2.7 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19 mRNA 表达的影响

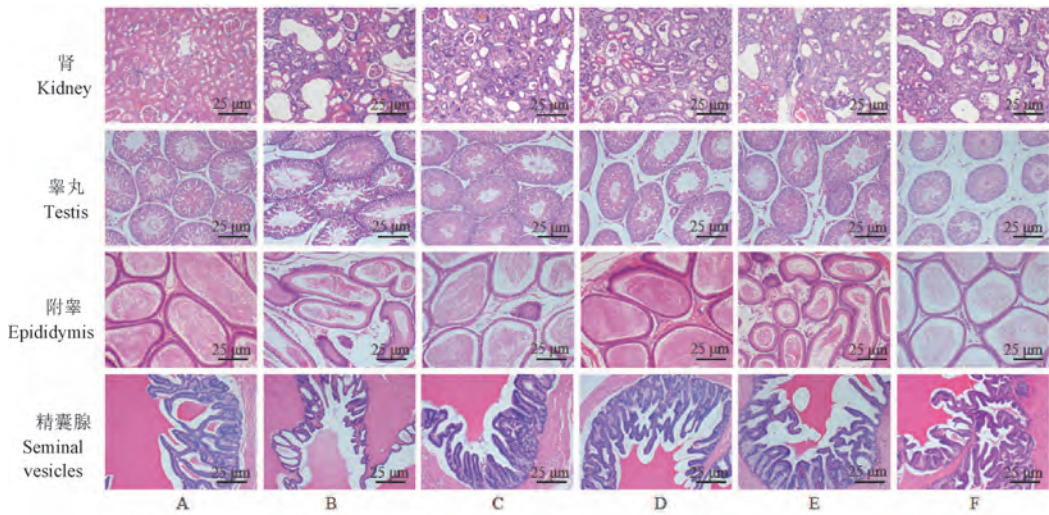
与正常组相比,模型组睾丸 CYP19 mRNA 表达显著降低($P<0.01$);与模型组相比,睾丸片组和蛹虫草提取物高剂量组 CYP19 mRNA 水平显著升高($P<0.05$)。见表 6。

表 3 蛹虫草提取物对模型大鼠血清因子的影响 ($n=6$)
Table 3 Effects of *Cordyceps militaris* extract on serum factors in model rats

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose	GnRH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	T(pg/mL)	E2(pg/mL)
正常组 Normal group	/	70.62±5.78	27.57±2.36	40.14±6.48	50.30±8.67
模型组 Model group	/	53.54±4.12**	23.21±2.85*	28.08±2.44**	61.41±10.20
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	61.14±10.19	24.83±2.51	36.18±4.20##	57.69±3.07
	0.720	67.20±5.41 [#]	26.42±1.13 [#]	32.55±4.46 [#]	51.73±8.81
蛹虫草提取物 <i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	59.79±7.24	24.64±5.89	29.33±2.20	54.85±7.30
	0.180	53.74±9.28	23.56±3.40	28.46±5.16	53.67±9.13

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

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

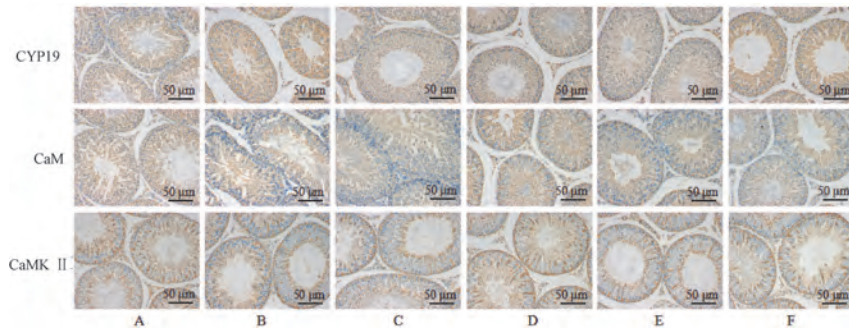


注:A;正常组;B:模型组;C:睾丸片组;D:蛹虫草提取物高剂量组;E:蛹虫草提取物中剂量组;F:蛹虫草提取物低剂量组。

图 1 蛹虫草提取物对模型大鼠组织形态的影响(HE 染色)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 1 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the tissue morphology of model rats (HE staining)



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 睾丸片组; D: 蛹虫草提取物高剂量组; E: 蛹虫草提取物中剂量组; F: 蛹虫草提取物低剂量组。

图 2 各组大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 阳性表达情况 (免疫组化)

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 2 The positive expression of CYP19, CaM and CaMK II in testis of rats in each group (immunohistochemistry)

表 4 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 平均光密度值的影响 ($n=4$)

Table 4 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the average optical density of CYP19, CaM and CaMK II in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19	CaM	CaMK II
正常组 Normal group	/	0.268±0.049	0.099±0.012	0.165±0.017
模型组 Model group	/	0.198±0.019 **	0.208±0.060 **	0.252±0.023 **
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.222±0.007 #	0.147±0.029 #	0.183±0.011 ##
蛹虫草提取物	0.720	0.241±0.015 ##	0.130±0.011 ##	0.200±0.021 ##
<i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	0.233±0.023 #	0.135±0.023 ##	0.222±0.031
	0.180	0.219±0.015	0.161±0.030	0.228±0.051

注: 与正常组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

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

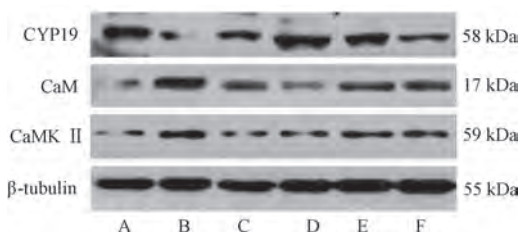
表 5 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 表达的影响 ($n=4$)

Table 5 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the expression of CYP19, CaM and CaMK II in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19	CaM	CaMK II
正常组 Normal group	/	0.572±0.096	0.132±0.067	0.213±0.031
模型组 Model group	/	0.256±0.074 **	0.330±0.053 **	0.542±0.057 **
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.455±0.114 #	0.220±0.027 #	0.261±0.032 ##
蛹虫草提取物	0.720	0.592±0.103 ##	0.198±0.051 ##	0.278±0.045 ##
<i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	0.487±0.095 #	0.294±0.068	0.337±0.068 #
	0.180	0.415±0.080	0.286±0.033	0.352±0.057

注: 与正常组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

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



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 睾丸片组; D: 蛹虫草提取物高剂量组; E: 蛹虫草提取物中剂量组; F: 蛹虫草提取物低剂量组。

图 3 各组大鼠睾丸 CYP19、CaM、CaMK II 蛋白电泳图

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Testicular tablet group. D, *Cordyceps militaris* extract high-dose group. E, *Cordyceps militaris* extract medium-dose group. F, *Cordyceps militaris* extract low-dose group.

Figure 3 Electrophoresis of CYP19, CaM and CaMK II proteins in testis of rats in each group

表 6 蛹虫草提取物对模型大鼠睾丸 CYP19 mRNA 表达的影响 ($n=4$)

Table 6 Effects of *Cordyceps militaris* extract on the expression of CYP19 mRNA in the testis of model rats

组别 Groups	剂量 (g/kg) Dose	CYP19
正常组 Normal group	/	1.000±0.048
模型组 Model group	/	0.466±0.105 **
睾丸片组 Testicular tablet group	0.216	0.773±0.141 #
蛹虫草提取物	0.720	0.827±0.307 #
<i>Cordyceps militaris</i> extract group	0.360	0.739±0.131
	0.180	0.530±0.161

注: 与正常组相比, ** $P<0.01$; 与模型组相比, # $P<0.05$ 。

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

3 讨论

《中华本草》中记载,虫草入肺肾二经,既能滋肺阴,又能补肾阳,主治肾虚,阳痿遗精,腰膝酸痛,病后虚弱等。现代药理研究证实,蛹虫草具有肾保护作用。Sun 等^[10]研究表明,蛹虫草通过影响 Toll 样受体 4/核因子 κ B (toll-like receptor 4/nuclear factor κ B, TLR4/NF- κ B) 氧化还原信号通路改善慢性肾疾病;Cai 等^[11]发现蛹虫草通过调控沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 介导的自噬改善大鼠肾性高血压损伤和肾纤维化;李冰等^[12]研究发现蛹虫草提取物能够同时发挥降血糖和肾保护作用,减缓糖尿病大鼠肾病程进展;此外,蛹虫草对慢性肾衰、肾小球肾炎、肺气虚证等病证也有一定的治疗作用^[13-15]。蛹虫草肾保护作用主要与虫草素以及多糖类成分有关。Kopalli 等^[16]明确来源于药用真菌蛹虫草的虫草素能够减轻自然衰老大鼠体内炎症介导的肾和睾丸组织损伤;虫草素还具有补肾益精、改善性功能的功效^[17],蛹虫草多糖则是蛹虫草治疗糖尿病肾病的主要有效成分^[18]。然而,目前关于蛹虫草对肾阳虚模型动物的研究仅限于小鼠的在体功能及组织病理变化^[19],未涉及相关机制,对于蛹虫草的开发有一定局限。本研究旨在建立肾阳虚大鼠模型,通过予以不同剂量的蛹虫草提取物干预,研究其补肾阳的能效及潜在作用机理。

肾阳虚病理模型主要包括大剂量激素造模、化学药物诱导损伤、手术造模、自然衰老等,其中应用最广泛的是激素造模中的氢化可的松致肾阳虚模型及药物造模中的腺嘌呤致肾阳虚模型,且两者原理均是通过影响机体内分泌轴的功能而引起肾阳虚症状^[20-21]。腺嘌呤是核酸的主要组成成分之一,当机体摄入大剂量腺嘌呤时,在酶的作用下转变成极难溶解于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,沉积于肾小管,导致肾功能低下,同时其具有毒性作用,使肾组织中与糖、脂肪、蛋白质代谢有关的多种酶活性受到抑制,影响肾组织的能量代谢^[22]。经文献调研及前期预实验摸索,本研究采用 200 mg/kg 剂量的腺嘌呤造模,发现大鼠外形消瘦、皮毛无光泽、活动减少、体温降低、尿量明显增多、大便稀溏,表现出典型的肾阳虚症状,模型建立成功。

HPG 轴是机体三大功能轴之一,主要负责调控机体生殖功能。中医认为肾主生殖,肾与生殖系统

功能关系密切,肾虚与 HPG 轴功能异常亦密切相关^[23]。HPG 轴通过下丘脑分泌 GnRH,作用于垂体释放促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、LH,该类激素的合成分泌又进一步作用于性腺组织,调节睾酮、雌二醇等性激素的分泌并反馈于下丘脑,从而调节机体生殖功能^[24]。肾阳虚通常伴随着生殖功能的衰退,性激素分泌紊乱,在雄性中主要表现为睾酮分泌不足。本研究发现,模型大鼠体内 GnRH、LH、睾酮含量均显著下降,雌二醇含量有上升趋势,同时肾、睾丸、附睾、精囊腺等与生殖相关的组织均存在明显损伤,而蛹虫草提取物能够上调 HPG 轴相关激素的水平,恢复 HPG 轴功能,缓解生殖组织的损伤状态。

CYP19 是细胞色素 P450 超基因家族中 19 号家族的唯一成员,负责编码芳香化酶 P450arom 基因,后者与性腺激素的合成分泌密切相关。一方面,CYP 敲除的雄性小鼠不能产生雌激素,导致生殖细胞发育受阻,精子数量及活性明显降低,小鼠生殖功能低下甚至完全不育^[25];另一方面,睾丸组织 CYP19 的过表达会导致雌激素产生过多,也可引起不育^[26]。CYP19 基因主要通过 cAMP 依赖性蛋白激酶信号在转录水平进行调节,对于维持雌雄激素间的平衡、保证机体的正常生理功能具有重要意义^[27]。CaM/CaMK II 信号通路是 cAMP 依赖性蛋白激酶信号传导系统的重要组成部分。CaM 是一种钙结合蛋白,静息态下无生物活性,在胞内 Ca^{2+} 增加时,CaM 会结合形成 Ca^{2+} /CaM 复合物,并通过激活其特异性激酶 CaMK II 发挥生物学活性^[28-29]。CaM 与垂体-靶腺轴的分泌功能密切相关,可以作用于 HPG 轴的不同环节、不同层次,并通过不同的途径对其进行着复杂而精细的调节作用。研究表明,CaM 表达增加可以通过线粒体途径引起睾丸细胞凋亡,抑制 CaMK II 能够缓解内质网应激和氧化损伤,提高睾丸间质细胞的完整性^[30]。本研究发现,模型大鼠睾丸组织 CYP19 mRNA 和蛋白表达均显著降低,CaM、CaMK II 表达显著增加,证实 CYP19 通过 CaM/CaMK II 信号通路介导大鼠生殖损伤,而蛹虫草提取物则能明显逆转该趋势。

综上,蛹虫草提取物能够调节 HPG 轴功能,缓解肾、睾丸等组织损伤,发挥补肾阳功效,其机制可能与调控 CYP19/CaM/CaMK II 信号有关。本研究首次阐明蛹虫草补肾阳的潜在机理,有助于进一步开发应用,下一步继续挖掘其能效作用及潜在靶点。

参考文献:

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 1979.
- [2] 李陈雪, 刘雅芳. 蛹虫草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2019, 33(10): 55-57.
- [3] 左锦辉, 贡晓燕, 董银卯, 等. 蛹虫草的活性成分和药理作用及其应用研究进展 [J]. 食品科学, 2018, 39(21): 330-339.
- [4] Ke Y, Yang LY, Zhu L, et al. The association between CYP19 polymorphism and endometriosis risk: a system review and meta-analysis [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016, 199(4): 42-48.
- [5] Lardone MC, Argandoña F, Flórez M, et al. Overexpression of CYP19A1 aromatase in Leydig cells is associated with steroidogenic dysfunction in subjects with Sertoli cell-only syndrome [J]. Andrology, 2017, 5(1): 41-48.
- [6] 段鹏, 韩慧蓉, 房春燕, 等. 二甲双胍对大鼠垂体-性腺轴钙调蛋白 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(4): 521-523.
- [7] 张希, 廖宇娇, 杨卓, 等. 覆盆子盐制前后对肾阳虚多尿大鼠肾脏改善作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 140-142.
- [8] 鞠成国, 李媛媛, 王巍, 等. 仙茅不同炮制品对腺嘌呤致肾阳虚大鼠的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 101-107.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学(第3版) [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
- [10] Sun T, Dong W, Jiang G, et al. Cordyceps militaris improves chronic kidney disease by affecting TLR4/NF- κ B redox signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 31(3): 7850863.
- [11] Cai Y, Feng Z, Jia Q, et al. Cordyceps cicadae ameliorates renal hypertensive injury and fibrosis through the regulation of SIRT1-mediated autophagy [J]. Front Pharmacol, 2022, 12(10): 801094.
- [12] 李冰, 王静凤, 杨延村, 等. 蛹虫草对糖尿病大鼠肾脏病程发展的抑制作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(15): 255-259.
- [13] 冯云. 蛹虫草抗慢性肾衰有效成分及其分离方法的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [14] 杨楠. 蛹虫草提取物对大鼠系膜增生型肾小球肾炎模型的防治作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.
- [15] 朱铁珍, 张英平, 朱铁英. 蛹虫草菌粉胶囊治疗慢性气管炎(肺肾气虚证) 30 例 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 64-65.
- [16] Kopalli SR, Cha KM, Cho JY, et al. Cordycepin from medicinal fungi Cordyceps militaris mitigates inflammaging-associated testicular damage via regulating NF- κ B/MAPKs signaling in naturally aged rats [J]. Mycobiology, 2022, 50(1): 89-98.
- [17] Chen YY, Chen CH, Lin WC, et al. The role of autophagy in anti-cancer and health promoting effects of cordycepin [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4954.
- [18] 陈丹丹. 基于 JAK/STAT 通路调控足细胞自噬探讨蛹虫草多糖防治糖尿病肾病的作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [19] 陈育, 魏巍, 许晓燕, 等. 蛹虫草对腺嘌呤致肾阳虚证小鼠影响的实验研究 [J]. 四川动物, 2015, 34(4): 594-598.
- [20] 戴冰, 张嘉妮, 杨梦琳, 等. 氢化可的松致肾虚证小鼠模型的建立及相关指标的评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 70-73.
- [21] 陈颖颖, 罗静, 徐愿, 等. 肾阳虚动物模型造模方法评价及进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(11): 2697-2700.
- [22] 张子怡, 陈宝军, 张庆, 等. 肾阳虚证动物模型的造模方法与评价指标 [J]. 福建中医药, 2014, 45(2): 61-63.
- [23] 张嘉妮. 从 HPG 轴角度探讨六味地黄汤及其“补泻”药对的补肾作用机制和药效成分 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [24] 王启新, 陈则华, 罗晓捷, 等. 肉苁蓉不同提取部位改善肾阳虚大鼠性能能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 95-101.
- [25] 南亚昀, 王宗仁, 卢兹凡, 等. 菟丝子提取物对肾阳虚大鼠睾丸 P450arom、CYP19 表达及性激素和精子的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(2): 20-25.
- [26] Carpino A, Rago V, Carani C, et al. Detection of aromatase and estrogen receptors in human Leydig cell tumor [J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(2): 239-244.
- [27] 王慧, 李霞, 张育辉. CYP19 基因表达与芳香化酶活性调控因子的研究进展 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(3): 304-308.
- [28] 高震, 陈婉莹, 张萌, 等. 葛根素对氧糖剥夺细胞模型 CaM、CaMK II、MECP2、BDNF 及 Akt 表达的影响 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(1): 153-157.
- [29] Akizuki K, Ono A, Xue H, et al. Biochemical characterization of four splice variants of mouse Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I [J]. J Biochem, 2021, 169(4): 445-458.
- [30] 吴震, 朱文祥, 刘洪茂, 等. 热应激对睾丸钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(12): 1938-1942.

[收稿日期] 2022-02-28

张慧宇,白振军,李亮,等. 雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 9-15.

Zhang HY, Bai ZJ, Li L, et al. Triptolide attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.002

雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤

张慧宇^{1*}, 白振军¹, 李 亮¹, 张金锋¹, 解佳伟¹, 邓 亮¹, 孟 燕¹, 郭敏芳²

(1.山西大同大学中医药健康服务学院,山西 大同 037009;2.山西大同大学医学院,山西 大同 037009)

【摘要】 目的 基于 Nogo-A/RhoA/ROCK 信号通路探讨雷公藤甲素减轻氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的机制。**方法** CCK8 法检测不同浓度雷公藤甲素对正常 SH-SY5Y 细胞活性的影响以筛选最佳的药物作用浓度;然后将 SH-SY5Y 细胞分为 4 组:正常对照组、模型组、雷公藤甲素(1 nmol/L)干预组、Rho 激酶抑制剂法舒地尔(15 μ g/mL)干预组。CCK8 法检测 SH-SY5Y 细胞活性;JC-1 试剂盒评估线粒体膜电位;免疫荧光染色检测 NogoA、ROCK2 和 GAP43 的表达;Western blot 法检测 GAP43、PSD95、NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达。**结果** CCK8 结果显示,雷公藤甲素的最适作用浓度为 1 nmol/L。与正常对照组比较,模型组细胞活性降低($P < 0.001$);线粒体膜电位下调($P < 0.001$);GAP43 和 PSD95 表达降低($P < 0.001$);同时 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 表达增加($P < 0.001$);雷公藤甲素干预和法舒地尔干预均可以改善 OGD/R 诱导的细胞损伤,使细胞活性增加($P < 0.001$),线粒体膜电位上升($P < 0.001$);上调 GAP43 和 PSD95 表达($P < 0.05$);同时下调 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达($P < 0.001$)。**结论** 雷公藤甲素可以通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。

【关键词】 雷公藤甲素;氧糖剥夺/复糖复氧;神经突生长抑制因子 A;Rho 激酶;突触可塑性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0009-07

Triptolide attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway

ZHANG Huiyu^{1*}, BAI Zhenjun¹, LI Liang¹, ZHANG Jinfeng¹, XIE Jiawei¹, DENG Liang¹, MENG Yan¹, GUO Minfang²

(1. College of Traditional Chinese Medicine Health Service, Shanxi Datong University, Datong 037009, China.

2. Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037009)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of triptolide reducing oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced SH-SY5Y cell injury via the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway. **Methods** The effect of various triptolide concentrations on SH-SY5Y cell proliferation was assessed by CCK8 assays to select the optimal concentration. Cells were divided into normal control, model, triptolide (1 nmol/L) treatment and fasudil (15 μ g/mL) treatment groups. Cell proliferation was assessed by CCK8 assays. A JC-1 assay was used to measure the mitochondrial membrane potential. NogoA, ROCK2 and GAP43 expression was detected by immunofluorescence staining. GAP43, PSD95, NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression was detected by Western blot. **Results** CCK8 assays showed that the optimal concentration

【基金项目】 山西省基础研究计划项目(20210302123478,20210302123476);基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室开放课题(2021sxxyw12);国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室开放课题(2021-KF-04T)。

【作者简介】 张慧宇(1979—),男,副教授,研究方向:中医药防治神经变性疾病。E-mail: snowstom12@163.com

of triptolide was 1 nmol/L. Cell proliferation and the mitochondrial membrane potential of the model group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.001$). Compared with the control group, GAP43 and PSD95 expression was decreased and NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression was increased in the model group ($P < 0.001$). Both triptolide and fasudil increased cell proliferation ($P < 0.001$) the and mitochondrial membrane potential ($P < 0.001$), upregulated GAP43 and PSD95 expression ($P < 0.05$), and downregulated NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression ($P < 0.001$). **Conclusions** Triptolide may alleviate OGD/R-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway.

【Keywords】 triptolide; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; neurite outgrowth inhibitor A; Rho kinase; synaptic plasticity

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

缺血性脑卒中占脑卒中的 80% 以上^[1]。目前其主要的治疗方法仍然是快速溶栓,但是在某些情况下存在缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤^[2]。损伤神经元周围存在的抑制微环境是脑 I/R 损伤后神经功能修复困难的主要原因之一。神经生长抑制因子 A (neurite outgrowth inhibitor A, NogoA) 是构成这种抑制微环境的重要成分^[3]。生理学上, NogoA 信号通过其受体在少突胶质细胞和神经元的发育成熟、髓鞘形成、调节树突棘形态和突触可塑性从而调节大脑的学习和记忆等方面具有重要作用^[4]。NogoA 可以结合 Nogo 受体 (Nogo receptor, NgR), 使其下游的 RhoA/Rho 激酶 (ROCK) 通路激活, 从而抑制轴突再生以及脊髓或脑损伤后的功能恢复^[5]。有研究显示, NogoA 与神经细胞的凋亡密切相关, 并且调节突触的可塑性^[6], 在体内, 阻断 NogoA 可导致皮质锥体神经元的树突棘密度增加, 而抗 NogoA 抗体治疗可以使由皮质控制精确运动的学习得到了改善, 表明 NogoA 是一种重要的突触可塑性调节剂, 也是运动皮层熟练动作学习的调节器^[7]。因此, 消除脑 I/R 损伤后抑制神经再生过程的障碍, NogoA/RhoA/ROCK 通路的下调非常重要。

由于溶栓治疗的时间窗窄, 并且存在 I/R 损伤和费用高等缺点。在各种卒中相关疾病的治疗方法中, 中草药疗法在古代医学体系早有描述^[8]。因此, 众多研究者致力于从中草药中寻找有效的治疗药物。雷公藤甲素是从中草药雷公藤中提取出来的活性成分, 具有神经保护作用^[9]。研究表明雷公藤甲素可以减轻脑 I/R 损伤^[10-11], 然而, 关于雷公藤甲素改善脑 I/R 损伤的机制还有待深入研究。因此, 本实验选用人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y), 采用氧糖剥夺/复糖复氧 (oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导其损伤, 观察雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞的保护作用, 并且基于 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

SH-SY5Y 人源神经母细胞瘤细胞株由军事医学研究院军事认知与脑科学研究所赠送。

1.2 主要试剂与仪器

雷公藤甲素 ($\geq 98\%$, 货号: DL0034) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 法舒地尔 (批号: 2007171) 由天津红日药业公司提供; 胎牛血清 (货号: 16140063)、高糖 DMEM 培养基 (货号: 21013024)、无糖 DMEM 培养基 (货号: 11966025) 和青霉素-链霉素双抗混合液 (货号: 5140163) 均购自美国 Gibco 公司; NogoA 抗体 (货号: 13401)、ROCK2 抗体 (货号: 47012)、突触后密度蛋白-95 (synaptic protein postsynaptic density 95, PSD-95) 抗体 (货号: 3450)、Alex Flour[®] 594 和 Alex Flour[®] 488 标记的 IgG 二抗 (货号: 8889、4412) 均购自美国 CST 公司; NgR 抗体 (ab184556) 购自英国 Abcam 公司; RhoA 抗体 (货号: A0272)、神经元生长相关蛋白 43 (growth associated protein-43, Gap43) 抗体 (货号: A6376)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 IgG 二抗 (货号: AS014) 均购自 ABClonal 公司; CCK8 试剂盒 (货号: C0038)、JC-1 试剂盒 (货号: C2003S) 购自碧云天生物技术有限公司。

FV-1000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); HERAcell 150i 三气培养箱 (美国 Thermo 公司); H1M 酶标仪 (美国伯腾); SYSTEM GelDoc XR⁺ 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop One 超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK8 法筛选 TP 浓度

用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM 完全培养基培养 SY5Y 细胞, 常规传代。将传代细胞 (每毫升 5×10^3 个) 接种于 96 孔板中, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后加入不同浓度的雷公藤甲素 (0、0.1、1、10、50、100、500 nmol/L), 每个浓度设 5 个复孔, 药物处理 24 h 按照说明书操作进行

CCK8 检测,每孔加入 20 μ L CCK8 溶液,CO₂ 培养箱中培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的光密度值(OD 值)。最后计算细胞活力,计算公式为(用药孔 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-调零孔 OD 值) $\times$ 100%。选取可以增加细胞活性的雷公藤甲素浓度为实验使用浓度。

1.3.2 OGD/R 模型的建立及分组

将细胞分为 4 组:正常对照组、模型组、雷公藤甲素干预组(雷公藤甲素组)、Rho 激酶抑制剂法舒地尔干预组(法舒地尔组)。模型组、雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞进行 OGD/R 诱导损伤,细胞更换无糖 DMEM 培养基,雷公藤甲素组和法舒地尔组在更换无糖 DMEM 培养基后分别加入 1 nmol/L 雷公藤甲素和 15 μ g/mL 法舒地尔,3 组细胞置于三气培养箱(94% N₂,5% CO₂,1% O₂,37℃)中培养 4 h,然后模型组更换为完全培养基,雷公藤甲素组和法舒地尔组分别更换含有 1 nmol/L 雷公藤甲素和 15 μ g/mL 法舒地尔的完全培养基。37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后进行后续实验。对照组细胞加完全培养基于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 细胞活性的检测

细胞复糖复氧 24 h 后按照上述 CCK8 检测方法检测 4 组细胞的活性。细胞活性计算公式为(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times$ 100%。评估雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的细胞损伤的保护效果。

1.3.4 线粒体膜电位的检测

将细胞(1×10^4 个/孔)接种于激光共聚焦培养皿内,复糖复氧 24 h 后每孔加入 1 mL JC-1 工作液,37℃ 恒温孵育 20 min 后用 JC-1 染色缓冲液洗涤,于激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.5 免疫荧光染色

复糖复氧 24 h 后,将接种于 24 孔板内细胞爬片上的细胞用 4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 洗涤后用含有 0.3% Triton X-100 和 1% 牛血清白蛋白的封闭液室温封闭 1 h,加入一抗 NogoA、ROCK2、GAP43 (1:1000),4℃ 过夜后加入 594 或 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h 后用封片液封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.6 Western blot 法检测

复糖复氧 24 h 后,加入 RIPA 裂解液提取细胞蛋白质,使用微量分光光度计进行蛋白定量并将各组蛋白浓度调齐。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,然后将蛋白转至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,加入一抗 GAPDH (1:1000) 或 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2、PSD-95、GAP43 (1:500),4℃ 过夜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5000),室温孵育 2 h 后 TBST 洗膜,最后用凝胶成像系统显影。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,所有实验均重复 3 次。组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤甲素浓度筛选

CCK8 结果显示,当雷公藤甲素浓度 ≤ 10 nmol/L 时,细胞受药物影响小,细胞活力与对照孔相比差异无显著性意义;当雷公藤甲素浓度 ≥ 50 nmol/L 时,细胞活力下降,与对照孔相比差异有显著性意义($P < 0.001$),见表 1。可见雷公藤甲素浓度在 ≤ 10 nmol/L 时对细胞无毒性,而且雷公藤甲素浓度为 0.1 nmol/L 和 1 nmol/L 时可增加细胞活性,因此后续我们选择雷公藤甲素浓度为 1 nmol/L 进行实验。

2.2 雷公藤甲素对细胞活性的影响

CCK8 结果显示,模型组的细胞活性较正常对照组明显降低($P < 0.001$);与模型组相比,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞活性有显著性提高($P < 0.001$)。并且雷公藤甲素组和法舒地尔组相比,细胞活性无显著差异,见表 2。

表 1 不同雷公藤甲素浓度对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响($n=5$)

Table 1 Effects of triptolide of different concentrations on the viability of normal SH-SY5Y cells

给药浓度(nmol/L) Drug concentration	细胞活性(%) Cell viability
0	100.00 $\pm$ 0.00
0.1	104.09 $\pm$ 5.37
1	104.63 $\pm$ 7.43
10	97.32 $\pm$ 6.68
50	71.86 $\pm$ 5.65 ^a
100	45.29 $\pm$ 3.11 ^a
500	40.79 $\pm$ 2.63 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.001$.

表 2 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用($n=5$)

Table 2 Protective effect of triptolide on SH-SY5Y cells injured by OGD/R

组别 Groups	细胞活性(%) Cell viability
正常对照组 Normal control group	100.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	72.92 $\pm$ 3.96 ^a
雷公藤甲素组 Triptolide group	86.67 $\pm$ 2.59 ^{bc}
法舒地尔组 Fasudil group	88.01 $\pm$ 2.34 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.001$;与模型组比较,^b $P < 0.001$;与法舒地尔组比较,^c $P > 0.05$ 。

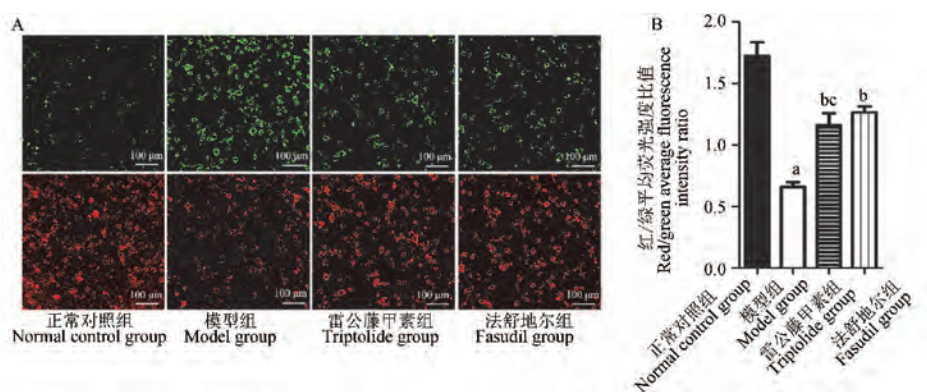
Note. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.001$. Compared with the model group, ^b $P < 0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P > 0.05$.

2.3 雷公藤甲素对细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位下降时 JC-1 产生绿色荧光;线粒体膜电位升高时 JC-1 产生红色荧光。结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞的红/绿荧光强度比值明显下降($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞的红/绿荧光强度比值均显著增加($P<0.001$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比,红/绿荧光强度比值无显著差异见图 1。

2.4 雷公藤甲素对突触蛋白的影响

免疫荧光染色和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞突触相关蛋白 GAP43 和 PSD-95 的表达明显下降($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞 GAP43 和 PSD-95 的表达均显著升高($P<0.05$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比无显著差异,具体内容详见图 2。

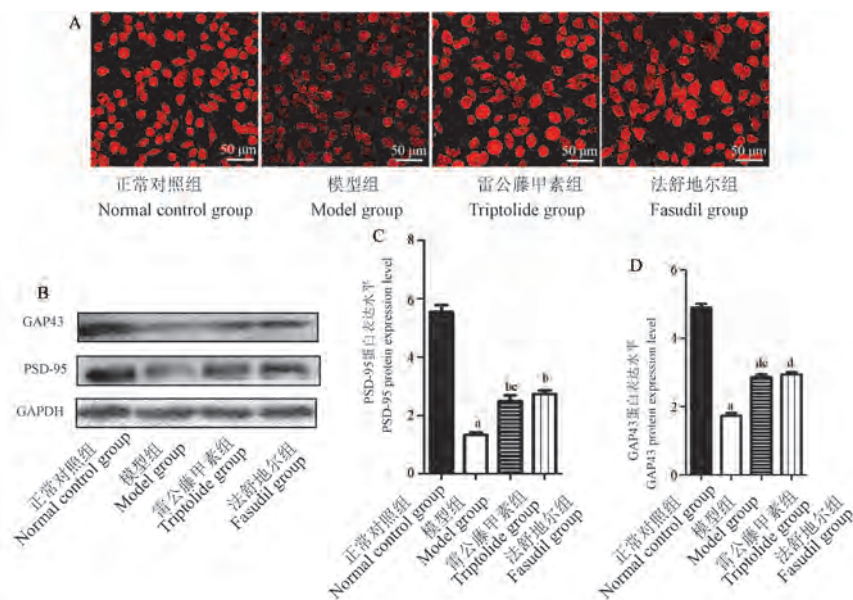


注:A:JC-1 染色荧光图;B:各组细胞红/绿平均荧光强度比值的统计图。与正常对照组比较, ^a $P<0.001$;与模型组比较, ^b $P<0.05$;与法舒地尔组比较, ^c $P>0.05$ 。

图 1 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

Note. A, JC-1 staining fluorescence diagram. B, Statistical chart of red/green average fluorescence intensity ratio of each group cells. Compared with the normal normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 1 Effect of triptolide on the mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells injured by OGD/R



注:A:免疫荧光染色检测 GAP43 的表达;B:GAP43 和 PSD-95 蛋白免疫印迹条带图;C: PSD-95 蛋白表达水平统计图;D:GAP43 蛋白表达水平统计图。与正常对照组比较, ^a $P<0.001$;与模型组比较, ^b $P<0.01$, ^d $P<0.001$;与法舒地尔组比较, ^c $P>0.05$ 。

图 2 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞突触蛋白的影响

Note. A, Immunofluorescence staining detect the expression of GAP43. B, Western blot assay of GAP43 and PSD-95. C, Statistical chart of PSD-95 protein expression level. D, Statistical chart of GAP43 protein expression level. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the normal model group, ^b $P<0.01$, ^d $P<0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 2 Effect of triptolide on the expression of synaptic protein in SH-SY5Y cells injured by OGD/R

2.5 雷公藤甲素对 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路蛋白的影响

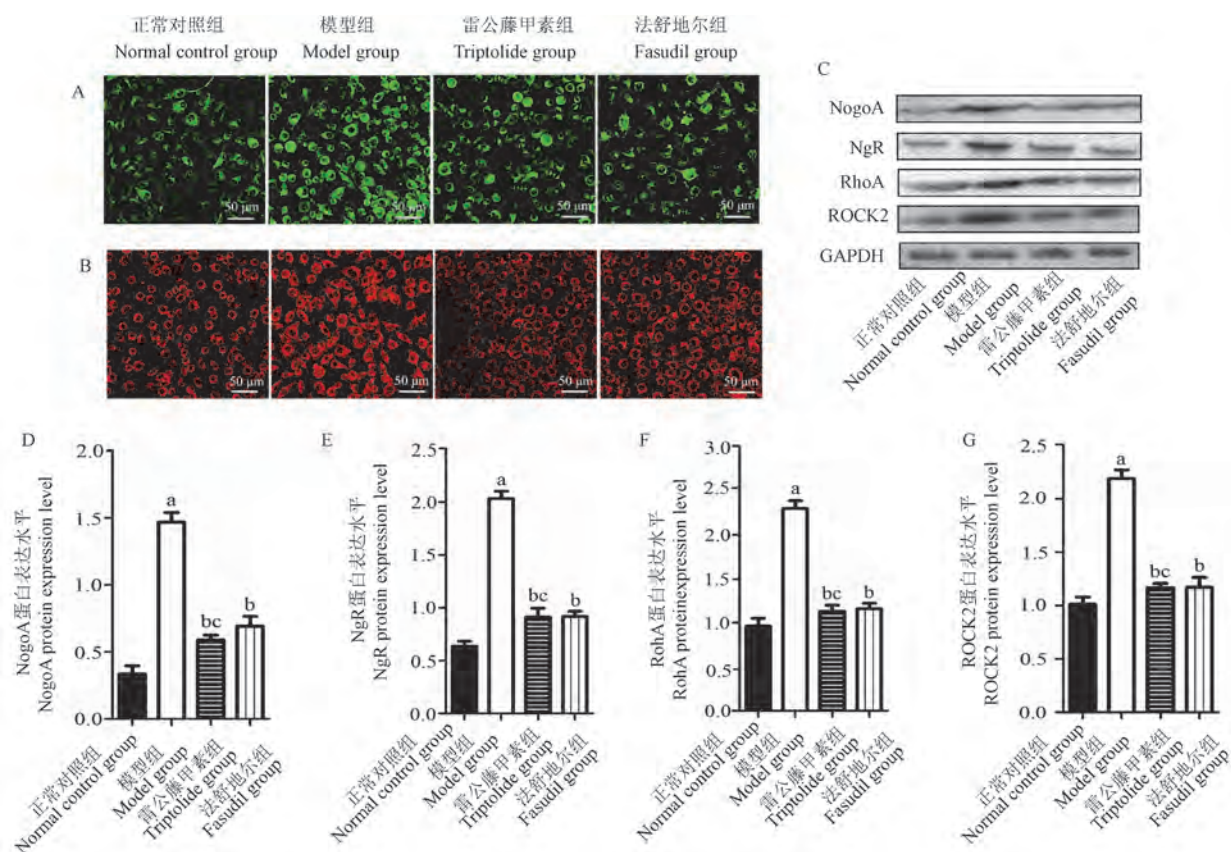
免疫荧光染色和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 的表达均明显增加 ($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 的表达均下调 ($P<0.001$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比无显著差异,见图 3。

3 讨论

多项研究表明,雷公藤甲素可以改善脑 I/R 损伤,其机制可能与抑制氧化应激和神经炎症、调节自噬、抗凋亡等有关^[12-13]。因此雷公藤甲素可能成为脑卒中的潜在治疗药物。本实验在体外建立

SH-SY5Y 细胞的 OGD/R 损伤模型,作为脑 I/R 损伤的细胞模型,观察了雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护效果。CCK8 结果显示 OGD/R 可以导致细胞活性降低,而雷公藤甲素干预增加了细胞活性,减轻了细胞损伤。JC-1 染色显示了同样的结果,模型组细胞的线粒体膜电位下降,雷公藤甲素干预可以使线粒体膜电位升高。表明雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的细胞损伤具有保护效应。

GAP43 是轴突生长锥的主要蛋白,被认为是轴突可塑性的内在决定因素,是轴突再生的主要标志物,参与神经元的分化、可塑性和再生^[14]。GAP43 表达增加可能是脑缺血后功能恢复的机制之一^[15]。PSD-95 是维持兴奋性神经元突触后密度区建立的



注:A:免疫荧光染色检测 NogoA 的表达;B:免疫荧光染色检测 ROCK2 的表达;C:NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 蛋白免疫印迹条带图;D:NogoA 蛋白表达水平统计图;E:NgR 蛋白表达水平统计图;F:RhoA 蛋白表达水平统计图;G:ROCK2 蛋白表达水平统计图。与正常对照组比较, ^a $P<0.001$;与模型组比较, ^b $P<0.001$;与法舒地尔组比较, ^c $P>0.05$ 。

图 3 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路蛋白的影响

Note. A, Immunofluorescence staining detect the expression of NogoA. B, Immunofluorescence staining detect the expression of ROCK2. C, Western blot assay of NogoA, NgR, RhoA and ROCK2. D, Statistical chart of NogoA protein expression level. E, Statistical chart of NgR protein expression level. F, Statistical chart of RhoA protein expression level. G, Statistical chart of ROCK2 protein expression level. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the model group, ^b $P<0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 3 Effect of triptolide on the expression of NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway protein in SH-SY5Y cells injured by OGD/R

关键,与神经元功能和存活密切相关,PSD-95 蛋白可以通过对抗兴奋性毒性为脑卒中提供神经保护作用,PSD-95 水平增加可以促进突触可塑性^[16]。免疫荧光和 Western blot 结果均显示,OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞中 GAP43 和 PSD-95 的表达均减少,表明 OGD/R 在诱导细胞损伤的同时减弱了神经元突触功能。而雷公藤甲素干预不仅可以减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤,还可以使 GAP43 和 PSD-95 表达增加,促进突触可塑性。

脑 I/R 损伤的病理生理过程极为复杂。而成人脑组织缺血缺氧后通过轴突再生或者代偿性纤维生长来自修复是极为有限且不完全的,原因有多方面,包括神经营养因子的减少、抑制性蛋白的产生、胶质瘢痕的形成等等,会形成抑制性微环境,从而限制受损神经元的结构可塑性^[17]。其中 NogoA 作为轴突再生的主要障碍受到了广泛关注。NogoA 通过激活细胞内 RhoA/ROCK 通路,抑制轴突生长,阻碍神经再生和修复^[18]。有研究显示,在全脑缺血大鼠中,NogoA 的表达在 6 h 显著增加,持续 7 d^[19]。Eslamboli 等^[20]报告绒猴脑缺血后 2 个月内 NogoA 水平持续升高。并且在脑 I/R 损伤的动物模型脑组织中 NogoA 也表现为升高状态^[21-22]。因此,NogoA 参与缺血性脑卒中的病理过程。而抗 NogoA 免疫疗法可改善中枢神经损伤后的神经再生和神经可塑性,并改善脑卒中动物模型的预后^[23]。还有研究显示,脑 I/R 损伤大鼠脑组织中 RhoA 和 ROCK 基因和蛋白表达水平均显著升高^[24],而 ROCK 抑制剂法舒地尔可以刺激脑 I/R 损伤大鼠轴突再生并增加脑血流量^[25]。这些结果均表明,抑制 NogoA/RhoA/ROCK 通路可能有助于 I/R 脑损伤的恢复。虽然有研究表明雷公藤甲素可以改善脑 I/R 损伤,但是其机制尚不明确。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK 的表达均增加,与模型组相比,雷公藤甲素干预组细胞 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK 的表达均减少。我们同时采用了 ROCK 抑制剂法舒地尔对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞进行干预。观察到雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用与法舒地尔相当,法舒地尔干预同样能使细胞活性和线粒体膜电位增加,并且使 GAP43 和 PSD-95 的表达增加,NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达下调,并且和雷公藤甲素干预组相比没有统计意义。这些结果均表明雷公藤甲素可能通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK

通路发挥神经保护作用。

综上所述,雷公藤甲素可能通过抑制神经元内 NogoA/RhoA/ROCK 通路的激活改善 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤,并且促进突触可塑性。此研究为深入探讨雷公藤甲素对脑 I/R 损伤的保护作用以及作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7609.
- [2] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [3] Wälchli T, Pernet V, Weinmann O, et al. Nogo-A is a negative regulator of CNS angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(21): 1943-1952.
- [4] Tang BL. Nogo-A and the regulation of neurotransmitter receptors [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(11): 2037-2038.
- [5] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 799-811.
- [6] Guo MF, Zhang HY, Zhang PJ, et al. Fasudil reduces β -amyloid levels and neuronal apoptosis in APP/PS1 transgenic mice via inhibition of the Nogo-A/NgR/RhoA signaling axis [J]. *J Integr Neurosci*, 2020, 19(4): 651-662.
- [7] Zemmar A, Weinmann O, Kellner Y, et al. Neutralization of Nogo-A enhances synaptic plasticity in the rodent motor cortex and improves motor learning *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(26): 8685-8698.
- [8] Luo Y, Wang CZ, Hesse-Fong J, et al. Application of Chinese medicine in acute and critical medical conditions [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1223-1235.
- [9] Zhang L, Chang J, Zhao Y, et al. Fabrication of a triptolide-loaded and poly-gamma-glutamic acid-based amphiphilic nanoparticle for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 2051-2064.
- [10] Jin XQ, Ye F, Zhang JJ, et al. Triptolide attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats through the inhibition the nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 1395-1403.
- [11] Pan W, Xu Z. Triptolide mediates Wnt/ β -catenin signalling pathway to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Folia Neuropathol*, 2020, 58(4): 324-333.
- [12] Yang Y, Gao K, He Z, et al. Autophagy upregulation and apoptosis downregulation in DAHP and triptolide treated cerebral ischemia [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 120198.
- [13] Zhang B, Song C, Feng B, et al. Neuroprotection by triptolide against cerebral ischemia/reperfusion injury through the inhibition of NF- κ B/PUMA signal in rats [J]. *Ther Clin Risk Manag*,

- 2016, 12: 817–824.
- [14] Frey D, Laux T, Xu L, et al. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity [J]. J Cell Biol, 2000, 149(7): 1443–1454.
- [15] Zhao H, Liu ZD, Zhang YB, et al. NEP140 promotes myelin regeneration via upregulation of GAP43 and MAP2 expression after focal cerebral ischemia in rats [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6): 844.
- [16] Ugalde-Triviño L, Díaz-Guerra M. PSD-95: an effective target for stroke therapy using neuroprotective peptides [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12585.
- [17] Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(9): 703–713.
- [18] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409(6818): 341–346.
- [19] Zhou C, Li Y, Nanda A, et al. HBO suppresses NogoA, NgR or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2): 368–376.
- [20] Eslamboli A, Grundy RI, Irving EA. Timedependent increase in NogoA expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys [J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2): 8993.
- [21] Zhai ZY, Feng J. Constraint-induced movement therapy enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia/reperfusion [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(10): 1743–1754.
- [22] Hong L, Chen W, He L, et al. Effect of naoluoxtong on the NogoA/RhoA/ROCK pathway by down-regulating DNA methylation in MCAO rats [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114559.
- [23] Kumar P, Moon LD. Therapeutics targeting Nogo-A hold promise for stroke restoration [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(2): 200–208.
- [24] 邓莉, 赵延礼, 何宗钊, 等. 基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 73–78.
- [25] Fukuta T, Asai T, Sato A, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil [J]. Int J Pharm, 2016, 506(1–2): 129–137.

[收稿日期] 2022-05-19

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgswdw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!

韩敏, 易旭, 游绍伟. 酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测及白藜芦醇干预作用机制的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 16-25.

Han M, Yi X, You SW. Liver protein expression profile of AFLD mice determined by four-dimensional label-free quantitative proteomics and the therapeutic effect of resveratrol [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 16-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.003

酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测 及白藜芦醇干预作用机制的探讨

韩 敏¹, 易 旭^{2*}, 游绍伟²

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550003)

【摘要】 目的 应用蛋白质组学方法分析酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver disease, AFLD) 小鼠肝组织蛋白表达谱变化及白藜芦醇干预影响。**方法** 采用 NIAAA 法制备 C57BL/6J 小鼠 AFLD 模型, 连续 9 d 灌胃给予白藜芦醇 (400 mg/kg) 干预。采用 4D 非标定量蛋白质组方法对各实验组小鼠肝组织中的蛋白质进行鉴定和定量。以同时满足倍数变化 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 且 $P < 0.05$ 的条件对正常对照组与 AFLD 组、AFLD 组与白藜芦醇干预组, 正常对照组与白藜芦醇等 3 个比较组中显著上调或下调差异表达蛋白进行筛选, 然后进行差异表达蛋白的 GO 分类、KEGG 通路富集和蛋白质网络互作分析。**结果** 分别鉴定和定量到 4513、3763 个蛋白质, 筛选出 1228 个差异表达蛋白和 11 个差异共表达蛋白。与对照组比较 ($P < 0.05$), AFLD 组分别有 370、324 个蛋白质显著下调和上调, 白藜芦醇干预组分别有 40、43 个蛋白质显著上调和下调; 与 AFLD 组比较 ($P < 0.05$), 白藜芦醇干预组分别有 224、227 个蛋白质显著上调和下调。1228 个差异表达蛋白分别涉及 GO 注释的 40 个生物学过程、36 个细胞组成、38 个分子功能和 45 条 KEGG 通路, 11 个差异共表达蛋白经 GO、KEGG 及蛋白质网络互作分析, 其中 9 个差异共表达蛋白涉及 9 种分子功能、5 个差异共表达蛋白涉及 5 条信号通路, 4 个差异共表达蛋白发生了相互作用。**结论** 慢性酒精摄入后小鼠肝组织蛋白表达谱发生了显著变化, 硫转移酶家族胞浆 1B 成员 1 (sulfotransferase family cytosolic 1B member 1, Sult1b1)、载脂蛋白 A-IV (apolipoprotein A-IV, ApoA4)、甘油-3-磷酸酰基转移酶 3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, Gpat3)、环氧化物水解酶 1 (epoxide hydrolase 1, Ephx1) 等 4 种蛋白质表达水平变化与 AFLD 的发生和白藜芦醇的 AFLD 干预作用具有密切关系。

【关键词】 酒精性脂肪肝; 白藜芦醇; 4D 非标量蛋白质组

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0016-10

Liver protein expression profile of AFLD mice determined by four-dimensional label-free quantitative proteomics and the therapeutic effect of resveratrol

HAN Min¹, YI Xu^{2*}, YOU Shaowei²

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China.

2. the Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

【Abstract】 Objective Proteomics were used to analyze changes in the liver protein expression profile of AFLD mice and the effect of resveratrol treatment. **Methods** The AFLD model of C57BL/6J mice was prepared by NIAAA method, and resveratrol (400 mg/kg) was administered orally for 9 days. Proteins in the liver tissues were quantified by the 4D non-standard quantitative proteomic method. Under conditions of multiple changes ≥ 1.5 or ≤ 0.67 and $P < 0.05$, significantly up- or down-regulated differentially expressed proteins in three comparison groups were screened. GO

【基金项目】 国家自然科学基金 (81660752) 结余经费 (3040-040210081, 3054-054210007)。

【作者简介】 韩敏 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肝病的发生与防治基础。E-mail: 2523035077@qq.com

【通信作者】 易旭 (1976—), 女, 教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向: 肝病的发生与防治基础。E-mail: yixu2013@yeah.net

classification, KEGG pathway enrichment, and protein network interaction analysis of differentially expressed proteins were carried out. **Results** Totals of 4513 and 3763 proteins were identified and quantified, respectively, and 1228 differentially expressed proteins and 11 differentially coexpressed proteins were screened. Compared with the control group ($P < 0.05$), 370 and 324 proteins were significantly down- and up-regulated in the AFLD group. Compared with the AFLD group ($P < 0.05$), 224 and 227 proteins were significantly up- and down-regulated, respectively, in the resveratrol treatment group. A total of 1228 differentially expressed proteins were involved in 40 biological processes, 36 cellular components, 38 molecular functions, and 45 KEGG pathways annotated by GO classification. A total of 11 differentially coexpressed proteins were screened and found to be related to 9 molecular functions and 5 signaling pathways, of which 4 differentially coexpressed proteins interacted. **Conclusions** After chronic alcohol intake, the protein expression profile of mouse liver tissue changes significantly. The changes in expression of Sult1b1 (sulfotransferase family cytosolic 1B member 1), Apoa4 (apolipoprotein A-IV), Gpat3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3), and Ephx1 (epoxide hydrolase 1) were closely related to AFLD occurrence and the therapeutic effect of resveratrol on AFLD.

【Keywords】 alcoholic fatty liver; resveratrol; 4D label-free quantitative proteomics

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

酒精性脂肪肝 (alcoholic fatty liver disease, AFLD) 是酒精性肝病逐渐发展和治疗的关键病理前提^[1-2]。尽管对酒精诱导脂肪肝的病理生理学进行了广泛的研究,但在过去 50 年中,除了禁酒以及对症处理和营养支持外,仍然没有针对性的治疗^[3-4]。白藜芦醇是一种存在于红酒和葡萄的膳食多酚,研究显示在减轻酒精性和非酒精性肝功能障碍、胆汁淤积性肝损伤、化学性肝毒性、肝缺血再灌注等方面具有独特的药理活性^[5-8]。Tang 等^[9]发现白藜芦醇处理减少了油酸和酒精作用后的 HepG2 细胞内脂滴形成。类似地, Tang 等^[10]、Kasdallah-Grissa 等^[11]、Chen 等^[12]和 Ma 等^[13]发现,白藜芦醇除可能通过诱导自噬对酒精性脂肪肝变性具有保护作用外,膳食补充或服用白藜芦醇可降低酒精诱导的大鼠或 C57BL/6J 小鼠肝的氧化应激和凋亡,增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 等抗氧化酶活性,上调肝缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 蛋白表达,从而减少酒精性肝损伤。白藜芦醇也作为蛋白质去乙酰化酶 SIRT1 的激动剂,可以通过上调肝中 SIRT1-AMPK 信号系统阻止乙醇喂养小鼠酒精性脂肪肝的发生^[14-18]。尽管白藜芦醇的有益作用已在各种酒精性肝病的动物和细胞模型中得到充分证实,但其具体作用分子机制仍不清楚。使用多种蛋白质质谱技术分别在一定程度上揭示了大鼠或小鼠肝组织在摄入不同程度酒精后的蛋白质表达变化^[19-22]。遗憾的是,这些研究结果较零散,且对 AFLD 这一重要酒精性肝病病理初始

阶段的肝蛋白质表达谱变化缺乏了解^[23-24]。因此,本文运用 4D 非标定量蛋白质组学技术检测 AFLD 小鼠肝组织蛋白质表达情况,并由此探索白藜芦醇介导的抗 AFLD 干预作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 9 只, 8~10 周龄, 体重 (22 $\pm$ 2) g, 由北京唯尚立德生物科技有限公司提供 [SCXK (京) 2021-0010]。饲养于贵州医科大学实验动物中心 (北校区) 带有 IVC 系统的饲养房内 [SYXK (黔) 2018-0001], 20~23℃。实验前适应性喂养 1 周, 自由进食 SPF 级鼠饲料和自由饮用灭菌自来水。实验过程严格遵守 3R 原则。动物实验由贵州中医药大学伦理委员会审批 (20210093)。

1.2 主要试剂与仪器

BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (中国碧云天公司, 生产编号: P0011); 胰蛋白酶 (美国 Promega, 生产编号: V5117); 乙腈 (美国 Thermofisher scientific, 生产编号: 204433); 甲酸 (美国 Fluka, 生产编号: A117-50); 二硫苏糖醇 (美国 Sigma, 生产编号: D9163-25G)。除盐柱 (Phenomenex, 货号: 8B-S100-EBJ); NanoElute 液相色谱仪、Tims TOF Pro 飞行时间质谱仪 (美国 bruker)。

1.3 实验方法

1.3.1 药物制备

运用高压灭菌的 30% koliphor HS15 (BASF, 30944788Q0) 制备白藜芦醇 (sigma, R5010) 溶液。

1.3.2 动物分组与处理

小鼠分为对照组(C)、AFLD组(M)及白藜芦醇干预组(R),采用 Lieber-DeCarli 酒精液体饲料自由摄入+1次95%乙醇灌胃的 NIAAA 法制备小鼠 AFLD 模型和给予 400 mg/kg 白藜芦醇灌胃处理,具体方法见以往发表文章^[25]。最后1次用药后24 h 收集肝组织,以备蛋白组学检测分析用。

1.3.3 肝组织总蛋白质制备和胰蛋白酶水解

取适量-80℃保存的肝组织,用液氮研磨成粉末,加入 40 μL 体积含 8 mol/L 尿素、1%蛋白酶抑制剂、3 μmol/L 去乙酰化酶抑制剂、50 mmol/L 烟酰胺的裂解缓冲液,进行3次高强度超声裂解。4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 后,收集上清液,蛋白质浓度用 BCA 法测定。取等量蛋白质样品和适量标准蛋白质混合物,加入终浓度为 20% v/v 的三氯乙酸,充分混合,4℃沉淀 2 h。500 r/min 离心 5 min 后,使用预冷丙酮洗涤和沉淀样品。在最终浓度为 200 mmol/L 的四甲基溴化铵溶液中进行超声分散,然后添加 1/50 比例的胰蛋白酶过夜处理,加入最终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇,然后在 56℃下还原 30 min。

1.3.4 液相色谱-质谱联用分析

分别制备含有 2%乙腈和 0.1%甲酸的液相色谱流动相 A 溶液和含有 100%乙腈和 0.1%甲酸的 B 溶液,然后通过纳米管 UHPLC 系统分离溶解在流动相 A 溶液中的肽。将流速设置为 300 nL/min,按 2%~5% B, 0~1 min 进行;5%~27% B, 1~76 min; 27%~35% B, 76~82 min 和 35%~85% B, 82~86 min。分离的肽经毛细管离子源电离,电压为 1.75 kV,然后进行一次和二次(扫描范围为 100~1700)串联质谱分析,动态排除时间扫描为 30 s。

1.3.5 肝组织蛋白组学的生物信息学分析

(1) 数据库搜索

借助 Maxquant (v1.6.15.0) 进行二级质谱数据检索,在 Mus_musculus_10090_SP_20201214 中有蛋白质序列。FASTA (17 063 序列) 蛋白质数据库构建理论二级光谱数据库,搜索质谱产生的二级光谱,并与理论二级光谱图进行比较,通过算法评分和过滤得到匹配的理论肽序列,完成样品蛋白质的识别,识别出的蛋白质特异性肽可以识别蛋白质信息。

(2) 蛋白质的定量分析及差异表达蛋白的筛选

将肽段在不同样本中的肽信号强度值通过中

心化变化后得到相应的相对定量值,进一步采用中位数归一化方法校正后用于计算蛋白的相对定量值。最后采用皮尔森相关性、主成分分析和相对标准差三种统计分析方法对蛋白质定量结果进行重复性检验,使定量结果具有统计学一致性。以重复定量值的平均值比值作为各蛋白质在 AFLD 组/对照组(M/C)、白藜芦醇组/AFLD 组(R/M)、白藜芦醇组 and 对照组(R/C) 3 个样本比较对中的表达差异倍数,经过 Log2 对数转换后进行 *t* 检验分析,并计算相应的 *P* 值,以此作为显著性指标。以满足 $P < 0.05$ 和差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 两个条件进行显著上调或下调的差异表达蛋白筛选,将同时在 3 个样本比较组中显著差异表达的蛋白视为差异共表达蛋白。

(3) 差异表达蛋白的 GO、KEGG 分析及蛋白质互作网络分析

对每个比较组的差异表达蛋白进行了基因本体论(GO)分类和 KEGG 通路分析。将 3 个比较组中共表达的差异蛋白进行 GO 功能富集及 KEGG 通路分析,然后将 3 个比较组中筛选出的差异共表达蛋白的蛋白序列与 STRING (v. 11.0) 蛋白网络互作数据库比对,根据 confidence score > 0.4 提取得到差异蛋白互作关系,并对差异蛋白互作网络进行可视化展示。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。组间蛋白差异倍数比较采用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 AFLD 小鼠肝脂肪变性的影响

经油红“O”染色后镜下观察,发现白藜芦醇干预后 AFLD 小鼠肝细胞脂肪变性显著减轻,具体结果可参见以往发表论文^[24]。

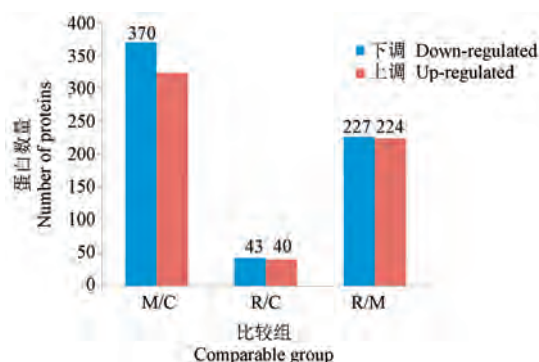
2.2 肝组织蛋白质表达质谱鉴定、定量及差异表达蛋白质筛选结果

各实验组共鉴定出 4513 个蛋白质,其中定量蛋白质有 3763 个。M/C、R/M 和 R/C 3 个样本比较组共筛选出 1228 个显著差异表达蛋白质。与对照组比较($P < 0.05$), AFLD 组、白藜芦醇干预组小鼠肝组织中分别有 324、40 个蛋白表达显著上调和分别有 370、43 个蛋白表达显著下调。与 AFLD 组比较($P < 0.05$),白藜芦醇干预组小鼠肝组织分别有

224、227 个蛋白表达显著上调和下调(如图 1)。白藜芦醇干预后能够将模型组中 198 个显著上调、171 个显著下调表达的蛋白质分别相应地显著下调和上调。运用火山图分析 3 个样本比较组之间蛋白质表达水平的差异(如图 2)。

2.3 差异表达蛋白的功能富集分析结果

1228 个差异表达蛋白的 GO 功能富集分析显示,M/C、R/M 和 R/C 三个比较组对分别涉及 19、10、11 个生物过程、19、9、8 个细胞组成和 14、11、13 个分子功能的变化(如图 3),此外,分别有 13、15 和 17 个 KEGG 通路显著富集(如图 4)。

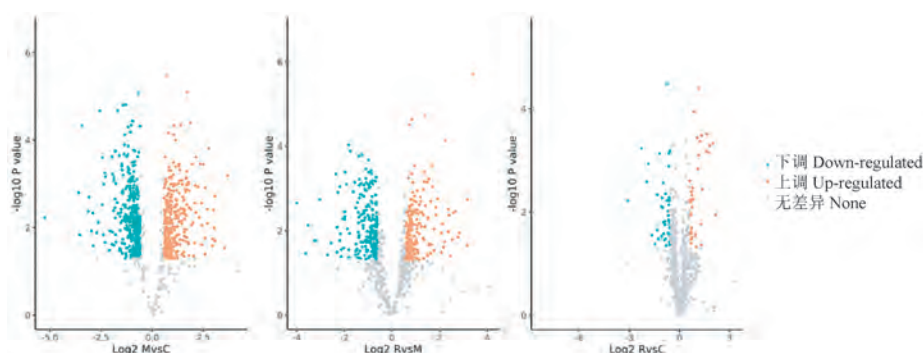


注:M/C:AFLD 组/对照组;R/C:白藜芦醇组/对照组;R/M:白藜芦醇组/AFLD 组。蛋白表达相对定量值满足 $P < 0.05$, 差异倍数 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 被分别视为显著上调(红色)或下调(蓝色)。

图 1 三个样本比较组差异表达蛋白质筛选

Note. M/C, AFLD group/control group. R/C, Resveratrol group/control group. R/M, Resveratrol group/AFLD group. The relative quantitative value of protein expression meets the $P < 0.05$, and the difference multiple ≥ 1.5 or ≤ 0.67 is regarded as significantly up-regulated (red) or down-regulated (blue), respectively.

Figure 1 Screening of differentially expressed proteins in three sample comparison groups



注:图中红色和绿色点分别代表上调、下调的差异表达蛋白。

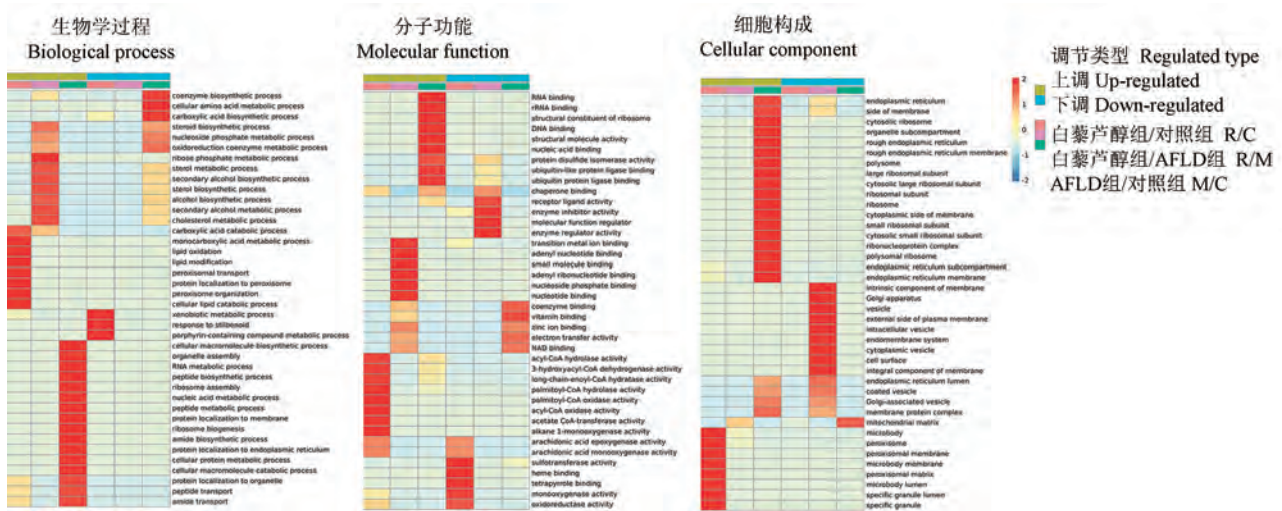
图 2 三个样本比较组差异表达蛋白质的火山图分析

Note. The red and green dots in the figure represent the up-regulated and down-regulated differentially expressed proteins respectively.

Figure 2 Volcanic map analysis of differentially expressed proteins in three sample comparison groups

2.4 差异共表达蛋白筛选及 GO 功能、KEGG 通路分析

在 M/C、R/C、R/M 3 个比较组中筛选出 11 个差异共表达蛋白质,其中推测水解酶 (putative hydrolase RBBP9, Rbbp9),白细胞弹性蛋白酶抑制剂 A (leukocyte elastase inhibitor A, Serpinb1a),蛋氨酸-R-亚砷还原酶 B1 (methionine-R-sulfoxide reductase B1, Msrb1),硫转移酶家族胞质 1B (sulfotransferase family cytosolic 1B, Sult1b1)等 4 个蛋白在模型组中显著下调 0.08~0.39 倍,过氧化物酶体膜蛋白 (peroxisomal membrane protein, Slc25a17),载脂蛋白 A-IV (apolipoprotein A-IV, ApoA4),UDP-N-乙酰己糖胺焦磷酸化酶样蛋白 1 (UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase-like protein 1, Uap1l1)内质网金属肽酶 1 (endoplasmic reticulum metalloproteinase 1, Ermp1),甘油-3-磷酸酰基转移酶 3 (glycerol-3-phosphate acyltransferase 3, Gpat3),环氧化物水解酶 1 (epoxide hydrolase 1, Ephx1),STIP1 同源性含 U 盒蛋白 1 (STIP1 homology and U box-containing protein 1, Stub1)等 7 个蛋白显著上调 2.44~6.79 倍,相应地,经白藜芦醇干预后能够分别上调 1.6~6.0 倍和下调 0.26~0.63 倍。GO 功能富集分析显示,除 Rbbp9、Ermp1 2 个蛋白质无分子功能外,其余 9 个蛋白质涉及 9 种分子功能(如表 1)。此外,KEGG 通路分析显示其中 ApoA4、Uap1l1、Slc25a17、Gpat3、Ephx1 等 5 个蛋白质分别涉及脂肪消化和吸收、过氧化物、异生物质 CYP450 代谢和代谢等 5 条通路(如图 5)。

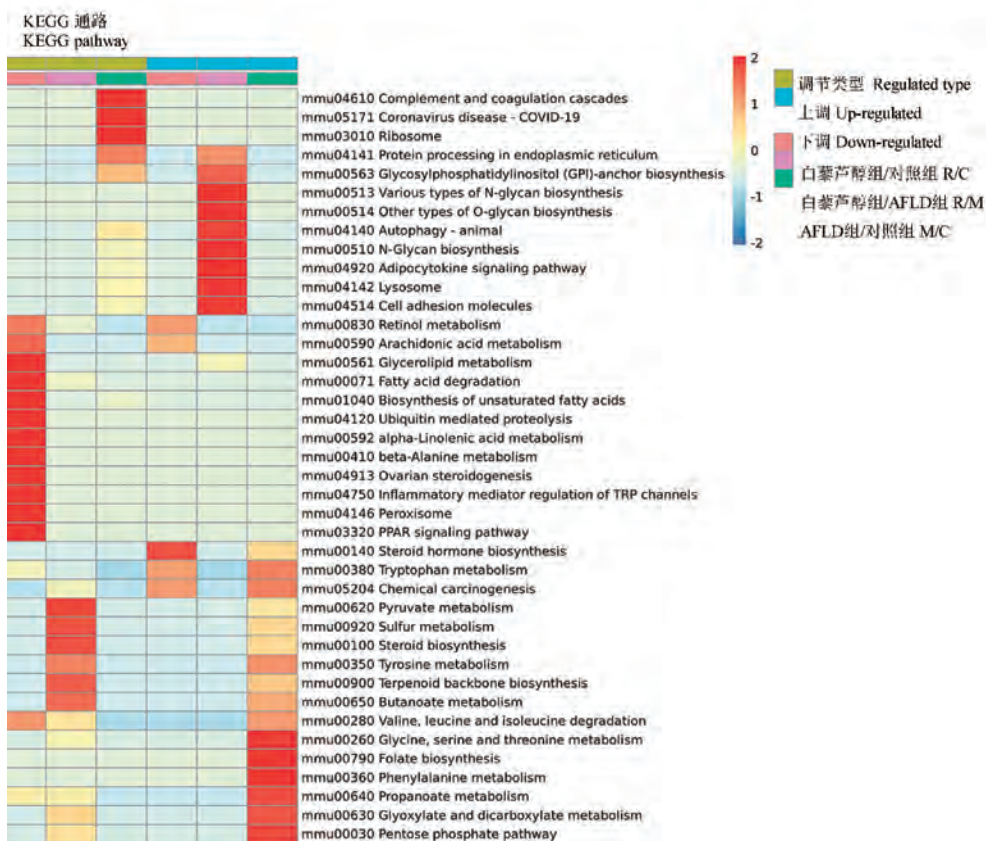


注:图中映射颜色越深且 P 值越小,表示显著性越明显;映射值越大表示蛋白聚集越丰富。

图3 差异表达蛋白的 GO 分类分析结果

Note. Darker the mapping color in the figure and the smaller the P value, the more obvious the significance is. Higher the aggregation value, the more abundant the mapping protein.

Figure 3 GO classification analysis results of differentially expressed proteins



注:图中映射颜色越深且 P 值越小,表示显著性越明显;映射值越大表示蛋白聚集越丰富。

图4 差异表达蛋白的 KEGG 富集通路分析结果

Note. Darker the mapping color in the figure and the smaller the P value, the more obvious the significance is. Higher the aggregation value, the more abundant the mapping protein.

Figure 4 Analysis results of KEGG enrichment pathway of differentially expressed proteins

2.5 差异共表达蛋白网络互作分析结果

11 个差异共表达蛋白网络互作分析结果显示, Sult1b1、Apoa4、Agpat9 (Gpat3)、Ephx1 等 4 个蛋白

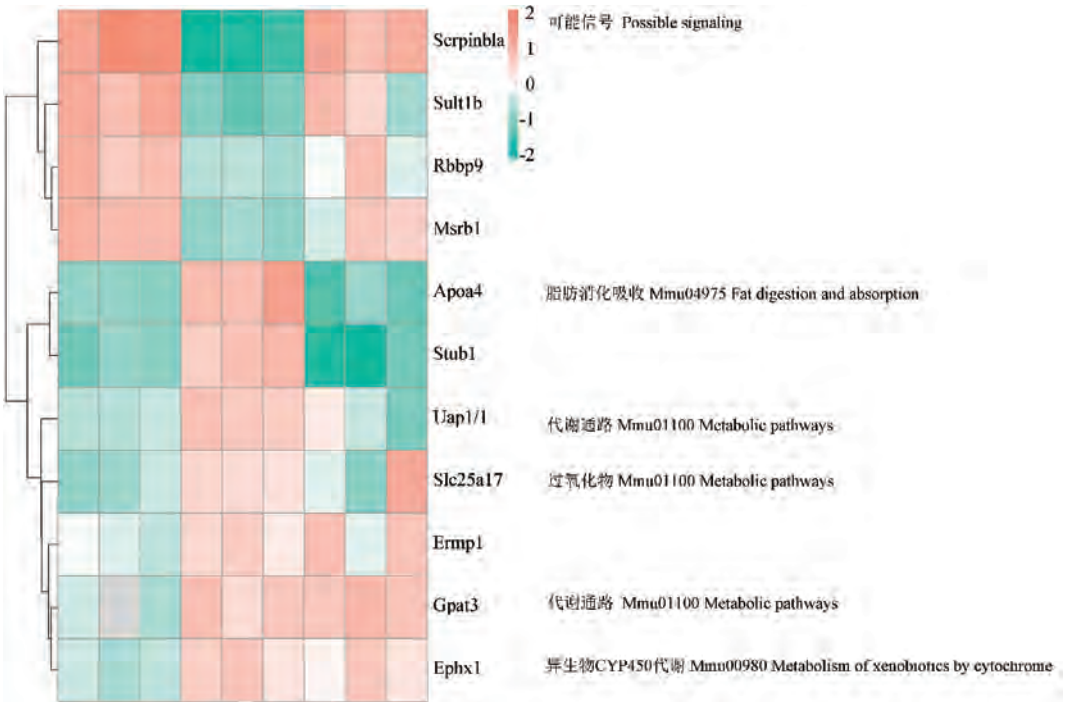
具有相互作用关系, 其余 7 个蛋白 Rbbp9、Msrbl、Ermp1、Stub1、Slc25a17、Serpina1a、Uap111 无相互作用关系(如图 6)。

表 1 11 个差异共表达蛋白质分子功能及差异倍数

Table 1 Molecular functions and differential fold values of 11 differentially co-expressed proteins															
基因名称 Gene name	分子功能 Molecular function									差异比值 Ratio			P		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	M/C	R/M	R/C	M/C	R/M	R/C
Rbbp9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.39	1.68	0.65	0.000211	0.002696	0.005586
Serpina1a	-	-	-	+	+	-	-	-	-	0.08	6	0.5	0.001592	0.003747	0.008216
Msrbl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0.29	2.17	0.64	0.000971	0.006664	0.007230
Sult1b1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	0.21	2.87	0.59	0.000684	0.004905	0.005977
Slc25a17	-	+				+	-	-	-	3.24	0.59	1.92	0.001354	0.021333	0.026815
Apoa4	-	+		+	+	+		+	+	6.79	0.26	1.73	0.000155	0.000410	0.005629
Uap111	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3.92	0.4	1.56	0.000354	0.001367	0.011455
Ermp1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.44	0.63	1.54	0.004036	0.026737	0.026245
Gpat3	+		+	-	-	-	-	-	-	3.98	0.53	2.12	0.007723	0.018115	0.001476
Ephx1	+	+	-	-	-	-	+	-	-	3.38	0.54	1.81	0.000985	0.013226	0.000113
Stub1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	5.66	0.30	1.68	0.000357	0.000129	0.030385

注:1:催化活性;2:蛋白结合;3:转移酶活性;4:分子功能调节剂;5:酶调节活性;6:运输活动;7:环氧化物水解酶活性;8:脂质转运体活性;9:抗氧化活性;+:蛋白质具有此分子功能;-:蛋白质无此分子功能。

Note. 1, Catalytic activity. 2, Protein binding. 3, Transferase activity. 4, Molecular function regulator. 5, Enzyme regulatory activity. 6, Transport activity. 7, Epoxide hydrolase activity. 8, Lipid transporter activity. 9, Antioxidant activity. +, Protein has this molecular function. -, Protein doesn't have this molecular function.

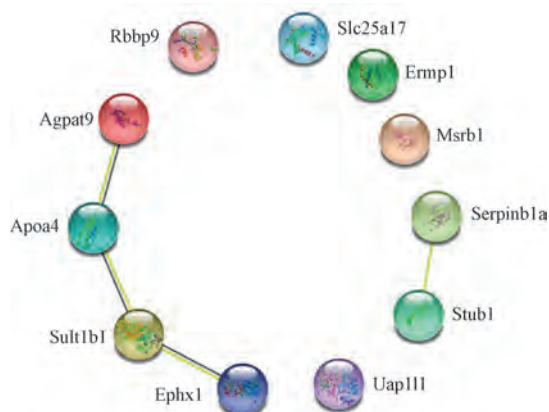


注:横轴代表各实验室组样本,纵轴代表 11 个差异共表达蛋白及其表达情况。每个颜色方块代表蛋白质表达水平,其中橙色代表上调,从暗到亮的颜色表示蛋白质表达逐渐减少;绿色代表下调,从暗到亮的颜色代表蛋白质表达逐渐增加。

图 5 11 个差异共表达蛋白的 KEGG 通路分析结果

Note. The horizontal axis represents the samples of each group, and the vertical axis represents the expression levels of 11 differential coexpressed proteins. Each color square represents the protein expression level, in which orange represents up-regulation, and the color from dark to light indicates the gradual decrease of protein expression. Green represents down-regulation, and the color from dark to light represents a gradual increase in protein expression.

Figure 5 Analysis results of KEGG enrichment pathway of 11 differentially co-expressed proteins



注:圆圈代表差异表达蛋白,存在双线代表蛋白质之间具有相互关系。

图 6 11 个差异共表达蛋白质的网络互作关系图

Note. Circles represent differentially expressed proteins, and double lines indicate that the two proteins interact.

Figure 6 Network interaction diagram of 11 differentially co-expressed proteins

3 讨论

众所周知,疾病往往伴随着多个层面的蛋白质功能障碍^[26-27]。蛋白质组学技术的进步使筛选与疾病发生、防治相关的蛋白标志物成为可能^[28-30]。因此,全面了解 AFLD 相关信号通路中涉及的蛋白质分子可能会为 AFLD 的发生机制理解以及开发合适的临床治疗或新药的方法提供有价值的见解。Song 等^[31]通过蛋白质组学方法分析了刺梨对高脂血症小鼠肝组织蛋白质表达的影响,发现了 15 种与脂质代谢相关的蛋白质。类似的,Dai 等^[32]通过定量化学蛋白质组学分析发现,从黄芩中提取的黄芩苷激活了肝肉碱棕榈基转移酶 1,从而对代谢性疾病(如肝脂肪变性和肥胖)起到干预作用。Du 等^[33]利用蛋白质定量蛋白质组学发现,赖氨酸丙二酰化可能与 2 型糖尿病治疗密切相关。Liu 等^[34]利用蛋白质翻译后修饰技术发现泛素特异性蛋白酶 14 通过稳定其底物脂肪酸合酶在非酒精性脂肪肝中发挥作用。白藜芦醇作为治疗酒精性肝病研究最广泛、最有前途的膳食多酚^[5-8],其具体作用分子机制仍不清楚。故本文采用更高检测深度的 4D 非标定量蛋白质组学分析技术,从 AFLD 组中获得了 370 个差异表达蛋白质,该结果提示慢性饮酒可导致肝组织蛋白质表达谱的显著变化,也表明这些差异蛋白可能参与了 AFLD 的形成。白藜芦醇干预后能分别将 AFLD 小鼠其中下调表达的蛋白质中的 198 个

上调、将上调表达中的 171 个蛋白实现下调的结果表明,这些蛋白也可能与白藜芦醇的 AFLD 干预作用可能密切相关。因此,慢性酒精摄入后引起肝组织蛋白质表达谱变化的结果为后续探讨药物干预机理和完善 AFLD 发生机制提供了重要的研究方向。进一步的差异表达蛋白质的功能富集分析也表明这些差异表达蛋白质与多种生物学效应有关,能够通过多种途径直接或间接影响小鼠摄入酒精后的肝病理学结局。

有趣的是,运用 PPI 分析,我们从 11 个差异共表达蛋白质中发现了 4 个具有相互作用关系的蛋白质,即环氧化物水解酶 1(Ephx1)、载脂蛋白 A-IV(Apoa4)、甘油-3-磷酸酰基转移酶 3(Gpat3)和硫转移酶家族胞浆 1B 成员(Sult1b1),然而与酒精性肝病关系尚不明确。本文检测结果显示,酒精摄入后小鼠肝组织 Ephx1、Apoa4、Gpat3 的表达水平分别显著上调 3.38、6.79 和 3.98 倍,经白藜芦醇干预后均分别显著下调了 0.54、0.26 和 0.53 倍。相反地,Sult1b1 在酒精摄入后显著下调 0.21 倍,经白藜芦醇干预后显著上调 2.87 倍。GO 分类和 KEGG 通路功能富集分析显示 Ephx1 通过细胞色素 P450 代谢外源性物质途径发挥作用。Ephx1 为在肝中广泛表达的解毒酶和水解酶折叠酶^[35],Gautheron 等^[36]通过小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞的 Ephx1 敲除实验,证明了 Ephx1 敲除促进细胞的氧化应激和衰老。然而也有研究证明 Ephx1 与细胞色素 P450 酶偶联^[37],Davydov 等^[38]使用化学交联质谱法确证了 Ephx1 和细胞色素 P450 2E1 的相互作用关系。微粒体 Ephx1 活性的增加可能通过增加细胞色素 P450 活性加速酒精向其有毒代谢物乙醛的转化^[39]。基于细胞色素 P450 2E1 与 AFLD 发生的密切相关性认知^[40-41],这些结果表明了白藜芦醇可能通过调节 Ephx1 表达水平进而影响细胞色素 P450 活性,从而达到小鼠 AFLD 的保护作用。脂肪生成和分解代谢的不平衡会导致脂肪肝等代谢性疾病^[42]。Apoa4 是主要表达于肠上皮细胞中的交换性载脂蛋白家族成员之一,它在促进肠脂质吸收、调节脂质和葡萄糖代谢中起关键作用^[43-45]。Li 等^[42]发现 Apoa4 缺乏会降低小鼠肝脂肪分解相关限速酶的表达,Apoa4 会促进脂肪分解和能量代谢。此外,肝 Apoa4 蛋白的过度表达在肝纤维化初期和非酒精性脂肪性肝炎相关肝癌中得到证实^[46-47]。Kang 等^[48]使用微阵列分析鉴定了参与肝脂肪代谢

的人亮氨酸拉链蛋白(LZIP)诱导基因,发现LZIP和Apoa4在人类脂肪变性样品中均高度表达,并促进小鼠肝中的肝脂肪变性。近期Tryndyak等^[49]利用饮食诱导的肝细胞脂肪变性体外模型,也证明了Apoa4表达的显著上调。一致地,我们的蛋白质组学数据也显示AFLD小鼠肝组织Apoa4蛋白的上调表达和白藜芦醇干预后的下调表达。提示白藜芦醇可能通过干预Apoa4的表达,调节肠道脂肪消化吸收途径参与小鼠AFLD的保护作用,不过需要进一步的验证。Gpat3是甘油-3-磷酸酰基转移酶的一种亚型酶,在脂肪组织中高度表达,有研究证明Gpat3的敲低不仅减少甘油三酯的合成,还会损害脂肪的生成^[50]。Gao等^[51]通过Seipin/Gpat3敲除小鼠体内实验,也发现Gpat3的缺乏能够缓解严重先天性全身性脂肪营养不良小鼠模型中的胰岛素抵抗和肝脂肪变性。Pagac等^[52]在运用3T3-L1前脂肪细胞,发现敲低Gpat3显著增强了脂肪细胞分化,而Sim等^[53]通过Gpat3过表达3T3-L1细胞实验发现增强的Gpat3活性将积极调节脂肪细胞分化。Khatun等^[54]发现Gpat3敲除小鼠表现出减弱的血浆甘油三酯偏移和肠细胞中积聚的脂质等结果证明了Gpat3是参与肠脂代谢的新型酶,肠道Gpat3是脂质吸收的次要途径。因此,研究这个蛋白是否通过脂肪细胞分化、肠道脂质吸收失衡来参与酒精诱导的脂肪肝及作为药物干预作用靶点将会是非常有意义的。综合我们的蛋白质组学定量数据和功能富集分析结果,提示,通过调节Gpat3对肝脂质稳态代谢通路的影响也可能是白藜芦醇发挥抗AFLD的重要途径。作为SULT家族成员之一的Sult1b1是小肠中表达并参与人体异源解毒的主要酶,与SULT1A3/4一起主要构成组织中硫转移酶蛋白质^[55-56]。Lian等^[57]近期通过生物信息学分析和qRT-PCR鉴定、验证了Sult1b1在结直肠癌细胞中表达水平的显著降低,确定了是结直肠癌转移的新型生物标志物。然而Sult1b1虽然在药物、环境毒素和内源性类固醇的代谢中起重要作用已经被证实^[58],但是很少有研究显示Sult1b1表达或活性在酒精摄入后肝病理条件下的变化。我们研究结果表明了AFLD小鼠肝组织中Sult1b1的显著表达下调和白藜芦醇干预后的显著上调。GO功能富集分析结果显示该蛋白涉及催化活性和转移酶活性两种分子功能,提示通过上调Sult1b1表达增强其发挥清除外源性物质、加强酒精代谢可能参与白藜芦醇

的小鼠的AFLD保护作用,有必要深入了解具体的分子作用机理。

综上所述,我们研究了AFLD小鼠肝组织中蛋白质表达谱的变化及其与白藜芦醇干预作用的可能相关性。白藜芦醇至少通过正向或负向调节Sult1b1、Apoa4、Gpat3、Ephx1等4个蛋白质的表达,发挥调节肠道脂肪消化、细胞色素P450代谢外源性物质途径和代谢途径来减轻小鼠肝的酒精性脂肪变性,有望成为新的治疗AFLD的靶点,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] Seitz HK, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16-38.
- [2] Zeng T, Zhang CL, Zhao N, et al. Impairment of akt activity by CYP2E1 mediated oxidative stress is involved in chronic ethanol-induced fatty liver [J]. Redox Biol, 2018, 14: 295-304.
- [3] Singh S, Osna NA, Kharbanda KK, et al. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(36): 6549-6570.
- [4] 丁庆学, 王德学, 张小会. 中医药治疗酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 基层医学论坛, 2017, 21(16): 2124-2126.
- [5] Chan CC, Lee KC, Huang YH, et al. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(3): 603-613.
- [6] Han SY, Choi YJ, Kang MK, et al. Resveratrol suppresses cytokine production linked to fceRI-MAPK activation in ige-antigen complex-exposed basophilic mast cells and mice [J]. Am J Chin Med, 2015, 43(8): 1605-1623.
- [7] Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats [J]. Life Sci, 2002, 71(6): 655-665.
- [8] Chupradit S, Bokov D, Zamanian MY, et al. Hepatoprotective and therapeutic effects of Res-veratrol: a focus on anti-inflammatory and antioxidative activities [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2022, 36(3): 468-485.
- [9] Tang LY, Chen Y, Rui BB, et al. Resveratrol ameliorates lipid accumulation in HepG2 cells, associated with down-regulation of lipin1 expression [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(2): 185-189.
- [10] Tang L, Yang F, Fang Z, et al. Resveratrol ameliorates alcoholic fatty liver by inducing autophagy [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(6): 1207-1220.
- [11] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Resveratrol a red wine polyphenol attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver [J]. Life Sci, 2007, 80(11): 1033-1039.
- [12] Chen WM, Shaw LH, Chang PJ, et al. Hepatoprotective effect

- of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase *in vivo* and *in vitro* [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1231–1238.
- [13] Ma Z, Zhang Y, Li Q, et al. Resveratrol improves alcoholic fatty liver disease by downregulating HIF-1 α expression and mitochondrial ROS production [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0183426.
- [14] Peiyuan H, Zhiping H, Chengjun S, et al. Resveratrol ameliorates experimental alcoholic liver disease by modulating oxidative stress [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2017, 2017(12): 4287890–4287900.
- [15] Luo G, Xiao L, Wang D, et al. Resveratrol protects against ethanol-induced impairment of insulin secretion in INS-1 cells through SIRT1-UCP2 axis [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 65: 104808–104840.
- [16] Ren R, Wang Z, Wu M, et al. Emerging roles of SIRT1 in alcoholic liver disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(16): 3174–3183.
- [17] Szkudelski T, Szkudelska K. Potential of resveratrol in mitigating metabolic disturbances induced by ethanol [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 579–584.
- [18] Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, et al. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4): G833–842.
- [19] 王晓玉, 罗建平, 查学强, 等. 蛋白质组学及代谢组学在酒精性肝病中的应用 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(2): 168–173.
- [20] Fernando H, Wiktorowicz JE, Soman KV, et al. Liver proteomics in progressive alcoholic steatosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 266(3): 470–480.
- [21] Banerjee A, Russell WK, Jayaraman A, et al. Identification of proteins to predict the molecular basis for the observed gender susceptibility in a rat model of alcoholic steatohepatitis by 2-D gel proteomics [J]. *Proteomics*, 2008, 8(20): 4327–4337.
- [22] Klouckova I, Hrnčirova P, Mechref Y, et al. Changes in liver protein abundance in inbred alcohol-preferring rats due to chronic alcohol exposure as measured through a proteomics approach [J]. *Proteomics*, 2006, 6(10): 3060–3074.
- [23] Swart PC, Russell VA, Vlok NM, et al. Early-Ethanol exposure induced region-specific changes in metabolic proteins in the rat brain: a proteomics study [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(3): 277–288.
- [24] 易旭, 王硕石, 郝杰, 等. 酒精性脂肪肝小鼠肝脏 LXR α -SREBP-1c 信号表达检测及葛花解酒汤脂汤干预作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(7): 13–16, 261.
- [25] 易旭, 游绍伟, 龙毅, 等. 自拟葛花解酒汤脂汤对酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂肪沉积及 PXR 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(3): 36–42.
- [26] Li X, Wang W, Chen J. Recent progress in mass spectrometry proteomics for biomedical research [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2017, 60(10): 1093–1113.
- [27] Liu S, Li Z, Yu B, et al. Recent advances on protein separation and purification methods [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2020, 284: 102254–102286.
- [28] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422(6928): 198–207.
- [29] Niu L, Thiele M, Geyer PE, et al. A paired Liver biopsy and plasma proteomics study reveals circulating biomarkers for alcohol-related Liver disease [EB/OL]. [2020-01-01]. <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.337592>.
- [30] 朱明雪, 匡海学, 兰辛键, 等. ITRAO 法分析增龄雌性小鼠肝蛋白组学变化 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 168–175.
- [31] Song P, Shen X. Proteomic analysis of liver in diet-induced Hyperlipidemic mice under Fructus Rosa roxburghii action [J]. *J Proteomics*, 2021, 230: 103982–103994.
- [32] Dai J, Liang K, Zhao S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(26): E5896–E5905.
- [33] Du Y, Cai T, Li T, et al. Lysine malonylation is elevated in type 2 diabetic mouse models and enriched in metabolic associated proteins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(1): 227–236.
- [34] Liu B, Jiang S, Li M, et al. Proteome-wide analysis of USP14 substrates revealed its role in hepatosteatosis via stabilization of FASN [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4770–4782.
- [35] Václavíková R, Hughes DJ, Soucek P. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene structure function and role in human disease [J]. *Gene*, 2015, 571(1): 1–8.
- [36] Gautheron J, Morisseau C, Chung WK, et al. EPHX1 mutations cause a lipotrophic diabetes syndrome due to impaired epoxide hydrolysis and increased cellular senescence [J]. *eLife*, 2021, 10: e68445–e68475.
- [37] Guengerich FP, Davidson NK. Interaction of epoxide hydrolase with itself and other microsomal proteins [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 215(2): 462–477.
- [38] Davydov DR, Dangi B, Yue G, et al. Exploring the interactome of cytochrome P450 2E1 in human liver microsomes with chemical crosslinking mass spectrometry [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 185–200.
- [39] Wong NA, Rae F, Bathgate A, et al. Polymorphisms of the gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a Caucasian population [J]. *Toxicol Lett*, 2000, 115(1): 17–22.
- [40] 庞硕, 吕丹, 张连峰. 二烯丙基硫醚通过靶向抑制 CYP2E1 对相关疾病治疗的潜在作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 117–121.
- [41] Li BY, Mao QQ, Gan RY, et al. Protective effects of tea extracts against alcoholic fatty liver disease in mice via modulating cytochrome P450 2E1 expression and ameliorating oxidative damage [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(10): 5626–5640.
- [42] Li XM, Liu XH, Cheng C, et al. 1822-P: Regulation of trafficking of lipids from liver to fat by apoA4 in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis [EB/OL]. [2020-01-01].

- <https://doi.org/10.2337/db20-1822-P>.
- [43] Wu CL, Zhao SP, Yu BL. Intracellular role of exchangeable apolipoproteins in energy homeostasis, obesity and non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2015, 90(2): 367-376.
- [44] Simon T, Cook VR, Rao A, et al. Impact of murine intestinal apolipoprotein A-IV expression on regional lipid absorption gene expression and growth [J]. J Lipid Res, 2011, 52(11): 1984-1994.
- [45] Qu J, Fourman S, Fitzgerald M, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) is a novel receptor for apolipoprotein A4 (APOA4) in adipose tissue [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 13289-13293.
- [46] Wang PW, Hung YC, Wu TH, et al. Proteome-based identification of apolipoprotein A-IV as an early diagnostic biomarker in liver fibrosis [J]. Oncotarget, 2017, 8(51): 88951-88964.
- [47] Dechassa ML, Tryndyak V, Conti AD, et al. Identification of chromatin-accessible domains in non-alcoholic steatohepatitis-derived hepatocellular carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(8): 978-987.
- [48] Kang M, Kim J, An HT, et al. Human leucine zipper protein promotes hepatic steatosis via induction of apolipoprotein A-IV [J]. FASEB J, 2017, 31(6): 2548-2561.
- [49] Tryndyak VP, Willett RA, Avigan MI, et al. Non-Alcoholic fatty liver disease-associated DNA methylation and gene expression alterations in the livers of collaborative cross mice fed an obesogenic high-fat and high-sucrose diet [J]. Epigenetics, 2022, 17(11): 1-15.
- [50] Shan D, Li JL, Wu L, et al. GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis [J]. J Lipid Res, 2010, 51(7): 1971-1981.
- [51] Gao M, Liu L, Wang X, et al. GPAT3 deficiency alleviates insulin resistance and hepatic steatosis in a mouse model of severe congenital generalized lipodystrophy [J]. Human Mol Genet, 2020, 29(3): 432-443.
- [52] Pagac M, Cooper DE, Qi Y, et al. SEIPIN regulates lipid droplet expansion and adipocyte development by modulating the activity of glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. Cell Rep, 2016, 17(6): 1546-1559.
- [53] Sim MFM, Persiani E, Talukder MMU, et al. Oligomers of the lipodystrophy protein seipin may co-ordinate GPAT3 and AGPAT2 enzymes to facilitate adipocyte differentiation [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 3259-3273.
- [54] Khatun I, Clark RW, Vera NB, et al. Characterization of a novel intestinal glycerol-3-phosphate acyltransferase pathway and its role in lipid homeostasis [J]. J Biol Chem, 2016, 291(6): 2602-2615.
- [55] Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, et al. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (sults) in human tissues: the sult "pie" [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(11): 2255-2261.
- [56] Coughtrie MWH. Function and organization of the human cytosolic sulfotransferase (sult) family [J]. Chem Biol Interact, 2016, 259: 2-7.
- [57] Lian W, Jin H, Cao J, et al. Identification of novel biomarkers affecting the metastasis of colorectal cancer through bioinformatics analysis and validation through qRT-PCR [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 105-117.
- [58] Xie Y, Xie W. The Role of sulfotransferases in liver diseases [J]. Drug Metab Dispos, 2020, 48(9): 742-749.

[收稿日期] 2022-04-08

甘斌,李华南,李松,等. 基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 26-33.

Gan B, Li HN, Li S, et al. Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 26-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.004

基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建

甘 斌¹, 李华南^{2*}, 李 松¹, 章晓云¹, 陈 宇³, 顾 兵³, 张云开¹, 刘永乾¹, 邵子晨¹

(1.江西中医药大学临床医学院,南昌 330004;2.江西中医药大学附属医院,南昌 330006;
3.江西科技师范大学生命科学学院,南昌 330013)

【摘要】 目的 比较两种不同湿热证 GA 大鼠模型在脂代谢和炎症反应的差异,以探索安全、稳定、可重复性高的湿热证 GA 模型。**方法** 44 只 SD 大鼠随机分为正常对照组($n=10$)、GA 对照组($n=10$)、模型组 A($n=12$)和模型组 B($n=12$)。观察造模期间各组大鼠一般情况及死亡率;周长法测定踝关节肿胀度;酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清脂代谢(TG、TC、LDL-C、HDL-C)和炎症因子(NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6)。**结果** 模型组 A 死亡率 8.3%(1/12),模型组 B 死亡率 25%(3/12);与正常对照组和 GA 对照组比较,模型组 A 和模型组 B 血清 TG、TC 和 LDL-C 表达显著升高($P<0.01$),而 HDL-C 表达显著降低($P<0.01$);与模型组 A 相比,模型组 B 的 TG 和 HDL-C 趋势有所升高,TC 和 LDL-C 趋势降低,但无统计学意义($P>0.05$)。与正常对照组比较,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达显著升高($P<0.01$);与 GA 对照组比较,模型组 A 的 NF- κ B 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$),模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$);与模型组 A 比较,模型组 B 的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达有所升高($P<0.05$)。**结论** 两种方式均可成功诱导湿热证 GA 病证结合模型。二者既有共性也有各自特点,高脂高糖饮食是脂代谢紊乱的直接影响因素,生物因子较单纯的高温高湿环境对大鼠炎症影响更明显。

【关键词】 痛风性关节炎;湿热证;脂代谢;炎症因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0026-08

Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors

GAN Bin¹, LI Huanan^{2*}, LI Song¹, ZHANG Xiaoyun¹, CHEN Yu³, GU Bing³, ZHANG Yunkai¹,
LIU Yongqian¹, SHAO Zichen¹

(1. Clinical Medicine College of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China. 2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006. 3. College of Life Sciences, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013)

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81860857,82060871);江西省自然科学基金(20202BAB206071);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190582);江西省第二届国医名师邓运明名医工作室(赣中医药综合[2021]12号);江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目(JZYC20S26)。

【作者简介】 甘斌(1994—),男,硕士研究生,研究方向:中医药在痛风的基础研究。E-mail:ganbin134@163.com

【通信作者】 李华南(1974—),女,博士,主任,博士生导师,研究方向:痛风的现代中医药诊治。E-mail:lihuanan1974@126.com

【Abstract】 Objective To explore a safe, stable and repeatable model of gouty arthritis (GA) with damp-heat syndrome by comparing changes in lipid metabolism and proinflammatory factors between two rat models of GA with damp-heat. **Methods** Overall, 44 male SD rats were randomly divided into a control group ($n=10$), GA group ($n=10$), model group A ($n=12$) and model group B ($n=12$). The specific method was provided in full text, and the experimental period lasted for 21 days. The general condition of rats in each group was observed during the modeling period and the mortality rate was assessed after modeling. Ankle swelling was measured by the circumference method. Serum contents of lipid metabolism factors (TG, TC, LDL-C and HDL-C) and proinflammatory factors (NF- κ B, IL-1 β , TNF- α and IL-6) were determined by ELISA. **Results** The mortality rate was 8.3% (1/12) in model group A and 25% (3/12) in model group B. Compared with control and GA groups, the serum TG, TC, and LDL-C were significantly higher in the model group A and B ($P<0.01$), while HDL-C was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group A, TG and HDL-C were increased in the model group B, while TC and LDL-C were decreased, but without statistical significance ($P>0.05$). Compared with the control group, serum NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly higher in the GA group, and model group A and B ($P<0.01$). Compared with the GA group, NF- κ B and TNF- α were increased in the model group A ($P<0.05$), and NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased in model group B ($P<0.05$). Compared with model group A, IL-1 β , IL-6 and TNF- α were increased in model group B ($P<0.05$). **Conclusions** Both approaches successfully induced a combined model of GA with damp-heat syndrome. Both of them had commonalities and individualities. The high fat and sugar diet was a directly influencing factor for lipid metabolism disorder. Biological factors had more obvious effects on inflammation in rats than a high temperature and humidity environment.

【Keywords】 gouty arthritis; damp-heat syndrome; lipid metabolism; proinflammatory factors

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

痛风性关节炎(gouty arthritis,GA)是最常见的由晶体诱发的自身炎症性疾病之一,其特征是单钠尿酸盐(monosodium urate,MSU)晶体沉积于关节和(或)非关节结构中诱发^[1]。全球患病率在 1%~4%之间^[2]。随着国民经济提高和饮食习惯的改变,我国 GA 的患病率呈显著上升趋势,患病率数据显示已达 1136.24/100 000^[3],且愈趋于年轻化^[4]。一般来说,根据机体对 MSU 晶体炎症反应的临床表现可分为四期^[5]:持续性高尿酸血症期、剧烈疼痛的急性炎症性关节期(GA 发作期)、无痛无症状期(临界期)以及 MSU 晶体引起的持续性炎症期(慢性 GA)和痛风石(Tophi)期,其中 GA 发作期在临床中最为常见^[6]。

古代医学认为病之总者为病,而一病总有数证。94 版《中医病症诊断疗效标准》^[7]根据 GA 阶段性本质的症状集合将其概括为四证:湿热蕴结证、痰浊阻滞证、瘀热阻滞证、肝肾阴虚证。本课题组临床观察发现湿热证 GA 占比 73.14%^[8],这可能与江西人体质多属湿热质相关。江西省位于北回归线附近,属长江中下游地区,地形南高北低,雨量偏多,日照充足,为亚热带湿润气候;此外江西人饮食重油重辣,多食油脂等厚味之品,长此已久,故江西人体质偏湿热质。既往湿热内伏伤邪理论在临床学术研究中占首要,余邪伏于里遇诱因(外邪)而发-外邪入里、内湿为合,这也是湿热证最基础的

病机^[9]。

目前西医临床一线治疗急性期 GA 主要口服皮质内固醇、非甾体抗炎药或秋水仙碱等对症治疗^[5],这些药物可迅速控制疼痛并抑制炎症,但使用时普遍受肾功能不全和心血管等诸多合并症的限制^[10],此外还存在胃肠道和肾毒性等副作用。中药自古以来就用于 GA 治疗^[11],从单味中药或中药组方中分离出的部分化学成分具有多靶点、低毒等特点,在 GA 防治中展示出良好前景^[12]。动物模型是开展药物研究的重要载体,将“病”和“证”相结合构建接近人体湿热证 GA(急性发作期 GA)病证结合动物模型更是深入研究湿热证参与 GA 急性发作的病理生理机制及中药药效评价的基础^[13]。尽管单独的“湿热证”模型和“GA”模型造模方式繁多,但尚无公认合理成熟的湿热证 GA 病证结合动物模型造模方法。基于此,本实验以雄性 SD 大鼠为造模对象,从脂代谢和炎症反应出发探讨两种不同湿热证 GA 病证结合模型造模差异,以期筛选稳定且具备可重复性的湿热证 GA 病证结合大鼠模型提供客观数据支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 44 只,6 周龄,体重

180~200 g,由江西中医药大学实验动物科学技术中心提供[SCXK(赣)2018-0001],饲养于江西中医药大学实验动物科学技术中心[SYXK(赣)2017-0004]。实验过程通过了江西中医药大学实验动物伦理委员会审查(JZSYDWLL-20200901),并严格遵循实验动物 3R 原则。于江西中医药大学动物中心无特定病原体级屏障系统内采用昼夜间断 12 h/12 h 照明方式饲养,温度(23 ± 2)℃,相对湿度(55 ± 3)%。所有大鼠均由江西中医药大学实验动物科学技术中心的工作人员检疫并适应性饲养 1 周后开始造模。适应性饲养期间大鼠自由饮水、进食,同时每 3 d 更换高温灭菌后的玉米芯垫料。

1.2 主要试剂与仪器

正常普通基础饲料:成分为玉米 30%,小麦 25.5%,豆粕 20%,酪蛋白 10%,鱼粉 5%,蜜糖酵母 2.5%,油 2.5%,磷酸氢钙 2%,生长预混料 1%,石粉 1%,食盐 0.3%,氯化胆碱 0.2%;高脂高糖饲料:在上述正常普通基础饲料基础上添加糖、黄油和鱼粉,具体成分为 58.9%普通基础饲料、黄油 15%,绵糖 15%、蛋黄粉 5%,鱼粉 5%,胆固醇 1%,猪胆盐 0.1%。

TG、TC、LDL-C、HDL-C(批号分别为:20210118、20210115、20210118、20210304,南京建成生物工程研究所);NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6(批号分别为:YX-201406R、YX-091203R、YX-201407R、YX-091206R,上海赫澎生物科技有限公司);红星二锅头白酒(批号:20160424,北京红星股份有限公司);冠生园蜂蜜(批号:GB14963,上海冠生园蜂制品有限公司);鼠伤寒沙门菌(批号:ATCC14028,美国菌株保藏中心);戊巴比妥钠(批号:SIGMA-P3761,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

人工气候箱(批号:MGC-350-HP-2,上海一恒科学仪器有限公司);全波长多功能酶标仪(批号:3001-1950,美国 Thermo 公司);高速冷冻离心机(批号:C2500-RC,美国 Labnet 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 MSU 混悬液的配置

向关节腔内注射 MSU 混悬液是湿热证 GA 病证结合模型中“GA”模型诱导的关键。按照黄火高^[14]的方法并结合 MSU 晶体在不同 pH 值环境下的形态改变^[15]对其配制方法进行改良,具体步骤如下:将 4.5 mL NaOH 溶液(浓度:0.5 mol/L)加入 400 mL 超纯水中,加入 2 g 尿酸,用磁力搅拌器缓慢

加热并不断搅拌,直至尿酸完全溶解。随后将温度保持在 60℃用 1 mol/L 的 HCl 溶液调 pH=7.2,室温冷却后置于 4℃冰箱过夜冷藏,隔日滤去上清,盛入蒸发皿中经水浴锅干燥,干燥后用碾钵碾成细末并通过 250 μ m 孔径金属网筛过筛,经高温高压灭菌后用无菌 EP 管收集。以无菌生理盐水配成浓度 20 mg/mL MSU 混悬液,使用前置于高压灭菌锅内灭菌 30 min,现配现用。

1.3.2 实验分组及干预

健康 SD 雄性大鼠 44 只,经由江西中医药大学实验动物科学技术中心的工作人员检疫并适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为 4 组:正常对照组、GA 对照组、模型组 A、模型组 B。除正常对照组和 GA 对照组 10 只外其余各组每组 12 只(根据预实验中大鼠死亡率评估增加 20%)。

正常对照组:在屏障实验室恒温恒湿环境内普通饲料喂养,自由饮水 21 d。

GA 对照组:喂饲方式同正常对照组,第 18 天以大鼠踝关节外侧两骨突出为注射定位点,将抽取了 MSU 混悬液注射器配 6 号注射器针头,针头斜面朝关节腔沿胫骨前肌内侧向下插至关节腔,有落空感时停止进针且回抽无血后注入 50 μ L MSU 溶液(浓度:20 mg/mL)以对侧关节囊鼓起为注入标准,诱导 GA 模型。

模型组 A:第一阶段即高脂高糖和高温高湿阶段制备湿热证模型,给大鼠饲以高脂高糖饮食,并在高脂高糖饲料喂养的基础上,用 200 g/L 蜂蜜水自由饮用,且白酒 1 mL/100 g 和猪脂 1.5 mL/100 g 交替灌服,共持续 14 d。从第 8 天开始每日上午 8:00 放入人工气候箱中,温度为(32 ± 2)℃,相对湿度 95%,8 h,共持续 14 d;第二阶段制备 GA“病”模型,在第 18 天造模同 GA 对照组。通过上述复合多因素造模方式制备湿热证 GA 病症结合大鼠模型。

模型组 B:第一阶段即高脂高糖阶段联合生物因素干预制备湿热证模型,给大鼠饲以高脂高糖饮食,并在高脂高糖饲料喂养的基础上,加用 200 g/L 蜂蜜水自由饮用,且白酒 1 mL/100 g 和猪脂 1.5 mL/100 g 交替灌服,共持续 14 d。于第 10 天灌服鼠伤寒沙门氏菌液(10 mL/kg,每毫升 10^9 个),第 15 天加强一次(5 mL/kg);第二阶段制备 GA“病”模型,在第 18 天造模同 GA 对照组。通过上述复合多因素造模方式制备湿热证 GA 病症结合大鼠模型。

1.3.3 观测指标

(1) 一般情况观测及统计造模后各组死亡率

确定以第 1、8、15、21 天同一时刻对大鼠表征进行观察,包括:①精神状态;②饮食饮水;③毛色;④大小便等情况;最后造模结束统计大鼠死亡率。

(2) 踝关节肿胀的测定

周长法:使用缚线测量注射 MSU 混悬液前 0 h 及造模后 4、8、12、24、48 及 72 h 后大鼠踝关节划线部位的周长。以造模前后周长的差值作为肿胀度变化,即肿胀度=造模后周长-造模前周长。

(3) 大鼠步态分析

①步态改变分级:在造模后,请 1 名骨科医生(不知分组情况)观察大鼠步态的改变并按步态分级标准计分:正常步态为 0 级;轻度跛行,右足稍呈弯曲态行走为 1 级;中度跛行,右足弯曲明显,轻挨地面行走为 2 级;重度跛行,右足脱离接触面甚至三足步态行走为 3 级。

②炎症指数评分标准:正常为 0 级,记作 1 分;关节皮肤出现红斑,轻度肿胀,骨性标志可见为 I 级,记作 2 分;肿胀皮肤出现褶皱,骨性标志消失,但肿胀未跨出关节部位为 II 级,记作 3 分;关节皮肤呈暗红且关节以外肢体也出现肿胀为 III 级,记作 4 分。

(4) 血清制备、脂代谢指标和炎症因子检测

造模后第 21 天,各组大鼠禁食不禁水 12 h,3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后腹主动脉采血,将采血管略倾斜静置 2 h,3000 r/min × 15 min 离心,收集上层血清于-80℃中保存。严格按照 ELISA 试剂盒检测血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C、IL-1β、IL-6、TNF-α、NF-κB 的表达情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析,采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用单因素方差分析对各组间统计数据进行比较。组间多重比较,若满足方差齐性采用 LSD 法检验,反之则采用 Dunnett's T_3 检验;以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示具有极显著统计学差异。采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件绘图。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况观察

正常对照组:喂养期间精神状态好,活动正常,毛色柔顺亮泽,双目炯炯有神,体重增加平稳,饮食、大小便均正常;GA 对照组:由于前期未参与高

糖高脂饲料和湿热证阶段造模,故表征均正常,注射 MSU 后首先出现烦躁不安并用舌头舔舐右足,右后肢弯曲明显,轻挨地面行走甚至抬离地面,随后精神萎靡,蜷缩在角落;模型组 A 和模型组 B:大鼠逐渐出现活动力减弱,毛发粗糙疏松、毛色暗淡,前 7 d 体重逐渐增加随后增势缓慢且饮食减少尤其在放入人工气候箱后大部分出现精神倦怠、嗜睡,毛发枯槁潮湿掉毛,体重及饮食均减少,大便较正常组量少甚至不成型、溏便。在第 18 天注射 MSU 后合并 GA 对照组造模症状。与模型组 A 相比,模型组 B 大鼠在灌服鼠伤寒沙门氏菌后大鼠体重不增反减,大便粪质稀溏味臭。

2.2 实验大鼠死亡及其解剖分析

纳入的 44 只大鼠,其中有 4 只(模型组 A 死亡 1 只,模型组 B 死亡 3 只)大鼠在造模过程中死亡,模型组 A 死亡率 8.3%,模型组 B 死亡率 25%。

2.3 各组大鼠踝关节肿胀度测定比较

由表 1 可见,组内比较:正常对照组在 4 h 肿胀程度达到高峰,随后肿胀程度逐渐回落,到 72 h 基本恢复,可能是由于注射生理盐水引起的非病理性肿胀,后期生理盐水被自体吸收。GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 在 4、8、12 h 肿胀程度逐渐增大,并于 12 h 达到高峰,随后肿胀程度逐渐回落。组间比较:与正常对照组比较,造模后 4、8、12、24、48、72 h,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的踝关节肿胀明显增大($P < 0.01$)。这与前人研究相一致^[16-17],提示造模成功。模型组 A 在不同时间点与模型组 B 比较均不具备统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠步态分级和炎症指数评分比较

由表 2 可见 GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 大鼠步态等级大部分被评为 III 级。由图 1 可见,与正常对照组比较,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 炎症指数存在显著差异性($P < 0.01$),说明“GA”病模型复制成功。且进一步说明大鼠步态分级和炎症指数的改变主要与 MSU 注射后引发右踝关节的炎症改变相关。

2.5 各组大鼠脂代谢指标表达比较

由表 3 可知,模型组 A 和模型组 B 的 TG、TC 和 LDL-C 均高于正常对照组和 GA 对照组,HDL-C 则显著低于正常对照组和 GA 对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组 A 相比,模型组 B 的 TG 和 HDL-C 趋势有所升高,TC 和 LDL-C 趋势降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点踝关节周长法肿胀度测量变化($\bar{x}\pm s$, mm)

Table 1 Measure the changes of ankle joint swelling degree at different time points in each group of rats based on the circumference method

组别 Groups	<i>n</i>	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组 Control group	10	0.24±0.06	0.16±0.03	0.09±0.04	0.08±0.03	0.10±0.03	0.07±0.02
GA 对照组 GA group	10	2.38±0.35**	3.47±0.88**	4.47±0.98**	3.89±0.62**	3.07±0.54**	1.96±0.43**
模型组 A Model group A	11	2.28±0.30**	3.48±0.55**	4.88±1.07**	4.28±0.88**	3.38±0.67*	2.89±0.49** [#]
模型组 B Model group B	9	2.22±0.41**	3.52±0.35**	5.22±0.64**	4.97±0.57** [#]	3.66±0.65**	2.74±0.62** [#]

注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 GA 对照组相比, [#] $P<0.05$ 。Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the GA group, [#] $P<0.05$.

表 2 注射 MSU 混悬液后各组大鼠踝关节步态分级情况

Table 2 Ankle gait classification of rats in each group after inject MSU suspension

组别 Groups	<i>n</i>	D1				D2				D3			
		0	I	II	III	0	I	II	III	0	I	II	III
正常对照组 Control group	10	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
GA 对照组 GA group	10	0	0	1	9	0	1	3	6	0	2	5	3
模型组 A Model group A	11	0	0	1	10	0	0	3	8	0	2	4	5
模型组 B Model group B	9	0	0	1	8	0	1	2	6	0	1	4	4

表 3 各组大鼠血脂代谢改变情况($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

Table 3 Changes of blood lipid metabolism in rats in each group

组别 Groups	<i>n</i>	甘油三酯 TG	总胆固醇 TC	低密度脂蛋白 LDL-C	高密度脂蛋白 HDL-C
正常对照组 Control group	10	0.71±0.21	1.81±0.33	0.48±0.16	1.10±0.48
GA 对照组 GA group	10	0.92±0.20	1.93±0.29	0.53±0.27	1.06±0.50
模型组 A Model group A	11	2.13±0.18** ^{###}	2.62±0.55** [#]	0.98±0.31** ^{###}	0.38±0.28** ^{###}
模型组 B Model group B	9	2.30±0.34** ^{###}	2.49±0.36* [#]	0.78±0.12*	0.41±0.33** ^{###}

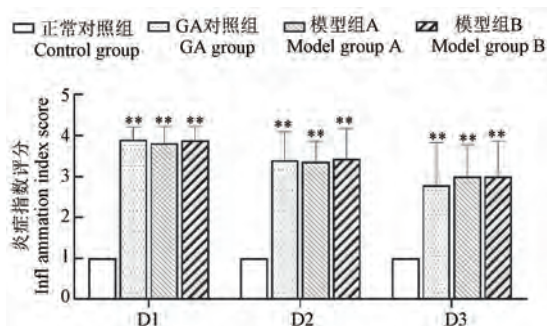
注:与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 GA 对照组相比, [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$ 。Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the GA group, [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$.注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠注射 MSU 混悬液后关节炎症指数评分柱状图

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

Figure 1 The score of ankle joint inflammation index in each group after inject MSU suspension

2.6 各组大鼠免疫炎症因子表达比较

由表 4 可知,与正常对照组相比,GA 对照组、模型组 A 和模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均显著升高($P<0.01$),这提示模型复制成功。与 GA 对照组相比,模型组 A 的 NF- κ B 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),模型组 B 的 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),这提示两种病证结合模型造模方式或可刺激机体产生慢性炎症反应。与模型组 A 相比,模型组 B 的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平有所升高($P<0.05$),这或许可以作为两种病证结合模型炎症反应量化指标。

表 4 各组大鼠 NF-κB、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 改变情况($\bar{x}\pm s$, pg/mL)
Table 4 The level of NF-κB, IL-1β, IL-6, TNF-α in rats of each group

组别 Groups	n	核因子-κB NF-κB	白细胞介素 1β IL-1β	白细胞介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子-α TNF-α
正常对照组 Control group	10	391.69±22.99	46.13±10.68	32.76±5.81	4.86±1.26
GA 对照组 GA group	10	680.10±29.07**	361.50±8.58**	143.1±10.67**	58.81±6.53**
模型组 A Model group A	11	738.74±49.33**#	366.70±12.48**	146.5±11.09**	64.78±5.93**#
模型组 B Model group B	9	741.15±52.59**#	430.00±12.50**## ^{aa}	168.9±6.61**## ^{aa}	71.26±4.44**## ^a

注:与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 GA 对照组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与模型组 A 相比,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$
Note. Compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$. Compared with the GA group,# $P<0.05$,## $P<0.01$. Compared with the model group A,^a $P<0.05$,^{aa} $P<0.01$.

3 讨论

《素问·至真要大论篇》指出:“诸湿肿满,皆属于脾”^[18];《素问·阴阳应象大论篇》指出:“中央生湿……其藏为脾”^[18],可见脾与湿密切相关;清代薛生白言“湿热乃阳明太阴同病也”,以上均说明湿热证病位多责之于脾胃^[19]。湿热证病程多缠绵反复,系饮食内伤致脾失健运,水液运化机能失职,导致水液留滞、内湿内生,复感外邪,内外相引,故病湿热^[20]。这也和《素问·奇病论篇》中:“甘者,肥美之所发”,指出甘为湿之应,常食膏粱厚味,易生湿蕴热,病因病机相吻合。总结以上对湿热证病因病机的论述,在本实验中模型组 A 和模型组 B 均通过自由饮用蜂蜜水,猪脂、白酒隔日灌服 14 d,以损其脾胃,复刻脾失健运,水液运化失职,导致内湿自生。模型组 A 给予高温高湿外环境,模型组 B 通过外邪(鼠伤寒沙门氏菌)从口鼻而入,模拟中医传统病因,内外相引,故病湿热。从症状表现来看,模型组 A 和模型组 B 大鼠均出现便溏的临床表现,这提示脾胃运化机能障碍,升降失序,清浊不分。根据现有的模型评判标准,可认为模型组 A 和模型组 B 均复制身重困倦、腹胀纳呆、便溏的湿热证表现。

众所周知,高尿酸血症是 GA 最主要的危险因素,但临床研究表明,许多高尿酸血症患者不会发展为 GA,也不会形成 MSU 晶体,甚至终身无症状。另有研究表明,约 70% GA 患者虽血尿酸值正常,但临床却表现出 GA 急性发作症状。这说明只有当关节内 MSU 晶体沉积并与中性粒细胞相作用时,才会导致以中性粒细胞为首的先天免疫系统被激活,进而引发 GA 发作^[21-22]。临床上 GA 起病急骤,发作时可导致患者关节红肿、剧烈疼痛和运动障碍等症

状,通常在 7~10 d 后缓解,患者自行恢复。此外本次实验造模使用的大鼠为啮齿类动物,与灵长类不同在于其自身存在可将尿酸代谢为尿囊素的尿酸酶^[23],故非长期刺激,而只是一过性刺激难以建立以高尿酸血症为基础的 GA 动物模型^[24]。MSU 晶体作为诱发 GA 发作的关键物质,因此目前建立 GA 动物模型最经典方法便通过向关节腔内注射外源性 MSU 晶体。该造模方式不仅操作简便、模型稳定而且与临床 GA 患者急性发作症状相吻合。根据本实验结果,注射 MSU 晶体混悬液 2 h 后模型逐渐形成,12 h 后模型效果达到峰值,此后即使不做干预,红肿热痛症状亦逐渐缓解。这提示本实验 GA 模型复制与临床 GA 急性发作相符合,这也提示临床 GA 发作 12 h 内是治疗的黄金时间可极大地缓解 GA 发作症状。

湿邪为有形之邪,血脂便是其生化物质基础之一,脂代谢紊乱则表明脾失健运,导致运化水湿、分清泌浊的功能失职,为湿热证的发展创造了内在条件^[25]。吕文亮等^[26]采用“人工气候箱+肥甘饮食+鼠伤寒沙门氏菌”法建立湿热证模型可引发血循环中 LDL-C 升高而 HDL-C 降低。李华锋等^[27]和阙铁生等^[28]采用“高脂饮食+高温高湿+大肠埃希菌灌胃”法制备的温病湿热证中 TC、TG、LDL-C 水平显著增加,HDL-C 水平显著减少。由此可见脂代谢紊乱是湿热证特征之一。此外临床横断面研究表明脂代谢异常是 GA 诱发因素之一^[29]。本实验中模型组 A 和模型组 B 的 TG、TC 和 LDL-C 水平显著高于正常对照组和 GA 对照组,HDL-C 水平则显著低于正常对照组和 GA 对照组,说明两种造模方式均发生脂代谢紊乱,大鼠出现湿热证表现,且对 GA 发作有促进作用。

GA 属炎症性疾病的一种,其最大特征是 MSU 晶体沉积诱发炎症发作。先天免疫在 GA 发作的自我缓解机制中发挥重要作用,单核/巨噬细胞是先天免疫系统的重要细胞组分。MSU 晶体作为一种“危险信号”因子,在 GA 发作的启动、放大和维持中发挥重要作用,主要与 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎因子相关^[30]。这些促炎因子主要由于单核/巨噬细胞被 MSU 晶体诱导活化而产生。有生物活性的成熟 IL-1 β 被当作 GA 发作的始动因子,其可通过活化 IL-1 受体通路刺激炎症因子和趋化因子,募集大量中性粒细胞。TNF- α 可激活中性粒细胞和淋巴细胞,从而促进其他细胞因子的合成和释放,也可诱导细胞凋亡。此外 TNF- α 可刺激黏附因子的大量分泌,随后黏附因子与白细胞共同作用损伤关节细胞和关节软骨^[31],这可能与 GA 患者剧烈疼痛相关。Liu 等^[32]发现 MSU 晶体刺激单核细胞,可刺激单核细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α ,且呈时间依赖性。另有研究表明 IL-6 有助于诱发 GA 炎症,是激活 MSU 介导的 NLRP3 炎症体激活所必需的炎症因子^[33]。患者 IL-6 表达检测可反映 GA 病情发展变化^[34]。徐晓辰等^[35]探讨 GA 患者不同时间点血清炎症因子的变化,结果表明 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 在炎症过程中可能存在共同作用。研究报道,30 年前 David Baltimore 和 Ranjan Sen 发现一个在炎症反应过程中的关键转录因子,即 NF- κ B,其含了一个二聚体转录因子家族,对炎症反应的调控以及几乎所有生物中细胞的增殖、生化和凋亡都至关重要^[36]。MSU 晶体、促炎因子(如:IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)和脂多糖等胞外刺激均可诱导 NF- κ Bp65 转入细胞核,促进靶基因转录表达^[37]。研究表明 MSU 晶体主要通过两种途径诱导 NF- κ B 活化:(1)在大多数细胞中,其通常以 p65/p50 二聚体形式存在,p65 主要承担 NF- κ B 转录活性。MSU 晶体可能与 toll 样受体 2 和 toll 样受体 4 结合,导致 NF- κ Bp65 的核易位,最终诱导 NF- κ B 活化。(2)MSU 晶体可诱导由核苷酸结合寡聚化结构域、亮氨酸重复序列和热蛋白结构域组成的 NLRP3 炎症小体的活化,活化的 NLRP3 炎症小体可激活效应蛋白胱冬肽酶-1,最终导致成熟 IL-1 β 的产生^[38]。成熟的 IL-1 β 能够通过 IL-1 受体通路诱导 NF- κ B 的活化。以上诸多文献均证明 NF- κ B、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 在 GA 发作中的重要作用,同时也有研究表明湿热证与炎症密切相关^[39]。本实验结果表明 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和

NF- κ B 表达呈现模型组 B>模型组 A>GA 对照组>正常对照组,说明模型组 A、模型组 B 和 GA 对照组大鼠均表现出明显炎症反应。此外模型 B 炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 表达高于模型组 A,总体而言说明生物因子与单纯湿热环境相比,生物因子对于炎症因子的启动可反应“热”致病因子靶点所在。

综上所述,本研究结果表明两种造模方式均可诱导湿热证“证”和 GA“病”的临床表现。从脂代谢和炎症因子指标观察二者既有共性也有各自特点,但毋庸置疑高脂高糖饮食是脂代谢紊乱的直接影响因素,且脂代谢可作为“湿”致病因子靶点,炎症因子可作为“热”致病因子靶点。综合比较生物因子对于大鼠炎症影响更明显,可作为湿热证 GA 病证结合模型中“热”靶点量化评价指标。将“病”和“证”相结合制备湿热证痛风性关节炎病证结合模型可为探明中医药治疗作用和机理研究提供可行的动物模型选择。

参考文献:

- [1] Hansildaar R, Vedder D, Baniaamam M, et al. Cardiovascular risk in inflammatory arthritis: rheumatoid arthritis and gout [J]. *Lancet Rheumatol*, 2021, 3(1): e58-e70.
- [2] Singh JA, Gaffo A. Gout epidemiology and comorbidities [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2020, 50(3): S11-S16.
- [3] 赵敏,陈婷,黄振光,等. 1990-2019 年中国痛风疾病负担研究 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(21): 3974-3978.
- [4] Chen Y, Tang Z, Huang Z, et al. The prevalence of gout in mainland China from 2000 to 2016: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Public Health*, 2017, 25(5): 521-529.
- [5] Dalbeth N, Gosling AL, Gaffo A, et al. Gout [J]. *Lancet*, 2021, 397(10287): 1843-1855.
- [6] Wilson L, Saseen JJ. Gouty arthritis: a review of acute management and prevention [J]. *Pharmacotherapy*, 2016, 36(8): 906-922.
- [7] 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准: ZY/T 001.1-1994[S]. 1994.
- [8] 陈丁鹏. 基于中医传承计算平台 V3.0 探究邓运明教授治疗痛风辨证用药规律及学术思想研究 [D]. 南昌:江西中医药大学, 2021.
- [9] 吕文亮,周姝含,孙易娜,等. 基于病证结合的脾胃病湿热理论的创新与应用研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(8): 2601-2606.
- [10] Tausche AK. Gicht [J]. *Internist (Berl)*, 2021, 62(5): 513-525.
- [11] Jia L, Wang RS, He DY. Traditional Chinese and western medicine understanding of gout pathogenesis [J]. *Rheum Arthritis*, 2018, 7(2): 61-64.
- [12] Chi X, Zhang H, Zhang S, et al. Chinese herbal medicine for

- gout: a review of the clinical evidence and pharmacological mechanisms [J]. Chin Med, 2020, 2020(15): 17-30.
- [13] 甘斌, 李华南, 章晓云, 等. 湿热证急性痛风性关节炎动物模型的建立与评价 [J]. 江西中医药, 2021, 52(5): 77-80.
- [14] 黄火高, 孙运峰, 胡明, 等. 大鼠急性痛风性关节炎模型的建立及特点 [J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29(6): 538-542.
- [15] 苏厚恒, 孙欣, 崔佳佳, 等. 单钠尿酸盐晶体在不同 pH 值环境中的形态变化与意义 [J]. 泰山医学院学报, 2010, 31(3): 197-199.
- [16] 郭玉星, 熊辉, 易法银, 等. 蠲痹历节清方对改良痛风性关节炎模型大鼠滑膜的 TLR4、NF- κ B、PPAR γ 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 126-133.
- [17] 徐轶尔, 孙贵才, 郑春雨, 等. 豨薟草对尿酸钠引起痛风性关节炎 IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 表达的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(1): 9-13.
- [18] 朱明. 黄帝内经 [M]. 北京: 外文出版社; 2012.
- [19] 严世芸. 中医医家学说及学术思想史 [M]. 北京: 中国中医药出版社; 2015.
- [20] 肖照岑, 屠延寿.《湿热病篇》学术思想探讨 [J]. 天津中医学院学报, 1984, 3(1): 14-22.
- [21] Landis RC, Haskard DO. Pathogenesis of crystal-induced inflammation [J]. Curr Rheumatol Rep, 2001, 3(1): 36-41.
- [22] Rose DM, Liu-Bryan R. Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty inflammation [J]. Curr Rheumatol Rep, 2006, 8(3): 209-214.
- [23] Chen X, Burdett TC, Desjardins CA, et al. Disrupted and transgenic urate oxidase alter urate and dopaminergic neurodegeneration [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(1): 300-305.
- [24] Lu J, Dalbeth N, Yin H, et al. Mouse models for human hyperuricaemia: a critical review [J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(7): 413-426.
- [25] 吕文亮. 湿邪与血脂代谢异常关系的探讨 [J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(112): 5-6.
- [26] 吕文亮, 高清华, 李华锋. 清热化湿法对温病湿热证大鼠肝脏 LDL-RmRNA 的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(20): 2484-2487.
- [27] 李华锋, 林培政. 小鼠肝炎病毒温病湿热证模型的探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7): 1318-1321.
- [28] 阙铁生, 常丽萍, 吕军影, 等. 加味藿朴夏苓汤对温病湿热证大鼠模型血清 TNF- α 、IL-10 及血脂代谢的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2012, 29(2): 197-200.
- [29] 曹硕, 刘娜, 张曼. 男性痛风患者脂代谢紊乱的相关性研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(10): 1646-1648, 1680.
- [30] Shi Y, Mucsi AD, Ng G. Monosodium urate crystals in inflammation and immunity [J]. Immunol Rev, 2010, 233(1): 203-217.
- [31] 何建平. 针灸治疗痛风性关节炎患者的临床效果及对血清炎症因子水平的影响 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17(1): 128-131.
- [32] Liu YF, Tu SH, Chen Z, et al. Effects of modified simiao decoction on IL-1 β and TNF- α secretion in monocytic THP-1 cells with monosodium urate crystals-induced inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 406816.
- [33] Temmoku J, Fujita Y, Matsuoka N, et al. Uric acid-mediated inflammasome activation in IL-6 primed innate immune cells is regulated by baricitinib [J]. Mod Rheumatol, 2021, 31(1): 270-275.
- [34] Punzi L, Calò L, Plebani M. Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002, 39(1): 63-88.
- [35] 徐晓晨, 丁焕发, 刘淑娟, 等. 血清 IL-1 β 、IL-6、IL-18 及 TNF- α 水平在急性痛风性关节炎镇痛治疗不同时间动态变化的研究 [J]. 中国医学创新, 2016, 13(24): 4-10.
- [36] Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology [J]. Cell, 2017, 168(1-2): 37-57.
- [37] Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, et al. TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation [J]. J Immunol, 2005, 174(8): 5016-5023.
- [38] Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2018, 17(8): 588-606.
- [39] 闫润泽, 孙卫卫, 王珍, 等. 糖尿病肾病内热证与肾功能及炎症因子的相关性研究 [J]. 中医学报, 2020, 35(2): 393-397.

[收稿日期] 2022-04-20

许佳欢, 别亚男, 陈千晴, 等. 两种造模方法建立小鼠先兆子痫模型比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 34-41.
Xu JH, Bie YN, Chen QQ, et al. A comparative study of the establishment of mouse pre-eclampsia models [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 34-41.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.005

两种造模方法建立小鼠先兆子痫模型比较研究

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

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

【摘要】 目的 对比分析小鼠先兆子痫 (pre-eclampsia, PE) 模型两种造模方法的差异, 为不同类型先兆子痫动物模型的选择提供参考。**方法** 将 24 只 CD-1 孕鼠随机分成 4 组: 脂多糖对照组、脂多糖组、雷西莫特 (R848) 对照组、R848 组, 每组 6 只。脂多糖对照组和脂多糖组于妊娠第 13、14、15、16、17 天分别尾静脉注射生理盐水或 LPS (4 mg/kg); R848 对照组和 R848 组于妊娠第 13、15、17 天分别腹腔注射 R848 溶剂 (5% DMSO+40% PEG300+5% Tween-80+50% saline) 或 R848 (10 mg/kg); 同时于妊娠第 12、14、16、18 天测量尾动脉收缩压; 给药后于妊娠第 18 天解剖, 进行尿蛋白/尿肌酐检测、抗血管生成因子检测及 HE 染色。**结果** 与对照组相比, 两种造模方法均出现妊娠期高血压 (LPS 组的妊娠第 14、16、18 天的血压分别为: (142.16±4.81) mmHg、(144.07±2.91) mmHg 和 (143.31±4.61) mmHg; R848 组的妊娠第 14、16、18 天的血压分别为: (154.00±5.29) mmHg、(147.44±3.24) mmHg 和 (140.77±2.00) mmHg); 尿蛋白/尿肌酐检测结果显示, LPS 模型组比值升高 ($P<0.05$), R848 组无统计学差异 ($P>0.05$); 血清抗血管生成因子检测结果显示, 与对照组相比, 脂多糖组 sFlt-1 和 sEng 表达量无统计学差异 ($P>0.05$), R848 组血清内 sFlt-1 和 sEng 表达量均升高 ($P<0.01$); HE 结果显示, 与对照组相比, R848 组出现孕鼠胎盘血管慢性损伤, 合体滋养层广泛增生。**结论** 两种造模方法均能使孕鼠出现高血压、胎儿生长受限、内皮功能障碍等 PE 症状。腹腔注射 R848 造模法较尾静脉注射 LPS 法对动物的损伤程度更严重, 且给药方式为腹腔注射, 操作简单。

【关键词】 先兆子痫; 脂多糖; 雷西莫特; 动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0034-08

A comparative study of the establishment of mouse pre-eclampsia models

XU Jiahuan¹, BIE Yanan², CHEN Qianqing¹, CHEN Baiyu¹, OU Baofang¹, XIE Shuilin^{3*}, WU Shaoyu^{1*}

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

【Abstract】 Objective To compare and analyze differences between two modeling method of mouse pre-eclampsia (PE), and to provide a reference to select different types of PE animal models. **Methods** Overall, 24 CD-1 pregnant mice were randomly divided into LPS control, LPS, R848 control and R848 groups with six mice in each group. Saline or LPS (4 mg/kg) was injected intravenously via the tail vein into mice in LPS control or LPS groups on days 13 ~ 17 of

【基金项目】 大型模式动物研发平台的建设及产业化项目 (2120197000014); 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2020449); 广东省联合培养研究生示范基地项目 (粤教研函[2017]15 号)。

【作者简介】 许佳欢 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 干细胞与转化医学。E-mail: xujiahuan1209@163.com

【通信作者】 吴少瑜 (1980—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 具有抗肿瘤作用的新化合物筛选和机制研究。
E-mail: wushaoyu1980@126.com

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

pregnancy. R848 solvent or R848 (10 mg/kg) was injected intraperitoneally into mice of R848 control and R848 groups on days 13, 15 and 17 of pregnancy. Systolic blood pressure of the tail artery was measured on days 12, 14, 16 and 18 of pregnancy. The mice were dissected on day 18 of pregnancy, followed by urine protein/creatinine detection, anti-vascular generation factor detection, and HE staining. **Results** Compared with the control group, gestational hypertension occurred in both modeling method. Blood pressure on days 14, 16 and 18 of pregnancy in the LPS group was (142.16±4.81), (144.07±2.91), and (143.31±4.61) mmHg, respectively. Blood pressure on days 14, 16 and 18 of pregnancy in the R848 group was (154.00±5.29), (147.44±3.24) and (140.77±2.00) mmHg, respectively. Urine protein/urine creatinine tests showed that the ratio was increased in the LPS model group ($P<0.05$), but there was no statistical difference in the R848 group ($P>0.05$). Compared with the corresponding control group, there was no significant difference in sFlt-1 or sEng expression in the lipopolysaccharide group ($P>0.05$), whereas sFlt-1 and sEng expression was increased in the R848 group ($P<0.01$). Compared with the control group, the R848 group had chronic injury of placental blood vessels, and extensive hyperplasia of syncytiotrophoblasts in pregnant mice. **Conclusions** Both modeling method induce symptoms of PE in pregnant mice, such as hypertension, fetal growth restriction, and endothelial dysfunction. However, the damage caused by the R848 modeling method is more serious and its advantage is a simple operation.

【Keywords】 preeclampsia; lipopolysaccharide; Resiquimod; animal model

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

先兆子痫 (pre-eclampsia, PE) 是一种累及多器官的妊娠相关疾病,其发病机制是不同程度的胎盘灌注不良引起可溶性因子释放,导致母体血管内皮损伤,从而致使高血压和多器官功能障碍^[1-2]。PE 引起的胎盘损伤可导致胎儿生长受限、流产以及死胎死产。PE 是孕产妇围产期死亡主要原因之一。2019 年全球疾病负担报告显示,每年约有 1800 万妇女患有妊娠高血压疾病,约 27 800 名孕产妇死亡^[3]。在过去的二十年中,先兆子痫的预防治疗取得了重大进展,主要包括孕前咨询、围产期血压控制和并发症管理、胎儿及时分娩和产后监测等^[4]。但除分娩外,没有其他更有效的靶向性治疗方案,目前也缺乏特效药物延缓疾病进展。因此,建立 PE 动物模型,对揭示其相关分子机制和探索有效的靶向治疗方案提供理论和实验依据。

小鼠模型因与人类的高度同源性以及相似的循环系统,在 PE 研究中被广泛使用和接受^[5]。模拟小鼠 PE 样症状的方法包括手术操作、近交系交配、外源性药物诱导以及构建转基因动物模型等^[6]。其中外源性药物主要是通过干扰免疫系统从而诱导 PE 的发生。先天模式识别受体家族 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 的激活会诱发妊娠依赖性高血压、肾功能不全、内皮功能障碍和胎盘损伤^[7]。在本研究中,我们使用不同的 TLR 激动剂诱导 PE,并评估 TLR4 激动剂脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)^[8] 和 TLR7/8 激动剂雷西莫特 (Resiquimod, R848)^[9] 在构建 PE 模型方面的异同点。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 CD-1 小鼠 12 只,8~12 周龄,体重 30~40 g;SPF 级雌性 CD-1 小鼠 24 只,8~12 周龄,体重 20~40 g;购于浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001],饲养于广州华腾生物科技有限公司[SYXK(粤)2020-0237]。所有动物实验均经广州华腾生物科技有限公司伦理委员会审核并批准(HTSW211214),严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

脂多糖 (上海麦克林生化科技有限公司, L861706);雷西莫特 (MedChemExpress, 144875-48-9);小鼠 ELISA 试剂盒 (soluble FMS-like tyrosine kinase 1, sFlt-1, ml002064; soluble endothelial factor, sEng, ml002193) (上海酶联生物科技有限公司);异氟烷 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, R510-22)。大小鼠无创尾动脉血压测量分析系统 (ZS-Z, 北京众实科技有限公司);全自动生化分析仪 (Thermo Indiko Plus)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与造模处理

孕鼠的获得:将 24 只雌性小鼠与 12 只雄性小鼠按雌雄 2:1 的比例合笼饲养过夜;在第 2 天 9:00 检查雌性小鼠的阴道栓,若见阴道栓定义为妊娠第 0 天 (记为 E0)。

动物分组与造模处理:将 24 只孕鼠随机分为 4 组:脂多糖对照组、脂多糖组、R848 对照组、R848

组,每组 6 只。脂多糖对照组于妊娠第 13、14、15、16、17 天(E13、E14、E15、E16、E17)尾静脉注射 200 μ L 生理盐水;脂多糖组于妊娠第 13、14、15、16、17 天尾静脉注射 40 μ g/kg LPS;R848 对照组于妊娠第 13、15、17 天腹腔注射 200 μ L R848 溶剂(5% DMSO+40% PEG300+5% Tween-80+50% saline);R848 组于妊娠第 13、15、17 天按 10 mg/kg 的剂量腹腔注射 R848。

1.3.2 孕鼠无创血压测量

分别在妊娠第 12、14、16、18 天(E12、E14、E16、E18)上午 8:00~11:00,使用尾动脉血压监测仪测量孕鼠血压,每只孕鼠测量 3 次,结果取均值。

1.3.3 孕鼠尿蛋白/尿肌酐比值测定

收集孕鼠妊娠第 17 天 17:00~妊娠第 18 天 8:00 的尿液,使用全自动生化分析仪测定尿蛋白与尿肌酐含量。

1.3.4 ELISA 检测孕鼠血清 sFlt-1 和 sEng 水平

在妊娠第 18 天,采用眼眶静脉采血收集各组孕鼠血液于促凝管中,4℃ 静置 30 min 后,3000 r/min 离心 10 min 收集上清。根据试剂盒说明书检测血清中 sFlt-1 和 sEng 的含量。

1.3.5 HE 染色

在妊娠第 18 天,采用眼眶取血后,使用 10 mL 异氟烷过量麻醉处死孕鼠,开腹取出子宫,剥离胎盘,剖出胎鼠进行计数与称重。收集孕鼠的胎盘组织、子宫,于 10% 甲醛固定、乙醇脱水,经石蜡包埋、连续切片(厚度 4 μ m)后按常规步骤进行 HE 染色,观察各组织的病理改变。

1.4 统计学方法

实验数据采用 IBM SPSS 20 进行统计分析。采用 GraphPad Prism 7 软件进行绘图。对正态分布或近似正态分布的计量资料使用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计描述。多组比较采用单因素方差分析,

组间两两比较采用 LSD 法或 Tamhane's T^2 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

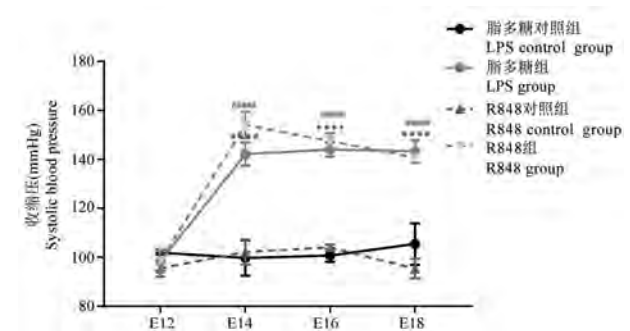
2 结果

2.1 各组孕鼠尾动脉收缩压比较

于妊娠第 13 天开始给予相应药物后,LPS 对照组与 R848 对照组相比,尾动脉收缩压水平无统计学差异($P>0.05$)。与 LPS 对照组相比,LPS 组尾动脉收缩压水平显著升高($P<0.0001$)。与 R848 对照组相比,R848 组尾动脉收缩压水平显著升高($P<0.0001$)(图 1、表 1)。LPS 组和 R848 组均出现孕鼠妊娠期高血压。

2.2 各组孕鼠尿蛋白/尿肌酐比值比较

使用终点法测定孕鼠尿蛋白,氧化酶法测定孕鼠尿肌酐,求得比值后发现,与 LPS 对照组相比,LPS 组比值升高($P<0.05$)。R848 组与 R848 对照组无统计学差异($P>0.05$)(图 2)。



注:与 LPS 对照组相比, **** $P<0.0001$;与 R848 对照组相比, #### $P<0.0001$ 。

图 1 四组孕鼠妊娠第 12、14、16、18 天尾动脉收缩压($n=6$)
Note. Compared with LPS control group, **** $P<0.0001$. Compared with R848 control group, #### $P<0.0001$.

Figure 1 The systolic blood pressure of caudal artery of pregnant mice in four groups on the 12th, 14th, 16th and 18th day of pregnancy

表 1 各组孕鼠尾动脉收缩压(mmHg, $n=6$)

Table 1 The systolic blood pressure of the tail artery of pregnant mice in each group

组别 Groups	E12	E14	E16	E18
LPS 对照组 LPS control group	98.17 $\pm$ 7.49	99.73 $\pm$ 7.24	100.74 $\pm$ 2.58	105.44 $\pm$ 8.46
LPS 组 LPS group	97.05 $\pm$ 10.96	142.16 $\pm$ 4.81****	144.07 $\pm$ 2.91****	143.31 $\pm$ 4.61****
R848 对照组 R848 control group	93.75 $\pm$ 4.24	102.17 $\pm$ 5.10	104.08 $\pm$ 1.16	95.38 $\pm$ 4.00
R848 组 R848 group	101.47 $\pm$ 6.88	154.00 $\pm$ 5.29####	147.44 $\pm$ 3.24####	140.77 $\pm$ 2.00####

注:与 LPS 对照组相比, **** $P<0.0001$;与 R848 对照组相比, #### $P<0.0001$ 。

Note. Compared with LPS control group, **** $P<0.0001$. Compared with R848 control group, #### $P<0.0001$.

2.3 各组孕鼠胎鼠情况比较

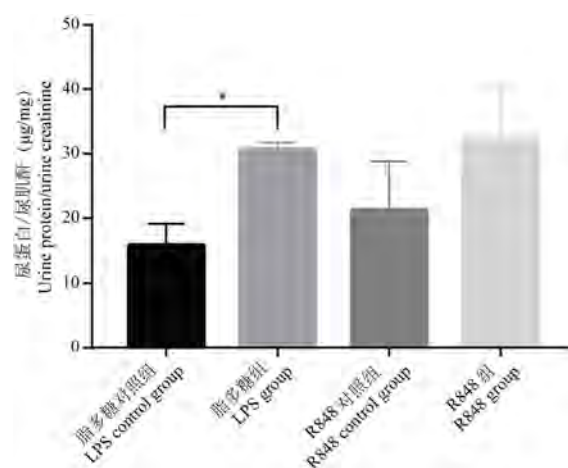
经过统计分析(图 3A),各组胎鼠数量无统计学差异($P>0.05$)(图 3B)。LPS 对照组与 R848 对照组胎鼠体重无统计学差异($P>0.05$),但与 LPS 对照组相比,LPS 组的胎鼠体重略有下降($P<0.05$)。与 R848 对照组相比,R848 组胎鼠体重显著下降($P<0.0001$)(图 3C)。提示 LPS 和 R848 诱导的先兆子痫模型会影响胚胎的发育。

2.4 各组孕鼠血清中 sFlt-1 和 sEng 的表达量

ELISA 检测结果显示(图 4),与 R848 对照组相比,LPS 对照组的各因子表达量无统计学差异($P>0.05$)。LPS 组与 LPS 对照组相比,sFlt-1 和 sEng 的表达无统计学差异($P>0.05$)。R848 组相比较于 R848 对照组,sFlt-1 和 sEng 的表达升高($P<0.01$)。

2.5 病理学变化

HE 染色结果显示(图 5),LPS 对照组和 R848 对照组的胎盘中迷路可见大量血窦,血窦大小正常,血窦周围见大量合体滋养层、细胞滋养层,细胞形态正常。LPS 组胎盘组织与 LPS 对照组相比无

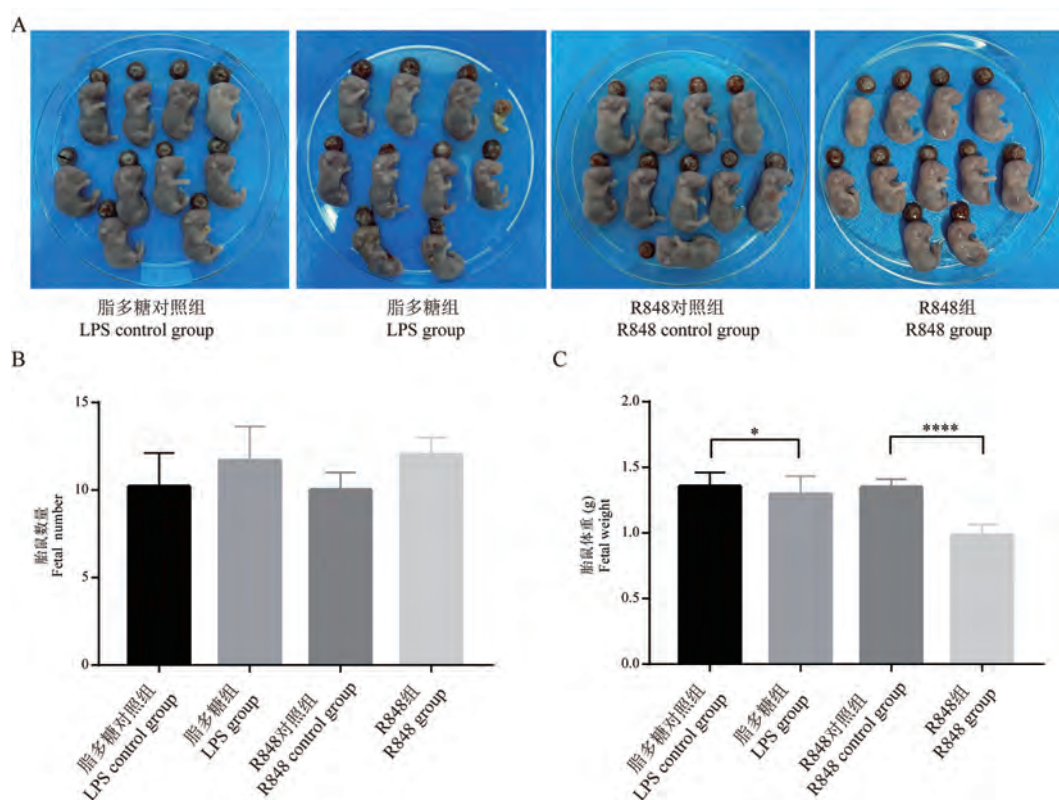


注:与同期相应组别比, * $P<0.05$ 。

图 2 四组孕鼠尿蛋白/尿肌酐结果($n=6$)

Note. Compared with the corresponding groups in the same period, * $P<0.05$.

Figure 2 Results of urinary protein/creatinine of pregnant mice in four groups

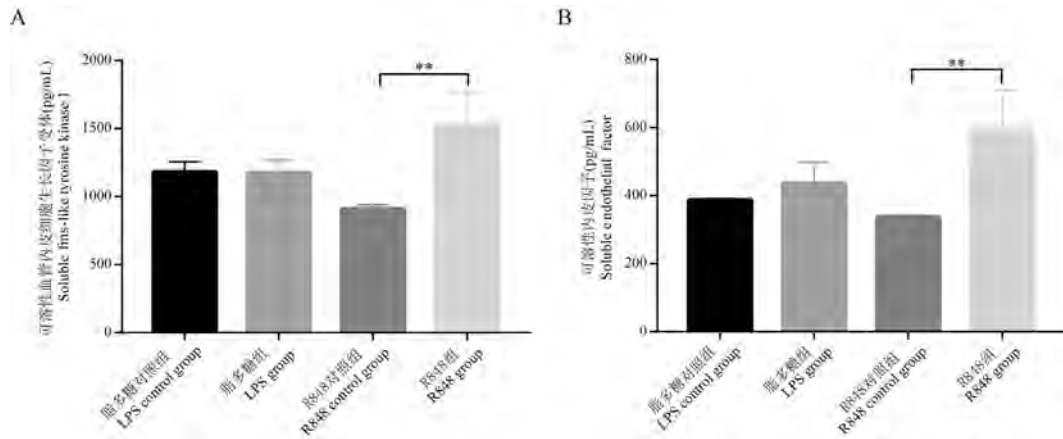


注:A:胎鼠大体观察结果;B:胎鼠数量;C:胎鼠体重。与同期相应组别比, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

图 3 四组孕鼠胎鼠大体观察、数量及体重结果($n=6$)

Note. A, General observation results of pregnant mice. B, Number of pregnant mice. C, Pregnant mice weight. Compared with the corresponding groups in the same period, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Results of gross observation, number and weight of pregnant mice in four groups

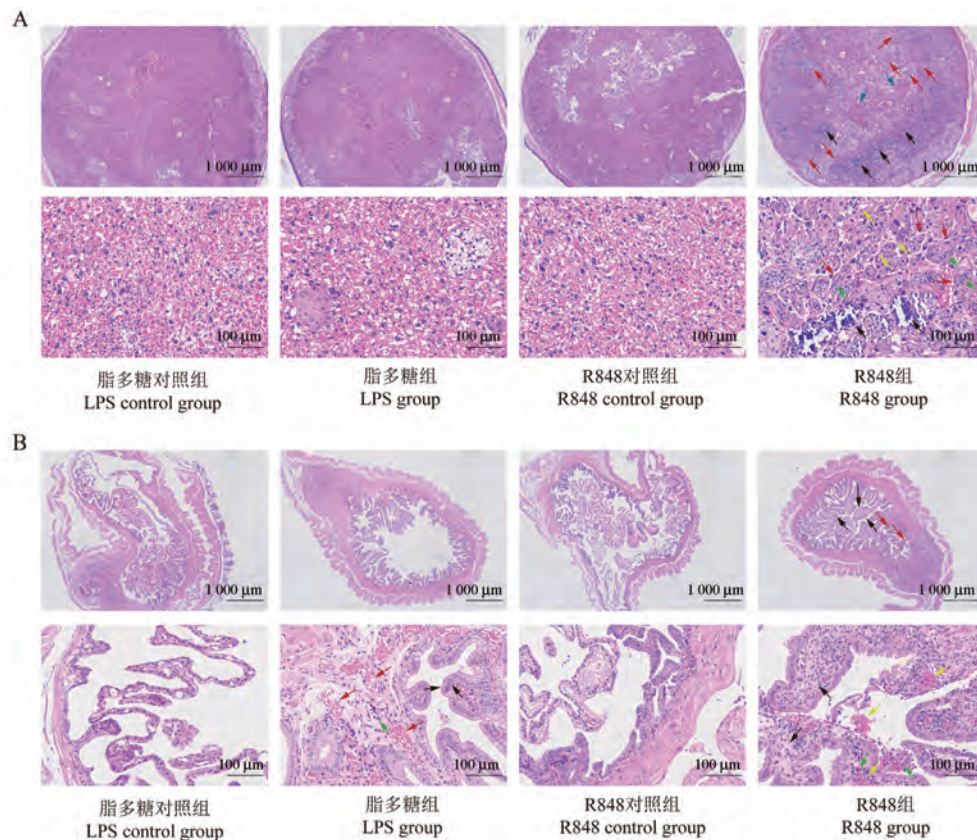


注:A:可溶性血管内皮细胞生长因子受体(sFlt-1)表达水平;B:可溶性内皮因子(sEng)表达水平。与同期相应组别比, ** $P < 0.01$ 。

图4 各组孕鼠血清中 sFlt-1 和 sEng 的表达水平结果($n=3$)

Note. A, Soluble FMS-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) expression level. B, Soluble endothelial factor (sEng) expression level. Compared with the corresponding groups in the same period, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Results of sFlt-1 and sEng expression level in serum of pregnant mice in four groups



注:A:胎盘;黑色箭头:蓝紫色钙盐;红色箭头:合体胞滋养层增生;黄色箭头:红细胞;蓝色箭头:胞核;绿色箭头:细胞钙化;B:子宫;黑色箭头:上皮层结缔组织;红色箭头:血管扩张;黄色箭头:红细胞;绿色箭头:炎性细胞浸润。

图5 四组孕鼠胎盘、子宫 HE 染色

Note. A, Placenta. Black arrows, Blue-purple calcium salts. Red arrows, Syncytiotrophoblast hyperplasia. Yellow arrows, Red blood cells. Blue arrows, Nuclei. Green arrows, Cell calcification. B, Uterus. Red arrows, Vasodilation. Yellow arrows, Red blood cells. Green arrows, Inflammatory cell infiltration.

Figure 5 HE staining of placenta and uterus of four groups of pregnant mice

明显差异。而 R848 组的全部孕鼠出现严重的胎盘病变:胎盘组织迷路可见大量蓝紫色钙盐沉积,合体滋养层广泛增生并伴有大量钙化,可见细胞灶状坏死,滋养层内血窦数量明显减少。

此外,子宫 HE 染色结果显示,LPS 对照组和 R848 对照组子宫的黏膜层见大量绒毛样结构,上皮完整,上皮细胞胞质丰富,形态正常,固有层见较多毛细血管,管腔大小正常。与 LPS 对照组比较,LPS 组 2/3 孕鼠的子宫的黏膜层绒毛轻度水肿,大量毛细血管增生及充血扩张,伴少量炎性细胞浸润。与 R848 对照组比较,R848 组全部孕鼠的子宫的黏膜上皮高度水肿,绒毛明显增厚,固有层结缔组织增生明显,毛细血管增生及淤血扩张,组织内可见小范围轻度出血,伴少量炎性细胞浸润。

3 讨论

先兆子痫是一种多系统妊娠特异性疾病,其发病机制主要涉及两个阶段:胎盘异常和母体综合征的发展^[10]。因此构建合适的动物模型有助于更好地了解其发病机制和寻找有效的治疗方法。小鼠胎盘在结构上类似于人类胎盘,具有高度的功能保护^[11]。目前,构建小鼠 PE 模型的方法主要有:(1)使用手术诱导法,降低胎盘灌注压^[12]。此方法产生类似于伴有胎儿生长受限的晚发性 PE 病理效应。由于手术是在胎盘发育后进行的,不影响螺旋动脉正常重塑,一般用于胎盘缺血和胎盘功能不全的研究;(2)近交系交配:雄性 DBA/2 近交系小鼠与 CBA/J 近亲繁殖^[13],此方法可引起半异体胎盘的免疫排斥反应,及主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)与母体不相容性导致流产;(3)基因编辑:storkhead box 1 过表达^[14]、吡啶胺 2,3-双加氧酶敲除^[15],此方法使用传统的转基因技术调控与 PE 相关基因的表达,同时影响胎盘和胎儿,因此必须考虑胎儿基因组改变对病理或表型的影响;(4)外源性药物诱导:血管紧张素 II 型 1 受体^[16]、TLR 激动剂^[17]、L-NAME (ng-nitro-L-arginine methyl ester, 硝基-L-Arg-甲基酯)^[18],这些药物中的绝大多数调节免疫系统,通常在胎盘发育发生后引入,模拟晚发性 PE 的慢性炎症状态;(5)全身性腺病毒感染和滋养层特异性转基因方法^[19],全身性腺病毒感染因其肝中靶基因的腺病毒摄取和错误表达可导致母体假病毒性肝炎,产生与 PE 无关联性的其他症状。滋养层特异性慢病毒转基

因方法仅在胎盘的滋养层部分表达靶基因,可避免产生脱靶或继发性效应。上述造模方法可产生 PE 部分或全部特征,及一些与人类 PE 临床不具相关性的辅助表型,但由于存在发病机制和功能活性的差异以及病理进程的不一致,仍需建立更可靠的 PE 动物模型进行验证以提高向人类转化效率。

LPS 是一种细菌内毒素,作用于细胞膜表面的 Toll 样受体 4^[20]。LPS 给药是常用的 PE 造模方法。在免疫细胞中,LPS 可以触发促炎细胞因子的释放和活性氧的产生^[21]。Li 等^[8]于妊娠 7.5~17.5 d 在 CD-1 小鼠中注射 LPS,随后观察到血压升高,胎盘胎儿血管面积、滋养层侵袭和螺旋动脉重塑减少,纤维蛋白沉积和肾小球肿胀的肾损伤。

TLR7 和 TLR8 通过与内体或吞噬体中的配体结合来识别细胞内信号^[22]。与正常孕妇相比,PE 患者的胎盘中合体滋养细胞和细胞滋养细胞中的 TLR7 和 TLR8 表达增加。研究发现,用 TLR7/8 激动剂诱导的 PE 小鼠,其滋养层细胞的 TLR7 和 TLR8 的蛋白质水平增加,出现高血压、蛋白尿、炎症和胎盘功能障碍的表征^[9]。

在本研究中,与相对应的对照组相比,LPS 模型组和 R848 模型组均出现了妊娠期高血压(收缩压 ≥ 140 mmHg/舒张压 ≥ 90 mmHg)。尿蛋白/尿肌酐结果显示,LPS 组出现蛋白尿,但 R848 组并没有出现蛋白尿,这可能与 TLR8 在小鼠中抑制 TLR7 的介导作用有关,从而对肾有保护作用^[23]。尽管如此,胎盘 TLR7/8 的过度激活可诱发妊娠依赖性高血压和内皮功能障碍。本研究发现,LPS 组和 R848 组的胎儿体重低于相应对照组($P < 0.05$),这表明胎儿生长受限。与此同时,HE 染色结果表明,LPS 组和 R848 组子宫均出现少量炎性细胞浸润,且 R848 组胎盘组织可见灶状坏死。因此,本研究成功地构建了使用 TLR4 激动剂 LPS 和 TLR7/8 激动剂 R848 诱导的 PE 动物模型。

在先兆子痫中,胎盘分泌的过量 sFlt-1,通过结合局部和循环血液中的血管生成蛋白(vascular endothelial growth factor, VEGF)和胎盘生长因子(placental growth factor, PlGF),抑制其传导,从而导致内皮细胞功能障碍^[24]。抗血管生成蛋白 sEng 是一种胎盘衍生的可溶性转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)共受体,抑制 TGF- β 1 与其受体和下游信号传导的结合,引起 TGF- β 信号传导失调^[25]。sEng 在先兆子痫患者血清中的表达量与

疾病严重程度呈正相关。在妊娠大鼠中,相比于单独使用,sEng 和 sFlt-1 的联用产生先兆子痫的体征和症状更严重^[26]。这与我们的实验结果相一致,sEng 和 sFlt-1 表达量升高的 R848 模型组比 sEng 和 sFlt-1 含量无统计学差异的 LPS 模型组的先兆子痫表征更严重,如胎儿体重下降更明显、胎盘严重病变。

综上所述,LPS 和 R848 均能构建出与人类 PE 病理相似(新发高血压或伴有蛋白尿、胎盘功能障碍以及其他器官功能障碍等^[6])的 PE 动物模型。LPS 在妊娠和非妊娠动物中都可诱导全身炎症,其机制为慢性炎症状态的持续激活,这表明 LPS 引起的表型可能不是妊娠特异性的^[27]。根据胎盘 HE 染色结果表明,R848 构建的 PE 模型表征更为严重,且给药方式为腹腔注射,操作简单。同时,在 R848 模型小鼠循环中发生了抗血管生成与促血管生成的不平衡:与对照组相比,R848 组小鼠血清的 sFlt-1 和 sEng 表达上升,暗示 TLR7/8 介导的炎症免疫反应可能通过调节 sFlt-1 和 sEng 的表达从而抑制母胎界面的血管生成,参与 PE 的发生发展^[28-29]。因此,针对 TLR7/8 开发的 ssRNA 或者小分子抑制剂可能通过促进新生血管的生成阻断 PE 的进展。

本研究建立的 TLR7/8 诱导的 PE 样小鼠模型是较为新颖且有相关数据支持的模型^[30]。该模型不仅具有妊娠期特有的高血压以及合并胎儿生长受限等不良妊娠结局的 PE 样表型,而且具有类似人类 PE 胎盘滋养细胞侵袭不足的病理特征。进一步提示了母胎界面 TLR7 信号通路异常在 PE 发病过程中的重要作用,并为研究 PE 的发病机制提供了一个合适的动物模型。

参考文献:

- [1] Abbasi J. Cell-free RNA in maternal plasma predicts preeclampsia [J]. JAMA, 2022, 327(6): 517.
- [2] Chappell LC, Cluver CA, Kingdom J, et al. Pre-eclampsia [J]. Lancet, 2021, 398(10297): 341-354.
- [3] Wang W, Xie X, Yuan T, et al. Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2021, 21(1): 364.
- [4] Ashworth D, Battersby C, Green M, et al. Which antihypertensive treatment is better for mild to moderate hypertension in pregnancy? [J] BMC, 2022, 376: e066333.
- [5] 何岑盈, 谢莹莺, 徐梦婷. 关于建立子痫前期大鼠小鼠模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 110-116.
- [6] Waker CA, Kaufman MR, Brown TL. Current state of preeclampsia mouse models: approaches, relevance, and standardization [J]. Front Physiol, 2021, 12: 681632.
- [7] Afkham A, Eghbal-Fard S, Heydarlou H, et al. Toll-like receptors signaling network in pre-eclampsia: an updated review [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2229-2240.
- [8] Li G, Ma L, Lin L, et al. The intervention effect of aspirin on a lipopolysaccharide-induced preeclampsia-like mouse model by inhibiting the nuclear factor- κ B pathway [J]. Biol Reprod, 2018, 99(2): 422-432.
- [9] Chatterjee P, Weaver LE, Doersch KM, et al. Placental toll-like receptor 3 and toll-like receptor 7/8 activation contributes to preeclampsia in humans and mice [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41884.
- [10] Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies [J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(5): 275-289.
- [11] Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: a comparative view of humans and rodents [J]. Cell Adh Migr, 2016, 10(1-2): 88-110.
- [12] 黄文亭, 曾子纯, 王冬菊, 等. 改良减少子宫血流灌注法建立子痫前期大鼠模型 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 776-780.
- [13] Ahmed A, Singh J, Khan Y, et al. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13663.
- [14] Doridot L, Passet B, Méhats C, et al. Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment [J]. Hypertension, 2013, 61(3): 662-668.
- [15] Broekhuizen M, Klein T, Hitzerd E, et al. L-Tryptophan-Induced vasodilation is enhanced in preeclampsia: studies on its uptake and metabolism in the human placenta [J]. Hypertension, 2020, 76(1): 184-194.
- [16] Xia Y, Kellems RE. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond [J]. Circ Res, 2013, 113(1): 78-87.
- [17] Afkham A, Eghbal-Fard S, Heydarlou H, et al. Toll-like receptors signaling network in pre-eclampsia: an updated review [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2229-2240.
- [18] 朴慧娟. 针刺颈段夹脊穴对 L-NAME 诱导的高血压大鼠降压效应及其机理研究 [D]. 延边: 延边大学, 2021.
- [19] Albers RE, Kaufman MR, Natale BV, et al. Trophoblast-specific expression of HIF-1 α results in preeclampsia-like symptoms and fetal growth restriction [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 2742.
- [20] Heinrich MA, Mangia M, Prakash J. Impact of endotoxins on bioengineered tissues and models [J]. Trends Biotechnol, 2022, 40(5): 532-534.
- [21] Sheller-Miller S, Radnaa E, Yoo J, et al. Exosomal delivery of

- NF- κ B inhibitor delays LPS-induced preterm birth and modulates fetal immune cell profile in mouse models [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(4): eabd3865.
- [22] Huppertsberg A, Kaps L, Zhong Z, et al. Squaric ester-based, pH-degradable nanogels: modular nanocarriers for safe, systemic administration of toll-like receptor 7/8 agonistic immune modulators [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(26): 9872–9883.
- [23] Demaria O, Pagni PP, Traub S, et al. TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(10): 3651–3662.
- [24] 于颖, 路鸿艳. 血管内皮生长因子失衡及补体沉积与先兆子痫的相关性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 70–76.
- [25] Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance [J]. *Annu Rev Med*, 2008, 59(1): 61–78.
- [26] Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 642–649.
- [27] Zhou J, Miao H, Li X, et al. Curcumin inhibits placental inflammation to ameliorate LPS-induced adverse pregnancy outcomes in mice via upregulation of phosphorylated Akt [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(2): 177–185.
- [28] Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease [J]. *Circulation*, 2011, 123: 2856–2869.
- [29] Opichka MA, Rappelt MW, Gutterman DD, et al. Vascular dysfunction in preeclampsia [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3055.
- [30] Chiasson VL, Chatterjee P, Hatahet M, et al. Placental expanded (PLX) cell treatment ameliorates preeclampsia induced by TLR3 or TLR7 activation in mice [J]. *Hypertension*, 2013, 62(1): A545.
- [收稿日期] 2022-03-01

小鼠背侧导水管周围灰质在先天胁迫下逃跑和僵立的不同编码特征

鼠类为了躲避天敌常常表现出逃跑(flight)或僵立(freezing)的先天防御行为,该行为的产生与中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)有关。目前,背侧 PAG(dorsal PAG, dPAG)对这两种防御行为的神经编码机制尚需要进一步研究。

该研究采用模拟天敌迫近的 Looming 和模拟天敌掠过的 sweeping 两种视觉刺激范式诱导 C57BL/6 小鼠先天性防御行为,并将 4×4 的微电极阵列植入 dPAG 记录小鼠产生两种防御行为的神经信号,从胞外动作电位(spike)和局部场电位(local field potential, LFP)中分别提取和分析两种防御行为的神经编码特征。结果表明,dPAG 在 C57 小鼠逃跑和僵立时神经放电模式和编码特征不同;逃跑行为比僵立行为的时间延迟更短,逃跑时 dPAG 的 Spike 发放率显著升高,而僵立行为的则显著下降;此外,两种防御行为的 dPAG 神经动作电位放电序列的峰峰间隔(Inter Spike Interval, ISI)分布差异主要表现在 2~10 ms 内,且逃跑行为高于僵立行为。两种防御行为 dPAG 的 LFP 差异主要集中在 theta 频带,其中逃跑行为 8~10 Hz,而僵立行为则在 6~8 Hz。同步似然算法构建脑功能网络表明,逃跑和僵立时 dPAG theta 频带的脑功能网络连接密度显著增强。综上所述,该研究揭示了视觉诱导的恐惧情绪在小鼠防御运动行为调制中发挥关键作用。Looming 刺激模拟天敌迫近,诱发小鼠强烈的恐惧应激产生潜意识快速逃跑行为;而 Sweeping 刺激模拟天敌掠过,刺激相对较弱可能诱发僵立行,揭示了小鼠 dPAG 在先天恐惧范式中诱发逃跑和僵立行为的神经编码机制,证实了恐惧核团在哺乳动物行为调控中的发挥重要作用。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6):491–501; <https://doi.org/10.1002/ame2.12276>)

赵峻秀, 霍明洋, 陈振宇, 等. 线粒体铁蛋白调控上皮-间质转化对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 42-50.

Zhao JX, Huo MY, Chen ZY, et al. Cisplatin resistance in non-small lung cancer cells is affected by ferritin mitochondrial through EMT regulation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 42-50.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.006

线粒体铁蛋白调控上皮-间质转化对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药的影响

赵峻秀¹, 霍明洋², 陈振宇¹, 白雪松¹, 马洪波¹, 郝艳丽^{1*}

(1. 吉林医药学院公共卫生学院, 吉林 吉林 132013; 2. 延边大学基础医学院, 吉林 延边 133002)

【摘要】 目的 研究线粒体铁蛋白(FtMt)对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药株 A549/DDP 和非小细胞肺癌细胞株 A549 上皮-间质转化(EMT)的影响,探讨其改善顺铂耐药的分子机制。**方法** 流式细胞术检测 A549 和 A549/DDP 的凋亡率和细胞周期情况,Western blot 检测 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 FtMt 蛋白表达水平,RT-qPCR 法检测细胞中 E-cadherin、N-cadherin、snail、slug、twist、波形蛋白(vimentin)、铁转运蛋白(ferroportin,FPn)、二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1,DMT1)、铁调素和转铁蛋白受体 1(transferrin receptor1,TfR1)基因表达水平。细胞划痕实验检测细胞迁移情况。**结果** 随着顺铂使用剂量增加,A549/DDP 和 A549 细胞凋亡率逐渐升高,且 A549 细胞凋亡率显著高于 A549/DDP 细胞。顺铂处理后,与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,顺铂各剂量组 A549 细胞 G0/G1 期和 G2/M 期逐渐降低,A549/DDP 细胞 G0/G1 期和 G2/M 期先升高后降低($P<0.05$)。A549/DDP 细胞 E-cadherin 和 mRNA 水平低于 A549 细胞,A549/DDP 细胞 N-cadherin 和 mRNA 水平高于 A549 细胞,A549/DDP 细胞中 snail、slug、vimentin、FPn、铁调素(hepcidin)和 TfR1 mRNA 水平高于 A549 细胞($P<0.05$),A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平低于 A549 细胞($P>0.05$),A549/DDP 细胞迁移的速度显著快于 A549 细胞($P<0.05$),A549/DDP 细胞中 FtMt 蛋白表达水平显著高于 A549 细胞($P<0.05$)。**结论** 肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂过程中可能发挥了重要作用。

【关键词】 线粒体铁蛋白;顺铂耐药;非小细胞肺癌;上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0042-09

Cisplatin resistance in non-small lung cancer cells is affected by ferritin mitochondrial through EMT regulation

ZHAO Junxiu¹, HUO Mingyang², CHEN Zhenyu¹, BAI Xuesong¹, MA Hongbo¹, XI Yanli^{1*}

(1. School of Public Health, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

2. School of Basic Medicine, Yanbian University, Yanbian 133002)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of mitochondrial ferritin (FtMt) on epithelial mesenchymal transition (EMT) of cisplatin-resistant non-small lung cancer line A549/DDP and non-small lung cancer line A549, and to explore the molecular mechanism in improving cisplatin resistance. **Methods** Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate and cell cycle of A549 and A549/DDP cells. Western blot was used to analyze expression of E-cadherin, N-cadherin and FtMt. RT-qPCR was used to measure gene expression of E-cadherin, N-cadherin, snail, slug, twist,

【基金项目】 国家级大学生创新创业训练项目(201816);吉林省科技厅项目资助(20170623093-11TC);吉林省教育厅资助项目(JJKH20210480KJ)。

【作者简介】 赵峻秀(1998—),本科,研究方向:非小细胞肺癌发病机制的基础研究。E-mail: zjx1147501221@163.com

【通信作者】 郝艳丽(1981—),博士,副教授,研究方向:非小细胞肺癌发病机制的基础研究。E-mail: jilin2534126@163.com

vimentin, FPN, DMT1, hepcidin and TfR1 in cells. Cell migration was assessed by a scratch assay. **Results** The apoptotic rate of A549/DDP and A549 cells was increased with the increase in cisplatin concentration, and the apoptotic rate of A549 cells was significantly higher than that of A549/DDP cells. After cisplatin treatment, A549 cells in G0/G1 and G2/M phases were gradually decreased in all groups compared with the 0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, whereas A549/DDP cells in G0/G1 and G2/M phases were first increased and then decreased ($P < 0.05$). The protein and mRNA levels of E-cadherin in A549/DDP cells were lower than those in A549 cells, while the protein and mRNA levels of N-cadherin in A549/DDP cells were higher than those in A549 cells. The mRNA levels of snail, slug, vimentin, FPN, hepcidin and TfR1 in A549/DDP cells were higher than those in A549 cells ($P < 0.05$). The mRNA level of DMT1 in A549/DDP cells was lower than that in A549 cells ($P > 0.05$). The cell migration rate was significantly faster in A549/DDP cells than in A549 cells ($P < 0.05$). The expression of FtMt in A549/DDP cells was significantly higher than that in A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Cisplatin resistance of lung cancer cells is related to the EMT process, and FtMt might play an important role in cisplatin resistance of lung cancer cells.

【Keywords】 mitochondrial ferritin; cisplatin resistance; non-small lung cancer; epithelial mesenchymal transition

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

肺癌是全球致死率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)大约能占肺癌总数的 80%~85%^[1-2]。多数肺癌患者确诊时已处于临床晚期,临床上缺少疗效显著的治疗药物,生物靶向药物的针对性强,很多患者因基因配型不符而错失最佳治疗机会。此外,许多肺癌患者对临床常用的化疗或放射疗法存在耐药,导致肺癌患者的 5 年生存率较低,仅有 4%~17%^[3]。顺铂(cisplatin, DDP)是临床上常用的抗肿瘤药物,抗癌谱广,与多种抗肿瘤药物有协同作用、且无交叉耐药^[4],但顺铂的单独长期使用会造成患者耐药^[5]。研究发现,肺癌患者的顺铂耐药可能诱导上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,抑制肺癌细胞的 EMT 过程,可能会有效抑制肺癌细胞的耐药与侵袭^[6]。持续性铁过载能促进胰腺癌细胞发生 EMT 过程^[7]。在乳腺癌细胞中,通过抑制膜铁转运蛋白的表达可以促使细胞内铁浓度升高,进而导致 EMT 发生^[8]。由此推测,铁过载可能与肿瘤细胞的耐药及 EMT 过程有关。线粒体铁蛋白(ferritin mitochondrial, FtMt)是一种定位在线粒体上、与铁代谢密切相关的蛋白,具有组织受限性表达的特点,由于其 mRNA 上缺乏铁依赖的、能翻译调控铁反应元件的共有序列,所以它的翻译不受铁反应元件(iron responsive element, IRE)-铁调节蛋白(iron regulatory protein, IRP)机制的调控,而该机制被认为是调控细胞铁稳态的重要机制^[9-10]。已证实 FtMt 参与了线粒体中的铁调节并维持线粒体内铁稳态^[11],但目前关于 FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂及 EMT 过程中的作用尚不清楚。为此,本研究通过

比较顺铂耐药细胞株 A549/DDP 与非耐药细胞株 A549 之间 FtMt 表达水平、EMT 过程及相关信号通路的差异,探索 FtMt 与顺铂耐药和 EMT 之间的关系,为进一步了解肺癌的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞株(中国科学院典型培养物宝藏委员会细胞库);人非小细胞肺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP(长春晶美生物工程有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(以色列 BI);RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone);凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);线粒体铁蛋白一抗(Ferritin mitochondrial, FtMt)、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、 β -actin、HRP-Goat Anti-Rabbit IgG、HRP-Goat Anti-Mouse IgG(武汉三鹰生物技术有限公司);cDNA 合成试剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司);BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix 和线粒体提取试剂盒(碧云天生物技术);顺铂(cisplatin, DDP)(美国 sigma);引物(生物工程上海股份有限公司)。

NBS Galaxy 170S 二氧化碳培养箱(德国, Eppendorf);Epoch 多功能酶标仪(美国 BioTek);C6 流式细胞仪(美国 BD);7500 FastPCR 仪(美国 ABI);Mastercycler nexus gradient 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf);IX73 活细胞工作站(日本奥林巴斯);Mini-Protein 电泳槽、Mini Trans-Blot 转印槽和 Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞凋亡检测

A549 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养液(完全培养液)中,37℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜。A549/DDP 细胞培养于富含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDP 的 RPMI-1640 培养液(完全培养液)中,37℃、5% CO_2 培养箱中培养。按如下分组给予受试物处理:对照组加入 2 mL 的不完全培养液(不含血清,其余同完全培养液),给药组分别加入相同体积的 1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂溶液(不含血清,其余同完全培养液)。37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,消化并收集细胞,离心去上清,向沉淀中加入预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 染色液,混匀,室温避光孵育 20 min,立即上机检测。实验重复 3 次。

1.3.2 细胞周期检测

细胞处理同 1.3.1。处理终点后,用 1×PBS 洗 3 次,消化并收集细胞,1000 r/min 离心 3 min,弃上清,向沉淀中加入 70% 冷乙醇,4℃ 固定过夜,PBS 洗涤,RNaseA 在 37℃ 孵育 30 min。1000 r/min 离心 3 min,弃上清,加入 0.5 mL、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI 溶液,室温避光反应 30 min。PBS 洗去未结合染色液,立即上机检测。实验重复 3 次。Modfit 软件分析结果。

1.3.3 蛋白表达检测

A549 和 A549/DDP 细胞接种于 6 孔板,37℃、5% CO_2 培养 24 h 后,用 1×PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μL 细胞裂解液,冰浴 10 min,待细胞裂解完全,移入 1.5 mL EP 管中,100℃ 变性 15 min,3000 r/min

离心 5 min 后,取上清进行 Western blot 检测 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平。按照线粒体提取试剂盒说明书步骤,提取线粒体,检测 FtMt 蛋白表达水平。通过 Image Lab 软件对蛋白印迹进行分析,以 β -actin 为内参计算蛋白的相对含量。

1.3.4 mRNA 表达水平检测

细胞处理同 1.3.1。处理终点后,胰蛋白酶消化收集细胞,1000 r/min 离心 5 min,去上清留沉淀,加入 1 mL TRIzol,冰浴 15 min 以充分裂解,加入 0.2 mL 氯仿并剧烈摇荡 15 s,12 000 r/min 离心 15 min,留取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清后加入 1 mL、75% 预冷乙醇,7500 r/min 离心 5 min 后弃上清,37℃ 干燥后,加入 20 μL DEPC 水融解。用提取的 RNA 作为模板,按照试剂盒说明书的步骤合成 cDNA,并进行 Real-time PCR 检测。以 GAPDH 为内参,反应条件为:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s,共进行 35 个循环。扩增后采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列参照 PrimerBank,见表 1。

1.3.5 细胞迁移检测

细胞以 2×10^5 个/皿接种 30 mm 培养皿,待细胞贴壁后,用 20 μL 枪头在培养皿底部画一条直线,制备出细胞划痕区域。加入不完全培养液洗净划痕区域残留的细胞碎片,分别加入 2 mL 不同浓度的顺铂溶液,置于活细胞工作站,观察细胞迁移情况。观察时间为 24 h。每个实验重复 3 次,利用 Image J 软件统计分析划痕区域的宽度。宽度 = 24 h 划痕区域的宽度/0 h 划痕区域的宽度。

1.4 统计学方法

SPSS 16.0 软件进行数据处理,所有数据均用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	上游引物序列(5'→3') Upstream primer sequence	下游引物序列(5'→3') Downstream primer sequence	长度(bp) Length
<i>E-cadherin</i>	GAACGCATTGCCACATACAC	GAATTCGGGCTTGTGTCAT	125
<i>N-cadherin</i>	GTGCCATTAGCCAAGGGAATTCAGC	GCGTTCCTGTTCCTCATAGGAGG	370
<i>Snail</i>	ACCACTATGCCGCGCTCTT	GGTCGTAGGGCTGCTGGAA	115
<i>Slug</i>	GCGCATGCTCCATTGTCTTAC	AGGCACTTGAAGGGGTATTG	167
<i>Twist</i>	AGAAGTCTCGGGCTGTGGCG	GAGGGCAGCGTGGGGATGATC	193
<i>Vimentin</i>	TGAGTACCGGAGACAGGTCGAG	TAGCAGCTTCAACGCAAAGTTC	119
<i>FPn</i>	TTACCAGAAAACCCAGCTC	CAGGGGTTTTGGCTCAGTAT	103
<i>DMT1</i>	GTGGTTACTGGGCTGCATCT	CCCACAGAGGAATTCCTCCT	172
<i>Hepcidin</i>	CTGAGCAGTGGCTCTGTTTTC	GAAGTGGGTGCTCTGCCTC	129
<i>TjR1</i>	CATGTGGAGATGAAACTTGC	TCCCATAGCAGATACTTCCA	106
<i>GAPDH</i>	AAATCCCATCACCATCTTCCAG	GAGTCCTTCCACGATACCAAAGTTG	136

用最小显著差法(LSD)检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞凋亡的比较

结果显示,随着顺铂给药剂量的增加,细胞凋亡率和坏死率逐渐增多。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞早期凋亡、晚期凋亡和坏死率均显著高于 0、1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P<0.05$)。1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞早期凋亡、晚期凋亡和坏死率虽高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组,但比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞之间早期凋亡、晚期凋亡和坏死率比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 早期凋亡率显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P<0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 早期凋亡率显著高于 1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂

组 ($P<0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞晚期凋亡率显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P<0.05$)。与 A549 细胞 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,A549/DDP 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和坏死率显著降低 ($P<0.05$)。与 A549 细胞 1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,A549/DDP 细胞的坏死率显著降低 ($P<0.05$)。见表 2 和图 1。

2.2 细胞周期的比较

与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组比较,5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 G0/G1 期显著降低 ($P<0.05$);2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 S 期显著升高 ($P<0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549 细胞 G2/M 期显著低于 0、1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P<0.05$)。各剂量组 A549 细胞凋亡率之间比较有显著差异 ($P<0.05$)。1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 G2/M 期显著高于 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组;5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 G2/M 期显著低于 0、1.0 和 2.5

表 2 A549 和 A549/DDP 细胞凋亡率及坏死率的比较 (%)

Table 2 Comparison of apoptosis rate and necrosis rate between A549 and A549/DDP cells

剂量 ($\mu\text{g/mL}$) Dose	A549			A549/DDP		
	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	坏死 Necrosis	早期凋亡 Early apoptosis	晚期凋亡 Late apoptosis	坏死 Necrosis
0	1.90 $\pm$ 0.28	1.05 $\pm$ 0.35	1.00 $\pm$ 0.28	1.55 $\pm$ 0.45	1.20 $\pm$ 0.11	0.55 $\pm$ 0.15
1.0	2.40 $\pm$ 0.42	1.45 $\pm$ 0.35	1.50 $\pm$ 0.28	3.35 $\pm$ 0.10 [*]	1.40 $\pm$ 0.10	0.70 $\pm$ 0.05 ⁽¹⁾
2.5	3.55 $\pm$ 0.64	1.60 $\pm$ 0.28	1.85 $\pm$ 0.35	4.40 $\pm$ 0.28 [*]	1.55 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.10 ⁽¹⁾
5.0	13.55 $\pm$ 2.06 ^{*##}	3.70 $\pm$ 1.41 ^{*##}	3.00 $\pm$ 0.57 ^{*##}	6.10 $\pm$ 0.30 ^{*##(1)}	1.60 $\pm$ 0.20 ^{*(1)}	0.95 $\pm$ 0.15 ⁽¹⁾

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, $^*P<0.05$;与 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, $^{\#}P<0.05$;与 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, $^{\&}P<0.05$;与 A549 细胞相比, $^{(1)}P<0.05$ 。

Note. Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, $^*P<0.05$. Compared with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, $^{\#}P<0.05$. Compared with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, $^{\&}P<0.05$. Compared with A549 cells, $^{(1)}P<0.05$.

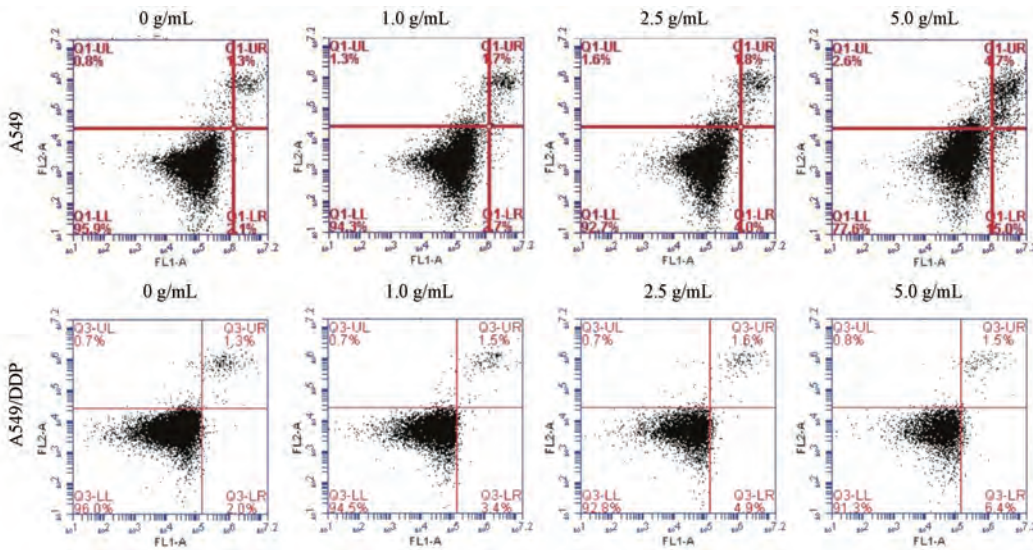


图 1 不同浓度顺铂处理下 A549 和 A549/DDP 细胞凋亡率及坏死率的流式图

Figure 1 Flow cytometry of apoptosis rate and necrosis rate of A549 and A549/DDP cells under different concentrations of cisplatin

$\mu\text{g/mL}$ 顺铂组。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞凋亡率显著高于 0、1.0 和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 ($P < 0.05$)。2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 G0/G1 期显著高于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 S 期显著高于 A549 细胞 ($P < 0.05$), G2/M 期显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞 S 期显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。1.0、2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组 A549/DDP 细胞凋亡率显著低于 A549 细胞 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

2.3 E-cadherin 和 N-cadherin 表达水平的比较

由结果可知,与 A549 细胞比较,A549/DDP 细胞中 E-cadherin 表达水平虽降低,但比较差异无统计学意义 ($t = 1.919, P > 0.05$);A549/DDP 细胞中 N-cadherin 表达水平显著升高,比较差异有统计学意义 ($t = 4.162, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 EMT 信号通路的比较

结果显示,与 A549 细胞比较,A549/DDP 细胞中 E-cadherin mRNA 水平降低,但比较差异没有统计学意义 ($t = 0.570, P > 0.05$);A549/DDP 细胞中

N-cadherin、snail、slug 和 vimentin 的 mRNA 水平显著升高 ($t = 8.469, t = 8.768, t = 5.793, t = 7.118, P < 0.05$);Twist 的 mRNA 水平虽然显著升高,但比较差异无统计学意义 ($t = 2.819, P > 0.05$)。见图 4。

2.5 细胞迁移的比较

由结果可知,与 A549 细胞比较,A549/DDP 细胞伤口划痕区域面积显著升高 ($t = 6.745, P < 0.05$),表明 A549/DDP 细胞迁移的速度显著快于 A549 细胞。见图 5。

2.6 FPN、DMT1、hepcidin 和 TfR1 的 mRNA 水平比较

由图 6 可知,与 A549 细胞比较,A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平虽降低,但比较差异无统计学意义 ($t = 2.112, P > 0.05$)。FPN、hepcidin 和 TfR1 mRNA 水平显著升高,且比较差异有统计学意义 ($t = 5.385, t = 2.893, t = 5.611, P < 0.05$)。

2.7 FtMt 表达水平的比较

由结果可知,与 A549 细胞比较,A549/DDP 细胞中 FtMt 蛋白表达水平显著升高 ($t = 2.804, P < 0.05$)。见图 7。

表 3 A549 和 A549/DDP 细胞周期的比较 (%)

Table 3 Comparison of cell cycle between A549 and A549/DDP

组别 ($\mu\text{g/mL}$) Groups	A549				A549/DDP			
	G0/G1	S	G2/M	凋亡率 (%) Apoptosis rate	G0/G1	S	G2/M	凋亡率 (%) Apoptosis rate
0	60.04 $\pm$ 5.04	28.89 $\pm$ 1.76	11.80 $\pm$ 0.48	0.21 $\pm$ 0.07	56.38 $\pm$ 3.62	40.88 $\pm$ 4.12 ⁽¹⁾	3.88 $\pm$ 0.60 ⁽¹⁾	0.15 $\pm$ 0.02
1.0	53.54 $\pm$ 6.54	35.79 $\pm$ 1.53	10.46 $\pm$ 0.52	1.42 $\pm$ 0.13 [*]	60.73 $\pm$ 6.27	33.15 $\pm$ 2.85	6.57 $\pm$ 0.68 [*]	0.17 $\pm$ 0.02 ⁽¹⁾
2.5	48.71 $\pm$ 6.71	42.36 $\pm$ 3.10 [*]	8.06 $\pm$ 0.30	2.46 $\pm$ 0.25 ^{**}	65.57 $\pm$ 4.44 ⁽¹⁾	30.78 $\pm$ 2.23	6.62 $\pm$ 0.71 [*]	0.24 $\pm$ 0.08 ⁽¹⁾
5.0	30.10 $\pm$ 2.10 ^{**}	68.35 $\pm$ 2.97 ^{*#&}	2.22 $\pm$ 0.21 ^{*#&}	6.09 $\pm$ 0.35 ^{*#&}	52.07 $\pm$ 2.94 ⁽¹⁾	46.26 $\pm$ 4.26 ⁽¹⁾	0.89 $\pm$ 0.46 ^{*#&}	1.59 $\pm$ 0.16 ^{*#&(1)}

注:与 0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, ^{*} $P < 0.05$;与 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, [#] $P < 0.05$;与 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂组相比, [&] $P < 0.05$;与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。
Note. Compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, [#] $P < 0.05$. Compared with 2.5 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin group, [&] $P < 0.05$. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

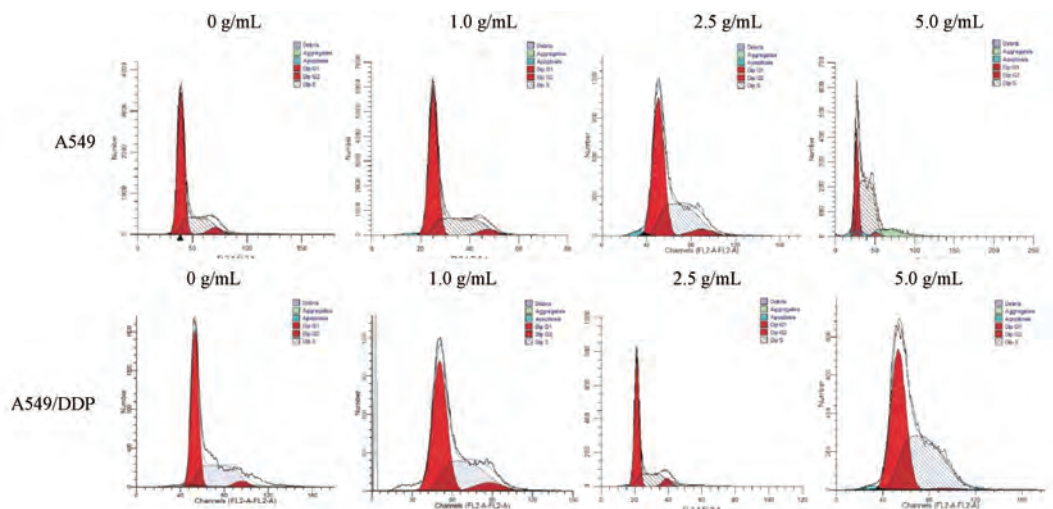
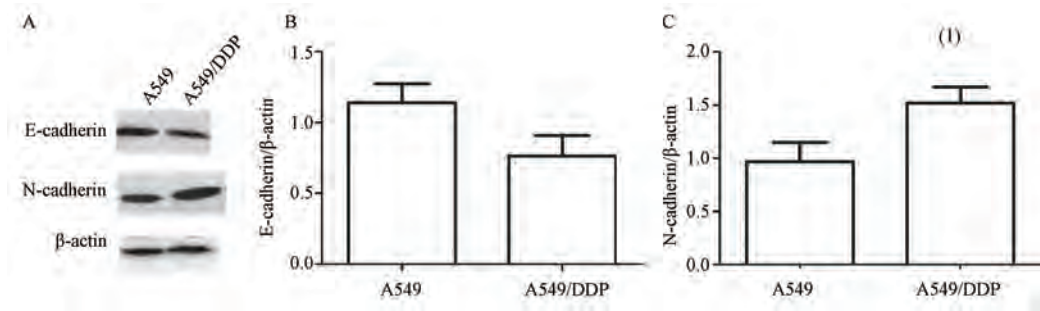


图 2 不同浓度顺铂处理下 A549 和 A549/DDP 细胞周期的流式图谱

Figure 2 Flow cytometry of A549 and A549/DDP cell cycles under different concentrations of cisplatin

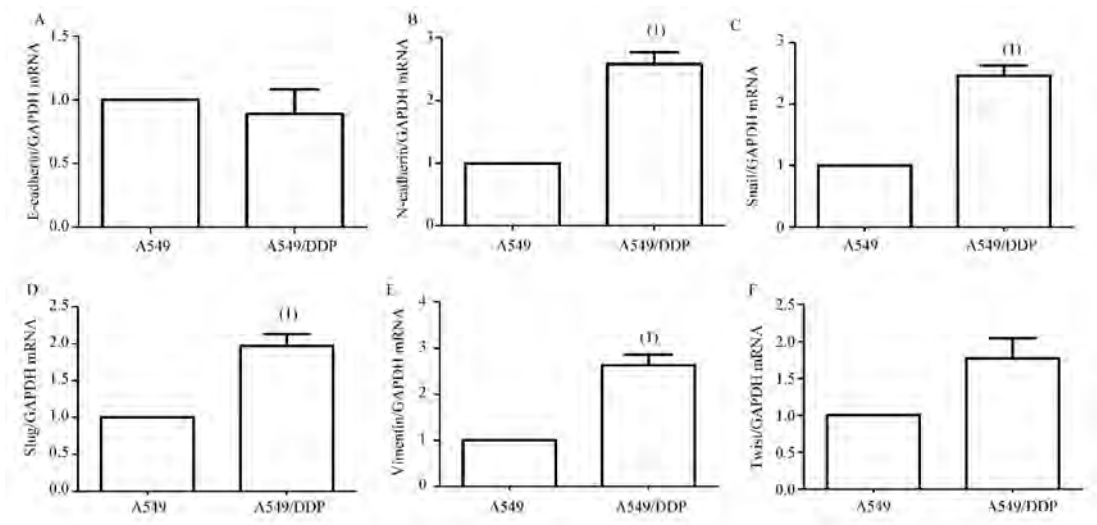


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P<0.05$ 。

图 3 A549 和 A549/DDP 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P<0.05$.

Figure 3 Expression levels of E-cadherin and N-cadherin in A549 and A549/DDP cells

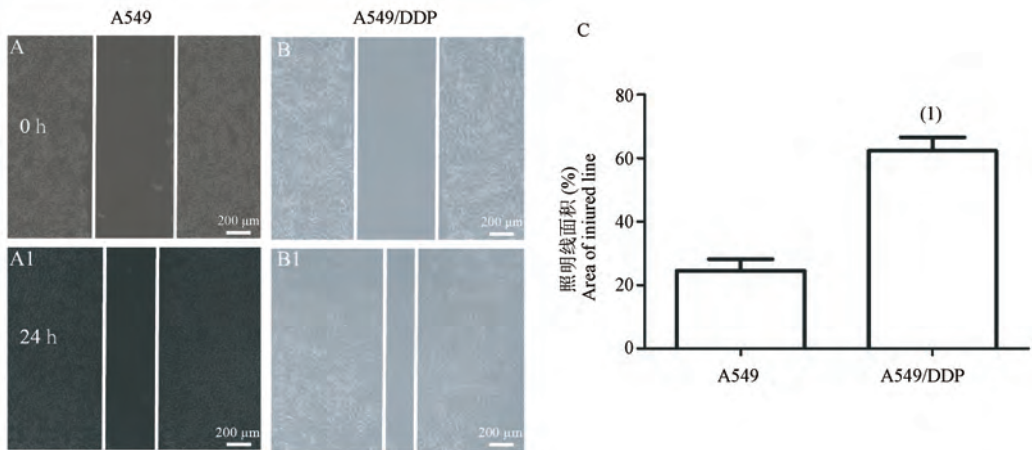


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P<0.05$ 。

图 4 A549 和 A549/DDP 细胞 EMT 信号通路的比较

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of EMT signaling pathways in A549 and A549/DDP cells

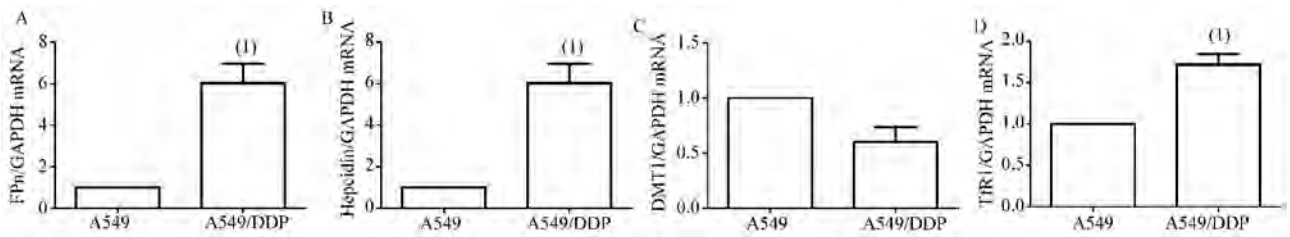


注:与 A549 细胞相比, ⁽¹⁾ $P<0.05$ 。

图 5 A549 和 A549/DDP 细胞迁移的比较

Note. Compared with A549 cells, ⁽¹⁾ $P<0.05$.

Figure 5 Comparison of A549 and A549/DDP cell migration

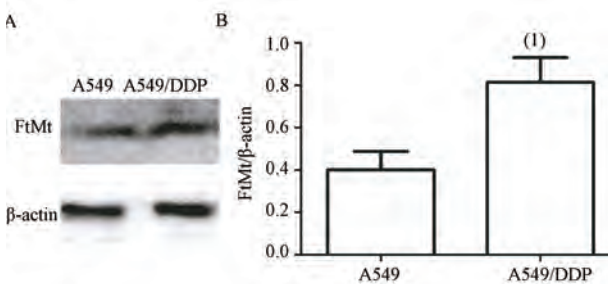


注:与 A549 细胞相比, (*) $P < 0.05$ 。

图 6 A549 和 A549/DDP 细胞中 FPN、DMT1、铁调素和 TfR1 的 mRNA 水平

Note. Compared with A549 cells, (*) $P < 0.05$.

Figure 6 mRNA levels of FPN, DMT1, hepcidin and TfR1 in A549 and A549/DDP cells



注:与 A549 细胞相比, (*) $P < 0.05$ 。

图 7 A549 和 A549/DDP 细胞中 FtMt 的表达水平

Note. Compared with A549 cells, (*) $P < 0.05$.

Figure 7 Expression level of FtMt in A549 and A549/DDP cells

3 讨论

NSCLC 是常见的恶性肿瘤之一,临床对于 NSCLC 的治疗往往采用以铂类为基础的联合治疗,部分患者治疗 2~3 年后对铂类会产生继发性耐药^[12]。耐药细胞具有更强的侵袭转移特性,晚期 NSCLC 患者常死于铂类耐药后的广泛转移,寻找 NSCLC 铂类化疗耐药机制一直是医学界研究的热点^[13]。构建铂类耐药的肺癌细胞系将有利于探寻其耐药机制。在本研究中,购买了一株肺癌顺铂耐药细胞株 A549/DDP,在深入探讨肺癌耐药机制之前,首先验证了购买的 A549/DDP 细胞的顺铂耐药性。通过研究发现,A549/DDP 细胞与 A549 细胞经顺铂处理后,A549/DDP 细胞的存活率显著高于 A549 细胞,凋亡率和坏死率显著低于 A549 细胞。这表明 A549/DDP 细胞是顺铂耐药细胞系。

研究证实,顺铂可通过与肿瘤细胞 DNA 结合形成交叉键,从而抑制其复制^[14]。当 DNA 受损后,细胞停滞在 G0/G1 期,此时细胞发生修复,容易使化疗药物无效^[15]。若细胞周期大量停滞在 G2/M 期,细胞周期调控系统会发生失衡,可诱发肿瘤细胞失

控性生长^[16]。本研究结果显示,1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂处理后,A549 细胞的细胞周期主要停留在 G0/G1 期和 G2/M 期,随着顺铂给药剂量的增加,A549 细胞停留在 G0/G1 期和 G2/M 期的细胞数量逐渐降低,即在 1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,A549 细胞未发生顺铂耐药,细胞凋亡率随着顺铂给药剂量增加而增加。顺铂可以更好地与肺癌细胞 DNA 稳定结合,抑制肺癌细胞的自我修复,从而诱导肺癌细胞 A549 发生凋亡。1.0~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂处理后,随着顺铂给药浓度的增加,进入 G0/G1 期和 G2/M 期的 A549/DDP 细胞数量先升高后降低。在顺铂低剂量给药条件下(1.0~2.5 $\mu\text{g/mL}$),其诱导的 A549/DDP 细胞凋亡率升高的不十分显著,此时 A549/DDP 细胞发生了顺铂耐药;当顺铂给药剂量增加到 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,其诱导的 A549/DDP 细胞凋亡率显著升高,此时 A549/DDP 细胞的耐药性因顺铂给药剂量的增加而得到缓解。但在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。因而在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。因而在临床治疗中,顺铂给药剂量的增加,可能会导致出现肝肾组织毒性,引起严重的副作用。

EMT 是指在特定生理病理条件下,具有极性的上皮细胞失去极性,向间质细胞表型转化,使其具有运动能力且能在细胞基质间自由运动,具有间质表型的细胞对化学药物的敏感性降低,但向周围组织及远端器官侵袭、迁移的能力增强^[17]。E-cadherin 的减少和 N-cadherin 的升高是 EMT 发生的重要标志,此时细胞间的粘附能力下降,运动能力和粘附能力增强^[18]。波形蛋白(vimentin)是细胞间质表型的重要标志,能使细胞的空间结构发生变化,增加细胞的迁移与侵袭能力^[19]。机体内参与调控 EMT 过程的关键转录因子包括锌指蛋白、snail、slug、twist 等,其中 snail、slug 和 twist 的研究最为多

见^[20]。Snail、slug、ZEB1、E12/E47 和 SIP1 均是转录抑制因子 snail 超家族的成员,该家族成员的结构非常相似,C-末端含有锌指 DNA 结合区域,N-末端含有 SNAG 结构域^[21]。Snail、slug 与 EMT 的进展有关^[22]。下调 snail 和 slug 水平,可以逆转 EMT 过程^[23]。Twist 与恶性肿瘤转移密切相关,在 NSCLC 肺癌组织中高表达。减少 twist 的表达可通过抑制 N-钙黏蛋白表达抑制癌细胞侵袭^[24]。Twist 作为碱性螺旋-环-螺旋转录因子的家族成员,是多种肿瘤的不良预后因子^[25]。大量研究表明,EMT 过程与肺癌的获得性耐药有关,抑制肺癌细胞的 EMT 过程,可能会有效抑制肺癌细胞的耐药与侵袭^[26]。本研究结果显示,A549/DDP 细胞迁移速度显著快于 A549 细胞,且 A549/DDP 细胞中的 E-cadherin 表达水平和 mRNA 水平低于 A549 细胞,N-cadherin 和 vimentin 蛋白的表达水平和 mRNA 水平显著高于 A549 细胞,参与 EMT 过程的 snail、slug 和 twist 的 mRNA 水平高于 A549 细胞。这一结果表明,A549/DDP 细胞不仅存在顺铂耐药,还具备较高的细胞侵袭和迁移能力,即肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,肺癌细胞发生顺铂耐药,预示着其可能会同时发生远端转移。

FtMt 是一种由染色体 5q23.1 上无内含子基因编码的线粒体定位的铁存储蛋白,具有与铁蛋白重链同源结构,该结构有助于在 FtMt 的壳结构中储存铁^[11,27-28]。FtMt 主要在高耗氧量和代谢活性的细胞中表达,如精母细胞、神经元和心肌细胞。FtMt 会随着线粒体中铁的增加而增加,但在肝和脾中的 FtMt 表达相对较低,而这两个部位的细胞质内储存了大量的铁。FtMt 的水平似乎与线粒体丰度的相关性大于铁代谢的相关性^[29]。FtMt 作为铁库,储存铁的能力大于细胞质铁蛋白^[30-31]。FtMt 增加时会促进铁从胞质向线粒体重新分布,加入铁螯合剂后,这种作用会增强。FtMt 对铁的强烈储存作用解释了为什么大多数细胞一直保持低水平的 FtMt^[31]。目前关于 FtMt 在肺癌细胞中的表达情况研究较少,本课题组之前研究发现,在肺癌细胞 A549 中检测到了 FtMt mRNA 的表达,通过给予顺铂后,线粒体中 FtMt mRNA 水平下调^[32]。这提示 FtMt 在肺癌细胞中可能有重要作用,但具体机制尚不十分清楚。本研究发现,A549/DDP 细胞中的 FtMt 蛋白表达水平显著高于 A549 细胞,这提示在肺癌细胞耐受顺铂的过程中,存在着 FtMt 蛋白表达水平的变化,

FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂过程中可能发挥了重要作用,但具体作用机制有待进一步研究。

铁转运蛋白(ferroportin,FPn)、二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1,DMT1)和转铁蛋白受体 1(transferrin receptor1,TfR1)均是细胞中负责参与铁运输的重要信号因子。其中,FPn 是目前唯一已知的铁输出蛋白,而铁调素是一种铁稳态调节激素,可以与 FPn 结合,以防止铁外流^[33-34]。在本研究中,A549/DDP 细胞中 DMT1 和 FPn mRNA 水平显著高于 A549 细胞,这提示 A549/DDP 细胞中的铁代谢比 A549 细胞活跃。

组织可以通过 TfR1 从血液中吸收转铁蛋白结合铁,DMT1 可介导内吞小泡上转铁蛋白-TfR1 复合物上的铁进入细胞浆^[35]。当铁负荷时 TfR1 和 DMT1 表达会下调^[36]。在本研究中,A549/DDP 细胞中 DMT1 mRNA 水平虽低于 A549 细胞,但比较差异无统计学意义。这提示 DMT1 可能不是造成 A549/DDP 与 A549 细胞中铁代谢差异的主要基因。而 A549/DDP 细胞中 TfR1 mRNA 水平显著高于 A549 细胞,提示 TfR1 参与了肺癌顺铂耐药细胞的铁代谢,TfR1 的高表达可能是肺癌顺铂耐药细胞中铁代谢紊乱的重要机制之一。此外,Nie 等^[31]研究发现,细胞转染 FtMt 以后,细胞中的 TfR1 的表达水平会升高,这一结论与我们的结果相似。

综上所述,肺癌细胞的顺铂耐药与 EMT 过程有关,肺癌细胞发生顺铂耐药的同时可能也发生了侵袭和转移。肺癌细胞顺铂耐药过程中,存在着 FtMt 蛋白表达水平的变化,提示 FtMt 在肺癌细胞耐受顺铂过程中可能发挥了重要作用。铁代谢紊乱可能与肺癌细胞顺铂耐药有关。但具体作用机制有待进一步研究。下一步会通过构建过表达载体或敲除载体进一步评价 FtMt 在 EMT 和顺铂耐药过程中的作用,为非小细胞肺癌发病机制的探讨提供更多的实验数据。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances [J]. Transl Lung Cancer Res, 2016, 5(3): 288-300.
- [3] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389(10066): 299-311.
- [4] 彭琳洁. 牡蛎肽对顺铂所致小鼠肠屏障损伤的干预作用

- [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [5] Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung cancer statistics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1–19.
- [6] Peng DH, Ungewiss C, Tong P, et al. ZEB1 induces LOXL2-mediated collagen stabilization and deposition in the extracellular matrix to drive lung cancer invasion and metastasis [J]. *Oncogene*, 2017, 36(14): 1925–1938.
- [7] 刘鑫鑫, 田孝东, 杨尹默. 铁死亡机制在胰腺癌中的研究现状与进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37(7): 1366–1368.
- [8] 段晓悦. 缺铁条件下高转移性乳腺癌细胞摄取铁的途径及机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
- [9] 李若男, 郭昆全. 铁蛋白与 2 型糖尿病 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(10): 951–954.
- [10] Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800(8): 783–792.
- [11] Guan H, Yang H, Yang M, et al. Mitochondrial ferritin protects SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative stress and modulates α -synuclein expression [J]. *Exp Neurol*, 2017, 291: 51–61.
- [12] Ma X, Liang AL, Liu YJ. Research progress on the relationship between lung cancer drug-resistance and microRNAs [J]. *J Cancer*, 2019, 10(27): 6865–6875.
- [13] Phiboonchaiyanan PP, Petpiroon N, Sritularak B, et al. Phoyunnanin E induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via p53 activation and down-regulation of surviving [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(11): 6281–6290.
- [14] 蔡晓燕. MACC1、MRP、LRP 与胰腺癌顺铂耐药的相关性研究 [D]. 新乡: 新乡医学院, 2021.
- [15] 陈媛媛. 长链非编码 RNA SCARNA2 介导的 DNA 损伤修复在结直肠癌放疗敏感性中的作用及机制 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [16] Ji T, Liu D, Shao W, et al. Decreased expression of *Lats1* is correlated with the progression and prognosis of glioma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 67.
- [17] Feng LM, Wang XF, Huang QX. Thymoquinone induces cytotoxicity and reprogramming of EMT in gastric cancer cells by targeting PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *J Biosci*, 2017, 42(4): 547–554.
- [18] Lee GH, Malietzis G, Askari A, et al. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer? -A systematic review [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015, 41(3): 300–308.
- [19] Williams MA, Biguetti C, Romero-Bustillos M, et al. Colorectal cancer-associated genes are associated with tooth agenesis and may have a role in tooth development [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2979.
- [20] Grzegorzolka J, Biala M, Wojtyra P, et al. Expression of EMT markers Slug and Twist in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(7): 3961–3968.
- [21] 李奇隆, 陈湘楠, 龙凤, 等. Snail 家族基因功能研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(4): 1287–1294.
- [22] Han J, Xue Y, Liang Y, et al. USP5 promotes epithelial-mesenchymal transition by stabilizing SLUG in hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9(2): 573–587.
- [23] Jin L, Zhu C, Wang X, et al. Urocortin attenuates TGF β ₁-induced Snail₁ and slug expressions: inhibitory role of Smad₇ in Smad_{2/3} signaling in breast cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11): 2494–2503.
- [24] Yang Z, Zhang X, Gang H, et al. Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358(3): 925–930.
- [25] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analysis [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1–33.
- [26] Lee JG, Wu R. Erlotinib-cisplatin combination inhibits growth and angiogenesis through c-MYC and HIF-1 α in EGFR-mutated lung cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2015, 17(2): 190–200.
- [27] Hagen WR, Hagedoorn PL, Honarmand Ebrahimi K. The workings of ferritin: a crossroad of opinions [J]. *Metallomics*, 2017, 9(6): 595–605.
- [28] Honarmand Ebrahimi K, Hagedoorn PL, Hagen WR. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(1): 295–326.
- [29] Drysdale J, Arosio P, Invernizzi R, et al. Mitochondrial ferritin: a new player in iron metabolism [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 29(3): 376–383.
- [30] Ciambellotti S, Pratesi A, Tassone G, et al. Iron binding in the ferroxidase site of human mitochondrial ferritin [J]. *Chemistry*. 2021, 27(59): 14690–14701.
- [31] Nie G, Sheftel AD, Kim SF, et al. Overexpression of mitochondrial ferritin causes cytosolic iron depletion and changes cellular iron homeostasis [J]. *Blood*, 2005, 105(5): 2161–2167.
- [32] 郝艳丽, 霍明洋, 覃锐, 等. 线粒体铁蛋白对顺铂诱导 A549 细胞凋亡的作用研究 [J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(2): 126–133, 142.
- [33] Saneela S, Iqbal R, Raza A, et al. Hcpidin: A key regulator of iron [J]. *J Pak Med Assoc*, 2019, 69(8): 1170–1175.
- [34] Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms [J]. *Nature*, 2020, 586(7831): 807–811.
- [35] 赵晋英, 曾佳佳, 李艳伟. 肺的铁稳态机制与肺疾病时铁代谢的变化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, 36(9): 1002–1012.
- [36] Deschemin JC, Mathieu JRR, Zumerle S, et al. Pulmonary iron homeostasis in hepcidin knockout mice [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 804.

康婷,毛海霞,林佳如,等.自噬在慢性肾病血管钙化中的作用研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(1):51-60.

Kang T, Mao HX, Lin JR, et al. Effects of autophagy on vascular calcification in chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 51-60.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.007

自噬在慢性肾病血管钙化中的作用研究

康 婷^{1,2}, 毛海霞^{1,2}, 林佳如^{1,2}, 朱婷婷^{1,2}, 张丽玲^{1,2}, 张冬梅^{1,2}, 吴蔚桦^{1,2}, 欧三桃^{1,2*}

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

【摘要】 目的 探索自噬与CKD血管钙化之间的关系,以及自噬在CKD血管钙化中的作用。**方法** 首先将30只SD大鼠随机分为对照组(Control组,15只)和腺嘌呤及高磷饮食诱导的模型组(CKD组,15只)。免疫组化检测主动脉中 α -SMA、RUNX2、LC3B及Beclin-1蛋白表达,新鲜主动脉做钙含量测定,进一步做它们之间的相关性分析。再构建 β -GP诱导的主动脉平滑肌细胞(aorta smooth muscle cell, ASMC)钙化模型。电镜检测细胞内自噬小体,免疫荧光及Western blot检测LC3B蛋白。自噬抑制剂3-MA及激活剂RAP干预自噬后,采用免疫组化、Western blot检测ASMC中 α -SMA、RUNX2蛋白表达变化,茜素红染色及钙含量检测ASMC钙化情况。**结果** 模型组成功建立CKD血管钙化模型。与对照组相比,模型组主动脉 α -SMA蛋白表达下降,RUNX2、LC3B、Beclin-1蛋白表达及钙含量升高。Beclin-1及LC3B蛋白表达分别与主动脉钙含量及RUNX2蛋白表达呈正相关。 β -GP诱导ASMC自噬小体增加,LC3B荧光斑点增多,LC3BII蛋白表达增强($P<0.01$)。RAP激活自噬后减少ASMC钙沉积及钙含量($P<0.05$),减少RUNX2蛋白表达($P<0.05$),促进 α -SMA蛋白表达($P<0.05$);3-MA抑制自噬后结果与之相反。**结论** CKD血管钙化同时存在自噬激活,自噬在CKD血管钙化中可能具有内源性保护作用,自噬有望成为CKD血管钙化新的治疗靶目标。

【关键词】 慢性肾病;血管钙化;动脉平滑肌细胞;自噬;成骨样分化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0051-10

Effects of autophagy on vascular calcification in chronic kidney disease

KANG Ting^{1,2}, MAO Haixia^{1,2}, LIN Jiaru^{1,2}, ZHU Tingting^{1,2}, ZHANG Liling^{1,2},
ZHANG Dongmei^{1,2}, WU Weihua^{1,2}, OU Santao^{1,2*}

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.

2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To explore the association and role of autophagy in vascular calcification of chronic kidney disease. **Methods** Overall, 30 SD rats were randomly divided into a control group (Control group, $n=15$) and adenine and high phosphorus diet-induced model group (CKD group, $n=15$). Immunohistochemistry was applied to detect α -SMA, RUNX2, LC3B and Beclin-1 in the aorta. Calcium content was measured to further analyze the correlation between them. Aorta smooth muscle cell (ASMC) calcification was induced by β -GP. Autophagy activation was detected by electron microscopy, immunofluorescence, and Western blot. After 3-MA and RAP regulation of autophagy, immunohistochemistry and Western blot were used to detect α -SMA and RUNX2 protein expression, and alizarin red staining and calcium contents were used to detect calcification of ASMC. **Results** Compared with the control group, vascular calcification was established in the CKD group. RUNX2, LC3B and Beclin-1 proteins, and calcium content were higher in the CKD group

【基金项目】 四川省肾脏疾病临床医学研究中心重点项目(2019YFS0537-3)。

【作者简介】 康婷(1993—),女,医师,硕士,研究方向:慢性肾病与血管钙化。E-mail: 409875863@qq.com

【通信作者】 欧三桃(1976—),女,教授,博士,研究方向:慢性肾病与血管钙化。E-mail: ousantao@163.com

than in the control group, while α -SMA protein expression had declined. Correlation analysis showed that Beclin-1 and LC3B protein expression were positively correlated with aortic calcium content and RUNX2 protein expression, respectively. β -GP induced ASMC calcium deposition and osteogenic differentiation. β -GP induced an increase of autophagosomes, LC3B fluorescent spots, and LC3BII protein expression ($P < 0.01$). After autophagy activation by RAP, calcium deposition and content ($P < 0.05$) and RUNX2 protein expression ($P < 0.05$) were reduced, while α -SMA protein expression was promoted ($P < 0.05$). After-autophagy inhibition by 3-MA, calcium deposition and content were increased ($P < 0.05$), RUNX2 protein expression was promoted ($P < 0.05$), and α -SMA protein expression was decreased ($P < 0.05$).

Conclusions Autophagy might play a protective role in CKD vascular calcification. Autophagy is expected to become a new therapeutic target for CKD vascular calcification.

【Keywords】 chronic kidney disease; vascular calcification; aorta smooth muscle cell; autophagy; osteogenic differentiation

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

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是心血管疾病独立的风险因素,反过来心血管疾病也是CKD患者高死亡率的首要原因。有研究发现血管钙化是导致CKD患者心血管疾病发病率和死亡率呈倍数增长的主要危险因素^[1]。目前认为血管钙化是一种血管平滑肌细胞由收缩表型向成骨样表型转分化的生物学过程^[2]。CKD血管钙化的发生机制非常复杂,近期有研究发现尿毒症患者钙化的肾动脉较移植肾的肾动脉自噬相关蛋白明显增加,自噬可能参与了尿毒症患者血管钙化的形成^[3]。由于自噬是一种动态的调节系统,越来越多的研究发现自噬在血管钙化中的作用会受疾病过程、诱发因素以及周围微环境等多种因素的影响,甚至在血管钙化中有保护性自噬和非保护性自噬两种观点,其机制尚不完全清楚^[4]。目前,自噬与CKD血管钙化的关系研究较少,自噬在血管钙化中的作用很复杂,因此本研究旨在通过体内、外实验探讨自噬在高磷诱导的CKD血管钙化中的激活情况及其作用,为CKD血管钙化的防治提供新策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选用SPF级SD雄性大鼠30只,6周龄,体重250~280 g,购自西南医科大学城北校区动物中心[SCXK(川)2018-0017],于西南医科大学城北校区动物房饲养[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU2020262),并遵守实验动物的3R原则。

1.1.2 细胞

大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A7R5),购自中国科学院(上海细胞库)。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471,美国Sigma公司);1.8%高磷饮食(北京科奥协力);钙含量测定试剂盒(C004-2-1,南京建成生物有限公司); β -甘油磷酸钠(β -glycerophosphate, β -GP)及氯喹(chloroquine, CQ)(G9422, C6628, 美国Sigma公司);雷帕霉素(rapamycin, RAP)及3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(S1039, S2767, Selleck公司); α -SMA多克隆抗体(BS70000,南京巴傲得生物科技有限公司);兔抗RUNX2多克隆抗体(bs-20003R,北京博奥森生物技术有限公司);Beclin-1兔单克隆抗体、LC3B兔单克隆抗体及鬼笔环肽(Phalloidin)(#3495, #3868, #8953, 美国CST公司)。光学显微镜(Nikon公司);全自动生化分析仪(西门子,德国)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及造模

将SD大鼠随机分为对照组(Control, 15只)和CKD血管钙化模型组(CKD, 15只)。模型组大鼠给予腺嘌呤混悬液(200 mg/(kg·d))灌胃+1.8%高磷饮食,而对照组大鼠予以相应等体积的生理盐水及正常饮食,持续灌胃给药6周。

1.3.2 取材

成模后用代谢笼收集24 h尿液用于检测24 h尿蛋白,取材当天使用1%戊巴比妥钠按照40 mg/kg剂量腹腔注射麻醉大鼠,取下腔静脉血检测生化指标;取右肾做常规石蜡包埋、切片;游离胸腹主动脉,部分做常规石蜡包埋切片,部分新鲜组织做钙含量测定。

1.3.3 生化指标检测

采用自动生化分析仪检测血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、血钙(Ca)、血磷(P)及24 h尿蛋白。

1.3.4 HE 染色

常规脱蜡复水,苏木素染 5 min 后,1%盐酸酒精分色 2 s,0.5%氨水返蓝 1 min,75%乙醇 2 s,1%伊红 30 s,脱水透明封片。

1.3.5 茜素红染色

石蜡切片常规脱蜡复水,滴加茜素红 S 液染色 30 min,用双蒸水洗 5 min 共 3 次,常规脱水、透明、封片。

1.3.6 Masson 染色

按照 Masson 染色试剂盒说明书进行操作。常规脱水、透明、封片,在光镜视野下观察拍摄。

1.3.7 钙含量测定

大鼠主动脉组织匀浆后取上清液,按照试剂盒说明书加入工作液及上清液,混匀后使用酶标仪测定 OD 值,BCA 法测定主动脉总蛋白浓度,主动脉钙含量(mmol/g pro) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品浓度 (1 mmol/L) / 待测样本蛋白浓度 (mmol/g)。

1.3.8 免疫组化法检测胸腹主动脉蛋白的表达

常规脱蜡水化,修复抗原,蒸馏水浸泡 5 min,3% H_2O_2 孵育 15 min,山羊血清室温封闭 20 min。分别滴加一抗(RUNX2、 α -SMA、LC3B、Beclin-1),4℃冰箱过夜,依次滴加相应的二抗、辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 20 min,DAB 显色液,显微镜下观察显色情况,棕黄色或棕褐色为阳性表达。蒸馏水充分冲洗,苏木素复染 20 s,脱水,透明,封片。

1.3.9 细胞培养及分组

将大鼠胸主动脉平滑肌细胞(aortic smooth muscle cell, ASMC)培养在含有 15% 胎牛血清 DMEM 高糖完全培养基的基础培养基中作为正常组(Normal),加入 10 mmol/L β -GP 刺激诱导细胞钙化的细胞作为高磷组(β -GP)。干预分组:用 $25 \mu\text{mol/L}$ CQ 干预自噬的降解过程,预处理 30 min 后再分别加入基础培养基和含有 10 mmol/L β -GP 的培养基,分为氯喹组(CQ)、高磷+氯喹组(β -GP+CQ),并与正常组(Normal)、高磷组(β -GP)做对照。再分别用 100 nmol/L RAP 及 5 mmol/L 3-MA 干预自噬强弱,预处理细胞 30 min 后分别加入含有 10 mmol/L β -GP 的培养基,分为高磷+雷帕霉素组(β -GP+RAP)、高磷+3-甲基腺嘌呤组(β -GP+3-MA),并与正常组(Normal)、高磷组(β -GP)作对照。将不同时间点的不同组别细胞做好标记后置于 37℃、5% CO_2 培养箱继续培养。

1.3.10 细胞免疫组化

将细胞固定,破膜,滴加 10% 正常山羊血清封闭液室温下 20 min,,滴加 α -SMA 抗体或 RUNX2 抗体,于 4℃冰箱孵育过夜,滴加二抗工作液,室温孵育 20 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 20 min,DAB 溶液显色,PBS 冲洗后苏木素复染细胞核 5 min,PBS 洗净后吸水纸吸干爬片上的液体,封片。

1.3.11 细胞免疫荧光

将细胞固定,破膜,滴加 10% 山羊血清封闭液 30 min,滴加 LC3B 抗体,于 4℃冰箱过夜,滴加 10% 山羊血清稀释的荧光二抗孵育 1 h,避光滴加鬼笔环肽染细胞质,再滴加 DAPI 细胞核,避光清洗后,封片,荧光显微镜下观察。

1.3.12 钙含量测定

1.5 mL 0.6 mol/L 盐酸进行细胞脱钙,24 h 后收集细胞上清液,根据钙测试盒说明书(微板法)测定钙含量;PBS 洗涤细胞后加入 1.5 mL 1 mol/L NaOH/0.1% SDS 裂解细胞,并提取细胞上清液,BCA 法测定蛋白含量,结果以钙含量/蛋白含量(mmol/g pro)表示。

1.3.13 Western blot

裂解并提取细胞蛋白,依照碧云天公司的 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定上清液蛋白浓度,SDS-Loading buffer 进行稀释,干煮,配胶,上样,在不同浓度的 SDS-PAGE 凝胶中电泳,转膜,封闭,加入 LC3B、Beclin-1、RUNX2 及 α -SMA 孵育,在 4℃冰箱过夜,再用二抗稀释液室温孵育 1~2 h,显色液显色,曝光检测。

1.3.14 电镜

收集细胞后依次 0.5% 戊二醛、3% 戊二醛、1% 四氧化锇固定,丙酮脱水,环氧树脂渗透液进行渗透,包埋,制成超薄切片后,依次用醋酸铀、枸橼酸铅染色,室温下染 15~20 min,透射电镜下观察。

1.4 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析,方差不齐时采用 Kruskal-Wallis H 检验,Pearson 做两个变量之间的相关性分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠生化指标比较

与对照组大鼠相比,CKD 钙化组大鼠 Scr、

BUN、P 及 24 h 尿蛋白均有不同程度的升高, Ca 降低, 差异具有统计学意义。见图 1。

2.2 两组大鼠肾病理改变

对照组大鼠肾小球大小正常, 肾小管及肾间质结构与形态无明显异常。CKD 钙化组大鼠肾 HE 染色结果显示肾小球及肾小管中可见大量的棕黄色物质沉积, 肾小球囊腔有轻度扩张, 部分肾小管扩张, 肾间质纤维化; Masson 染色结果显示: 肾小球基底膜增厚, 同时可见少数的肾小球硬化, 肾间质广泛蓝染的胶原纤维。见图 2。

2.3 两组大鼠主动脉钙化情况

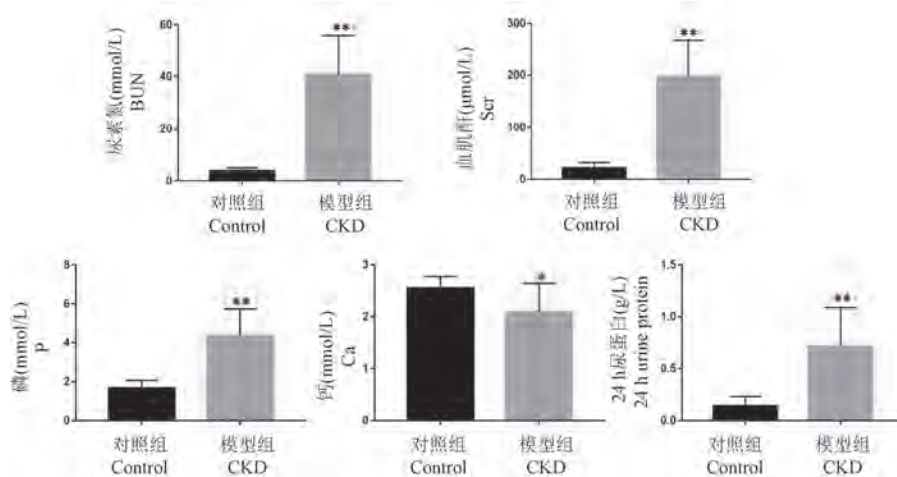
HE 染色可见对照组大鼠主动脉染色均匀, 血管壁完整, 弹性纤维连续; 而 CKD 钙化组大鼠主动脉中膜层颜色加深, 弹性纤维明显断裂, 血管平滑肌细胞排列紊乱。茜素红染色结果显示与对照组相比, CKD 钙化组大鼠主动脉中膜层广泛分布红染的钙结节沉积。此外, CKD 组主动脉钙含量也较对照组更高, 差异具有统计学意义。见图 3。

2.4 大鼠主动脉成骨样分化及自噬相关蛋白表达

免疫组化结果显示: 对照组大鼠主动脉平滑肌细胞质中可见 α -SMA 蛋白均匀分布, 而 RUNX2 无明显表达。CKD 大鼠动脉血管壁中膜弹性纤维断裂, 中膜层平滑肌细胞可见 α -SMA 蛋白表达明显减少, 而 RUNX2 蛋白表达增加, 差异具有统计学意义。LC3B、Beclin-1 是目前最常用的自噬相关蛋白标记物, 可用于静态观察自噬的激活情况。免疫组化结果显示: 对照组大鼠动脉血管壁各层细胞中均有少量的 LC3B、Beclin-1 蛋白表达, 而 CKD 大鼠动脉血管壁中膜层平滑肌细胞排列紊乱, 棕黄色染色明显加深, LC3B、Beclin-1 蛋白表达增强, 差异具有统计学意义。见图 4。

2.5 相关性分析

Pearson 相关分析显示, 大鼠主动脉钙含量与 Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达呈正相关关系, RUNX2 蛋白与 Beclin-1 及 LC3B 蛋白表达也呈正相关关系。见图 5。



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 两组大鼠生化指标的比较

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

Figure 1 Comparison of biochemical indexes in two groups of rats

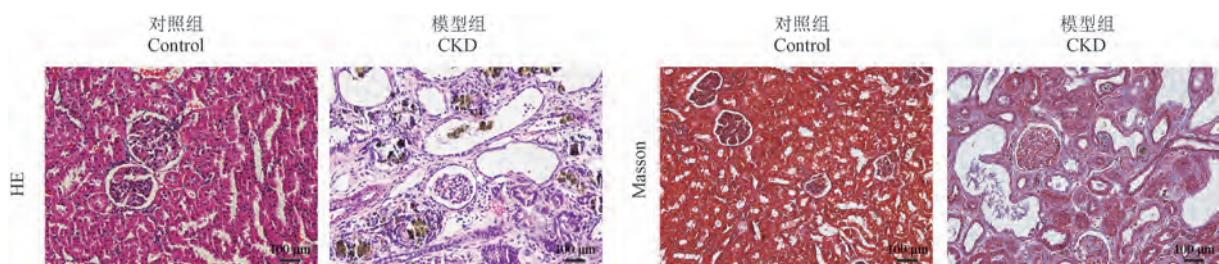


图 2 两组大鼠肾 HE 及 Masson 染色

Figure 2 HE and Masson staining of kidney in two groups of rats

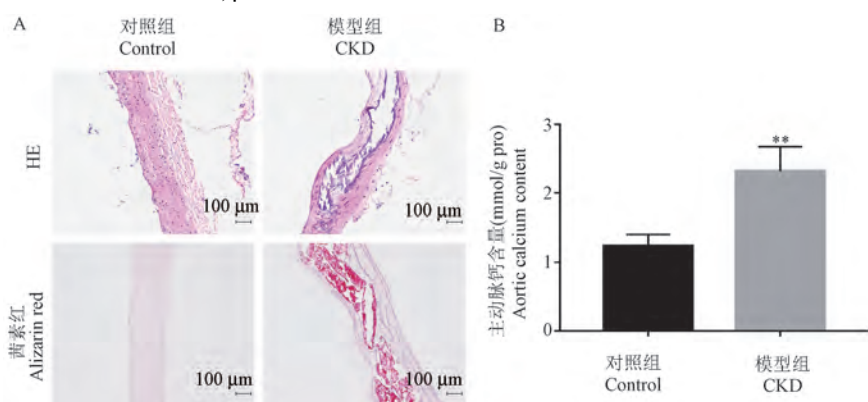
2.6 β -GP 诱导大鼠 ASMC 钙化及成骨样分化

使用 10 mmol/L β -GP 刺激 ASMC 3、5、7 d 后,茜素红染色结果显示 β -GP 组较正常组 (Normal) 有明显的橘红色钙化结节,且随着时间的延长逐渐增多。免疫组化结果也显示,随着时间的延长, β -GP 组较正常组细胞质内 α -SMA 表达逐渐减少,而分布在细胞核内的 RUNX2 表达则逐渐增加,以上结果提示 β -GP 成功诱导了 ASMC 钙化,并逐渐向成骨样分化,且具有时间依赖性。见图 6。

2.7 β -GP 诱导大鼠 ASMC 自噬增强

β -GP 刺激大鼠 ASMC 48 h 后,免疫荧光结果显示:两组细胞红色荧光信号的平滑肌细胞质骨架及蓝色荧光信号的细胞核结构清晰, β -GP 组较正常

组绿色荧光信号 LC3B 表达明显增强, Merge 后显示 LC3B 呈斑点状分布在细胞质中 (见图 7A)。透射电镜检测结果显示:与正常组相比, β -GP 组大鼠 ASMC 细胞质中可见溶酶体与自体吞噬体融合,自噬小体明显增多,提示 β -GP 诱导的 ASMC 钙化模型中存在明显的自噬 (见图 7B)。Western blot 结果显示: β -GP 组较正常组 LC3BII 蛋白相对表达量增加,加入溶酶体抑制剂 CQ 抑制自噬的降解过程,可见 β -GP+CQ 组较 β -GP 组 LC3BII 表达明显增多,同时 β -GP+CQ 组较 CQ 组 LC3BII 表达也明显增多 (见图 7C)。以上结果提示 β -GP 对大鼠 ASMC 的刺激促进了自噬激活过程。

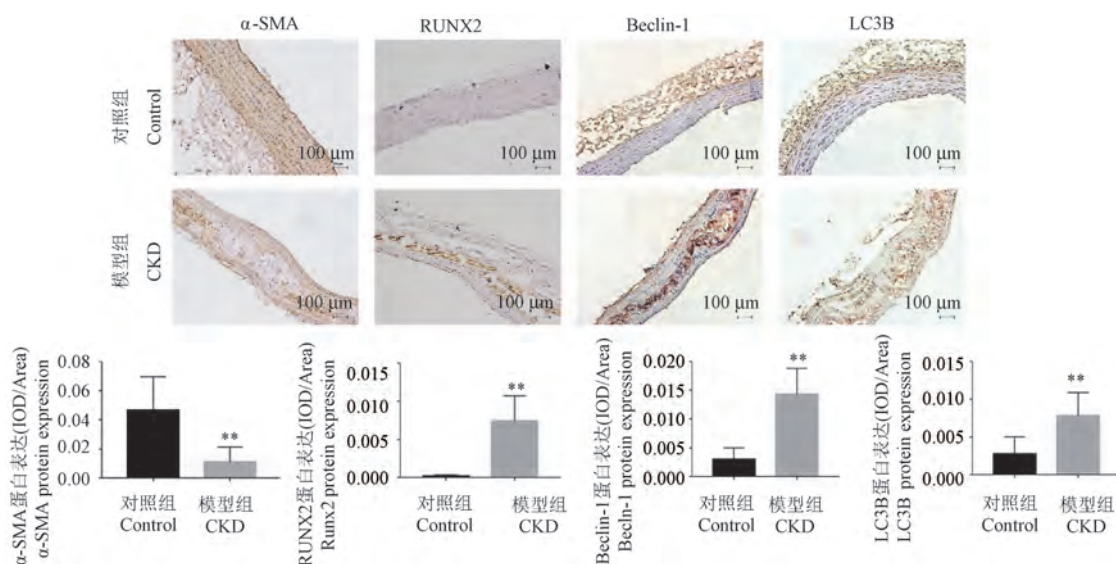


注:A:主动脉 HE 染色及茜素红染色;B:主动脉钙含量比较。与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 两组大鼠胸腹主动脉钙化情况

Note. A, HE staining and Alizarin red staining in aorta. B, Comparison of aortic calcium content. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Calcification of thoracoabdominal aorta in two groups of rats



注:与对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 4 两组大鼠主动脉免疫组化染色

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

Figure 4 Immunohistochemical staining of aorta in two groups of rats

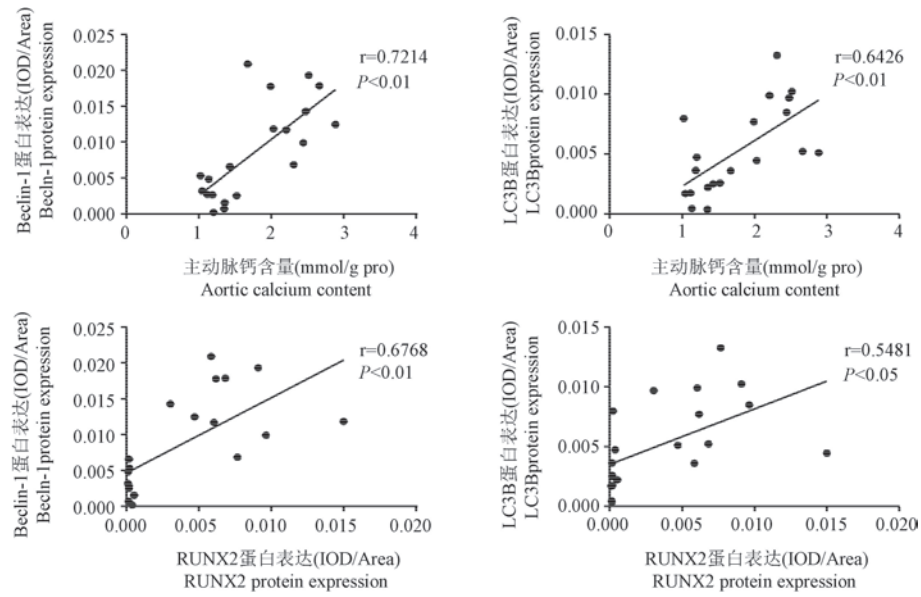


图 5 主动脉钙含量及蛋白的相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of calcium content and protein in aorta

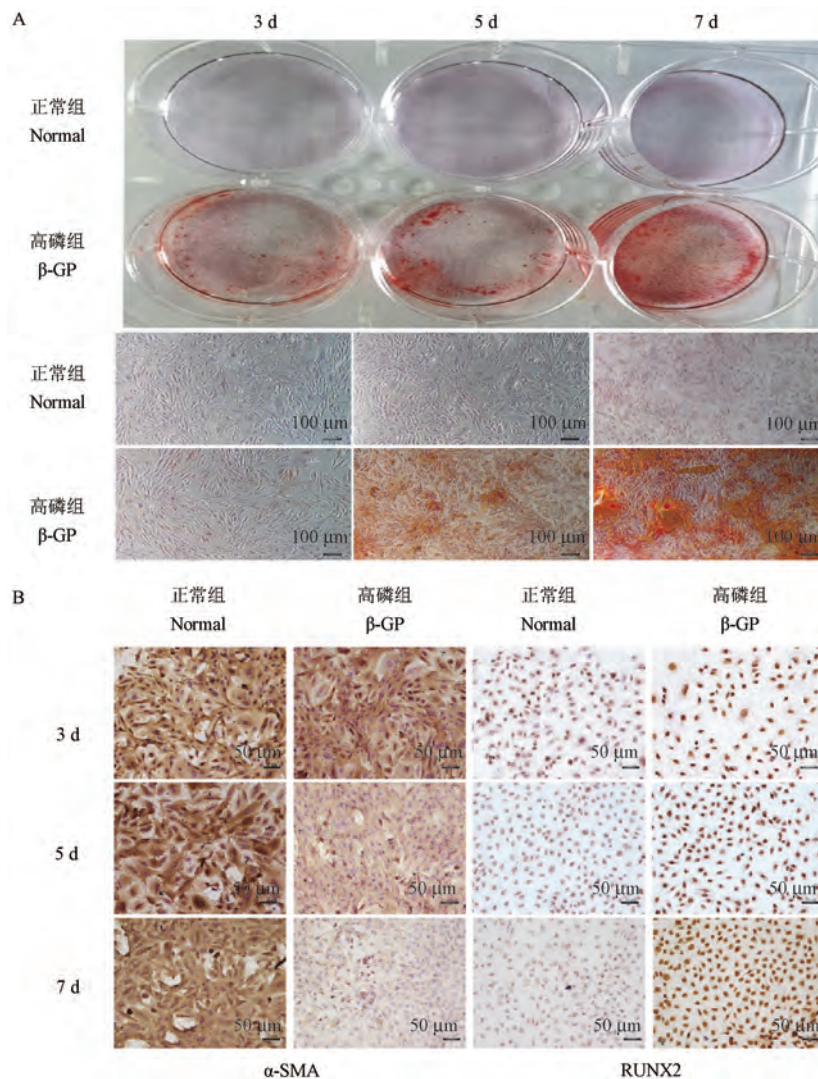


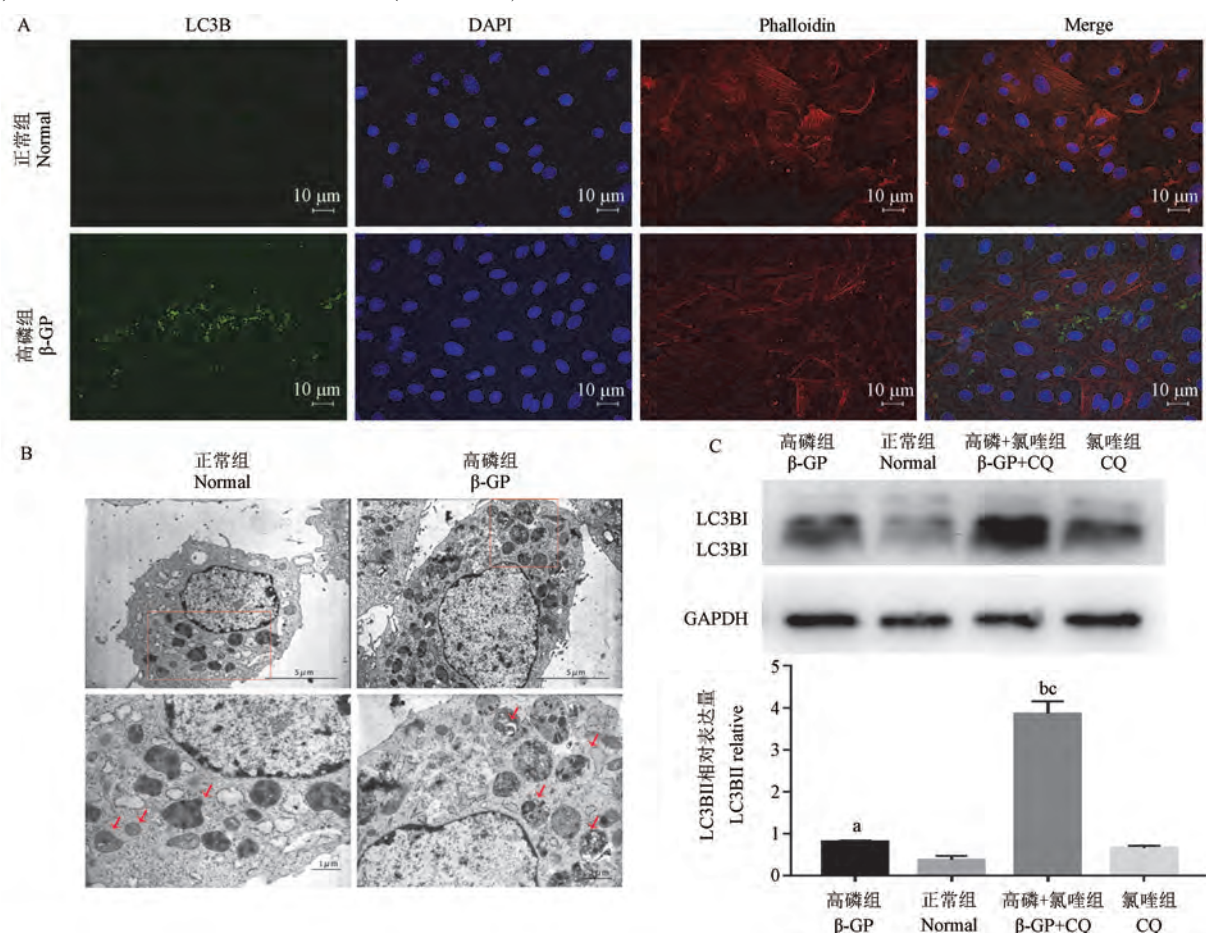
图 6 两组大鼠 ASMC 不同时间点茜素红染色及免疫组化结果

Figure 6 Alizarin red staining and immunohistochemical results of ASMC in two groups at different time points

2.8 增强及抑制自噬对大鼠 ASMC 钙化的影响

为进一步研究自噬对 ASMC 钙化表型的影响,加入自噬抑制剂 3-MA 及激活剂 RAP 干预 7 d 后观察其变化。结果见图 8, Western blot 显示 β -GP 组较正常组 ASMC 中 LC3BII、Beclin-1 蛋白表达升高,加入 3-MA 后 LC3BII、Beclin-1 蛋白表达下降,说明 3-MA 成功地抑制了自噬过程;反之,加入 RAP 后 LC3BII、Beclin-1 表达明显升高,说明 RAP 成功地诱导了自噬增强。同时, β -GP 组较正常组 α -SMA 蛋白表达减少, RUNX2 蛋白表达升高, β -GP+3-MA 组与 β -GP 组比较, α -SMA 蛋白表达明显进一步减少,而 RUNX2 蛋白表达明显进一步升高;反之, β -GP+RAP 组与 β -GP 组比较 α -SMA 蛋白表达明显升高,而 RUNX2 蛋白表达明显减少(见图 8A)。免

疫组化显示 β -GP 组较正常组 ASMC 内 α -SMA 蛋白表达减少,而细胞核内 RUNX2 蛋白增多,加入 3-MA 后 α -SMA 蛋白表达明显进一步减少, RUNX2 蛋白仍有大量表达,而加入 RAP 后 α -SMA 蛋白有所增加, RUNX2 蛋白表达减少(见图 8B)。茜素红染色结果显示正常组未见明显钙化结节, β -GP 组可见均匀分布的橘红色钙化结节, β -GP+3-MA 组橘红色钙化结节明显增多,而 β -GP+RAP 组只散在分布少许的钙化结节(见图 8C)。钙含量测定结果也与此一致,与正常组相比, β -GP 组大鼠动脉平滑肌细胞钙含量增多,加入 3-MA 后钙含量进一步升高,而加入 RAP 后钙含量明显降低(见图 8D)。以上结果表明抑制自噬可以加剧 β -GP 诱导的大鼠 ASMC 钙化及成骨样分化,而增强自噬则可以减轻钙化及成骨样分化。

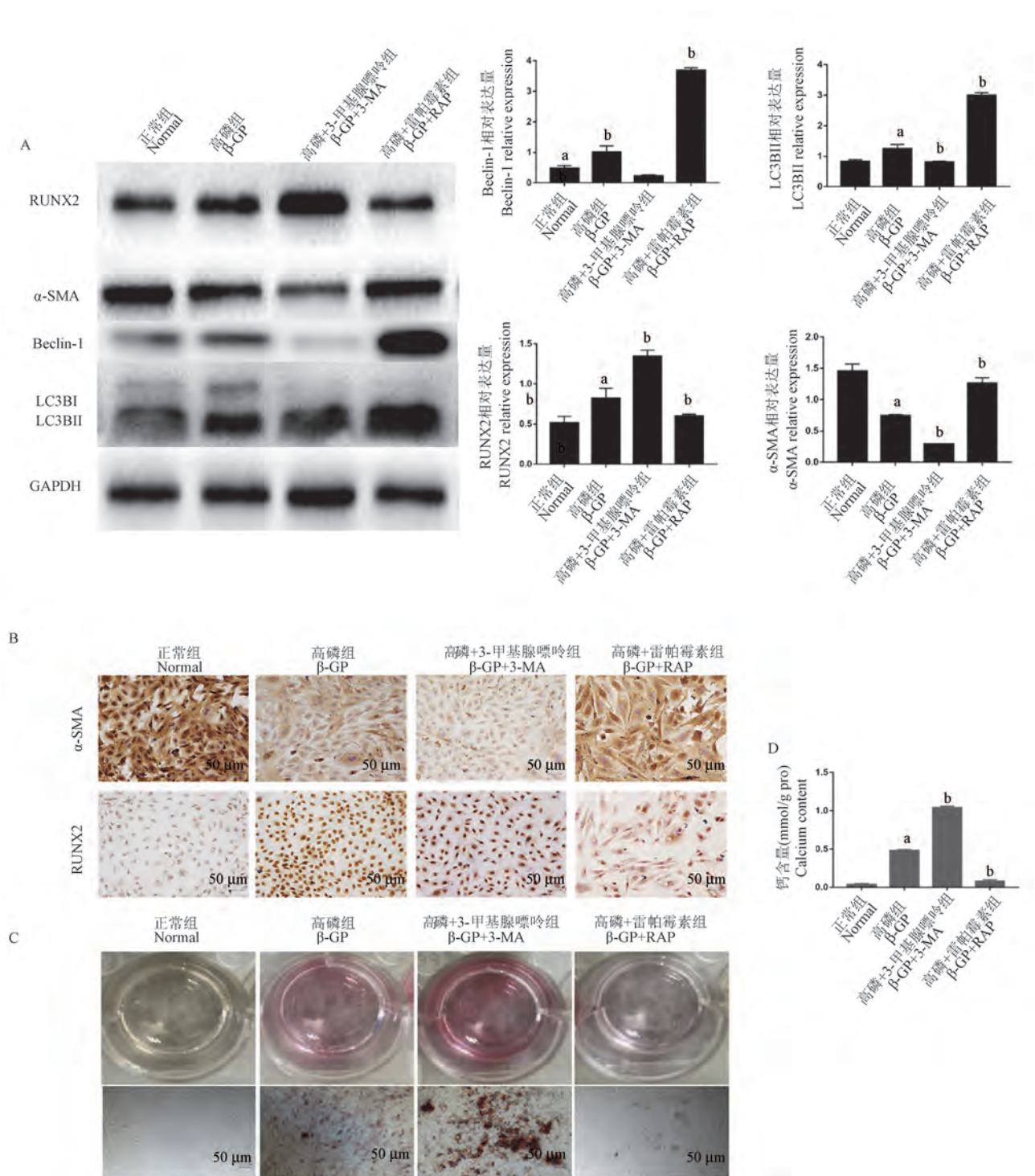


注:A:免疫荧光染色观察 LC3B 的表达分布情况;B:电镜观察自噬小体的形成;C:Western blot 观察 CQ 干预后 LC3B 蛋白表达。与正常组相比,^a $P<0.05$;与高磷组相比,^b $P<0.05$;与氯喹组相比,^c $P<0.05$ 。

图 7 β -GP 诱导自噬在 ASMC 中的激活情况

Note. A, The distribution of LC3B expression by Immunofluorescence staining. B, The formation of autophagic vesicles by electron microscopy. C, LC3B protein expression after CQ intervention by Western blot. Compared with Normal group, ^a $P<0.05$. Compared with β -GP group, ^b $P<0.05$. Compared with CQ group, ^c $P<0.05$.

Figure 7 β -GP induced autophagy activation in ASMC



注: A: Western blot 观察 RUNX2、α-SMA、Beclin-1、LC3BI、LC3BII 蛋白表达; B: 免疫组化观察细胞中 α-SMA 及 RUNX2 染色及分布; C: 茜素红染色观察细胞钙沉积; D: 细胞钙含量的比较。与正常组相比, ^a $P < 0.05$; 与高磷组相比, ^b $P < 0.05$ 。

图 8 3-MA 及 RAP 干预自噬对 ASMC 钙化的影响

Note. A, RUNX2, α-SMA, Beclin-1, LC3BI, LC3BII protein expressions by Western blot. B, α-SMA and RUNX2 staining and distribution by immunohistochemistry. C, Cellular calcium deposition by alizarin red staining. D, Comparison of cellular calcium content. Compared with Normal group, ^a $P < 0.05$. Compared with β-GP group, ^b $P < 0.05$.

Figure 8 Effects on ASMC calcification after 3-MA and RAP intervention on autophagy

3 讨论

CKD 血管钙化最初被认为仅发生在终末期肾病,近期有研究发现 CKD 早期也可发生血管钙化^[5-6]。一项研究纳入 439 例中度 CKD 但无心血管疾病的患者,亚组分析发现,血磷每升高 1 mg/dL,冠状动脉钙化风险增加 21%,胸主动脉钙化增加 33%,主动脉瓣钙化增加 25%,二尖瓣钙化增加 62%^[7]。大量研究表明,血磷已成为 CKD 血管钙化的关键调节因子,能以多条途径启动和推进血管钙化的发生^[8]。因此将高磷作为血管钙化诱导因素对研究 CKD 血管钙化机制具有重要的意义。由于单用磷酸盐造模周期长且模型不稳定,腺嘌呤可以在体内通过黄嘌呤氧化酶生成难以溶解的代谢产物沉积在肾小管和肾小球,破坏肾的滤过功能,影响磷酸盐的排泄,进而加重高磷血症。故本研究采用高磷饮食联合腺嘌呤诱导 CKD 血管钙化大鼠模型,生化结果显示模型组大鼠较对照组肾功能显著下降,血磷及 24 h 尿蛋白定量等显著升高,肾病理提示肾间质纤维化改变,主动脉中膜 α -SMA 表达减少而 RUNX2 表达增加,钙含量明显增加。细胞实验采用 β -GP 刺激大鼠 ASMC,可见随着时间的延长,细胞钙化及成骨样分化越明显。提示成功建立 CKD 血管钙化大鼠模型及 ASMC 钙化模型。

作为真核生物中普遍存在的对细胞内物质及成分进行降解再利用的基本过程,自噬在各种生理和病理过程中均有发生,生理范围内的自噬发挥保护作用,但病理性自噬可能产生过多或过少的活化,参与人体多种病理过程如感染、癌症、神经变性和衰老以及心脏、肝和肾系统等疾病^[9]。巨自噬是自噬的经典途径,也是本研究所涉及的自噬类型。在典型的自噬过程中,Beclin 1 与多个分子形成复合体诱导自噬体形成,LC3B 系统参与自噬体的运输和成熟。自噬相关蛋白已经成为疾病干预的新的候选靶标,Beclin 1 及 LC3B 已成为自噬相关蛋白常用的标记物。本研究发现与对照组相比,CKD 血管钙化大鼠主动脉在发生血管钙化及成骨样分化时,存在 LC3B 及 Beclin 1 的表达明显增加。相关性分析结果显示自噬与钙化可能呈正相关关系。曾有研究者在含有 0.9% 磷饮食及 0.75% 腺嘌呤诱导的大鼠腹主动脉钙化中检测到 LC3B 荧光斑点及 LC3B 蛋白表达增加^[10],这与我们的发现一致。为进一步明确自噬在 CKD 血管钙化中的激活情况,本

研究通过免疫荧光染色和电镜发现 β -GP 诱导 ASMC 发生钙化同时其 LC3B 表达及自噬小体较对照组明显增多。为证实钙化组是否有自噬流的增强,即 LC3B 或自噬小体的增加不是自噬降解过程障碍所致,而是由于自噬起始过程诱导增强,我们采用监测自噬流的常用方法即用溶酶体抑制剂 CQ 抑制自噬降解过程后观察 LC3BII 蛋白表达情况^[11],结果发现 β -GP 可以诱导大鼠动脉平滑肌细胞自噬流增强。这提示血管钙化的同时存在明显的自噬增强。

目前对于自噬增强究竟是促进还是抑制钙化存在争议。既往有研究发现 3-MA 抑制自噬后加剧维生素 D3 和尼古丁诱导的血管壁钙沉积^[12];二甲双胍可通过 AMPK-mTOR 途径激活自噬从而减轻 β -GP 诱导的 ASMC 钙化^[13]。然而也有研究发现自噬激活可能是尿毒症毒素硫酸吡啶酚诱导 CKD 血管钙化的关键机制之一^[14]。黄芪甲甙通过 ERK 抑制自噬并减轻 β -GP 诱导的 ASMC 钙化^[15]。自噬增强会促进 AGEs 诱导的人血管平滑肌细胞成骨样转化和凋亡^[16]。为了进一步探索自噬在 β -GP 诱导的 ASMC 中的具体作用,本研究通过抑制或者促进自噬,观察其对钙化的影响。通过免疫组化、Western blot、钙含量测定以及茜素红染色等发现 RAP 促进自噬后,高磷刺激下的大鼠 ASMC 的钙沉积减少,钙含量水平明显降低,RUNX2 蛋白表达减少, α -SMA 蛋白表达增多,而 3-MA 抑制自噬后其结果与之相反。这表明自噬参与 β -GP 诱导的动脉平滑肌细胞的钙化及成骨样分化,可能作为一种内源性保护作用的反馈机制而被 β -GP 诱导增强,与既往支持自噬激活可以减轻血管钙化的发现一致。我们推测自噬对血管钙化的抑制作用可能与自噬可降解特异性蛋白有关。既往有研究发现自噬可降解肺动脉平滑肌细胞表面的 BMPR2^[17]。Frauscher 等^[18]通过体内、体外实验发现自噬主要通过减少 RUNX2 并增加 α -SMA、SM22 α 蛋白转录水平从而抑制成骨转分化。此外,自噬可能还与减少释放基质小泡、抑制细胞凋亡等有关^[10,19]。

总之,本研究通过体内、外研究发现高磷诱导血管钙化同时存在自噬的激活,自噬的发生与钙化密切相关;自噬在 CKD 血管钙化中可能具有内源性保护作用,增强自噬可以抑制血管钙化,为未来将自噬作为治疗 CKD 患者血管钙化新的手段又增添了一个有力的依据。今后将进一步探讨自噬影响

CKD 血管钙化的具体机制,为血管钙化的防治提供新的思路。

参考文献:

- [1] Chen J, Budoff MJ, Reilly MP, et al. Coronary artery calcification and risk of cardiovascular disease and death among patients with chronic kidney disease [J]. *JAMA Cardiol*, 2017, 2(6): 635-643.
- [2] Byon CH, Chen Y. Molecular mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease: the link between bone and the vasculature [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(4): 206-215.
- [3] Peng YQ, Xiong D, Lin X, et al. Oestrogen inhibits arterial calcification by promoting autophagy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3549.
- [4] Zhou X, Xu SN, Yuan ST, et al. Multiple functions of autophagy in vascular calcification [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 159.
- [5] Fang Y, Ginsberg C, Sugatani T, et al. Early chronic kidney disease-mineral bone disorder stimulates vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2014, 85(1): 142-150.
- [6] 熊琳, 朱婷婷, 张丽玲, 等. 慢性肾病大鼠血管钙化与骨代谢标志物的相关性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 87-94.
- [7] Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, et al. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(2): 381-387.
- [8] Cozzolino M, Ciceri P, Galassi A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(4): 213.
- [9] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [10] Dai XY, Zhao MM, Cai Y, et al. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release [J]. *Kidney Int*, 2013, 83(6): 1042-1051.
- [11] Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1865.
- [12] 李艳青, 付佳, 李彤, 等. 内质网应激与自噬的交互作用对血管钙化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(11): 1099-1105.
- [13] Qiu X, Xu Q, Xu T, et al. Metformin alleviates β -glycerophosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via AMPK/mTOR-activated autophagy [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1): 58.
- [14] Chen J, Gu Y, Zhang H, et al. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced osteoblastic calcification by SET domain containing lysine methyltransferase 7/9 protein [J]. *Nephron*, 2019, 141(4): 287-294.
- [15] Song Z, Wei D, Chen Y, et al. Association of astragaloside IV-inhibited autophagy and mineralization in vascular smooth muscle cells with lncRNA H19 and DUSP5-mediated ERK signaling [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364: 45-54.
- [16] He HQ, Qu YQ, Kwan Law BY, et al. AGEs-induced calcification and apoptosis in human vascular smooth muscle cells is reversed by inhibition of autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 692431.
- [17] Long L, Yang X, Southwood M, et al. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation [J]. *Circ Res*, 2013, 112(8): 1159-1170.
- [18] Frauscher B, Kirsch AH, Schabhuth C, et al. Autophagy protects from uremic vascular media calcification [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1866.
- [19] Ciceri P, Falleni M, Tosi D, et al. Therapeutic effect of iron citrate in blocking calcium deposition in high Pi-calcified VSMC: role of autophagy and apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5925.

[收稿日期]2022-06-16

黎凯恺,张远威,张念杰,等. 环境雌激素壬基酚通过 SRXN1 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 61-69.

Li KK, Zhang YW, Zhang NJ, et al. Effects of xenoestrogen nonylphenol on proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells by SRXN1 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 61-69.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.008

环境雌激素壬基酚通过 SRXN1 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用研究

黎凯恺,张远威,张念杰,尹 硕,何 念,万 磊,陈 旭,杨雪峰*

(遵义医科大学第二附属医院,贵州 遵义 563006)

【摘要】 目的 研究环境雌激素壬基酚(nonylphenol, NP)对结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响及其与SRXN1(sulfiredoxin-1)表达的关系。方法 利用转录组测序及实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)分析NP对COLO205细胞中SRXN1表达的影响。通过癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)及免疫组织化学技术(IHC)分析SRXN1在结直肠癌组织中的表达。利用特异性小干扰RNA片段(si-SRXN1)抑制SRXN1的表达,NP(10^{-6} mol/L)干预24 h,通过CCK-8、克隆形成、Transwell实验检测COLO205细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响,蛋白印迹(Western blot)检测细胞中ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin通路激活情况。结果 转录组测序及qRT-PCR分析发现,NP显著上调COLO205细胞中SRXN1表达($P<0.05$)。TCGA及IHC检测分析发现,结直肠癌肿瘤组织中SRXN1的表达均显著高于癌旁组($P<0.01$)。与Control组比较,NP(10^{-6} mol/L)显著促进COLO205细胞活力、促进克隆形成、侵袭及迁移(均 $P<0.01$),而si-SRXN1组显著抑制细胞增殖、侵袭及迁移的能力($P<0.01$);与si-SRXN1组比较,NP联合si-SRXN1组细胞活力($P<0.01$)、克隆形成($P<0.05$)、侵袭($P<0.01$)及迁移($P<0.01$)显著升高。与Control组比较,NP组中ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin通路均被激活(均 $P<0.01$),si-SRXN1组均显著抑制(均 $P<0.01$);与si-SRXN1组比较,NP+si-SRXN1组中ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin通路均显著激活($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 NP通过促进SRXN1的表达,促进结直肠癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

【关键词】 结直肠癌;壬基酚;细胞增殖;侵袭及迁移;sulfiredoxin-1

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0061-09

Effects of xenoestrogen nonylphenol on proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells by SRXN1

LI Kaikai, ZHANG Yuanwei, ZHANG Nianjie, YIN Shuo, HE Nian, WAN Lei, CHEN Xu, YANG Xuefeng*

(Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of xenoestrogen nonylphenol (NP) on the proliferation, invasion, and migration of colorectal cancer cells and its relationship with sulfiredoxin-1 (SRXN1) expression. **Methods** Transcriptomic sequencing and qRT-PCR were used to analyze the effect of NP, SRXN1 expression in colorectal cancer cells. SRXN1 expression in colorectal cancer was analyzed by TCGA and immunohistochemistry. After SRXN1 knockdown in colorectal cancer cell line COLO205 by a specific small interfering RNA (si-SRXN1), effects on the activity, proliferation, ROS release, invasion, and migration of NP (10^{-6} mol/L)-treated COLO205 cells was detected by CCK-8,

【基金项目】遵义医科大学新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2017]5733-081);贵州省卫生健康委科学技术基金(gzwmkj2020-1-099)。

【作者简介】黎凯恺(1993—),男,在读硕士研究生,研究方向:消化道肿瘤发病机制。E-mail:463912649@qq.com

【通信作者】杨雪峰(1973—),男,主任医师,研究方向:消化道肿瘤发病机制。E-mail:yangxuefeng1978@126.com

colony formation, transwell, and invasion assays. ERK1/2, PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin expression was assessed by Western blot. **Results** Transcriptome sequencing and qRT-PCR analysis showed that NP significantly upregulated SRXN1 expression in COLO205 cells. TCGA and IHC analysis showed that SRXN1 expression in colorectal cancer tissue samples was significantly higher than that in the paracancerous group ($P < 0.01$). Compared with control group, NP significantly promoted COLO205 cell viability, colony formation, invasion, and migration ($P < 0.01$). si-SRXN1 significantly inhibited cell proliferation, invasion, and migration ($P < 0.01$). Compared with the si-SRXN1 group, cell viability ($P < 0.01$), colony formation ($P < 0.05$), invasion ($P < 0.01$), and migration ($P < 0.01$) were significantly increased in the NP+si-SRXN1 group. Western blotting showed that, compared with the control group, ERK1/2, PI3K/Akt, and Wnt/ β -catenin were significantly increased in the NP group (all $P < 0.01$) and significantly decreased in the si-SRXN1 group (all $P < 0.01$). Compared with the si-SRXN1 group, ERK1/2, PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin were significantly increased in the NP+si-SRXN1 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** NP promotes the proliferation, invasion, and metastasis of colorectal cancer cells by promoting SRXN1 expression.

【Keywords】 colorectal cancer; nonylphenol; cell proliferation; invasion and metastasis; sulfiredoxin-1

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

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,也是导致癌症死亡的重要原因,结直肠癌确诊时已经处于中晚期,转移及复发是导致其死亡的重要原因^[1-3]。深入研究结直肠癌的发生及进展的分子机制,筛选结直肠癌早期诊断的候选靶点,是结直肠癌防治的关键。课题组前期研究发现,血清壬基酚 (nonylphenol, NP) 浓度在结直肠癌组显著高于正常组^[4];体内、体外研究均发现 NP 可激活 ERK 通路,促进结直肠癌细胞增殖^[5-7]。NP 是环境内分泌干扰物 (endocrine disrupting compounds, EDCs) 典型代表,主要是由烷基酚聚氧乙醚 (alkylphenol ethoxylates, APE) 分解产生, APE 广泛应用于塑料制品、纺织品、农药以及洗涤剂、油漆等家庭用品,生活中随处可见。由于 NP 具有亲脂性,导致其极易在组织和器官中聚集,造成内分泌紊乱、免疫异常、生殖功能障碍和肿瘤的发生^[8-9]。上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤侵袭和迁移的重要原因^[10]。NP 促进 vimentin 及抑制 E-cadherin 的表达而促进卵巢癌的侵袭及迁移^[11]。NP 是否影响结直肠癌的侵袭及迁移,目前还未见报道。课题组通过转录组测序分析发现,SRXN1 (sulfiredoxin-1) 在 NP 干预后的人结直肠癌细胞 COLO205 中被显著上调。SRXN1 属于保守的内源性 sulfiredoxin 抗氧化家族的成员之一,具有调节氧化应激反应、发挥神经保护作用^[12]。最近研究发现,SRXN1 的异常表达可促进卵巢癌及肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[13-14]。本文通过临床及细胞水平,观察 NP 与结直肠癌增殖、侵袭及迁移的关系及与 SRXN1 相关性,初步阐

明 NP 通过 SRXN1 促进结直肠癌增殖、侵袭和迁移作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

结直肠癌 COLO205 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,由本实验室保存。

1.1.2 结直肠癌临床样本

30 对结直肠癌患者肿瘤及配对的癌旁组织均为 2020 年 1 月~2020 年 12 月在我院胃肠外科住院,经肠镜病理检查明确诊断为结直肠癌患者。患者年龄 54~77 岁,平均年龄 60.00 岁,其中男、女各 15 例。肿瘤及其配对的癌旁样本,取材后,等分成两份,一份置于 4% 多聚甲醛固定,经梯度乙醇脱水后,石蜡包埋;一份置于液氮保存。每位患者均签署知情同意书,协议由遵义医科大学第二附属医院伦理委员会审查批准 (遵医伦审 [2019] H-008 号)。

1.2 主要试剂与仪器

壬基酚购自中国 Aladdin 公司 (货号: 84852-15-3); CCK-8 (货号: CA1210) 及免疫组化 (货号: SP0041) 检测试剂盒购自于北京索莱宝科技有限公司; qRT-PCR 检测试剂盒购自于美国 Thermofisher 公司 (货号: 4472903); Anti-ERK1 + ERK2 antibody (货号: ab109282)、Anti-ERK1 + ERK2 (phospho T202 + Y204) antibody (货号: ab201015)、Anti-PI 3 Kinase p85 α antibody (货号: ab191606)、Anti-PI 3 Kinase p85 α (phospho Y607) antibody (货号: ab182651) 购自于英国 abcam 公司; Anti-Akt

antibody (货号: 60203-2-Ig)、Anti-SRXN1 antibody (货号: 14273-1-AP)、Anti-Phospho-AKT (Ser473) antibody (货号: 80455-1-RR)、Anti-Wnt3a antibody (货号: 26744-1-AP)、Anti- β -catenin antibody (货号: 51067-2-AP) 及 Anti-GAPDH antibody (货号: 60004-1-Ig) 购自于武汉三鹰生物技术有限公司。si-SRXN1 (si-SRXN1-1: 5'-GCCGGCUCCAAAUUCCAATT-3'; si-SRXN1-2: 5'-GGACUACAUCAGCUGCAATT-3') 及 si-NC (negative control) (5'-TAATTGAUUGGGTTAAAGGCC-3') 购自上海吉玛制药技术有限公司。qRT-PCR 引物 SRXN1 (Forward: 5'-CAGGGAGGTGACTACTTCTACTC-3'; Reverse: 5'-CAGGTACACCTTAGGTCTGA-3') 及 GAPDH 引物 (Forward: 5'-GGAGCGAGATCCC TCCAAAAT-3'; Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATAC TTCTCATGG-3') 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

HERAcell 150i1 型 CO₂ 培养箱购自于美国 Thermo 公司; Lightcycler480 型 qRT-PCR 仪购自于美国 Roche 公司; NIKON DS-U3 正置荧光显微镜购自于日本尼康; Multiskan Sky 全波长酶标仪购自于美国 Thermo 公司; FACS Calibur 流式细胞仪购自于美国 BD 公司; PowerPace Basic 型电泳仪购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

COLO205 细胞复苏后, 分别置于 RPMI-1640+10% 胎牛血清的培养基中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞联合度达到 80%~90% 时, 按照 1:2~1:3 的比例传代, 备用。

1.3.2 RNA-seq 分析

将 COLO205 细胞随机分成空白对照组 (Control)、壬基酚 (10⁻⁶ mol/L) 组 (NP), 处理 24 h (NP 浓度及作用时间参考^[5-7])。收集细胞, 样品经过 RNA 抽提、纯化、建库之后, 采用第二代测序技术 (next-generation sequencing, NGS), 基于 Illumina 测序平台, 对这些文库进行双末端 (Paired-end, PE) 测序; 筛选差异表达基因 (筛选标准: $|\log_2^{\text{FoldChange}}| > 1, P < 0.05$)。测序及初步分析委托上海派森诺生物科技股份有限公司协助完成。

1.3.3 TCGA 分析肠癌中 SRXN1 表达

UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 是基于癌症基因组图谱 (the cancer genome

atlas, TCGA) 数据库构建的在线分析平台。通过 UALCAN 数据库分析 SRXN1 在肠癌中的表达情况, 其中包括肿瘤样本 241 个, 正常样本 41 个。

1.3.4 qRT-PCR 检测 SRXN1 表达

将 COLO205 细胞随机分成空白对照组 (Control)、壬基酚 (10⁻⁷ mol/L、10⁻⁶ mol/L、10⁻⁵ mol/L) 组 (NP), 干预 24 h 后, 收集细胞, 提取 RNA, 逆转录成 cDNA, qRT-PCR 检测 SRXN1 的表达。同时提取结直肠癌患者肿瘤及其配对的癌旁组织 RNA, 逆转录成 cDNA 后, qRT-PCR 检测 SRXN1 的表达变化。数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示; ΔCT = 目的基因 Ct 值 - 内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta CT$ = 实验组 (Ct (目的基因) - Ct (GAPDH)) - 对照组 (Ct (目的基因) - Ct (GAPDH))。

1.3.5 免疫组化检测结直肠癌组织 SRXN1 表达

结直肠癌患者肿瘤及其配对的癌旁组织利用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片, 脱蜡、水化及抗原修复后, 5% BSA 抗原阻断, 滴加 SRXN1 抗体 (1:200), 4℃ 孵育过夜; PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 HRP 标记的二抗, 37℃ 孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木素复染 3 min, 1% 盐酸乙醇分化。利用徕卡显微镜 (DM1000) 采集照片。利用 Image-pro plus 6.0 分析软件计算每个样本中 SRXN1 表达的平均光密度值 (IOD)。

1.3.6 细胞分组及转染

取对数生长期的 COLO205 细胞, 1×10^4 cells/mL 的细胞量传于 6 孔板, 将 COLO205 细胞随机分成: 空白对照组 (Control)、SRXN1 干扰对照组 (si-NC)、壬基酚 (10⁻⁶ mol/L) 组 (NP)、SRXN1 干扰组 (si-SRXN1)、壬基酚 + SRXN1 干扰组 (NP + si-SRXN1)。si-NC 及 si-SRXN1 按照 Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒说明书转染入 COLO205 细胞 12 h 后, 再利用 NP 干预 24 h。

1.3.7 CCK-8 检测

按照 CCK-8 试剂盒操作说明, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 在细胞培养箱内继续孵育 4 h, 用酶标仪 (450 nm) 检测各组细胞的吸光值 (OD 值)。

1.3.8 克隆形成实验检测

以每皿 200 个 COLO205 细胞分别接种于 37℃ 预温 10 mL 培养液的皿中, 并轻轻转动, 使细胞分散均匀, 置 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 14 d。弃去上清液, 用 PBS 小心清洗 2 次。4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃去固定液, 加适量吉姆萨染色液

(GIMS)染色 30 min,然后洗去染色液。Nikon 显微镜(TS100-F)拍照后,计算克隆形成数量。

1.3.9 Transwell 检测

COLO205 细胞血清饥饿 24 h 后,将细胞按照 5×10^4 接种到 Transwell 小室上层内,下层的 24 孔板中加入含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后;每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛溶液,室温固定 10 min;吸去固定液,用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗,加入 1 mL 0.5%结晶紫溶液染色 30 min, $1 \times \text{PBS}$ 洗 3 次,每次 3~5 min;用棉签小心擦去 Transwell 小室内没有迁移的细胞,置于 $200 \times$ 显微镜下观察,计数每个视野中的细胞数。

1.3.10 Western blot 检测

收集细胞,利用 RIPA 裂解,冰上孵育 20 min 后, 4°C 、10 000~14 000 r/min 离心 3~5 min,取上清,BCA 定量,每孔按照 20 μg 蛋白量上样,SDS-PAGE 电泳后,转膜,分别以兔抗 SRXN1(1:800)、ERK1/2(1:800)、p-EKR1/2(1:800)、PI3K(1:1000)、p-PI3K(1:800)、Akt(1:1000)、p-Akt(1:800)、Wnt3a(1:1000)、 β -catenin(1:1000)及 GAPDH(1:10000), 4°C 、孵育过夜后,TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 酶标抗兔二抗。加入 ECL 发光液膜置于全自动化学发光分析仪中扫描,通过 TANON GIS 软件读取相关条带灰度值。

1.4 统计学方法

所有实验均重复 3 次,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 分析及绘图。多组间数据的比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD- t 检验,组织标本中 SRXN1 表达采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NP 对结直肠癌 COLO205 细胞中 SRXN1 表达的影响

RNA-seq 分析发现,NP 引起 COLO205 细胞中 154 个基因表达异常,上调基因 107 个,下调基因 57 个,其中 SRXN1 的 $\log_2^{\text{FoldChange}}$ 为 2.17 倍(图 1A)。与空白对照组(Control)比较,不同浓度 NP(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)分别作用 COLO205 细胞后,SRXN1 mRNA 及 SRXN1 蛋白表达均显著升高(均 $P < 0.05$) (图 1B、图 1C)。与 Control 组比较,SRXN1 特异性 si-SRXN1-1、si-SRXN1-2 均显著抑制 SRXN1 表达(t

$= 7.23, 5.14$, 均 $P < 0.01$), si-SRXN1-1 的抑制效果最明显,后续实验均使用 si-SRXN1-1 特异性抑制 SRXN1(图 1D~图 1F)。与 si-SRXN1-1 组比较,不同浓度的 NP(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)分别作用 COLO205 细胞后,SRXN1 mRNA 及 SRXN1 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$) (图 1G~图 1I)。以上结果说明 NP 能够促进结直肠癌 COLO205 细胞中 SRXN1 的表达。

2.2 SRXN1 在结直肠癌中的表达分析

TCGA 分析发现,在肿瘤样本中,SRXN1 的表达显著高于正常肠组织($P < 0.01$) (图 2A)。qRT-PCR 检测收集的结直肠癌肿瘤组织样本中 SRXN1 mRNA 表达量显著高于癌旁组织($t = 10.23$, $P < 0.01$) (图 2B);IHC 检测分析发现,结直肠癌肿瘤组织样本中 SRXN1 的表达显著高于癌旁组织($t = 6.64$, $P < 0.01$) (图 2C、图 2D)。以上结果说明,在结直肠癌中,SRXN1 的表达显著升高。

2.3 SRXN1 抑制后,NP 对结直肠癌细胞增殖影响

CCK-8 检测发现,与 Control 组比较,NP 组细胞活力显著高于 Control 组($t = 4.64$, $P < 0.01$),而 si-SRXN1 组细胞活力显著低于 Control 组;与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 组细胞活力显著增加($t = 5.72$, $P < 0.01$) (图 3A)。与 Control 组比较,NP 组克隆数显著高于 Control 组($t = 5.64$, $P < 0.01$), si-SRXN1 组显著低于 Control 组($t = 10.76$, $P < 0.01$);与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 克隆数显著增多($t = 4.24$, $P < 0.05$) (图 3B、图 3C)。

2.4 SRXN1 抑制后,NP 对结直肠癌细胞侵袭及迁移能力的影响

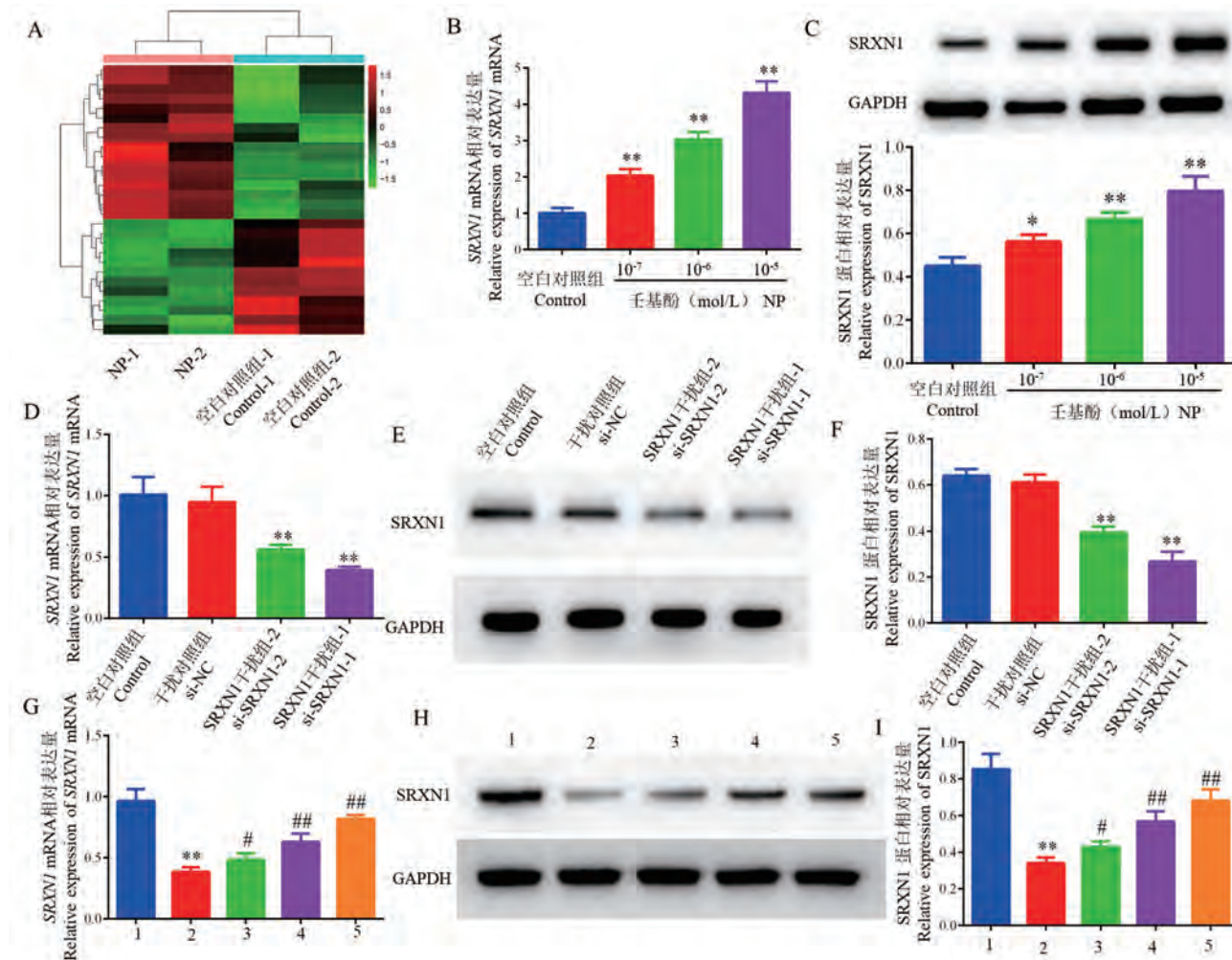
NP 组细胞侵袭数显著高于 Control 组($t = 2.31$, $P < 0.01$); si-SRXN1 组 COLO205 细胞侵袭数显著低于 Control 组($t = 4.99$, $P < 0.01$)。与 si-SRXN1 组比较,NP+si-SRXN1 能够促进细胞的侵袭($t = 2.97$, $P < 0.01$) (图 4A~图 4C)。NP 组 COLO205 细胞迁移数显著高于 Control 组($t = 2.45$, $P < 0.01$); si-SRXN1 组 COLO205 细胞迁移数显著低于 Control 组($t = 4.19$, $P < 0.01$)。与 si-SRXN1 组比较, NP + si-SRXN1 能够促进细胞的迁移($t = 2.07$, $P < 0.01$) (图 4A~图 4C)。

2.5 SRXN1 抑制后,NP 对增殖、侵袭相关通路激活的影响

课题组前期研究发现 NP 可通过激活 ERK1/2 促进结直肠癌细胞增殖^[5-7]。PI3K/Akt、Wnt/ β -

catenin 在多种肿瘤中异常激活,调节肿瘤的增殖及 EMT。Western blot 检测发现:与 Control 组比较,NP 显著促进 p-ERK1/2、p-PI3K、p-Akt、Wnt3a、 β -catenin 的表达($t=3.34, 3.04, 4.80, 6.81, 5.71$, 均 $P<0.01$),而 si-SRXN1 组抑制 p-ERK1/2、p-PI3K、p-Akt、Wnt3a、 β -catenin 的表达($t=13.34, 8.75, 11.74, 8.65, 12.47$, 均 $P<0.01$);与 si-SRXN1 组比

较,NP + si-SRXN1 组中 p-ERK1/2 ($t=4.80, P<0.01$)、p-PI3K($t=3.82, P<0.01$)、p-Akt($t=3.78, P<0.05$)、Wnt3a($t=4.48, P<0.05$)、 β -catenin($t=6.90, P<0.05$)的表达显著升高。以上结果说明 NP 能够促进 ERK1/2、PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin 通路的激活,而 SRXN1 显著抑制上述通路的激活影响 COLO205 细胞的增殖及侵袭能力(图 5)。

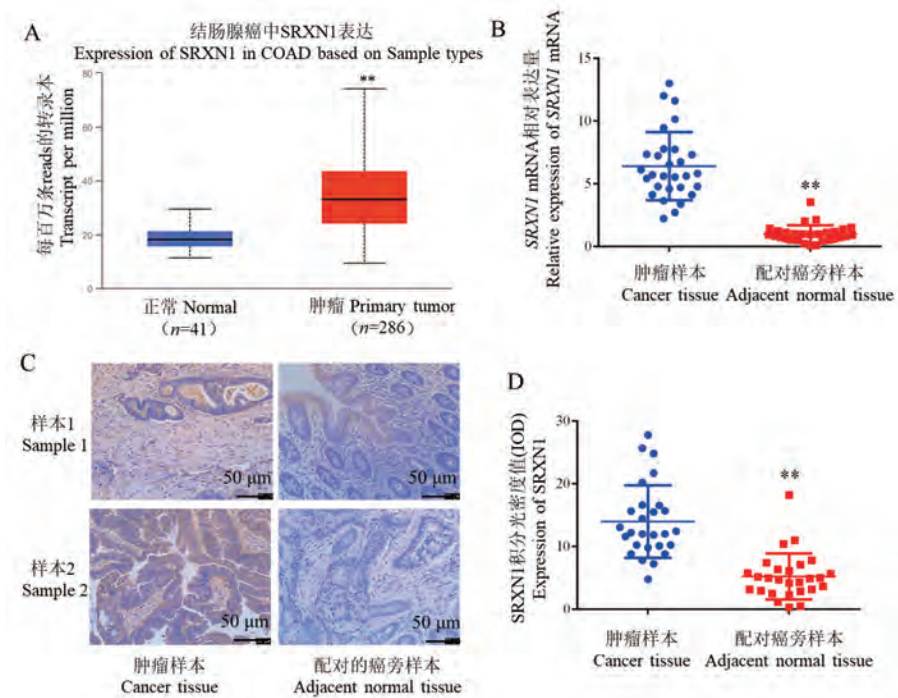


注:A:Heatmap(1,2为重复);B:qRT-PCR分析SRXN1表达;C:NP干预后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达;D:qRT-PCR分析SRXN1表达;E~F:转染si-SRXN1后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达;G:qRT-PCR分析SRXN1表达;H~I:SRXN1抑制后,Western blot检测COLO205细胞中SRXN1表达。1~5分别代表空白对照组、SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-7} mol/L)+SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-6} mol/L)+SRXN1干扰组、壬基酚(10^{-5} mol/L)+SRXN1干扰。与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与SRXN1干扰组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图1 SRXN1在COLO205细胞中的表达

Note. A, Heatmap (1 and 2 are repetitions). B, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. C, After NP intervention, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. D, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. E~F, After transfection with si-SRXN1, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. G, qRT-PCR analysis of SRXN1 expression in colorectal cancer. H~I, After SRXN1 inhibition, Western blot analysis of SRXN1 expression in COLO205 cells. 1~5 represents the Control, si-SRXN1, NP (10^{-7} mol/L) + si-SRXN1, NP (10^{-6} mol/L) + si-SRXN1, NP (10^{-5} mol/L) + si-SRXN1. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with si-SRXN1 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 Expression of SRXN1 in COLO205 cells

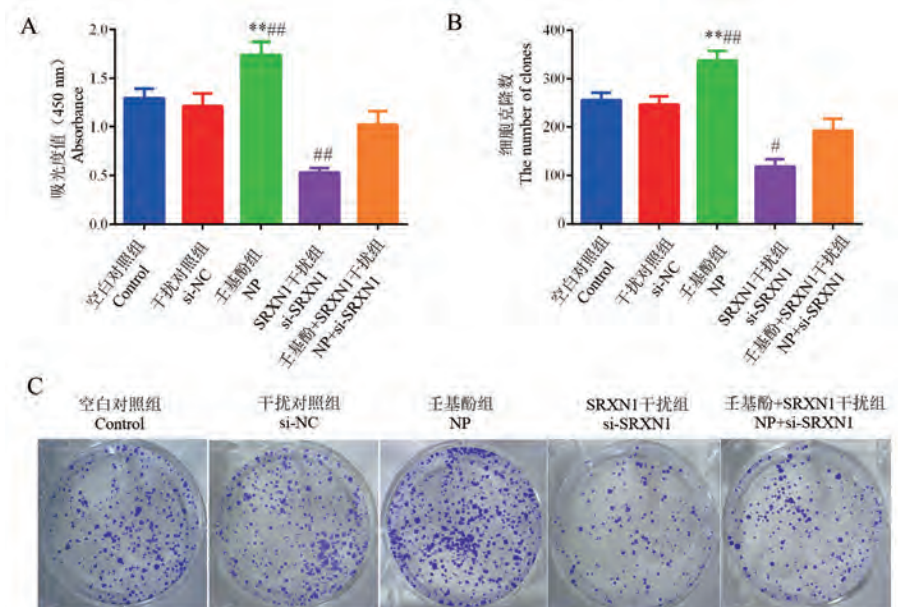


注:A:TCGA 分析 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达;B:qRT-PCR 分析 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达;C:IHC 分析 *SRXN1* 表达(200X);D:IOD 值统计分析结果。与肿瘤样本相比, ** $P<0.01$ 。

图 2 *SRXN1* 在结直肠癌中的表达

Note. A, TCGA analysis of *SRXN1* expression in colorectal cancer. B, qRT-PCR analysis of *SRXN1* expression in colorectal cancer. C, IHC analysis of *SRXN1* expression. D, Statistical analysis results of IOD values. Compared with cancer tissue, ** $P<0.01$.

Figure 2 Expression of *SRXN1* in colorectal cancer

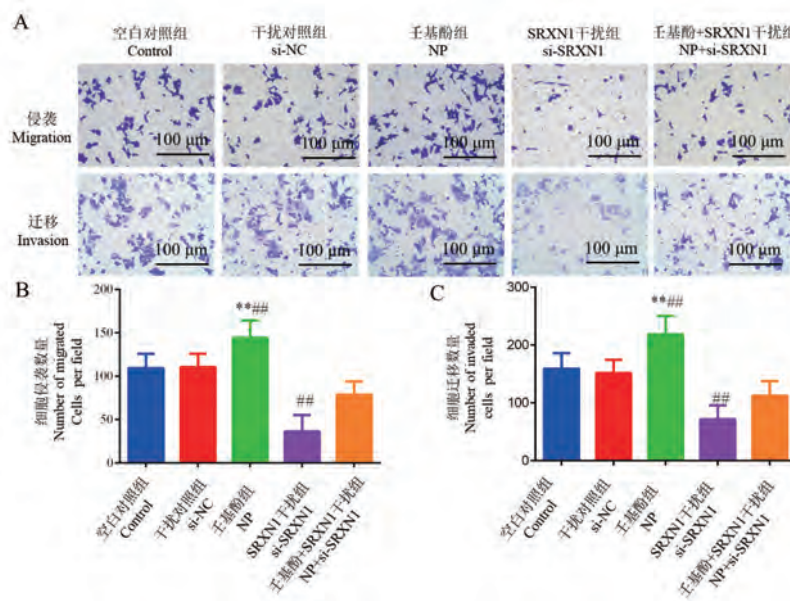


注:A:CCK-8 检测细胞活力;B、C:克隆形成实验检测。与空白对照组相比, ** $P<0.01$;与王基酚+si-SRXN1 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 COLO205 细胞增殖能力检测

Note. A, Cell viability was detected by CCK-8. B/C, Experimental detection of clone formation. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 COLO205 cell proliferation capacity assay

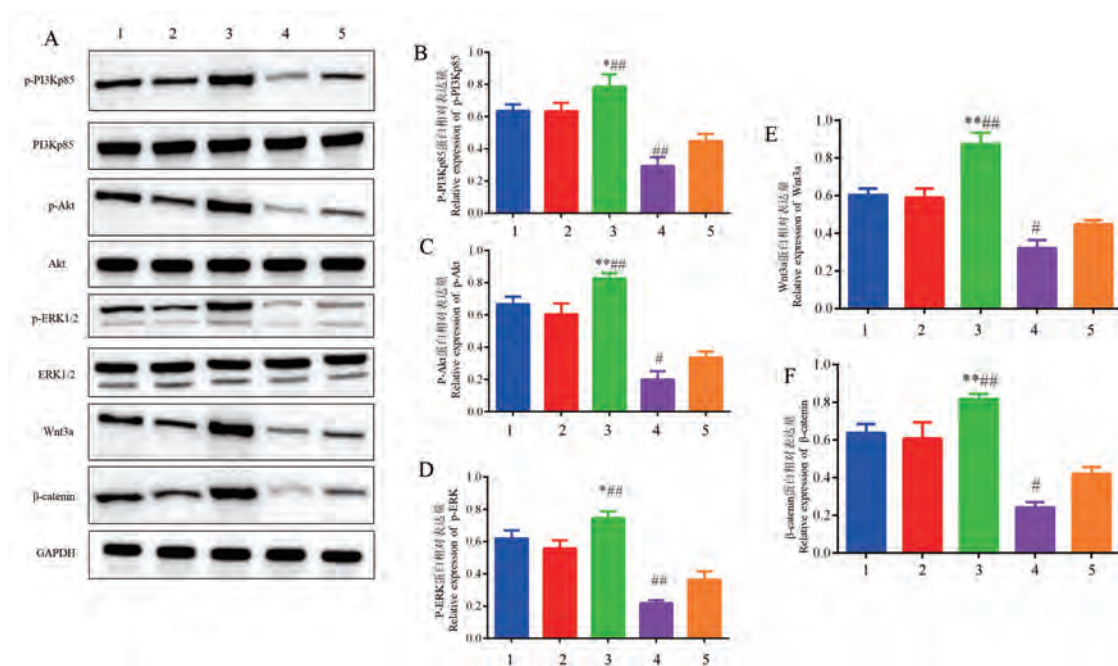


注:A:Transwell 检测;B:Migration 数据统计;C:Invasion 数据统计。与空白对照组相比, ** $P<0.01$;与壬基酚+SRXN1 干扰组相比, ## $P<0.01$ 。

图 4 COLO205 细胞侵袭及迁移能力变化

Note. A, Transwell test. B, Migration data statistics. C, Invasion statistics. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, ## $P<0.01$.

Figure 4 Changes in invasion and migration ability of COLO205 cells



注:A:Western blot 检测;B~F:分别代表 p-PI3Kp85、p-Akt、p-ERK、Wnt3a、β-catenin 表达统计。1~5 分别代表空白对照组、干扰对照组、壬基酚组、SRXN1 干扰组、壬基酚+SRXN1 干扰组。与空白对照组相比, ** $P<0.01$;与壬基酚+si-SRXN1 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 5 Western blot 检测 PI3K/Akt、ERK、Wnt3a/β-catenin 通路表达

Note. A, Western blot assay. B~F, Expression statistics of p-PI3Kp85, p-Akt, p-ERK, Wnt3a and β-catenin, respectively. 1~5 represents the Control, si-NC, NP, si-SRXN1, NP+si-SRXN1. Compared with Control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with NP+si-SRXN1 group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 5 Expression of PI3K/Akt, ERK1/2 and Wnt3a/β-catenin pathways detected by Western blot

3 讨论

随着现代工业的发展,大量化学物质释放到自然环境中,造成极大的环境污染,其中一类外源性化学物质可模仿或部分模仿性激素,并通过与性激素受体结合或影响细胞信号途径等方式发挥毒性作用,这类物质被称为环境内分泌干扰物(EDCs)亦称环境雌激素^[15]。研究发现 EDCs 能够引起人类生育能力降低和诱发多种疾病,如肥胖症、糖尿病和癌症^[16]。NP 是 EDCs 的典型代表,由于 NP 具有亲脂性,导致其极易在组织和器官中聚集,与肿瘤的发生密切相关^[8-9]。深入阐明 NP 与肿瘤的发生、进展的关系,对肿瘤的防治具有重要的意义。

肿瘤的发生及进展受氧化应激水平调节,活性氧通过调节炎症、线粒体功能、激活 MAPK 及 AMPK 等通路促进肿瘤的发生及进展^[17-18]。NP 能够引起机体氧化应激水平的失衡,促进 ROS 及炎症因子的释放促进心脏毒性、胃粘膜炎症、卵巢颗粒细胞的凋亡和自噬^[19-20]。RNA-seq 及 qRT-PCR 检测发现,NP 引起 SRXN1 表达显著上调。SRXN1 属于保守的内源性 Sulfiredoxin 抗氧化家族的成员之一,可通过调节活性氧的释放,发挥神经保护作用^[12]。最近研究发现,SRXN1 在多种恶性肿瘤中具有促进增殖及转移的能力^[21-22],SRXN1 通过影响过氧化物酶活性,调节 ROS 水平,以使组织免受氧化应激损伤,进而促进肿瘤细胞增殖及 EMT 的发生^[23-24]。本文研究发现,抑制 SRXN1 的表达后,结直肠癌 COLO205 细胞的增殖、侵袭及迁移能力显著降低,而 NP 则得到相反的结果。暗示 NP 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭及迁移可能与 SRXN1 表达相关,但 NP 如何影响 SRXN1 表达以及与氧化应激的关系,还需通过实验进一步研究。

调节细胞增殖及转移的主要通路为 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 等,ERK1/2、PI3K/Akt 在多种肿瘤中异常激活,调节肿瘤的增殖、分化及 EMT^[25]。ERK1/2 的异常激活,促进增殖相关蛋白(CyclinD1、C-myc、PCNA)的表达,促进结直肠癌细胞增殖^[7],抑制 PI3K/Akt 通路后,显著抑制卵巢癌细胞 EMT 及增殖^[26]。SRXN1 可通过激活 Wnt/ β -catenin^[27]、ERK1/2^[28] 及 PI3K/Akt^[29] 通路。通过 Western blot 检测发现,NP 显著促进 p-ERK1/2、p-Akt 及 Wnt3a、 β -catenin 的表达,暗示 NP 能够显著激活 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路;

SRXN1 抑制后,NP 对 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路的激活作用被减弱,暗示 NP 激活 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 通路与 SRXN1 表达相关。

综上所述,NP 可促进 SRXN1 的表达,调节结直肠癌细胞的增殖、侵袭及转移,其分子机制与 ERK1/2、PI3K/Akt 及 Wnt/ β -catenin 等通路激活有关;但 NP 与 SRXN1 具体调控机制,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Sauer AG, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164.
- [2] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [3] Thanikachalam K, Khan G, et al. Colorectal cancer and nutrition [J]. Nutrients, 2019, 11(1): 164.
- [4] 黄韩冬, 宁伟伟, 张桃, 等. 结直肠癌患者血清壬基酚含量测定及临床意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(9): 1568.
- [5] Yang X, Huang H, Wang M, et al. Effect of nonylphenol on the regulation of cell growth in colorectal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 2211-2216.
- [6] Yang X, Huang H, Wang M, et al. Nonylphenol promotes the proliferation of colorectal cancer COLO205 cells by upregulating the expression of protein kinase C ζ [J]. Oncol Lett, 2019, 17(2): 2498-2506.
- [7] Xie M, Liang JL, Huang HD, et al. Low doses of nonylphenol promote growth of colon cancer cells through activation of ERK1/2 via G protein-coupled receptor 30 [J]. Cancer Res Treat, 2019, 51(4): 1620-1631.
- [8] Kim H, Oh S, Gye MC, et al. Comparative toxicological evaluation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates using human keratinocytes [J]. Drug Chem Toxicol, 2018, 41(4): 486-491.
- [9] Kim SH, Nam KH, Hwang KA, et al. Influence of hexabromocyclododecane and 4-nonylphenol on the regulation of cell growth, apoptosis and migration in prostatic cancer cells [J]. Toxicol In Vitro, 2016, 32(3): 240-247.
- [10] Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, et al. Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: hematogenous versus peritoneal spread [J]. J Oncol, 2019, 2019: 7407190.
- [11] Kim YS, Hwang KA, Hyun SH, et al. Bisphenol A and nonylphenol have the potential to stimulate the migration of ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via an estrogen receptor dependent pathway [J]. Chem Res Toxicol, 2015, 28(4): 662-671.
- [12] 喻姗姗, 刘远玲, 陈曦, 等. Sulfiredoxin-1 对大鼠星形胶质细

- 胞缺血损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(1): 11-15.
- [13] Lv XF, Yu HL, Zhang QQ, et al. SRXN1 stimulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis through modulating ROS/p65/BTG2 signalling [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18): 10714-10729.
- [14] Chen X, Lan K, Liu Q, et al. Sulfiredoxin may promote metastasis and invasion of cervical squamous cell carcinoma by epithelial-mesenchymal transition [J]. Tumour Biol, 2017, 39(3): 1010428317695942.
- [15] 李金荣, 郭瑞昕, 刘艳华, 等. 五种典型环境内分泌干扰物赋存及风险评估的研究进展 [J]. 环境化学, 2020, 39(10): 2637-2653.
- [16] Yang O, Kim HL, Weon JI, et al. Endocrine-disrupting chemicals: review of toxicological mechanisms using molecular pathway analysis [J]. J Cancer Prev, 2015, 20(1): 12-24.
- [17] Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, et al. Oxidative stress in cancer [J]. Cancer Cell, 2020, 38(2): 167-197.
- [18] Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, et al. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4472.
- [19] 金海, 俞捷, 李仕旭, 等. 壬基酚暴露对大鼠胃粘膜的氧化损伤作用 [J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(1): 16-20.
- [20] Liu T, Di QN, Sun JH, et al. Effects of nonylphenol induced oxidative stress on apoptosis and autophagy in rat ovarian granulosa cells [J]. Chemosphere, 2020, 261: 127693.
- [21] Wang J, Si L, Wang G, et al. Increased sulfiredoxin expression in gastric cancer cells may be a molecular target of the anticancer component diallyl trisulfide [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 4636804.
- [22] Lan K, Zhao Y, Fan Y, et al. Sulfiredoxin may promote cervical cancer metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 1-13.
- [23] Lu Q, Wang W, Zhang M, et al. ROS induces epithelial-mesenchymal transition via the TGF- β 1/PI3K/Akt/mTOR pathway in diabetic nephropathy [J]. Exp Ther Med, 2019, 17(1): 835-846.
- [24] Li X, He P, Wang XL, et al. Sulfiredoxin-1 enhances cardiac progenitor cell survival against oxidative stress via the upregulation of the ERK/NRF2 signal pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 123: 8-19.
- [25] Liu X, Sun L, Zhang S, et al. GINS2 facilitates epithelial-to-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer through modulating PI3K/Akt and MEK/ERK signaling [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7747-7756.
- [26] Deng J, Bai X, Feng X, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway alleviates ovarian cancer chemoresistance through reversing epithelial-mesenchymal transition and decreasing cancer stem cell marker expression [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 618.
- [27] Lan K, Zhao Y, Fan Y, et al. Sulfiredoxin may promote cervical cancer metastasis via Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 917.
- [28] Li X, He P, Wang X, et al. Sulfiredoxin-1 enhances cardiac progenitor cell survival against oxidative stress via the upregulation of the ERK/NRF2 signal pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 123: 8-19.
- [29] Zhang JK, He ZY, Guo JH, et al. Sulfiredoxin-1 protects against simulated ischaemia/reperfusion injury in cardiomyocyte by inhibiting PI3K/AKT-regulated mitochondrial apoptotic pathways [J]. Biosci Rep, 2016, 36(2): e00325.

[收稿日期] 2022-06-20

吴朋朋,张彩勤,赵勇,等. 2017~2021 年陕西省实验动物使用单位 SPF 级大、小鼠质量监测结果分析与评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 70-77.

Wu PP, Zhang CQ, Zhao Y, et al. Analysis and evaluation of quality monitoring results of SPF rats and mice in Shaanxi province from 2017 to 2021 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 70-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.009

2017~2021 年陕西省实验动物使用单位 SPF 级大、小鼠质量监测结果分析与评估

吴朋朋,张彩勤,赵 勇,谭邓旭,师长宏,白 冰*

(空军军医大学实验动物中心,西安 710032)

【摘要】 目的 分析 2017~2021 年陕西省部分实验动物使用单位无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级大、小鼠微生物和寄生虫质量检测结果,了解各单位大、小鼠病原微生物学质量状况,为实验动物质量管理与监测提供参考依据。**方法** 按照现行国家标准 GB 14922.2-2011、GB/T 14926-2001 和 GB/T 14926.21-2008,由陕西省实验动物质量监督检测中心对大、小鼠进行病原微生物和寄生虫抽样检测并分析质量状况。**结果** 2017 年~2021 年累计抽检 109 家单位的小鼠 2549 只,45 家单位的大鼠 503 只。检测结果显示,小鼠体外寄生虫(螨虫)检出率由 5.26%降为 0.15%,肠道鞭毛虫由 10.53%降为 0.45%,肠道蠕虫由 0.40%升至 2.39%,沙门菌由 2.78%降至无检出,泰泽病原体抗体阳性率由 1.38%降至无检出;大鼠体外寄生虫(螨虫)检出率由 7.07%降至无检出;肠道鞭毛虫由 11.50%降为 0.83%,蠕虫由 3.79%升至 7.50%,金黄色葡萄球菌由 1.77%降至无检出。小鼠病毒血清抗体阳性率,2017 年检出小鼠肝炎病毒(4.71%)、仙台病毒(1.39%)和小鼠细小病毒(2.22%),2021 年出小鼠肝炎病毒(0.30%)和仙台病毒(0.15%),小鼠肺炎病毒阳性率则由 1.11%升至 2.39%,小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型由 0.17%升至 0.45%。大鼠仙台病毒阳性率由 7.07%降为 0.83%,大鼠细小病毒和大鼠冠状病毒仅 2017 年和 2018 年在个别单位有检出,大鼠肺炎病毒则由 0.88%增长为 10.00%。**结论** 近 5 年的检测结果表明,陕西省实验动物使用单位的大、小鼠病原微生物质量逐年提升,但仍存在一定问题,应持续采取严格的生物安全防护措施,加强动物实验过程,确保各单位在实验周期内动物质量合格。

【关键词】 SPF 级大、小鼠;质量监测;微生物学;寄生虫学;分析与评估

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0070-08

Analysis and evaluation of quality monitoring results of SPF rats and mice in Shaanxi province from 2017 to 2021

WU Pengpeng, ZHANG Caiqin, ZHAO Yong, TAN Dengxu, SHI Changhong, BAI Bing*
(Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To determine the current pathogenic microbiology quality status of experimental rats and mice in Shaanxi province, we analyzed quality monitoring result from 2017 to 2021 to provide a reference for health screening of laboratory rats and mice. **Methods** Using the current national standards GB 14922.2-2011, GB/T 14926-2001, and GB/T 14926.21-2008, the Laboratory Animal Quality Supervision and Testing Center of Shaanxi carried out pathogenic microbial and parasite quality sampling tests on SPF rats and mice in all licensed companies and research

[基金项目] 军队实验动物专项科研课题(SYDW[2018]08 号);陕西省科技资源开放共享平台项目(2022PT-36)。

[作者简介] 吴朋朋(1987—),男,助理实验师,研究方向:实验动物质量检测及疾病研究。E-mail:wpp217@163.com

[通信作者] 白冰(1980—),男,高级兽医师,研究方向:实验动物质量检测及疾病研究。E-mail:bone_1999@163.com

institutes, and then analyzed the result. **Results** From 2017 to 2021, 2549 SPF mice and 503 SPF rats were collected from 109 and 45 organizations, respectively. Mouse parasite detection showed a reduction of mites from 5.26% to 0.15%, intestinal flagellates from 10.53% to 0.45%, *Salmonella* and Tyzzer's organism from 2.78% and 1.38%, respectively, to undetected. Intestinal helminths increased from 0.40% to 2.39%. In rats, there were declines in mites and *Staphylococcus aureus* from 7.07% and 1.77%, respectively, to undetected, intestinal flagellates from 11.50% to 0.83%, and enrichment of helminths from 3.79% to 7.50%. In terms of positive rates of mouse serum antibodies, in 2017, mouse hepatitis virus (4.71%), Sendai virus (1.39%), and minute virus of mice (2.22%) were positive. Additionally, in 2021, mouse hepatitis virus (0.30%) and Sendai virus (0.15%) were positive. These result indicated raised trends of both pneumonia virus of mice and reovirus type III. However, there was a reduction in Sendai virus from 7.07% to 0.83% and an increase of pneumonia virus from 0.88% to 10.00%. In rats, although parvovirus and coronavirus had predominant potentials, which were detected in the past 5 years, the number of infected organizations and the positive rate showed a downward trend annually. **Conclusions** The test result in the past 5 years showed that pathogenic microorganisms in rats and mice in Shaanxi province had improved yearly. However, many problems still existed. Therefore, strict biosafety prevention and control measures should be conducted continuously, and the animal experimentation process should be strengthened to ensure that animals are qualified within the experimental period.

【Keywords】 SPF rats and mice; quality monitoring; microbiology; parasitology; analysis and evaluation

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

随着生命科学的发展,实验动物已成为其研究的基础与支撑,是医学教学和生物医学研究不可缺少的实验材料。实验动物的质量直接影响实验结果的准确和课题研究的成败,决定研究成果的可行性、重复性和科学性,特别是一些人兽共患性疾病,直接威胁动物饲养人员和研究人员的健康与生命安全^[1-2]。因此,做好实验动物的质量检测与评估的相关工作,对实验动物的生产和应用具有重要作用^[3-4]。

本中心作为陕西省实验动物质量检测机构(陕西省实验动物质量监督检测中心),根据《实验动物质量管理办法》、《实验动物许可证管理办法》和《陕西省实验动物管理办法》等相关法律法规以及实验动物国家标准^[5-8],除了每年对各实验动物生产单

位进行质量抽测外,近年来,加大对省内实验动物使用单位的质量抽检,并及时反馈检测结果,对不合格的动物进行处置并做好后期的跟踪监测,确保本地区实验动物使用安全。本文对 2017~2021 年期间陕西省实验动物使用单位饲养的 SPF 级大、小鼠质量抽检结果进行了总结分析,探讨了影响动物质量的因素,以期为动物实验过程中的质量管理和监测提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

抽检的不同品系的 SPF 级大、小鼠均来自陕西省内实验动物使用单位,各年度抽检单位数量、动物品种及数量见表 1。

表 1 2017~2021 年陕西地区实验动物质量监测结果
Table 1 Monitoring results of laboratory animals in Shaanxi from 2017 to 2021

年份 Year	单位数量 Total number of organizations	动物数量(只) Number of animals							动物总数(只) Total number of animals
		C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	KM 小鼠 KM mice	ICR 小鼠 ICR mice	基因编辑 小鼠 Gene editing mice	SD 大鼠 SD rats	Wistar 大鼠 Wistar rats	
2017	15	83	104	73	31	70	103	10	474
2018	17	145	78	66	15	202	68	11	585
2019	20	104	102	91	40	261	87	11	696
2020	25	68	44	37	2	263	64	29	507
2021	32	81	70	82	7	430	79	41	790
累计 Grand total	109	481	398	349	95	1226	401	102	3052

1.2 主要试剂与仪器

大、小鼠酶联免疫抗体检测试剂盒购买于苏州西山生物技术有限公司和中国食品药品检定研究院,其中苏州西山生物技术有限公司小鼠酶联免疫抗体检测试剂盒批号:鼠痘病毒(E22012201)、肝炎病毒(E22040801)、仙台病毒(E22012802)、肺炎病毒(E22031411)、呼肠孤病毒 III 型(E21102902)、细小病毒(E22012601)、弓形虫(E21112502)、支原体(E22012701)、泰泽病原体(E21120604);大鼠酶联免疫抗体检测试剂盒批号:仙台病毒(E22022503)、汉坦病毒(E22022502)、细小病毒 H-1 株(E21102201)、细小病毒 KRV 株(E21102202)、肺炎病毒(E21121501)、冠状病毒/涎腺炎病毒(20210702)、呼肠孤病毒 III 型(20210702)、支原体(E21102901)、弓形虫(E21122801)、泰泽病原体(E21101401);中国食品药品检定研究院小鼠酶联免疫抗体检测试剂盒批号:鼠痘病毒(20210604)、肝炎病毒(20211125)、仙台病毒(20211123)、肺炎病毒(20211003)、呼肠孤病毒 III 型(20211009)、细小病毒(20211017)、弓形虫(20211109)、支原体(20211104)、泰泽病原体(20210917),大鼠酶联免疫抗体检测试剂盒批号:仙台病毒(20211111)、汉坦病毒(20211025)、细小病毒 H-1 株(20211023)、细小病毒 KRV 株(20211113)、肺炎病毒(20210914)、冠状病毒/涎腺炎病毒(20210917)、呼肠孤病毒 III 型(20210917)、支原体(20211118)、弓形虫(20211008)、泰泽病原体(20211204);细菌培养平板(批号:0032213)、鉴别培养基(批号:20210314)和细菌生化微量管(批号:20210917)由杭州微生物试剂有限公司提供,其余相应检测试剂均参照国家标准配备。多功能酶标仪(Synergy LX)购于美国 Bio-Tek 公司;生物显微镜(BX3)购于日本奥林巴斯公司;全自动细菌鉴定及药敏分析系统(VITEK 2 Compact)购于法国梅里埃公司。

1.3 实验方法

1.3.1 抽样

抽样按照 GB 14922.2-2011《实验动物 微生物等级及监测》进行,在每一房间不同笼架多点采样,根据每个品系动物的种群数量随机采样 3~5 只,按 SPF 级动物进行包装、运输,包装箱上注明动物品种、级别、数量及检测项目。

1.3.2 检测

检测项目及方法依据《实验动物 微生物学检测

方法》(GB/T 14926.1-2001~GB/T 14926.64-2001)和《实验动物 寄生虫学检测方法》(GB 18448.1-2001~GB 18448.10-2001)执行^[7-8],涵盖国家标准中规定的必检项目(细菌、病毒和寄生虫)。为避免交叉污染,所有检测样本的采集均在生物安全柜中实施。采集动物粪便、体表毛发开展寄生虫检测;分离血清,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中的病毒抗体;采取呼吸道分泌物和肠道内容物,分离培养细菌并进行生化鉴定,确定感染菌群类型^[9-11]。检测中发现的病毒和细菌阳性样品均进行二次复检。

1.4 统计学方法

按照相应国家标准对检测结果进行综合判定,符合该病原微生物检测结果者作出阳性报告(感染),不符合者作出阴性报告(未感染)。用 SPSS 23.0 统计软件对近 5 年抽检的大、小鼠微生物及寄生虫感染阳性率(或血清抗体阳性率)进行统计学分析,结果以每年检出的阳性动物数占抽检动物总数的百分比进行表示。用单因素方差分析法进行每年间感染情况的差异性分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性,最后用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果

2.1 2017~2021 年 SPF 级大、小鼠寄生虫检测结果

5 年间,累计抽检小鼠 2549 只,大鼠 503 只(表 2、图 1 和图 2)。检测范围包括皮毛上的蚤、虱和螨等体外寄生虫成虫及其虫卵;肠道内的鞭毛虫、纤毛虫、蠕虫及其虫卵;血清中的弓形虫抗体采用 ELISA 进行检测。

小鼠主要存在体外寄生虫(螨虫)和肠道鞭毛虫的感染(表 2、图 1),5 年中均有检出,但检出率呈逐年下降趋势。体外寄生虫(螨虫)的检出率由 2017 年的 5.26%(19/361)降为 2021 年的 0.15%(1/670),单位检出率由 20.00%(3/15)降为 3.12%(1/32);肠道鞭毛虫的检出率由 2017 年 10.53%(38/361)降低为 2021 年的 0.45%(3/670),单位检出率由 20.00%(3/15)降为 3.12%(1/32)。弓形虫抗体检出率也呈现逐年降低的趋势,由 2019 年的 0.84%(5/598)降至 2021 年的 0.15%(1/670),单位检出率由 10.00%(2/20)降为 3.12%(1/32)。但

表 2 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大、小鼠寄生虫检测结果
Table 2 Parasite detection results of SPF mice and rats in Shaanxi from 2017 to 2021

年份 Year	动物品系 Animal strains	抽检单位 Total number of organizations	动物数量 Animal numbers	寄生虫感染率(%) Parasitic infection rate				
				体外寄生虫 Ectoparasites	鞭毛虫 Flagellates	纤毛虫 Ciliates	蠕虫 Helminths	弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i>
2017	小鼠 Mouse	15	361	5.26	10.53	0.00	0.00	0.00
	大鼠 Rat	5	113	7.07	11.50	0.00	0.00	0.00
2018	小鼠 Mouse	17	506	1.78	3.56	0.00	0.40	0.00
	大鼠 Rat	9	79	0.00	5.06	0.00	3.79	0.00
2019	小鼠 Mouse	20	598	1.51	1.33	0.00	1.17	0.84
	大鼠 Rat	9	98	0.00	2.04	0.00	2.04	0.00
2020	小鼠 Mouse	25	414	0.24	1.45	0.00	3.14	0.24
	大鼠 Rat	9	93	0.00	1.08	0.00	7.53	0.00
2021	小鼠 Mouse	32	670	0.15	0.45	0.00	2.39	0.15
	大鼠 Rat	13	120	0.00	0.83	0.00	7.50	0.00
累计 Grand total	小鼠 Mouse	109	2549	1.53	2.81	0.00	1.19	0.27
	大鼠 Rat	45	503	1.59	4.17	0.00	4.17	0.00

是,肠道蠕虫的检出率却由 2018 年的 0.40% (2/506)增加至 2021 年的 2.39% (16/670),单位检出率由 5.88% (1/17)增加至 9.38% (3/32)。

大鼠也存在体外寄生虫(蠕虫)、肠道鞭毛虫和蠕虫的感染(表 2、图 2)。检测结果显示,体外寄生虫(蠕虫)检出率由 2017 年的 7.07% (8/113)降至 2018 年后无检测出,单位检出率由 2017 年的 40.00% (2/5)降为 0.00%;肠道鞭毛虫的检出率由 2017 年的 11.50% (13/113)降低为 2021 年的 0.83% (1/120),单位检出率由 60.00% (3/5)降低为 7.69% (1/13)。蠕虫检出率由 2017 年的 3.79% (3/79)增长为 2021 年的 7.50% (9/120),单位检出率由 20.00% (1/5)增加至 2021 年的 15.38% (2/13)。

2.2 2017~2021 年 SPF 级大、小鼠病原微生物检测结果

5 年中 109 家单位的小鼠病原微生物检测结果(表 3、图 3)显示,小鼠主要存在沙门菌、肺炎克雷伯杆菌、肺炎链球菌、泰泽病原体 and 支原体的感染,但检出率呈下降趋势。其余必检项目 5 年内均未检出。其中,沙门菌 2017 年检出率为 2.78% (10/361)、2018 年为 1.18% (6/506)、2019 年 0.33% (2/598)到 2020 年以后均为 0.00%,单位检出率由 2017 年的 20.00% (3/15)降低为 2021 年的 0.00%;肺炎克雷伯杆菌仅 2018 年在 1 家单位 (5.88% 1/17)中检出 0.20% (1/506),其余 3 年均未检出;肺炎链球菌在 2017 年 1 家单位 (6.67% 1/15)检出

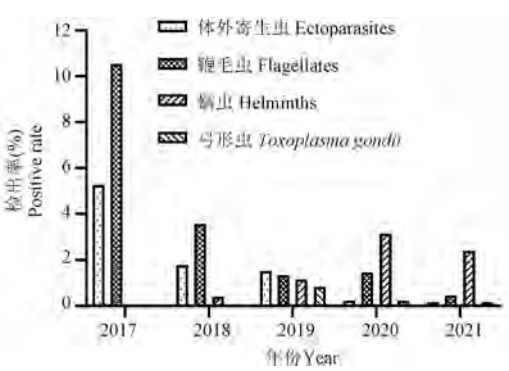


图 1 2017~2021 年陕西地区 SPF 级小鼠寄生虫检测结果

Figure 1 Parasite detection results of SPF mice in Shaanxi from 2017 to 2021

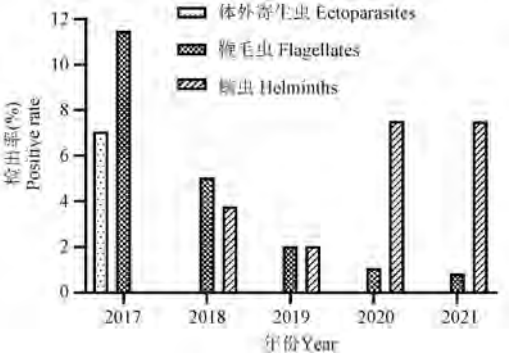


图 2 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大鼠寄生虫检测结果

Figure 2 Parasite detection results of SPF rats in Shaanxi from 2017 to 2021

0.27% (1/361)后,连续 4 年均未检出;泰泽病原体血清抗体阳性检出率由 2017 年 2 家单位 (13.33%

2/15)检出 1.38% (5/361)降低至 2021 年的 32 家单位均未检出;支原体血清抗体阳性仅在 2017 年 1 家单位 (6.67% 1/15) 中检出 (0.27% 1/361),此后连续 4 年均未检出。

45 家单位的大鼠细菌检测结果 (表 3、图 4) 显示,大鼠中主要存在金黄色葡萄球菌、沙门菌、绿脓杆菌、肺炎链球菌和泰泽病原体的感染,但检出率呈逐年下降趋势。其余必检项目 5 年内均未检出。其中,金黄色葡萄球菌 2017~2019 年连续 3 年均有 1 家单位检出,检出率分别为 1.77% (2/113)、1.27% (1/79) 和 1.02% (1/98),此后至 2021 年再未检出金黄色葡萄球菌;沙门菌仅在 2018 年 1 家单位 (11.11% 1/9) 中检出 (2.53% 2/79),其余 4 年均未检出;绿脓杆菌在 2017 年 (1.77% 2/113) 和 2018 年 (2.53% 2/79) 均有 1 家单位检出,2019 年至 2021 年连续 3 年均未检出;肺炎链球菌仅在 2018 年 1 家单位 (11.11% 1/9) 中检出 (1.27% 1/79),其余 4 年均未检出;泰泽病原体血清抗体阳性仅在 2017 年有 2 家单位 (40.00% 2/5) 检出 (4.42% 5/113),此后连续 4 年均未检出。

2.3 2017~2021 年 SPF 级大、小鼠病毒抗体检测结果

病毒检测主要采用 ELISA 方法检测血清中的病毒抗体,检测中发现的阳性血清样本再次采用不同厂家的 ELISA 检测试剂盒进行 2 次复检,两次结果均为阳性则判定为感染,检测结果如表 4 所示。

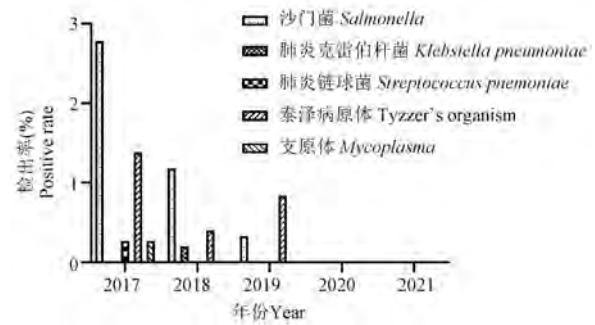


图 3 2017~2021 年陕西地区 SPF 级小鼠病原微生物检测结果

Figure 3 Pathogenic microorganism test results of SPF mice in Shaanxi from 2017 to 2021

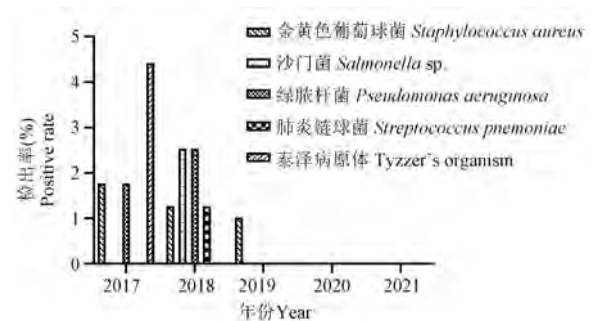


图 4 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大鼠病原微生物检测结果

Figure 4 Pathogenic microorganism test results of SPF rats in Shaanxi from 2017 to 2021

表 3 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大、小鼠病原微生物检测结果
Table 3 Pathogenic microorganism test results of SPF mice and rats in Shaanxi from 2017 to 2021

年份 Year	动物品系 Animal strains	动物数量 Animal numbers	金黄色葡萄球菌 (%) <i>Staphylococcus aureus</i>	沙门菌 (%) <i>Salmonella</i> sp.	绿脓杆菌 % <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	肺炎克雷伯杆菌 (%) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	肺炎链球菌 (%) <i>Streptococcus pneumoniae</i>	泰泽病原体 (%) Tyzzer's organism	支原体 (%) <i>Mycoplasma</i>
2017	小鼠 Mouse	361	0.00	2.78	0.00	0.00	0.27	1.38	0.27
	大鼠 Rat	113	1.77	0.00	1.77	0.00	0.00	4.42	0.00
2018	小鼠 Mouse	506	0.00	1.18	0.00	0.20	0.00	0.40	0.00
	大鼠 Rat	79	1.27	2.53	2.53	0.00	1.27	0.00	0.00
2019	小鼠 Mouse	598	0.00	0.33	0.00	0.00	0.00	0.84	0.00
	大鼠 Rat	98	1.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2020	小鼠 Mouse	414	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	大鼠 Rat	93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2021	小鼠 Mouse	670	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	大鼠 Rat	120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
累计	小鼠 Mouse	2549	0.00	0.71	0.00	0.04	0.04	0.31	0.04
Grand total	大鼠 Rat	503	0.80	0.40	0.80	0.00	0.20	1.00	0.00

表 4 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大、小鼠病毒血清抗体检测结果
Table 4 Virological test results of SPF mice and rats in Shaanxi from 2017 to 2021

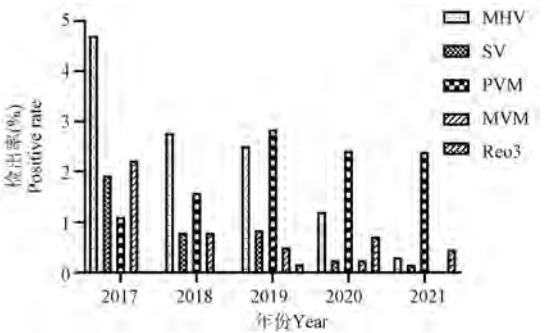
年份 Year	小鼠阳性率(%) Positive rate of mice						大鼠阳性率(%) Positive rate of rats						
	动物数量 Animal numbers	MHV	SV	PVM	MVM	Reo3	动物数量 Animal numbers	SV	H-1	KRV	PVM	RCV	Reo3
2017	361	4.71	1.39	1.11	2.22	0.00	113	7.07	9.73	0.88	0.88	5.31	0.00
2018	506	2.77	0.79	1.58	0.79	0.00	79	2.53	1.27	1.27	3.80	1.27	0.00
2019	598	2.51	0.84	2.84	0.50	0.17	98	2.04	0.00	0.00	9.18	0.00	0.00
2020	414	1.21	0.24	2.42	0.24	0.72	93	1.08	0.00	0.00	12.90	0.00	0.00
2021	670	0.30	0.15	2.39	0.00	0.45	120	0.83	0.00	0.00	10.00	0.00	0.00
累计 Grand total	2549	2.08	0.63	2.16	0.63	0.27	503	2.78	2.39	0.40	7.36	1.39	0.00

注:MHV:小鼠肝炎病毒;SV:仙台病毒;PVM:小鼠肺炎病毒;MVM:小鼠细小病毒;Reo3:小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型;H-1:大鼠细小病毒株 H-1 株;KRV:大鼠细小病毒株 KRV 株;RCV:大鼠冠状病毒/涎腺炎病毒。

Note. MHV, Mouse hepatitis virus. SV, Sendai virus. PVM, Pneumonia virus of mice. MVM, Minute virus of mice. Reo3, Reovirus type III. H-1, Rat parvovirus H-1 strain. KRV, Rat parvovirus KRV strain. RCV, Rat corona virus/sialodacryoadenitis virus.

小鼠病毒血清抗体检测结果(表 4、图 5)显示,小鼠肝炎病毒、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠细小病毒和小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型在 2017~2021 年均有检出。其余必检项目 5 年内均未检出。2017 年有 3 家单位(20.00% 3/15)检出小鼠肝炎病毒(阳性率 4.71% 17/361),1 家单位(6.67% 1/15)检出仙台病毒(阳性率 1.39% 5/361),2 家单位(13.33% 2/15)检出小鼠细小病毒(阳性率 2.22% 8/361)。2018~2021 年每年均有不同病毒检出,但阳性单位数和病毒阳性率均呈逐年下降趋势。至 2021 年,仅有 1 家单位(3.13% 1/32)检出小鼠肝炎病毒且阳性率降为 0.30%(2/670),仙台病毒阳性率降为 0.15%(1/670),32 家单位均未检出小鼠细小病毒。此外还发现,对于小鼠肺炎病毒和小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型,这 5 年来的血清抗体阳性检出率则呈现逐年上升的趋势:2017 年仅 1 家单位(6.67% 1/15)检出小鼠肺炎病毒(阳性率 1.11% 4/361),2019 年增长为 2 家单位(阳性率 2.84% 17/598),至 2021 年该 2 家单位(6.25% 2/32)小鼠肺炎病毒血清抗体阳性检出率为(2.39% 16/670);而 2019 年 1 家单位(5.00% 1/20)检出小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型(阳性率 0.17% 1/598),至 2021 年,该单位(3.13% 1/32)依旧有检出(阳性率 0.45% 3/670)且比率较过去 2 年有所增加。

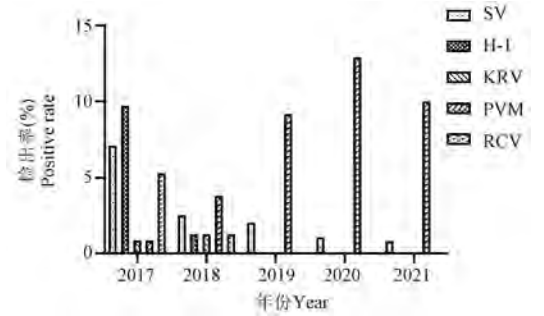
大鼠血清抗体阳性以仙台病毒、大鼠细小病毒、小鼠肺炎病毒和大鼠冠状病毒为主(表 4、图 6)。其余必检项目 5 年内均未检出。其中,仙台病毒每年均有检出,但阳性率从最初的 3 家单位(60.00% 3/5)的 7.07%(8/113)降低为 2021 年 1 家单位(7.69% 1/13)的 0.83%(1/120);大鼠细



注:MHV:小鼠肝炎病毒;SV:小鼠仙台病毒;PVM:小鼠肺炎病毒;MVM:小鼠细小病毒;Reo3:小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型。

图 5 2017~2021 年陕西地区 SPF 级小鼠病毒抗体检测结果
Note. MHV, Mouse hepatitis virus. SV, Sendai virus. PVM, Pneumonia virus of mice. MVM, Minute virus of mice. Reo3, Reovirus type III.

Figure 5 Virological test results of SPF mice in Shaanxi from 2017 to 2021



注:SV:仙台病毒;H-1:大鼠细小病毒株 H-1 株;KRV:大鼠细小病毒株 KRV 株;PVM:小鼠肺炎病毒;RCV:大鼠冠状病毒/涎腺炎病毒。

图 6 2017~2021 年陕西地区 SPF 级大鼠病毒抗体检测结果
Note. SV, Sendai virus. H-1, Rat parvovirus H-1 strain. KRV, Rat parvovirus KRV strain. PVM, Pneumonia virus of mice. RCV, Rat corona virus/sialodacryoadenitis virus.

Figure 6 Virological test results of SPF rats in Shaanxi from 2017 to 2021

小病毒和大鼠冠状病毒抗体阳性仅 2017 年和 2018 年在个别单位有检出,此后 2019~2021 年连续 3 年各单位均未检出;值得注意的是,小鼠肺炎病毒血清抗体阳性率却由最初 1 家单位(20.00% 1/5)的 0.88%(1/113)增长为 3 家单位(23.08% 3/13)的(10.00% 12/120)。

3 讨论

随着生命科学的发展与实验动物许可证制度的不断完善,实验动物质量监测显得尤为重要^[12]。定期的质量监测,不仅能够为实验动物的生产和使用提供科学依据,同时也能及时发现实验动物饲养中存在的问题,消除实验动物携带的人畜共患病原体,减少实验动物在生产使用过程中对人群的感染^[13]。对于实验动物使用单位而言,动物质量监测的缺失会导致日常管理出现盲区,动物一旦感染烈性传染病如鼠痘等,可导致整个动物群全军覆没,造成巨大损失^[14]。

通过对 2017~2021 年陕西省实验动物使用单位饲养的 SPF 级大、小鼠质量抽检结果的分析,发现 5 年间,陕西地区抽检单位和动物的数量均有所增长,从侧面反映出本地区实验动物使用数量的稳步提升。但值得注意的是,各单位使用的动物质量还存在着一定的问题,总体趋势是病原微生物感染降幅明显,但个别微生物感染控制水平有待提升。具体表现在寄生虫方面,大、小鼠中主要存在体外寄生虫(螨虫)、肠道鞭毛虫和蠕虫的感染(表 2);细菌方面存在金黄色葡萄球菌、沙门菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌、肺炎链球菌、泰泽病原体 and 支原体的感染(表 3);病毒方面则以小鼠肝炎病毒、仙台病毒、小鼠肺炎病毒、小鼠细小病毒、小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型、大鼠细小病毒和大鼠冠状病毒血清抗体阳性为主(表 4)。在我国广东、四川等地区也有金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌检测阳性的报道^[15-16]。2014~2019 年北京地区实验动物质量抽检结果中,鼠群检出的病原微生物以细小病毒、泰泽病原体、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等为主^[17-18]。可见,本地区与国内其它地区实验鼠群病原体污染的流行趋势基本一致。我国现行标准《实验动物 微生物学等级及监测》中明确规定金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌是 SPF 级实验大、小鼠必须检测和排除的病原菌^[6],但上述病原菌均属于条件性致病菌,可正常存在于动物体内和环境中,只有当

动物免疫功能低下时方可感染动物。国外多数企业将其作为环境监测的参考指标,当认为该病原体可能会对正在进行的实验存在干扰时才进行监测^[19-21]。对病原微生物来源进行调查发现,实验动物感染病原微生物主要集中在 3 个方面:一是来自病原微生物控制不明确的实验动物,占病原微生物来源的 83.33%(20/24)。感染动物主要来自于各单位构建的基因编辑动物,其微生物质量状况不明确,造成动物间交叉感染。二是来自实验物品、生物试剂和实验人员的污染,占病原微生物来源的 12.50%(3/24)。动物实验区域人员流动频繁,个别实验人员生物安全意识不强,物品消毒灭菌不彻底,洁净与非洁净区域实验仪器、试剂及物品交叉混用,感染性实验废弃物的不规范处置均可造成动物感染。三是屏障设施管理存在漏洞,占病原微生物来源的 4.17%(1/24)。饲料、垫料和饮水灭菌消毒不彻底,或是存在污染死角,设施设计及布局的缺陷等均可导致病原微生物的入侵。

针对以上实验动物使用单位的大、小鼠感染现状,在陕西省实验动物管理委员会和专家的监督与指导下,对检测不合格动物所在区域实行了严格消杀处理:不符合 SPF 级标准要求的实验动物(C57BL/6J、BALB/c 小鼠和 SD 大鼠等),须立即停止实验、处死感染动物并封锁该区域。区域内所有动物分区域、分批次进行病原筛查,及时淘汰病原(血清抗体)阳性动物(或整个种群),对房间环境及 IVC 系统进行彻底消毒,检测合格后重新引进质量合格的动物开展实验。同时对同房间内其他小鼠进行严密监控,每隔两周进行复查,确保没有交叉感染。珍稀的基因编辑小鼠则可经过相应的生物净化后(剖腹产、胚胎移植或体外受精),采用两次检测法确定是否达到 SPF 级要求,即在目标小鼠离乳后检测代孕母鼠,分窝留种后检测淘汰的仔鼠,只有两次检测均符合 SPF 标准方可判定净化合格。合格的基因编辑鼠群转移至微生物最高级别控制区域进行饲养,加强区域管控和环境消毒,严防病原微生物侵入,动物一旦出现污染,立即转入低级别饲养区,待重新进行生物净化后返回。此外,还需加强饲养和实验人员生物安全、消毒灭菌等专业知识的培训,降低动物感染的风险^[22]。

上述整改措施的实施,极大改善了本地区各使用单位实验动物病原微生物的感染状况,阳性动物检出率总体呈逐年下降趋势。其中,肺炎克雷伯杆

菌、肺炎链球菌和绿脓杆菌等细菌感染动物已经连续 4 年未检出。然而,肠道蠕虫、小鼠肺炎病毒、小鼠呼肠孤病毒Ⅲ型连续 5 年均有检出且呈现缓慢增长的趋势,这是因为检出的动物都属于正在实验的动物或珍稀的基因编辑动物,无法淘汰处理,仅靠隔离与消毒,病原防治比较困难。带毒(虫)动物也容易造成周围动物的交叉感染,只有通过微生物净化才能彻底清除病原感染^[23]。

通过对陕西省 2017~2021 年实验动物使用单位屏障环境饲养的 SPF 级大小鼠病原微生物监测结果的分析,了解到本地区实验动物质量得到较大改善,但也暴露出很多问题。作为实验动物质量检测机构,要坚持不懈的进行日常病原微生物监测,加强生物安全宣传,促使相关单位明确实验动物质量对本行业及生物医药卫生事业的发展至关重要。同时,督促各使用单位持续采取严格的生物安全防护措施,不断提高实验动物饲养管理水平。只有检测机构与各单位相互配合,才能不断降低实验动物病原感染风险,提高实验动物质量,为生命科学的发展提供强有力的支撑。

参考文献:

- [1] 秦川. 实验动物学 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社; 2016.
- [2] 高虹. 实验动物疾病 [M]. 北京: 科学出版社; 2018.
- [3] 彭丽娜, 王朝霞. 高校实验动物屏障设施微生物监控管理 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 154-159.
- [4] 王迪, 宋志琦, 赵德明, 等. 啮齿类实验动物的健康监测 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(3): 71-75.
- [5] GB/T 14922. 1-2001《实验动物 寄生虫学等级及监测》[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2002.
- [6] GB/T 14922. 2-2011《实验动物 微生物学等级及监测》[S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2011.
- [7] GB/T 14926-2001《实验动物 微生物学检测方法》[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2002.
- [8] GB/T GB 18448-2001《实验动物 寄生虫学检测方法》[S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2002.
- [9] 秦川. 中国实验动物学会团体标准汇编及实施指南(第一卷) [M]. 北京: 科学出版社; 2018.
- [10] 王莎莎, 付瑞, 王吉, 等. 鼠痘病毒 FQ-PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 101-105.
- [11] 钟女奇, 赵勇, 宋莹, 等. 基于 3R 的实验动物病原微生物质量检测方案的考量 [J]. 药物生物技术, 2020, 27(3): 244-246.
- [12] 史光华. 实验动物机构认可制度助力实验动物质量保障体系的建设与完善 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(1): 38-40.
- [13] 王锡乐, 巩薇, 贺争鸣, 等. 中国大陆地区实验动物生产现状分析 [J]. 实验动物科学, 2017, 34(4): 67-74.
- [14] 陶俊豪, 鄢慧琼, 谢珏, 等. 实验动物质量控制中泰泽病原体的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(4): 358-363.
- [15] 潘金春, 赵维波, 陈梅玲, 等. 2013-2015 年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 64-69.
- [16] 刘丽达, 刘科亮, 何其励, 等. 2011-2015 年四川省实验动物质量抽检结果分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 102-105.
- [17] 魏杰, 黄健, 刘文菊, 等. 2017-2019 年北京地区实验动物质量抽检结果分析 [J]. 实验动物科学, 2021, 38(5): 19-27.
- [18] 魏杰, 刘文菊, 李根平, 等. 2014-2016 年北京地区实验动物质量抽检结果分析 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(5): 60-66.
- [19] 李杰, 赵梦洋, 赖梦雨, 等. 2020 年北京市啮齿类实验动物组织病理学监测总结和分析 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(2): 80-86.
- [20] 戴方伟, 杜江涛, 周莎桑, 等. 普通环境长爪沙鼠种群中病原体携带情况普查 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 15-18.
- [21] 冯洁, 谢建云, 魏晓峰, 等. 实验大鼠和小鼠多种细菌 PCR 检测与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 89-93.
- [22] 王朝霞, 蒋兴浩. 高校实验动物的传染源防控措施研究与实践 [J]. 实验技术与管理, 2020, 37(3): 9-12.
- [23] 洪胜辉, 卫振, 刘平, 等. 高校外来基因工程小鼠质量控制技术分析探讨 [J]. 实验技术与管理, 2022, 39(7): 224-227.

[收稿日期] 2022-04-19

高祥举,高冬梅,陈宪梅,等. 超声影像在评价大鼠结节性甲状腺肿的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 78-84, 118.

Gao XJ, Gao DM, Chen XM, et al. Ultrasound imaging for evaluation of nodular goiter in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 78-84, 118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.010

超声影像在评价大鼠结节性甲状腺肿的应用

高祥举^{1,2,3},高冬梅^{1,2},陈宪梅^{1,2,3},宋婷婷^{2,3,4},高 占^{1,2,3},高 杰^{1,2*},王杰琼^{2,3,4*}

(1.山东中医药大学中医学院,济南 250355;2.山东中医药大学情志病证研究创新团队,济南 250355;
3.山东中医药大学情志病证肝藏象药理青年科研创新团队,济南 250355;4.山东中医药大学药学院,济南 250355)

【摘要】 目的 利用超声技术,确定大鼠甲状腺定位,同时分析评价大鼠结节性甲状腺肿模型的病变、造模程度,为结节性甲状腺肿及相关甲状腺疾病大鼠模型的诊断评估提供技术方法。**方法** 40 只 6~8 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,其中 20 只作为对照组,其余大鼠灌服丙基硫氧嘧啶 (PTU) 溶液 8 周,构建结节性甲状腺肿大鼠模型,造模结束后对大鼠进行甲状腺超声检测,同时进行病理检测,与超声结果进行对比。**结果** 超声检测显示,模型组大鼠甲状腺前后、内外侧径均显著大于对照组 ($P<0.001$),同时可见模型组大鼠腺体不对称性增大,甲状腺侧叶有结节无包膜,边界较为模糊,不规整,散在有点状或条状纤维增生的强回声。模型组大鼠甲状腺切片 HE 染色显示,甲状腺组织形状、滤泡大小均不规则,差异较大,且上皮细胞增生明显,排列紊乱,胶质压缩且分布不均。模型组大鼠的超声和病理学检测均符合疾病诊断。**结论** 超声检测技术可以较好地进行活体评价大鼠结节性甲状腺肿动物模型,是值得推广的结节性甲状腺肿大鼠模型的评价方法。

【关键词】 甲状腺疾病;动物模型;模型评价;超声探查

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0078-07

Ultrasound imaging for evaluation of nodular goiter in rats

GAO Xiangju^{1,2,3}, GAO Dongmei^{1,2}, CHEN Xianmei^{1,2,3}, SONG Tingting^{2,3,4}, GAO Zhan^{1,2,3},
GAO Jie^{1,2*}, WANG Jieqiong^{2,3,4*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China.
2. Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 3. Emotional Disease Syndrome Innovative Chinese Medicine Research Young Scientific Research and Innovation Team in Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355. 4. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355)

【Abstract】 Objective To determine localization of the rat thyroid gland by ultrasound technology, analyze and evaluate lesions and the degree of modeling in the rat nodular goiter model, and provide a technical method for diagnostic evaluation of the rat model of nodular goiter and related thyroid diseases. **Methods** Forty 6~8 weeks old SPF-grade Wistar rats (male and female) were used as the control group and 20 rats were instilled with a propylthiouracil (PTU) solution for 8 weeks to establish a rat model of nodular goiter. Ultrasound examination of the thyroid gland was performed after modeling, along with pathological examination for comparison with ultrasound. **Results** Ultrasonography showed that

[基金项目] 济南市“高校 20 条”资助项目 (2020GXR002)。

[作者简介] 高祥举 (1997—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝藏象病机与调肝方药作用机制。E-mail: gaoxiangju2020@163.com

[通信作者] 高杰 (1974—) 女, 教授, 博士, 研究方向: 肝藏象病机与调肝方药作用机制。E-mail: jiegaosdutcm@163.com

王杰琼 (1982—) 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药药理学及情志病调肝方药药理研究。E-mail: jieqiong2016@126.com

* 共同通信作者

the anterior-posterior and medial-lateral diameters of the thyroid gland in the model group were significantly larger than those in the control group ($P < 0.001$). Conversely, asymmetric enlargement of the gland was observed in the model group. The shape and size of thyroid tissue and the follicle size were irregular in HE-stained thyroid glands of the model group. In the group, epithelial cells were obviously hyperplastic, disorganized and unevenly distributed with compressed colloid. Ultrasound and pathological tests were consistent with the disease diagnosis. **Conclusions** Ultrasound is a good method for *in vivo* evaluation of a rat nodular goiter model.

【Keywords】 thyroid disease; animal models; model evaluation; ultrasound probing

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

甲状腺肿是一种常见的内分泌疾病,存在单纯性甲状腺肿,也可伴有结节性甲状腺肿、桥本甲状腺炎、Graves 病等甲状腺疾病^[1-2]。2015 年~2017 年对国内 31 个省、直辖市、自治区的流行病学调查结果显示,成年人甲状腺肿大的患病率为 1.17%^[3],且与少年代谢综合征、糖尿病、肝炎等有关,其本身病变率达 5%^[4]。结节性甲状腺肿(nodular goiter)是甲状腺肿中的一类,多由甲状腺激素分泌不足,刺激甲状腺体积增大,随时间发展,甲状腺在增大过程中形成一个或多个结节^[5]。

虽然近些年来,对甲状腺相关疾病基础研究日益增多,但其发病机制及病理过程尚不完全清楚,因此建立可重复、简单易行且稳定的动物模型显得尤为重要,国内多以制作大鼠模型为主。目前临床上公认的结节性甲状腺肿的诊断金标准是超声影像及细针穿刺病理结果^[6-7],但缺乏动物模型超声检测操作步骤、方法及相关参数。目前也未见应用超声检测大鼠结节性甲状腺肿细节报道,这对于基础研究人员使用超声检测大鼠甲状腺来说有不小的困难。本实验通过建立大鼠结节性甲状腺肿模型,确定其超声下甲状腺位置,再利用超声技术来进行模型评价,造模后取甲状腺组织进行病理学模型鉴定,旨在建立一种简单易行、稳定可靠的大鼠甲状腺结节模型评价方法。同时为今后大鼠甲状腺超声检测的操作提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,体重 150~180 g,6~8 周,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],饲养于山东中医药大学实验动物中心大楼[SYXK(鲁)2017-0022]。饲养大鼠运抵实验室后先行适应性饲养 1 周,自由饮水进食。保持 12 h/12 h 明暗周期,实验室温度控制(23 ± 1)℃,湿度控制 50%~60%,噪声 ≤ 60 dB,

实验动物使用经山东中医药大学实验动物福利伦理审查委员会批准(SDUTCM2022030001),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

生理盐水(辰欣药业股份有限公司);丙基硫氧嘧啶(PTU,上海朝晖药业有限公司,国药准字 H31021082);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);薇婷丝滑沁香脱毛膏(利洁时家化中国有限公司);耦合剂(天津津亚科技发展有限公司);40%多聚甲醛;HE 染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)。粘附载玻片(中国世泰);游标卡尺(上海美耐特实业有限公司);Ultra 超优刀片(赛默飞);P60-VET 动物超声(大为宠物医疗(江苏)有限公司);高频曲棍球探头 10.0 MHz(大为宠物医疗(江苏)有限公司);R580 呼吸麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

取 Wistar 大鼠雌雄各 20 只,随机分 2 组,每组 20 只,即对照组(control)、模型组(model),雌雄分笼饲养。

1.3.2 PTU 法制备结节性甲状腺肿大鼠模型

采用 Tamura 的方法造模^[8],模型组用生理盐水配成 0.1%的 PTU 溶液,每只大鼠每天按 100 mg/kg 连续灌服 8 周。对照组给与同体积的生理盐水连续灌服 8 周。

1.3.3 超声检测分组大鼠结节性甲状腺肿方法

(1)大鼠甲状腺超声定位及检测

选用大为 P60 型彩色多普勒超声仪,高频曲棍球探头。将老鼠颈部脱毛,充分暴露检查部位,采用异氟烷进行呼吸麻醉,探头从下颌骨开始,沿颈部长轴向下进行连续横切扫查,同时大鼠身体一侧放置病理标尺记录位置,上线与大鼠下颌骨下缘对齐,探头探查至舌骨时记录距离,并继续向下探查,

待图像中甲状腺整体消失再记录位置。同时记录甲状腺的状况,包括甲状腺两叶和颈部相邻结构的横向和纵向图像。对左右侧叶分别测量内外侧、前后和头尾直径(图 1A、图 1B),并根据超声影像结果进行诊断分析。

(2) HE 染色法检测大鼠甲状腺病理形态学改变

大鼠仰卧解剖位,麻醉后从颈部正中中线剪开大鼠颈部的皮肤,由胸骨剪至下颌,暴露甲状软骨和气管,用眼科剪小心剪开软骨腹面的肌肉和筋膜组织,将甲状软骨完全暴露(图 2A),从软骨下插入眼科弯镊,将软骨和气管撑开完全暴露甲状腺(图 2B),放置一病理尺与老鼠身体平行,使用另一病理尺进行测量在体甲状腺的上下缘距下颌骨的距离(图 2C、图 2D),并记录数值。用手术剪从喉剪开,为减少误差,向下计数至第六气管软骨剪掉(图 2E、图 2F),取下后使用游标卡尺测量甲状腺侧叶的内外侧、前后和头尾直径。之后浸入 40%多聚甲醛固定 48 h,包埋,从甲状腺向气管方向连续切片,每张切片厚度 3 μm ,进行常规 HE 染色。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad prism 9.0.0 进行分析处理,大鼠甲状腺超声测量与体外游标卡尺测量采用配对 t 检验,对照组与模型组的甲状腺侧叶前后、内外、头尾径长比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有显著意义。

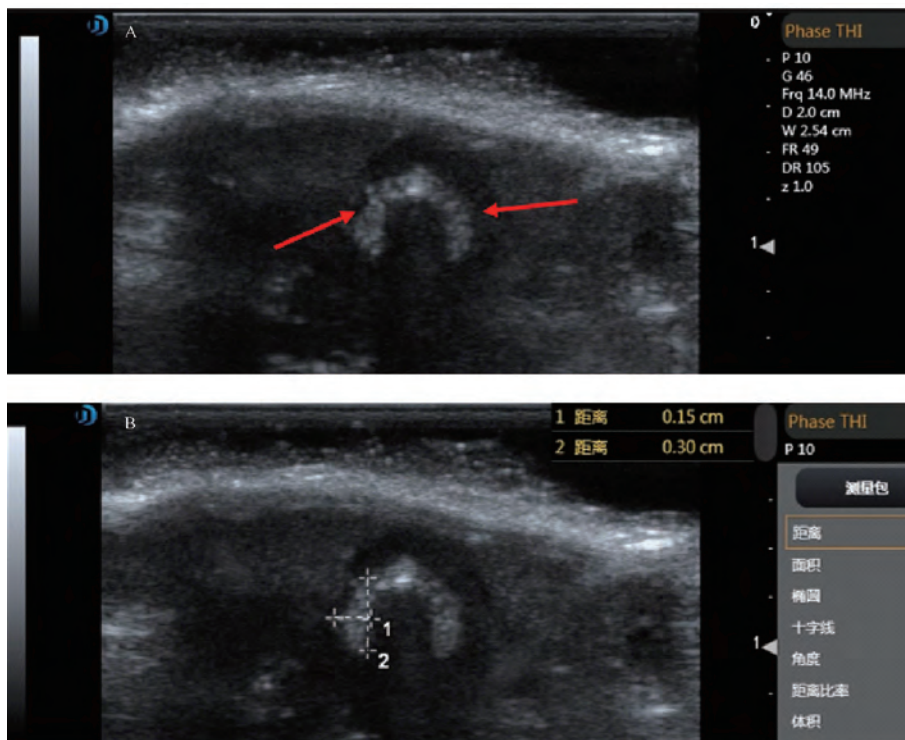
2 结果

2.1 大鼠甲状腺的超声定位

通过记录超声颈部横切扫描甲状腺位置参数,结果显示:对照组中,甲状腺位于大鼠下颌骨下 $(2.4 \pm 0.4) \sim (3.3 \pm 0.5) \text{ cm}$ 的位置(图 3A),模型组中,甲状腺位于大鼠下颌骨下 $(2.1 \pm 0.3) \sim (3.3 \pm 0.3) \text{ cm}$ 的位置(图 3B)。由此可见,在使用超声对大鼠甲状腺进行扫描时,位于距离大鼠下颌骨 $(2.3 \pm 0.5) \sim (3.3 \pm 0.5) \text{ cm}$ 处可探查甲状腺(图 3C、图 3D)。

2.2 大鼠甲状腺的超声测量结果及体外验证

取大鼠处死前最后一次超声扫描数据与处死后体外甲状腺游标卡尺测量结果进行分析,分

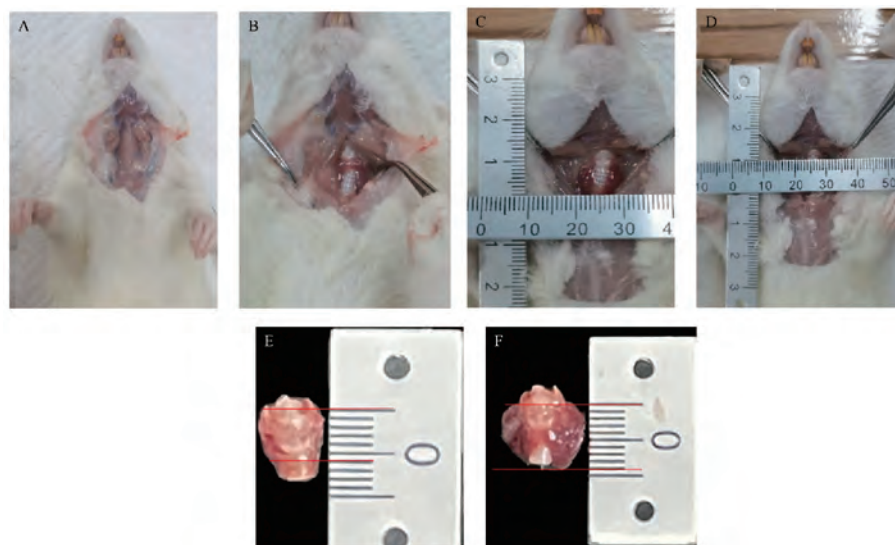


注:A:大鼠颈部超声下甲状腺均匀的腺体组织,红色箭头为甲状腺位置;B:超声下甲状腺的单侧叶的测量。

图 1 超声下大鼠甲状腺图像及侧叶测量

Note. A, Homogeneous glandular tissue of the thyroid gland under ultrasound in the rat neck, red arrows show the location of the thyroid gland. B, Measurement of the unilateral lobe of the thyroid gland under ultrasound.

Figure 1 Ultrasound images of the rat thyroid gland and lateral lobe measurements

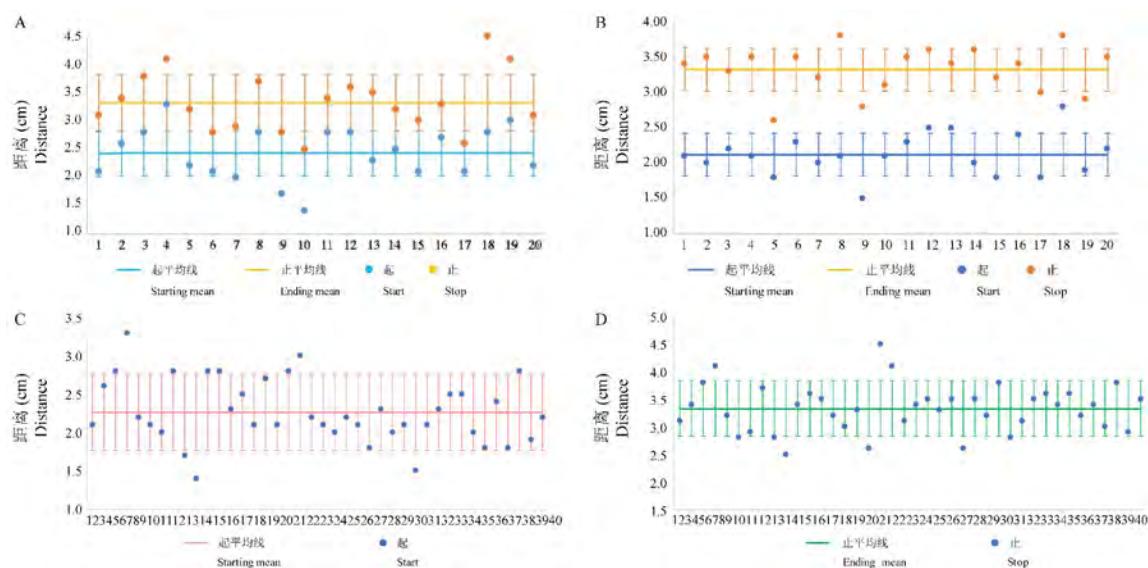


注:A:大鼠解剖暴露甲状软骨;B:完全暴露甲状腺;C:测量大鼠甲状腺上缘到下颌骨距离;D:测量大鼠甲状腺下缘到下颌骨距离;E:离体对照组甲状腺;F:离体模型组甲状腺。

图2 大鼠甲状腺在体测量及离体图像

Note. A, Rats dissected to expose the thyroid cartilage. B, Fully exposed thyroid gland. C, Measurement of the distance from the upper edge of the thyroid gland to the mandible in rats. D, Measurement of the distance from the lower edge of the thyroid gland to the mandible in rats. E, Isolated control group thyroid gland. F, Isolated model group thyroid gland.

Figure 2 *In vivo* measurements and *ex vivo* images of the rat thyroid gland



注:A:蓝色线表示起始平均数 2.4,上下误差 0.4,黄色线代表终止平均数 3.3,上下误差 0.5;B:蓝色线表示起始平均数 2.1,上下误差 0.3,黄色线代表终止平均数 3.3,上下误差 0.3;C:全部大鼠甲状腺起始位置,红色线代表平均数 2.2,上下误差 0.5;D:全部大鼠甲状腺终止位置绿色线代表平均数 3.3,上下误差 0.5;记录数据时采用的单位为 cm。

图3 多普勒超声检测大鼠甲状腺的起、止位置

Note. A, Blue line indicates the starting mean 2.4 with an up and down error of 0.4, and the yellow line represents the ending mean 3.3 with an up and down error of 0.5. B, Blue line indicates the starting mean 2.1 with an up and down error of 0.3, and the yellow line represents the ending mean 3.3 with an up and down error of 0.3. C, Starting position of the thyroid gland in all rats, the red line represents the mean 2.2, with an upper and lower error of 0.5. D, Ending position of thyroid gland in all rats, the green line represents the mean 3.3, with an upper and lower error of 0.5. Data are recorded in cm.

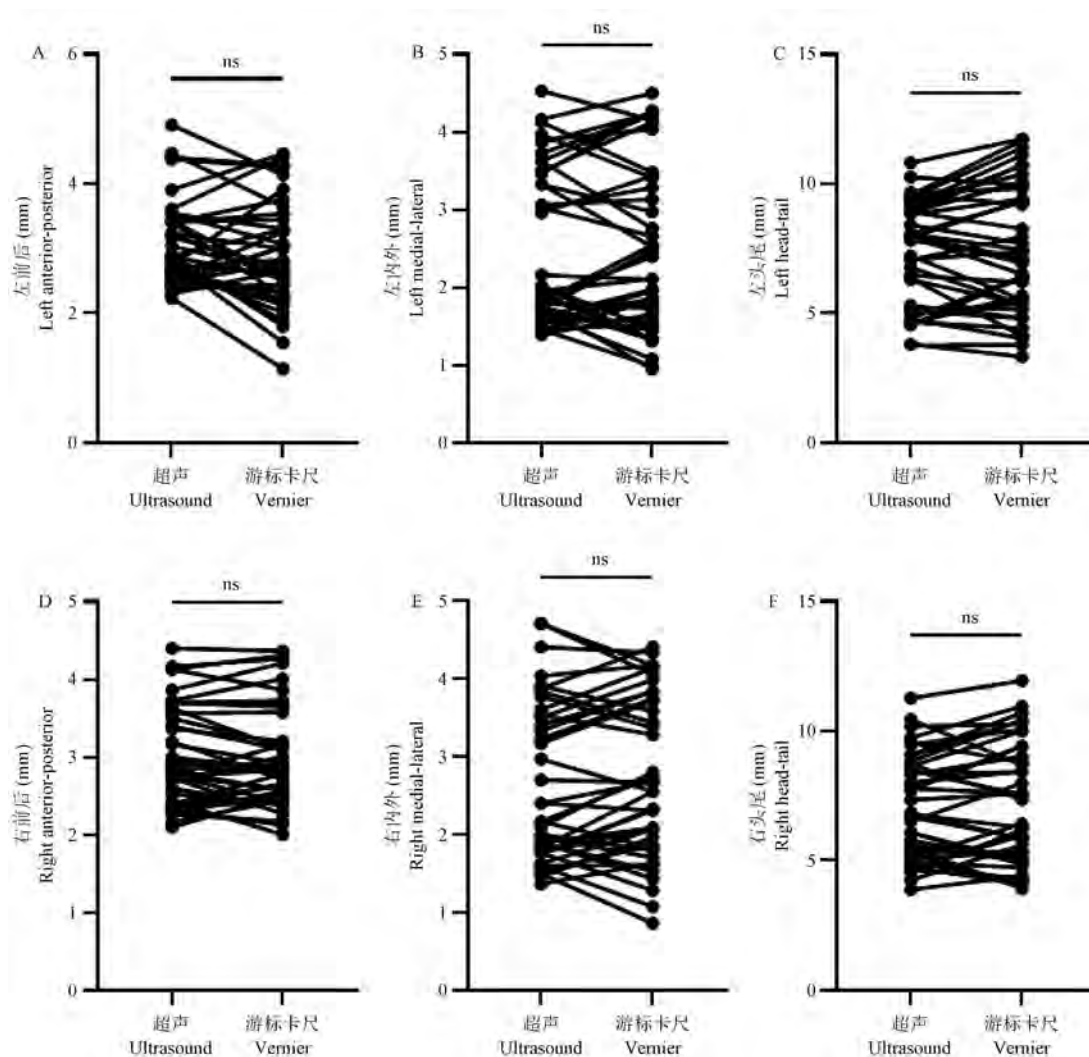
Figure 3 Ultrasound detection of the starting and ending position of the thyroid gland in rats

别对甲状腺的左叶、右叶的内外侧、前后和头尾直径进行配对 t 检验,活体超声扫描测量与甲状腺体外测量结果没有显著性差异 ($P>0.05$)。结果如图 4。

2.3 甲状腺超声检查结果分析

甲状腺由左、右两叶和峡部组成。超声颈前正中横切面甲状腺呈马蹄型或者蝶形,颈侧区纵切面呈上窄下宽的三角形,甲状腺被膜显示为光滑整齐的高回声带。对照组大鼠甲状腺实质回声呈均匀

偏高回声,内部可见血管呈管状无回声(图 5A)。超声检测模型组大鼠甲状腺,出现两侧腺体不对称性增大,其内存在异常组织,而且甲状腺侧叶有结节无包膜,边界较为模糊,不规整,散在有点状或条状纤维增生的强回声(图 5B)。运用 t 检验对对照组与模型甲状腺的前后、内外、头尾直径进行对比,得到模型组的前后、内外直径与对照组存在显著性差异 ($P<0.0001$),头尾直径没有显著性差异 ($P>0.05$)。结果如图 5C~5H。

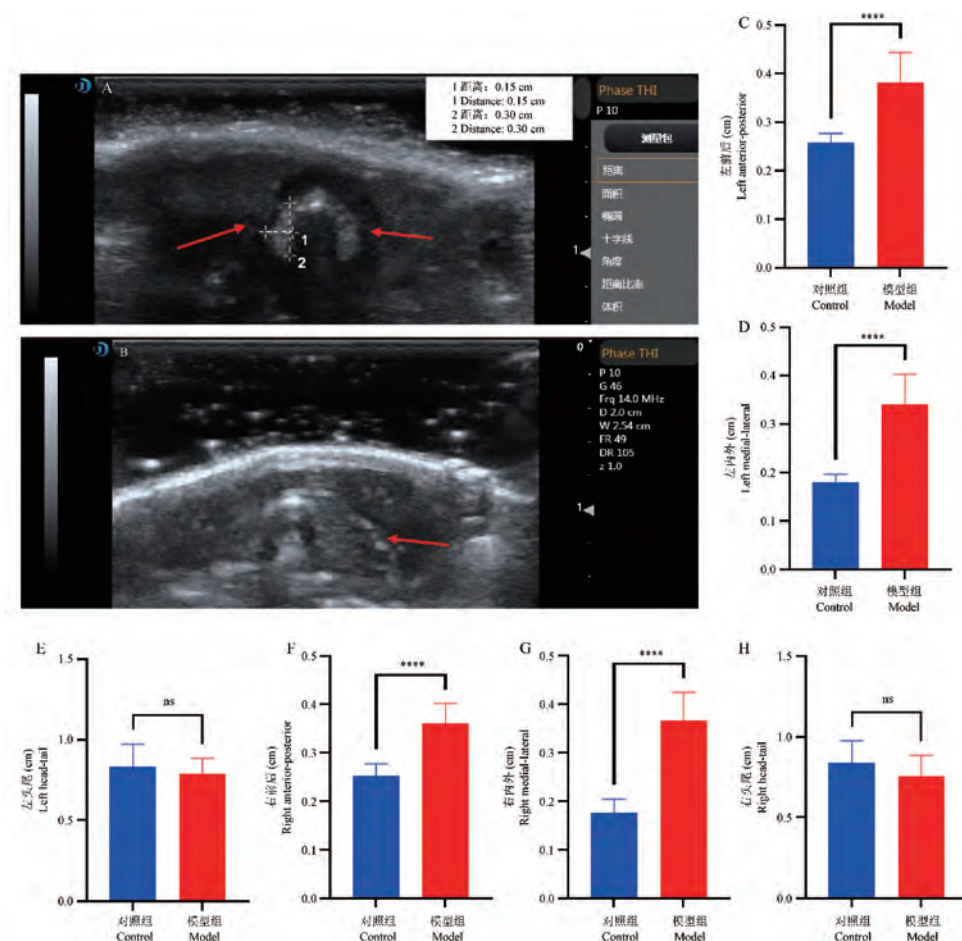


注:A~C:分别为超声下与体外游标卡尺测量大鼠甲状腺左侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析;D~F:分别为超声下与体外游标卡尺测量大鼠甲状腺右侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析;Ultrasound 为超声扫描时得到的甲状腺数值,Vernier 为体外游标卡尺测量数值,测量单位为 mm。

图 4 两侧甲状腺超声扫描与游标卡尺测量各数值配对 t 检验结果

Note. A~C, Comparison analysis of the anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail diameters of the left lobe of the rat thyroid gland measured under ultrasound and with *in vitro* vernier calipers, respectively. D~F, Comparison analysis of the anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail diameters of the right lobe of the rat thyroid gland measured under ultrasound and with *in vitro* vernier calipers, respectively. Ultrasound is the value of the thyroid gland obtained during ultrasound scanning, Vernier is the *in vitro* vernier calipers measurement, and the unit of measurement in mm.

Figure 4 Paired t -test results for each value of ultrasound scan and vernier caliper measurement of the thyroid gland on both sides

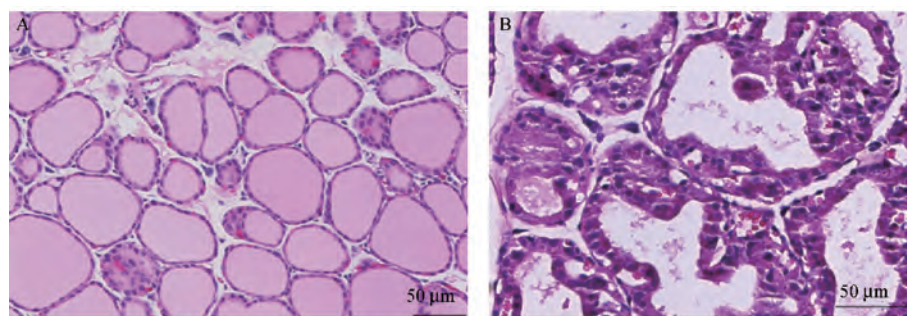


注:A:对照组大鼠甲状腺超声影像;B:模型组大鼠甲状腺超声影像;C~E:分别为对照组与模型组甲状腺左侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析, **** $P<0.0001$;F~H:分别为对照组与模型组甲状腺右侧叶前后、内外、头尾直径的对比分析, **** $P<0.0001$ 。在对照组和模型组超声图片中红色箭头表明了甲状腺的位置,分析统计时数据单位为 cm。

图 5 多普勒超声影像检测各组大鼠甲状腺形态学特点分析

Note. A, Ultrasound images of the thyroid gland of rats in the control group. B, Ultrasound images of the thyroid gland of rats in the model group. C~E, Comparative analysis of the diameters of the left lobe of the thyroid gland from anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail in control and model groups, respectively, **** $P<0.0001$. F~H, Comparative analysis of the diameters of the right lobe of the thyroid gland from anterior-posterior, medial-lateral, and head-tail in control and model groups, respectively, **** $P<0.0001$. Red arrows in the ultrasound images of control group and model group indicate the location of the thyroid gland, The unit of data for analysis and statistics is cm.

Figure 5 Analysis of thyroid examination results analysis of morphological characteristics of thyroid gland in various groups of rats by ultrasonic imaging



注:A:对照组大鼠甲状腺 HE 染色;B:模型组大鼠甲状腺 HE 染色。

图 6 HE 染色检测各组大鼠甲状腺病理学特点分析

Note. A, Thyroid HE staining of rats in control group. B, Thyroid HE staining of rats in model group.

Figure 6 HE staining was used to detect the pathological characteristics of thyroid in various groups

2.4 甲状腺病理学检测结果分析

对甲状腺切片进行 HE 染色后,在×400 显微镜下观察到对照组大鼠甲状腺组织滤泡大小均匀,滤泡腔内胶质均匀,上皮细胞排列规整,可见少量毛细血管(图 6A);与对照组相比,模型组大鼠甲状腺滤泡大小不规则,且上皮细胞增生明显,排列紊乱,胶质压缩分布不均(图 6B)。模型组大鼠甲状腺组织改变符合结节性甲状腺肿病理检查诊断^[9],与超声诊断一致。

3 讨论

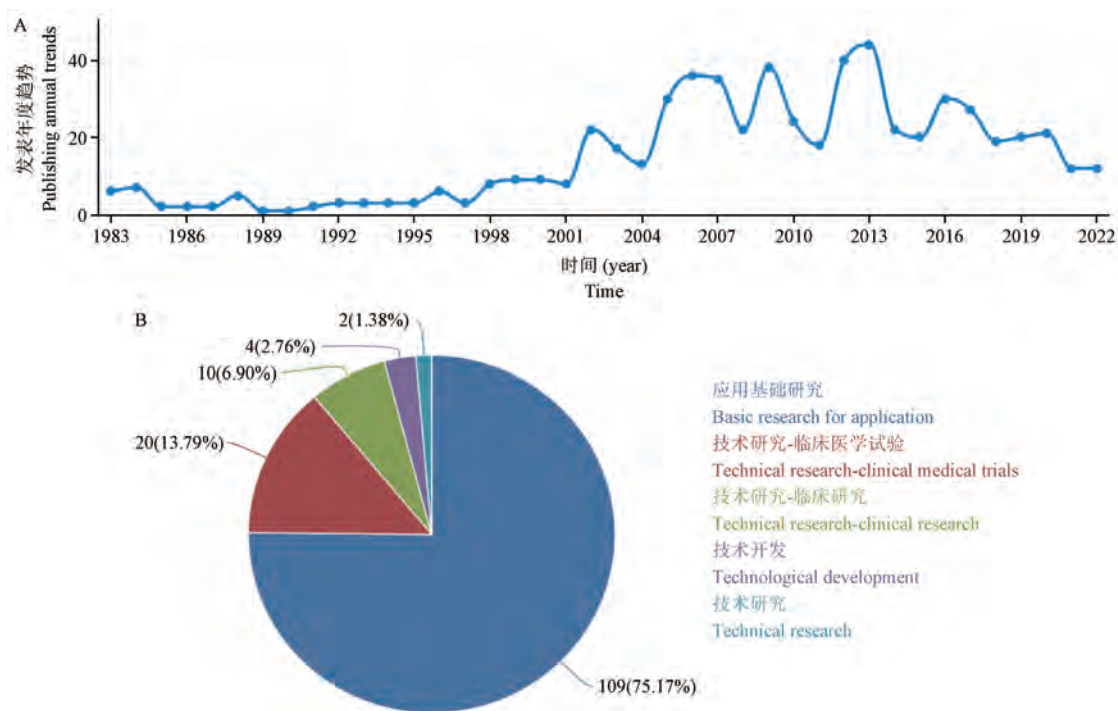
近些年来,甲状腺基础研究较早些年投入巨大,且不断开发出新的甲状腺动物模型^[10],发表的相关文章数量不断增加(图 7A、图 7B)。目前国内结节性甲状腺肿动物模型多以大鼠为主,制作方法多样,其原理都是通过不同方式诱使大鼠摄入碘降低,导致甲状腺肿,Sun 等^[11]通过药物诱导雌性 SD 大鼠含 PTU 的饮用水 6 周;Alayoubi 等^[12]通过喂食低碘鼠粮;Li 等^[13]喂养雄性 Wistar 大鼠甲减组含 MMI 的饮用水 12 周等来制作甲状腺肿动物模型。

结节性甲状腺肿动物模型目前缺乏经济、高效

的评价方法。实验室评价大鼠模型使用超声诊断的极少,多以处死大鼠后,取甲状腺进行 HE 染色,因其不可逆转性使这种方法存在明显不足。而超声诊断结节性甲状腺肿的灵敏度、特异性和安全性较高,该方法具有方便、经济、快速、无创等优势,且是临床人群诊断的金标准。

本实验探讨超声影像技术在大鼠结节性甲状腺肿评价方面的应用。通过 PTU 连续灌胃 8 周,建立动物模型,再结合超声和体外检测对甲状腺的大小、病理情况进行对照,结果一致。证明了超声准确诊断大鼠结节性甲状腺肿。同时通过此实验明确了超声下大鼠甲状腺定位参数,为后续研究者的工作提供科学依据和技术参考。

本实验利用超声技术来评价结节性甲状腺肿大鼠动物模型的建立,并利用病理学方法验证了其检测结果的准确性和可靠性,从而证实了超声技术能够较好的反映出结节性甲状腺肿的形态,避免了在造模过程中对活体动物采样所造成的损伤以及处死动物进行病理学检测等缺点,影响模型的进一步研究。该技术的应用为今后甲状腺疾病动物模型的评价建立提供了一种更方便的鉴定方法,同时



注:A:甲状腺动物模型文献发表年度趋势;B:基础研究在甲状腺动物模型中文献的占比。

图7 发表文章年度趋势及类型

Note. A, Annual trend of publications related to thyroid animal models. B, Proportion of basic research areas in the literature on thyroid animal models.

Figure 7 Annual trends and types of published articles

(下转第 118 页)

王顺意,陈思烁,于天力,等.巨噬细胞 AMPK α 1 敲除对非酒精性脂肪肝小鼠模型的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (1): 85-92.

Wang SY, Chen SS, Yu TL, et al. Effect of macrophage AMPK α 1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 85-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.011

巨噬细胞 AMPK α 1 敲除对非酒精性脂肪肝 小鼠模型的影响

王顺意,陈思烁,于天力,林彩霞,王丽京,郑凌云*

(广东药科大学,生命科学与生物制药学院,广州 510006)

【摘要】 目的 研究巨噬细胞特异性敲除 AMP 活化蛋白激酶 α 1 (AMPK α 1)对高脂高糖高胆固醇饮食诱导的非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)小鼠模型的影响并探讨可能的作用机制。**方法** 利用巨噬细胞特异的 cre 小鼠与 AMPK α 1^{fllox/fllox}(AMPK^{fl/fl})小鼠杂交,通过 DNA 基因型鉴定,获得巨噬细胞 AMPK α 1 敲除(AMPK ^{Δ Mc})鼠;给予 AMPK α 1^{fllox/fllox}和 AMPK ^{Δ Mc}两种小鼠高脂高糖高胆固醇饮食(HFHC 饮食)12 周诱导 NAFLD 模型;OGTT 测定两种小鼠葡萄糖耐量,HE 染色观察两种小鼠 NAFLD 肝病理改变差异,结合油红 O 染色观察肝脂滴堆积程度;利用 GC-MS 研究两种小鼠血清脂质组学改变。**结果** DNA 基因型鉴定的凝胶电泳结果显示,AMPK α 1^{fllox/fllox}条带为 450 bp,对应野生型条带为 334 bp,lyz2-cre 条带为 700 bp,对应野生型条带为 350 bp;Western blot 结果证实 AMPK ^{Δ Mc}小鼠的巨噬细胞不表达 AMPK α ,AMPK^{fl/fl}对照鼠巨噬细胞中 AMPK 表达;NAFLD 模型中,与 AMPK^{fl/fl}小鼠相比,AMPK ^{Δ Mc}小鼠肝组织中更多的肝细胞出现脂肪变性,且油红 O 染色面积增多;OGTT 结果显示,与 AMPK^{fl/fl}小鼠相比,AMPK ^{Δ Mc}小鼠的血糖在 15 min 时显著升高;非靶向脂质组学结果显示 AMPK ^{Δ Mc}小鼠血清中丙酸及乳酸较 AMPK^{fl/fl}小鼠显著减少。**结论** 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促进 NAFLD 小鼠模型肝脂肪变性并下调血清丙酸和乳酸浓度。

【关键词】 AMPK;巨噬细胞;NAFLD;丙酸;乳酸

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0085-08

Effect of macrophage AMPK α 1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice

WANG Shunyi, CHEN Sishuo, YU Tianli, LIN Caixia, WANG Lijing, ZHENG Lingyun*

(College of Life Sciences and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of macrophage-specific knockout of AMP-activated protein kinase α 1 (AMPK α 1) on a high fat, fructose and cholesterol diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mouse model and to explore the possible mechanism. **Methods** Lyz2-cre mice (macrophage-specific cre mice) and AMPK α 1^{fllox/fllox} (AMPK^{fl/fl}) mice were crossed to generate macrophage-specific AMPK α 1 gene knockout (AMPK ^{Δ Mc}) mice by DNA genotyping. AMPK α 1^{fllox/fllox} mice and APMK ^{Δ Mc} mice were fed a high fat, fructose, and cholesterol diet (CHFF diet) for 12 weeks to establish the NAFLD model. Glucose tolerance was measured by an OGTT. Differences in liver pathological changes of the two kinds of mice were observed by HE staining. Accumulation of liver lipid droplets was observed by oil red O staining. Changes in serum lipomics of two kinds of mice were assessed by GC-MS. **Results** Genotyping by gel

[作者简介]王顺意(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:wangshunyi17@163.com

[通信作者]郑凌云(1976—),女,教授,硕士生导师,研究方向:心血管炎症性疾病的分子机制及药物靶点研究。

E-mail:zhenglingyun@gdpu.edu.cn

electrophoresis showed that the AMPK α 1^{fllox/fllox} band was 450 bp, the corresponding wildtype band was 334 bp, the lyz2-cre band was 700 bp, and the corresponding wildtype band was 350 bp. Western blot confirmed that macrophages of AMPK Δ ^{M ϕ} mice did not express AMPK α . AMPK α expression was found in macrophages of AMPK^{fl/fl} control mice. In the NAFLD model, compared with AMPK^{fl/fl} mice, more hepatocytes in AMPK Δ ^{M ϕ} mice showed steatosis and an increase in the oil red O staining area. OGTT showed that, compared with AMPK^{fl/fl} mice, blood glucose of AMPK Δ ^{M ϕ} mice was increased significantly at 15 min. Non-targeted lipomics showed that the serum levels of propionic and lactic acids in AMPK Δ ^{M ϕ} mice were significantly lower than those in AMPK^{fl/fl} mice. **Conclusions** Macrophage-specific AMPK α 1 knockout promotes hepatic steatosis and downregulates serum propionic acid and lactate levels in NAFLD model mice.

【Keywords】 AMPK; macrophages; NAFLD; propionic acid; lactic acid

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

非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 已经成为威胁全球人类健康的主要疾病之一,其全球患病率约为 25%^[1]。NAFLD 是指非饮酒条件下,患者超过 5% 的肝细胞中存在脂肪变性^[2-3]。作为一种进行性疾病,NAFLD 可从非酒精性肝脂肪变性 (NAFL) 演变为非酒精性肝炎 (NASH),进一步发展为肝纤维化,最终导致肝硬化或肝癌^[4-5]。在 NAFLD 患者肝中,M1 型巨噬细胞为炎症因子的主要来源,激活将促进炎症的发展^[6-7]。AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,由 α (α 1/2) 催化亚基, β (β 1/2) 和 γ (γ 1/2/3) 两个调节亚基组成,是细胞内调节能量平衡和对代谢应激反应的能量传感器^[8]。AMPK 参与巨噬细胞线粒体脂质代谢进而调控其炎症反应^[9-10],AMPK 缺失将促进巨噬细胞 M1 型极化^[11]。但巨噬细胞特异性敲除 AMPK α 1 对 NAFLD 的作用尚未见报道。本研究利用巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠构建 NAFLD 模型,检测血糖及血清 TG 变化,观察肝病理改变及脂滴堆积程度,并利用 GC/MS 技术^[12]探究血清脂质组学改变。

1 材料和方法

1.1 实验动物

AMPK α 1^{fllox/fllox} (AMPK^{fl/fl}) 小鼠及 lyz2-cre 小鼠为 SPF 级的 C57BL/6J 背景小鼠,雄性,各 10 只,4 周龄,体重 14~15 g,购自美国 Jackson lab,购买动物卫生证书编号为 [2011A00085]。于广东省实验动物监测所进行胚胎净化,生产许可证号为 [SCXK (粤)2018-0044]。饲养于广东药科大学实验动物中心无特殊病原体 SPF 级环境,饲养许可证号为 [SYXK (粤)2017-0125],环境温度为 22~26℃,环境湿度为 50%~70%,压差 25 Pa,洁净度 10 000 级,氨浓度 15 mg/m³,照明度 150~300 Lux,定时循环照

明,8:00~20:00 为光照时间,夜间 20:00 至次日 8:00 为无照明时间。动物饲养设施配备了独立通风系统 (IVC),换气次数为每小时 10 次。小鼠日常维持饲料采购于广东省医学实验动物中心。本研究所有动物实验均通过广东药科大学动物伦理委员会审查批准许可 (gdpulacspf2021006),实验动物饲养及实验过程均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

GAPDH 抗体 (CST, 2118S); AMPK α 抗体 (CST, 2795S); Oil red (Sigma, O0625); 苏木精 & 伊红染液 (南昌雨露实验器材有限公司); 油红 O 染色液 (Sigma, O0625); 97% BSTFA+1% TMCS (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, B118473); 吡啶 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, P111512); 甲酰胺 (百灵威科技有限公司, 533032); 色谱级甲醇 (Sigma, 34860); 十九烷酸 (Sigma, N5252); 高脂高糖高胆固醇 (HFFC) 饲料 (D09100310) 购自北京博奥派克生物科技有限公司。ImageQuant LAS4000 化学发光成像仪 (General Electric, 0682345); 普通光学显微镜 (Olympus, BX43); 气相色谱与质谱联用仪 (Agilent GC/MS, 7890B)。

1.3 实验方法

1.3.1 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠的基因型鉴定

以 cre-loxp 技术,将 AMPK^{fl/fl} 小鼠及 lyz2-cre 小鼠杂交获得子代,提取组织 DNA 以 PCR 的方法鉴定小鼠基因型;提取小鼠骨髓来源原代巨噬细胞 (BMDM) 蛋白以 Western blot 的方法检测 AMPK α 表达情况鉴定敲除结果,获得巨噬细胞 AMPK α 1 特异性敲除的 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠。

1.3.2 NAFLD 模型

随机选取 4 周龄健康的 AMPK^{fl/fl} 和 AMPK Δ ^{M ϕ} 小鼠给予 HFFC 饮食 12 周,分组为 AMPK^{fl/fl} 对照

组、AMPK^{ΔMφ} 对照组、AMPK^{fl/fl} HFFC 组和 AMPK^{ΔMφ} HFFC 组。

1.3.3 口服葡萄糖耐量实验(OGTT)

小鼠空腹 12 h 后测定 0 min 时血糖浓度,将 100 μg/mL 的葡萄糖溶液以 20 μL/g 剂量灌胃,测定 15、30、60、120 min 的血糖浓度。

1.3.4 HE 染色

肝组织脱水并石蜡包埋后制作石蜡切片,于 65℃ 烘箱 30 min,二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,苏木素染色 1 min 30 s,流水返蓝 30 min,伊红染色 10 s。

1.3.5 油红 O 染色

肝组织蔗糖脱水后制作冰冻切片,于 60% 异丙醇水溶液润洗 5 min,置于油红工作液中避光染色 30 min,于 60% 异丙醇水溶液中分化,苏木素染色 1 min,流水返蓝 30 min。

1.3.6 GC-MS 非靶向代谢组学

(1) 样品制备:将小鼠麻醉后以毛细采血管对小鼠眼眶静脉采血,室温静置 5 min,4℃ 5000 r/min 离心 15 min,取上层血清置于 -80℃ 待用。取小鼠血清 50 μL,加入 10 μL 的 1 mg/mL 的十九烷酸甲醇溶液,加入 250 μL 萃取溶液(水 v:甲醇 v:氯仿 v=2:5:2),混匀后 4℃ 静置 20 min,13 300 r/min 离心 15 min,取 200 μL 上清于新的 1.5 mL EP 管中,真空干燥,加入 80 μL 甲氧胺吡啶(15 mg/mL),37℃ 孵育 90 min,加入 80 μL 的含 1% TMCS 的 BSTFA 溶液,70℃ 孵育 60 min,样品转移至微量反应瓶中,上机。

(2) 气相色谱-质谱条件:色谱条件:Agilent HP-5 MS 石英毛细管柱,进样体积为 1 μL,模式为不分流进样,载气为 He(1 mL/min),进样口 260℃,传输线 240℃,程序为:初始 60℃(1 min),8℃/min 至 100℃(保持 5 min),15℃/min 至 170℃(保持 5 min),10℃/min 至 210℃(保持 5 min),15℃/min 升温至 350℃(保持 5 min),运行条件为 350℃,7 min。质谱条件:离子源(230℃),四级杆(150℃),离子化方式为 EI,电子轰击能量为 70 eV,离子扫描模式为全扫描模式,溶剂延迟为 12 min。

1.4 统计学方法

本研究中病理图像数据用 Image pro plus 6.0 图像分析软件进行统计,实验数据主要用 Graphpad prism 9.0 进行分析及可视化。GC-MS 结果均用 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B. 07. 00 定性软件和 NIST 14. L 数据库对混标进行定性分析得到

化合物信息,用 Agilent Masshunter 定量分析 B. 07. 01 根据混标化合物表对化合物定量分析,结果用 Simca Version 14. 1. 0. 2047 进行 PCA 分析获得 VIP>1 及 P<0. 05 的化合物,KEGG 在线数据库比对获得 KEGG ID,在 Metaboanalyst 5. 0 在线进行富集分析及通路分析。P<0. 05 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 AMPK^{ΔMφ} 小鼠基因型鉴定

对小鼠脚趾组织抽提 DNA 后,以 PCR 的方法鉴定 AMPK^{ΔMφ} 小鼠基因型,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果 PCR 扩增产物长度判断基因型。

如图 1A 所示,对比 DL1000 DNA Marker 条带,LY2-cre 条带为 700 bp,野生型条带为 350 bp。AMPKα1^{fllox/fllox} 条带为 450 bp,野生型条带为 334 bp。如图 1B 所示,与 AMPK^{fl/fl} 对照组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ} 小鼠敲除巨噬细胞 AMPKα1 后,巨噬细胞 AMPKα 不表达,说明巨噬细胞特异性敲除 AMPKα1 的 AMPK^{ΔMφ} 小鼠构建成功。

2.2 小鼠口服葡萄糖耐量(OGTT)检测

给予 AMPK^{fl/fl} 小鼠及 AMPK^{ΔMφ} 小鼠高脂高胆固醇高糖饮食(HFFC)12 周后进行口服葡萄糖耐量检测。如图 2 所示,饥饿 12 h 后 AMPK^{fl/fl} 小鼠组空腹血糖(9.33±0.97) mmol/L,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠组(7.46±1.34) mmol/L,两者无统计学差异(P>0.05)。两种小鼠血糖在灌胃葡萄糖溶液后迅速升高,15 min 时达到峰值,随后逐渐下降,在 120 min 时基本恢复空腹时血糖水平,两组小鼠血糖变化规律基本一致。15 min 时 AMPK^{fl/fl} 组小鼠血糖(17.5±3.5) mmol/L,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血糖(22.5±1.9) mmol/L,两者有显著差异(P<0.05),提示巨噬细胞特异性敲除 AMPKα1 在 NAFLD 诱导后出现糖耐量异常。

2.3 血清甘油三酯(TG)检测

为探究巨噬细胞特异性敲除 AMPK 对 HFFC 饮食下小鼠体内脂质代谢的变化,我们检测小鼠血清甘油三酯(TG)水平,如图 3 所示,与对照组 AMPK^{fl/fl} 组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血清甘油三酯水平显著提高(P<0.05)。

2.4 HFFC 饮食小鼠肝组织病理学观察

如图 4 所示,小鼠肝 HE 染色可以发现,AMPK^{fl/fl} 组小鼠肝出现轻微的小空泡样变性,但肝基本结构正常,小叶结构完整。AMPK^{ΔMφ} 组小鼠肝

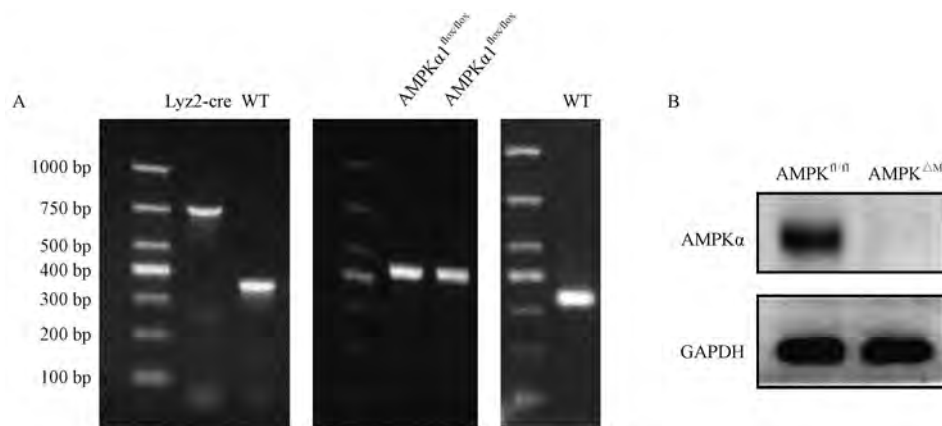
基本结构不清晰,肝小叶结构紊乱,肝出现严重的弥漫性空泡样变性,空泡增大,部分肝索结构消失,肝细胞细胞核偏移至细胞边缘,肝细胞大小不均一,部分肝细胞体积膨大,核膜边界不清晰。油红染色结果显示,AMPK^{fl/fl}组小鼠肝细胞中堆积的红色脂滴数量少、体积小,与对照组 AMPK^{fl/fl}组小鼠相比,AMPK^{ΔMφ}组小鼠肝细胞内红色脂滴数量明显增多($P < 0.01$),体积变大,颜色较为鲜艳,说明 AMPK^{ΔMφ}组小鼠肝细胞脂质沉积多于 AMPK^{fl/fl}组小鼠。

2.5 NAFLD 小鼠血清代谢组学分析

基于 GC-MS 对样品进行分析,将混标原始数据

导入 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 定性软件,获得 249 个峰信号化合物,如图 5 总 TIC 结果,各峰在保留时间上可见有良好的重现性,各组代谢轮廓存在一定差异。

如图 6A 所示,各组小鼠血清代谢物在 PCA 图上能较好的分离,并且组内可以很好的聚合起来, $R^2X[2] = 0.302$ 。如图 6B 所示,对 PCA 模型进行 Hotelling's T^2 检验所有样本检验值均明显低于 T^2 (95%),PCA 模型拟合度较高。基于 PCA 模型建立有监督的 PLS-DA 模型及 HFFC 组两组间 OPLS-DA 模型对 249 个差异化合物进行分析。如图 6C 所示,PLS-DA 各组之间可以很好的分离开来, $R^2X[2] =$

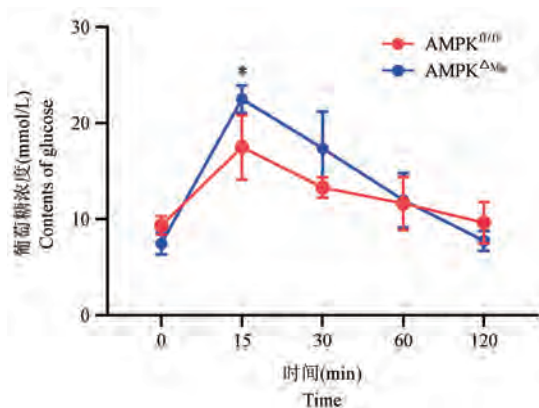


注:A:小鼠组织 DNA 琼脂糖凝胶电泳显影图;B:小鼠骨髓来源原代巨噬细胞 AMPKα 的蛋白质印迹图。

图 1 小鼠基因型鉴定结果

Note. A, DNA agarose gel electrophoresis development diagram of mouse tissue. B, Western blot of AMPKα in primary macrophages derived from mouse bone marrow.

Figure 1 The results of mouse genotype identification

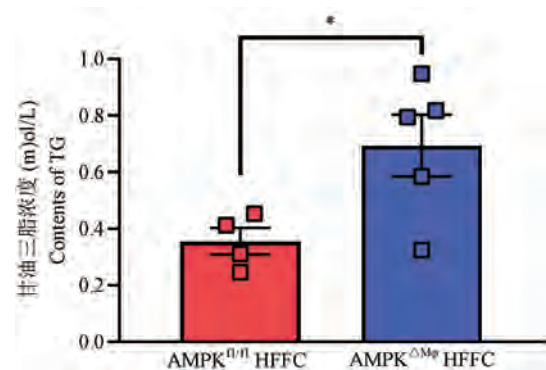


注:小鼠血糖水平各时间段结果。与 AMPK^{fl/fl} 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 巨噬细胞 AMPK 敲除对 HFFC 饮食小鼠口服葡萄糖耐量的影响($n = 5$)

Note. Results of blood glucose levels in mice at different time periods. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Effects of AMPK knockout in macrophages on oral glucose tolerance (OGTT) in HFFC-fed mice

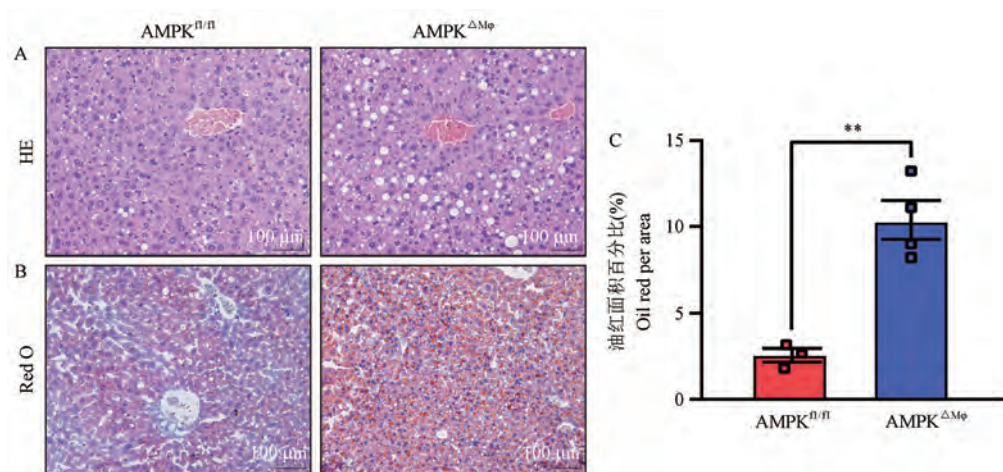


注:血清甘油三酯水平检测结果。与 AMPK^{fl/fl} 组比, * $P < 0.05$ 。

图 3 巨噬细胞 AMPK 敲除对 HFFC 饮食小鼠血清甘油三酯水平($n = 4$)

Note. Test results of serum triglyceride level. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Serum triglyceride levels in macrophage AMPK knockout HFFC diet mice

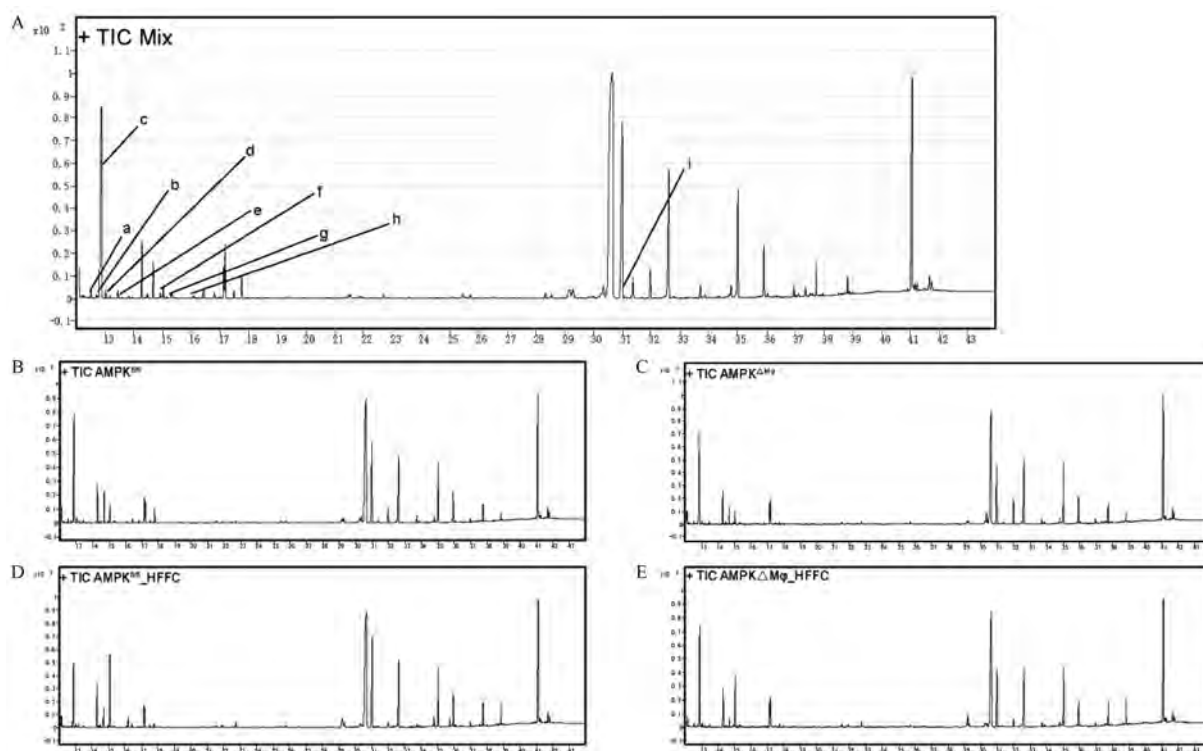


注:A:小鼠肝组织 HE 染色结果;B:小鼠肝组织油红 O 染色结果;C:油红 O 染色面积统计图。与 AMPK^{fl/fl} 组相比, * $P < 0.01$ 。

图 4 巨噬细胞敲除 AMPK 小鼠肝病理结果 ($n = 3$)

Note. A, HE staining results of mouse liver tissue. B, Results of oil red O staining in mouse liver. C, Statistical diagram of oil red O staining area. Compared with AMPK^{fl/fl} group, * $P < 0.01$.

Figure 4 Pathological results of liver in macrophage knockout AMPK mice



注:A:混标(a;Propanoic acid;b;N,N-Diethylglycine;c;D-Lactic acid;d;Glycolic acid;e;Tridecane;f;(R)-3-Hydroxybutanoic acid;g;(4-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol;h;Ethene;i;9-Hexadecenoic acid;B: AMPK^{fl/fl} 对照组;C: AMPK^{ΔMφ} 对照组;D: AMPK^{fl/fl} HFFC 组;E: AMPK^{ΔMφ} HFFC 组。

图 5 小鼠血清 GC-MS 总离子流图(TICs) ($n = 5$)

Note. A, Mixed standard (a, Propanoic acid. b, N,N-Diethylglycine. c, D-Lactic acid. d, Glycolic acid. e, Tridecane. f, (R)-3-Hydroxybutanoic acid. g, (4-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol. h, Ethene. i, 9-Hexadecenoic acid. B, AMPK^{fl/fl} control group. C, AMPK^{ΔMφ} control group. D, AMPK^{fl/fl} HFFC group. E, AMPK^{ΔMφ} HFFC group.

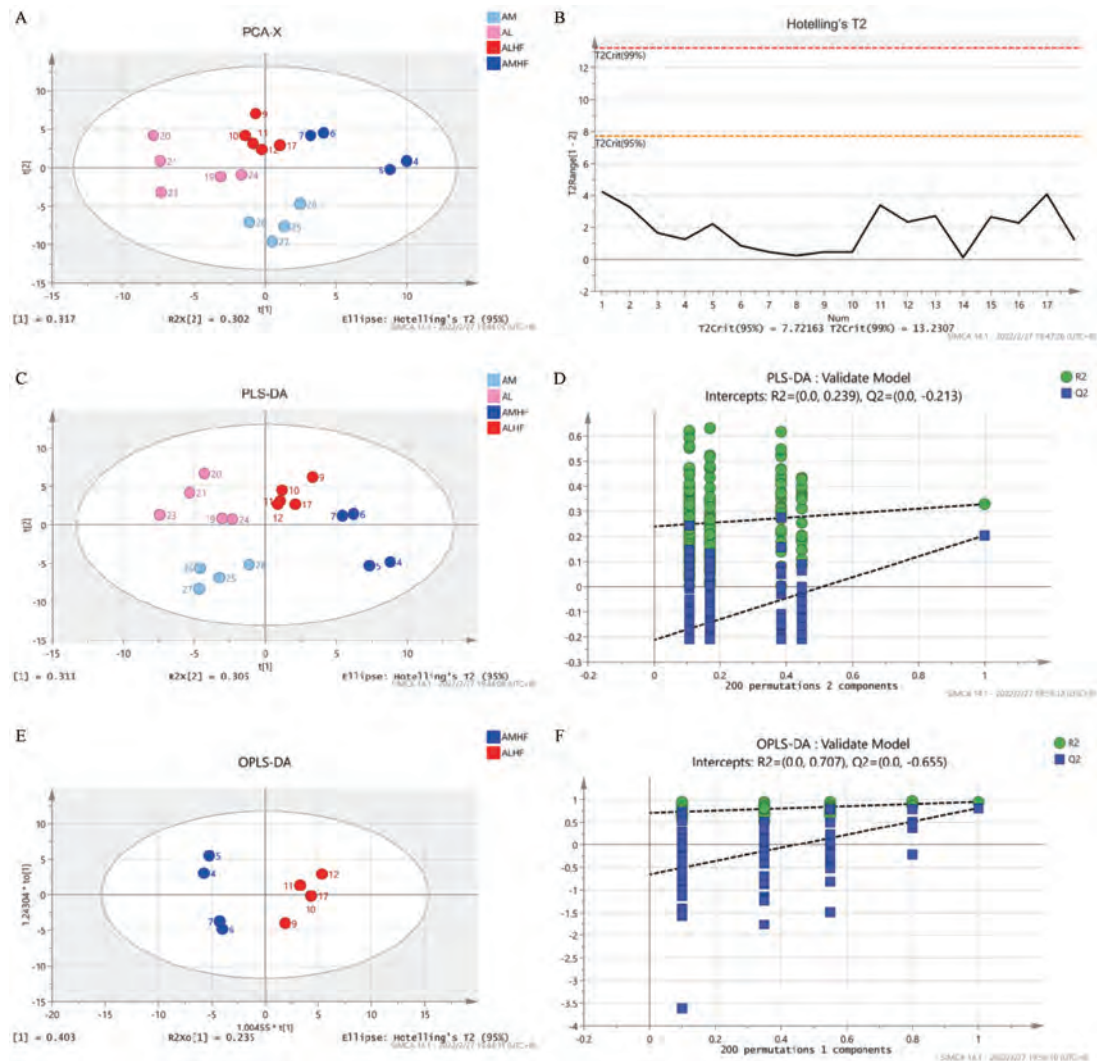
Figure 5 Mouse serum GC-MS total ion current map (TICs)

0.305。将 PLS-DA 结果进行 200 次的置换检验,图 6D 可见,Q2 与 Y 轴交点低于 0,PLS-DA 模型具有较好的拟合度,模型可靠性及预测性强。将 PLS-DA 模型的 AMHF 组($AMPK^{fl/fl}$ + HFFC 组)及 ALHF 组($AMPK^{\Delta M\phi}$ + HFFC 组)进行 OPLS-DA 分析结果显示(图 6E), $R^2X[1]=0.235$,两组可以很好的分离,组内聚合度较高,OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验结果显示(图 6F),Q2 与 Y 轴交点明显低于 0,说明模型可靠。

如表 1 所示,以 OPLS-DA 模型进行 VIP 预测差异化合物,得到 $VIP>1$ 共 15 个化合物。其中 $P<$

0.05 的差异化合物中,(R)-3-羟基丁酸、对辛弗林、乙烯发生上调($FC>0$),丙酸、N,N-二乙基甘氨酸、D-乳酸、羟基乙酸、十三烷、9-十六碳烯酸发生下调($FC<0$)。

进一步对筛选化合物进行富集分析(图 7A)这些差异化合物的相关代谢通路主要包括半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、酮体的合成和降解、丁酸代谢、果糖和甘露糖代谢、丙酮酸代谢及丙酸代谢。对差异化合物进行基因-化合物网络分析,如图 7B 所示,包括 *ACSL1*、*GUSB*、*ABHD6*、*DECRI*、*SLC16A1*、*GCG*、*CAT*、*LDHD*。在 genecards 在线综合



注:A:主成分分析(PCA);B:PCA 分析的 Hotelling's T2 检验;C:PCA 分析结果的偏最小二乘回归分析(PLS-DA);D:PLS-DA 分析的置换检验;E:HFFC 下的 $AMPK^{fl/fl}$ 组(AMHF)及 $AMPK^{\Delta M\phi}$ 组(ALHF)的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA);F:OPLS-DA 分析的置换检验。

图 6 小鼠肝组织代谢轮廓分析

Note. A, Principal component analysis (PCA). B, Hotelling's T2 test for PCA analysis. C, Partial least squares regression analysis (PLS-DA) for PCA analysis results. D, Permutation test for PLS-DA analysis. E, Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of $AMPK^{fl/fl}$ group (AMHF) and $AMPK^{\Delta M\phi}$ group (ALHF) under the action of HFFC. F, Permutation test of the OPLS-DA analysis.

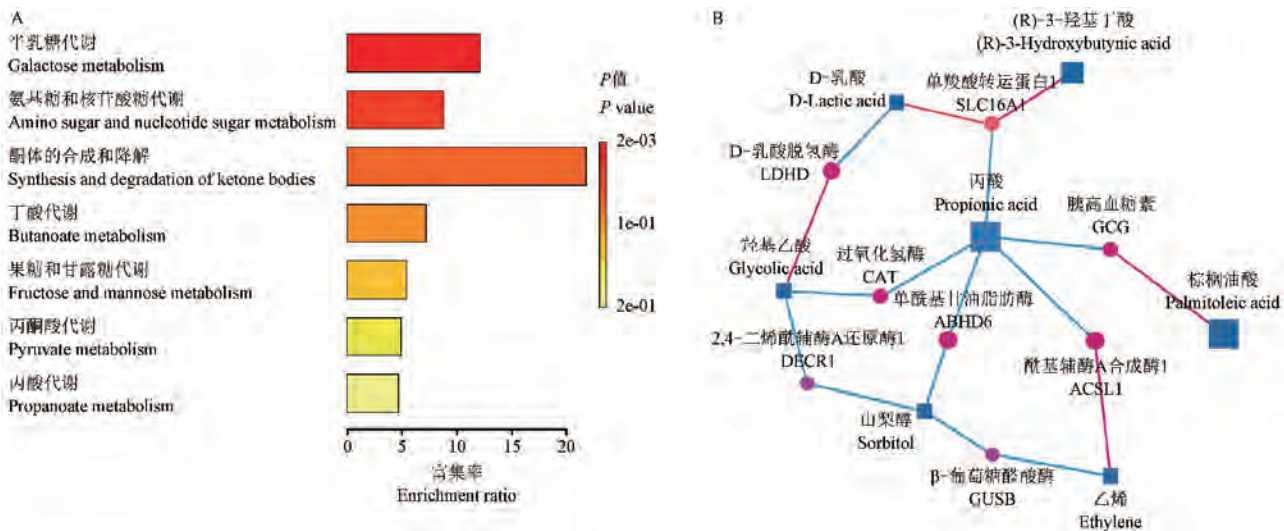
Figure 6 Metabolic profile analysis of mouse liver tissue

表 1 HFFC 饮食下 AMPK^{fl/fl} 组及 AMPK^{ΔMφ} 组小鼠血清差异代谢物
Table 1 Differential metabolites in serum of mice in AMPK^{fl/fl} group and AMPK^{ΔMφ} group under HFFC diet

序号 No.	保留时间 (min) RT	化学式 Formula	代谢产物 Metabolites	变量重要性 值 VIP	P 值 P value	差异倍数 FC	KEGG 数据库 编号 KEGG ID
1	12.550	C ₃ H ₆ O ₂	丙酸 Propanoic acid	5.31845	0.0012	-0.9180	C00163
2	12.738	C ₆ H ₁₃ NO ₂	N,N-二乙基甘氨酸 N,N-diethylglycine	5.30942	0.0012	-0.9134	C16647
3	12.900	C ₃ H ₆ O ₃	D-乳酸 D-lactic acid	5.31058	0.0012	-0.9135	C00256
4	13.201	C ₂ H ₄ O ₃	羟基乙酸 Glycolic acid	6.02812	0.4136	-1.4901	C00160
5	13.307	C ₁₃ H ₂₈	十三烷 Tridecane	6.02454	0.0066	-1.4890	C13834
6	13.363	C ₄ H ₁₀ O ₂	1,3-丁二醇 1,3-butanediol	1.83364	0.0605	-4.9295	C20335
7	15.059	C ₄ H ₈ O ₃	(R)-3-羟基丁酸 (R)-3-hydroxybutanoic acid	3.12239	0.0172	0.7987	C01089
8	15.315	C ₉ H ₁₃ NO ₂	对辛弗林 1-(4-hydroxyphenyl)-2-(methylamino) ethanol	4.05680	0.0000	4.5892	C04548
9	16.197	C ₂ H ₄	乙烯 Ethene	2.28625	0.0000	5.2032	C06547
10	30.303	C ₆ H ₁₂ O ₆	D-半乳糖 D-galactose	1.85337	0.2832	0.1300	C00124
11	30.678	C ₈ H ₁₅ NO ₆	N-乙酰基-D-氨基葡萄糖 N-acetyl-D-glucosamine	1.87295	0.2774	0.1314	C00140
12	30.722	C ₈ H ₁₅ NO ₆	N-乙酰基-D-甘露糖胺 N-acetyl-D-mannosamine	1.84885	0.2822	0.1300	C00645
13	31.385	C ₆ H ₁₄ O ₆	D-山梨糖醇 D-sorbitol	1.43863	0.2806	0.4358	C00794
14	31.716	C ₆ H ₁₃ NO ₅	鲨肌胺 Scyllo-Inosamine	1.14330	0.0786	-3.3772	C01214
15	32.304	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	9-十六碳烯酸 9-hexadecenoic acid	3.78824	0.0114	-3.0101	C08362

注:RT:保留时间;VIP:变量重要性;FC:Fold of change。

Note. RT, Retention time. VIP, Variable importance for the projection. FC, Fold of change.



注:A:差异代谢物通路富集分析结果;B:基因-差异化合物网络分析结果。

图 7 差异代谢物通路富集分析及基因-化合物通路分析

Note. A, Results of pathway enrichment analysis of differential metabolites. B, Results of gene-differential compound network analysis.

Figure 7 Differential metabolite pathway enrichment analysis and gene-compound pathway analysis

数据库及 NCBI gene 数据库查询可以发现, *ACSL1* 编码长链脂肪酸辅酶 A 连接酶的同工酶, 在脂质生物合成及脂肪酸代谢中发挥关键作用, 相关途径包括脂肪酸 β -氧化和 PPAR α 调节脂质代谢。 *GUSB* 编码葡萄糖醛酸酶 β , 在葡萄糖苷酸分解代谢中起作用。 *ABHD6* 启用酰基甘油酯酶活性, 参与酰基甘油分解代谢过程。 *DECR1* 编码蛋白参与不饱和脂肪酸酯辅酶 A 酯的 β -氧化。 *SLC16A1* 编码一种单羧酸盐转运蛋白, 相关代谢途径包括丙酮酸代谢及 TCA 循环反应, 在高脂饮食中影响营养吸收、白色脂肪及体重增加, 同时也对血糖稳态产生影响。 *GCG* 编码胰高血糖素的前体蛋白, 胰高血糖素在葡萄糖代谢中起重要作用, 通过增加糖异生和减少糖酵解来调节血糖。 *CAT* 编码过氧化氢酶, 是机体抵御氧化应激的关键抗氧化酶, 保护细胞免受过氧化氢的毒性作用, 其相关代谢途径包括嘌呤代谢及 DNA 损伤反应。 *LDHD* 编码乳酸脱氢酶 D, 相关代谢途径为乳酸分解代谢, 位于线粒体中。

3 讨论

HFFC 饮食诱导的 NAFLD 模型中, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促进肝脂质沉积。 OGTT 结果显示巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠糖耐量受损, 且血清甘油三酯(TG)水平上调, 提示巨噬细胞 AMPK α 1 敲除可加重 NAFLD 引起的小鼠糖脂代谢异常, 推测可能由于肝细胞损伤加重, AMPK α 1 敲除的巨噬细胞向 M1 极化而产生促炎细胞因子, 持续炎症刺激导致肝细胞胰岛素抵抗。 组织学检测结果进一步证实, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除促使肝细胞中脂滴增多, 肝脂肪变性加重, 考虑到肝脂肪变性可引起全身糖脂代谢异常, 在小鼠模型的血清非靶向脂质组学研究中, 对筛选出的 15 个化合物进行富集分析, 可以发现与 AMPK α 1 小鼠相比, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除小鼠血清中丙酸及乳酸下调。 有报道指出, 在饮食中添加丙酸可以降低肝和血中的脂肪酸含量^[13], 据此推测 NAFLD 模型中巨噬细胞 AMPK 敲除小鼠血清丙酸及乳酸下调可能与肝脂肪变性加重有关。 但血清中丙酸含量与炎症之间的具体机制未见报道, 我们尚不明确。

综上所述, 我们初步证实, 巨噬细胞 AMPK α 1 敲除导致 NAFLD 小鼠模型口服糖耐量受损, 血清甘油三酯上调, 肝脂肪变性, 以及血清中丙酸与乳酸水平下调, 血清代谢物的差异变化与基因 *ACSL1*、

GUSB、*ABHD6*、*DECR1*、*SLC16A1*、*GCG*、*CAT*、*LDHD* 有关, 具体机制有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Younossi Z, Koenig A, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [2] Sanyal A, Brunt E, Kleiner D, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 344-353.
- [3] Cobbin E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [4] Zhang X, Ji X, Wang Q, et al. New insight into inter-organ crosstalk contributing to the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(2): 164-177.
- [5] Friedman S, Neuschwander-tetri B, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [6] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10): 709-721.
- [7] 杨仁国, 贺微微, 罗婷婷. miR-29b-3p 靶向 IGF1 调控非酒精性脂肪肝脂质代谢及肝纤维化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 66-72.
- [8] Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(7): 1776-1783.
- [9] Rodríguez-Prados JC, Través PG, Cuenca J, et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation [J]. *J Immunol*, 2010, 185(1): 605-614.
- [10] O'neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 346-355.
- [11] Nawrocki A, Rajala M, Tomas, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(5): 2654-2660.
- [12] 巴哈古力·阿卜都热合曼, 阿布力克木·毛拉尤甫, 买吾拉尼江·依孜布拉等. 异常黑胆质证 2 型糖尿病大鼠模型的血浆代谢组学研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 16-21.
- [13] Demigné C, Morand C, Levrat MA, et al. Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes [J]. *Br J Nutr*, 1995, 74(2): 209-219.

[收稿日期] 2022-05-20

王孟迪,张秋梅,范蓓,等. 基于文献数据库的 6-OHDA 帕金森病大鼠模型特点分析及在中药研究中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 93-102.

Wang MD, Zhang QM, Fan B, et al. Analysis on the characteristics of 6-OHDA induced rat model of Parkinson's disease based on literature data base and the application in the study of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 93-102. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.012

基于文献数据库的 6-OHDA 帕金森病大鼠模型特点分析及在中药研究中的应用

王孟迪^{1,2}, 张秋梅^{1,2}, 范 蓓¹, Alberto Carlos Pires Dias³, 王凤忠^{1*}, 王 琼^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193; 2. 西南医科大学附属中医医院中葡中医药国际合作中心, 四川 泸州 646000; 3. 葡萄牙米尼奥大学生物系, 分子和环境生物学中心, 中葡药食植物资源研究中心, 葡萄牙 布拉加 4710-057)

【摘要】 目的 分析 6-OHDA 诱导的大鼠 PD 模型的品系选择、性别、造模要素、模型评价方法以及在抗 PD 中药研究中的应用情况, 以期为 6-OHDA 模型在帕金森研究中的应用提供参考。**方法** 查阅近 20 年来中国知网 (CNKI) 和 PubMed 中应用 6-OHDA 建立 PD 大鼠模型的相关文献, 分析 6-OHDA 诱导的大鼠 PD 模型的品系选择、性别体重、造模要素、模型评价方法以及在抗 PD 中药研究中的应用情况。**结果** 6-OHDA 诱导的大鼠 PD 模型多选用雄性 SD 或 Wistar 大鼠, 造模时注射部位多为单侧黑质、内侧前脑束或纹状体, 多在造模 4 周后检测阿扑吗啡诱导旋转实验、脑组织形态学、分子生物学、生化指标以判断模型成功率及防治 PD 药物的有效性。**结论** 本文通过对 6-OHDA 诱导的大鼠 PD 模型的品系选择、性别、体重、造模要素、模型评价方法以及在抗 PD 中药研究中的应用情况进行分析, 为 PD 模型的造模和应用提供参考。

【关键词】 帕金森病; 大鼠; 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA); 中药

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0093-10

Analysis on the characteristics of 6-OHDA induced rat model of Parkinson's disease based on literature data base and the application in the study of traditional Chinese medicine

WANG Mengdi^{1,2}, ZHANG Qiumei^{1,2}, FAN Bei¹, Alberto Carlos Pires Dias³, WANG Fengzhong^{1*}, WANG Qiong^{1,2*}

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

2. Sino-Portugal TCM International Cooperation Center, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Sino-PT Research Center for Medicinal and Food Plant Resources, Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, Braga 4710-057, Portugal)

【Abstract】 Objective To analyze the strain selection, sex, modeling key points, evaluation method of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson's disease (PD) model in rats and its application on the screening of

【基金项目】 国家高端外国专家引进计划 (G2022051012L); (泸州-医科大) 应用基础研究项目 (2018LZXNYD-ZK32); 四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目 (2019YFH0023)。

【作者简介】 王孟迪 (1994—), 女, 硕士, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: 18383067491@163.com

【通信作者】 王琼 (1975—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理与航天医学。E-mail: luyiwangqiong@163.com, wqimplad@126.com

王凤忠 (1972—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与功能性食品研究。E-mail: wangfengzhong@caas.cn

* 共同通信作者

traditional Chinese medicine in the treatment of Parkinson's disease. **Methods** Recent literatures related to 6-OHDA models in the CNKI and PubMed databases in 20 years were collected. The strains of rats, the weight, sex, modeling key points, evaluation method were analyzed, along with the application of 6-OHDA model in anti-PD traditional Chinese medicine screening. **Results** Male SD or Wistar rats are mostly selected as PD models in rats induced by 6-OHDA. The injection site is usually unilateral substantia nigra, medial forebrain bundle or striatum. Apomorphine induced rotation experiment, brain histomorphology, molecular biology and biochemical indicators are usually detected 4 weeks after modeling to determine the success rate of the model and the effectiveness of drugs for prevention and treatment of PD. **Conclusions** This study provides a useful reference for the use of 6-OHDA induced PD model regarding the strain selection, sex, modeling key points, evaluation method and the application on the screening of traditional Chinese medicine in the treatment of PD.

【Keywords】 Parkinson's disease; rat; 6-hydroxydopamine(6-OHDA); traditional Chinese medicine

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

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种由遗传和环境因素相互作用引起的老年性神经退行性疾病,临床表现为动作缓慢,肌体僵硬和静止性震颤。其典型的病理特征是中脑黑质纹状体多巴胺能神经元(dopaminergic neuron, DN)的丢失,导致多巴胺(dopamine, DA)分泌减少,并产生路易小体(Lewy bodies, LB)^[1]。PD好发于中老年人群,其发病机制目前尚不清楚^[2],为进一步探究PD的病因及诊疗方案,需要建立能很好模拟PD患者临床和病理表现的动物模型,神经毒素模型是最经典和历史最悠久的一类PD模型,通过使用神经毒素药物诱导啮齿类动物或灵长类动物脑中黑质纹状体神经元选择性退化,产生与临床患者相似的病理和行为变化^[3]。这类神经毒素可以全身给药或局部给药,取决于所用药物的类型和所涉及的种属。多年来,包括6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)、百草枯(paraquat, PQ)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、和鱼藤酮(rotenone)在内的许多药物都被成功应用于构建PD模型^[4]。6-OHDA模型是史上第一个PD动物模型,也是目前应用最广泛药物模型之一^[5]。6-OHDA作为DA的羟基化衍生物,可在多巴胺能神经元内运输毒素,竞争性抑制DA^[6]。该模型在病理、生化方面的表现与人类PD患者相似,如黑质DA能神经元变性坏死,黑质和纹状体TH活性及DA含量降低^[7]等。

为进一步明确6-OHDA模型的造模方法和特点,本文采用文献分析的方法对近20年国内外有关6-OHDA诱导大鼠PD模型的有效文献进行统计分析,对造模要素和模型鉴定方法进行归纳总结,并对近年来6-OHDA大鼠模型在抗PD中药研究中的

应用情况进行收集,为PD的机制研究及抗PD中药的非临床研究提供模型参考。

1 实验方法

1.1 6-OHDA模型在PD研究中的应用分析

使用CNKI和PubMed两大常用数据库进行文献检索。利用CNKI的中国学术文献网络总库进行文献检索。点击“高级搜索”,在主题搜索中同时,应用“并含”输入“大鼠”,时间设定为2001年1月1日至2021年7月30日,检索有关大鼠在6-OHDA方面的中文文献,用PubMed分别以“6-OHDA”和“rat”为关键词进行文献检索,检索同时段的相关的英文文献。

当文献符合以下标准时被纳入研究:(1)在正式期刊中发表的研究性文章(综述、学位论文、会议文章剔除);(2)实验中至少设计有对照组(或假手术组)和模型组;(3)所使用动物的品系、性别、体重信息描述清楚,造模要素描述完整;(4)6-OHDA被用于建立帕金森病模型;(5)使用了至少一种行为学检测,并有行为学检测结果。获得6-OHDA相关中英文文献共312条,其中中文文献162条,有效文献105条;英文150条,有效文献73条,最终得到有效文献共计178条。

1.2 模型动物及相关检测指标的分析

采用Excel软件建立数据库,对筛选后的178篇文献中的信息进行汇总。录入实验动物品系、性别、体重、造模方法、检测指标等信息,对6-OHDA所致的PD模型动物及相关测试指标进行分析,所有图形采用GraphPad Prism 6.02软件制作。

1.3 统计学方法

通过统计相关的文献数量并计算占比,文中图形由Graphpad Software提供。

2 结果

2.1 6-OHDA 模型实验动物的选择

经统计,6-OHDA 大鼠注射模型的使用品系主要是 SD 和 Wistar(图 1A),此外还有研究使用 Long Evans 大鼠^[8]和 Simonsen 大鼠^[9]。关于动物性别的选择,多数研究选择了雄性动物,少数选择了雌性动物(图 1B)。在造模动物的体重选择方面,大部分的研究选择了 180~250 g 的体重区间(49.25%)(图 1C)。

6-OHDA 模型的造模方法采用将药物直接注入脑区造成损伤的方式进行,没有全身吸收的过程,因此不同动物之间的差异小,可广泛用于灵长类、啮齿类动物等。虽然灵长类动物更能模拟人类疾病的症状,但费用昂贵,不利于初期药效筛选;小鼠等小型动物脑部体积较小,难以针对特定的脑区进行注射,且术后死亡率高,造模难度较大,因此最常选择的实验动物的是大鼠。与小鼠相比,大鼠脑部体积大,手术视野宽阔,术后存活率更高。有研究指出,SD 大鼠和 Wistar 大鼠的脑部结构不完全一致,因此在选择定位坐标时需要参考以相应品系为标本编写的脑立体图谱,以提高定位的准确度^[10]。

此外,有研究表明绝经后的女性 PD 患者的运动功能异常可通过雌激素缓解,说明雌激素对 PD 具有改善作用^[11]。在动物性别的选择方面,雄鼠的造模成功率显著高于雌鼠,且切除双侧卵巢的雌鼠造模成功率显著高于保留卵巢的雌鼠^[12]。或许是考虑到激素周期干扰的原因,大部分的研究选择了使用雄性大鼠建立 PD 模型。

2.2 6-OHDA 模型的造模要素

6-OHDA 整体给药无法透过血脑屏障,因此,只

能通过脑立体定位仪注射的方式将药物注入特定的靶点。据文献报道,在黑质纹状体多巴胺系统的不同部位注射不同剂量的 6-OHDA 可建立不同损伤程度和损伤类型的 PD 模型^[13]。

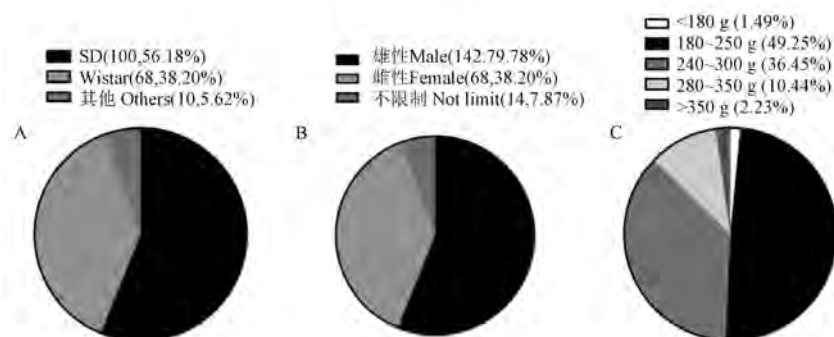
2.2.1 部位

6-OHDA 注射模型所选择的注射部位主要有黑质(substantia, SN),纹状体(corpus striatum, CPu),内侧前脑束(medial forebrain bundle, MFB),中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)。据文献分析,其中 28.98%的研究选择了 CPu 注射,27.27%的研究选择了 SN 注射,28.98%的研究选择了 MFB 注射,VTA 通常与其他部位复合注射,单独不作使用;在选择单侧和双侧注射的问题上,大部分研究选择了单侧注射(98.01%),单侧造模减少了手术损伤,操作更易、死亡率更低,同时可对正常侧和手术侧进行对比。在单侧注射模型中,70.86%的文献选择了单侧单点注射,23.17%的文献选择了单侧双点注射,3.97%的文献选择单侧多点(3 点及以上)注射。采用双侧造模的文献仅有 2.58%,因其损伤程度大,致死率高,故不做常规选择^[14]。

复合注射模型常见的有 SN+VTA(14,7.95%)、SN+MFB(5,2.84%)、MFB+VTA(3,1.70%)和 SN+CPu(2,1.14%),见表 1。

(1) 黑质(substantia, SN)

SN 主要的注射部位为黑质致密部(SNc),是黑质纹状体通路的起源部位,此处有丰富的 DA 能神经元,在该处造模可直接损毁 DN 胞体,引起手术侧纹状体内 DA 水平降低,DA 受体数量呈代偿性增加。6-OHDA 注射到黑质,12 h 内即开始发生 DA 神经元变性^[15],因此是常用的注射部位。SN 体积小,形状呈扁柱状,难以精准定位,单点注射模型



注:A:品系;B:性别;C:体重。

图 1 6-OHDA 模型动物品系与性别使用情况

Note. A, Strain. B, Sex. C, Body weight.

Figure 1 Animal strain and sex usage of 6-OHDA model

的成功率较低,双侧造模易出现吞咽困难、渴感缺乏和运动障碍,甚至死亡,通常选择单侧注射与其他位点联合注射,如李进等^[16]采用 SN+VTA 联合造模,以阿扑吗啡(apomorphine, APO)旋转实验作为模型鉴定标准,在 4 周时成功率达 60%,高于单一黑质组(30%);范凯等^[17]采用单侧 SN+MFB 联合造模,模型成功率 67.7%,术后死亡率仅 2.9%。

(2) 内侧前脑束(Medial forebrain bundle, MFB)

MFB 是一个神经传导束,起始于中脑 DA 能神经元,部分纤维终止于纹状体,邻近黑质纹状体 DA 能神经通路,该通路由位于黑质致密部(SNC)的 A9 细胞群组成,沿 MFB 发出纤维投射到纹状体的尾壳核,6-OHDA 单侧注射到 MFB 中可导致 A9 和 A10 细胞群的完全破坏^[18]。此位点注射模型对苯丙胺和 APO 都有能产生旋转行为,在 APO 旋转实验中出现阳性的大鼠 CPu 中 DA 组织含量减少 99.8%,SN 中 DA 组织含量减少 85%^[18]。该模型能使 DN 在较短时间内快速死亡,不易模拟早期 PD 的病理表现,但能产生肌肉震颤行为,可模拟晚期患者的临床特征,通常用于中晚期 PD 模型的研究^[19]。由于 MFB 解剖面积较小,定位相对困难,通常采用单侧多点或与其他部位联合造模,罗蔚锋等^[20]采用单侧双位点注射,术后 4~6 周成功率达 77%;秦晓凌等^[21]采用单侧单点注射,术后 2 周成功率可达 46.94%,3 周成功率可达 34.69%,且可维持至术后第 10 周。

(3) 纹状体(Corpus striatum, CPu)

CPu 位于黑质纹状体通路的末端,有文献报道单侧 CPu 注射 6-OHDA,可使部分 DA 耗竭,CPu 中 DA 水平降低 60%~80%,适用于构建早中期 PD 模型^[22]。与 MFB 注射相比,该模型导致的 SNpc 损伤程度不太明显,对 DN 是一种缓慢作用过程,将在 4~6 周逐渐演变。因此该模型引发的病理变化更接近临床患者 DN 进行性退变的过程^[23],有文献指

出 6-OHDA 直接注入 SNc 会造成过度的氧化应激反应,注入 CPu 部位可以一定程度避免^[24]。CPu 区域较大,注射操作的准确程度更高,目前纹状体注射 6-OHDA 通常采用单点、两点或多点注射法^[13]。王晓晓等^[25]采用单侧双靶点法分别在尾壳核内和苍白球内进行注射,2 周即诱导出 APO 旋转行为,4 周后造模成功率为 88.6%;Kirik 等^[13]采用单侧四点注射后模型的毁损侧纹状体 TH 免疫阳性纤维缺失 80%~95%,而损伤侧 SN 部的 DN 缺失达 75%;黄世明等^[26]采用单侧 CPu 四点注射大鼠 PD 模型,术后第 2 周成功率为 86.1%。

(4) 中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)

大鼠中脑多巴胺的主要来源是腹侧被盖区(VTA)的 A10 细胞,它是多巴胺能中脑边缘通路的起源^[27-28]。VTA 处进行 6-OHDA 注射可以使黑质 DN 胞体发生逆行性变性,还能造成纹状体 DN 神经末梢发生顺行性变性。有文献报道,VTA 与躯体运动密切相关,在该点注射造模能增加大鼠旋转圈数^[29]。虽然 VTA 易于操作,但与人类 PD 病理特征不符^[30],因此有关单一 VTA 部位注射造模的报道较少,通常与 SNc 或 MFB 联合注射。

2.2.2 剂量

6-OHDA 注射剂量、浓度及部位的选择都会影响 PD 模型的最终表现^[31],通过文献发现,6-OHDA 注射剂量从 4~30 μg 不等,与注射部位和点位密切相关。黄世明等^[26]采用 CPu 四点注射法,每点注射 2 μL ,共 8 μL ,术后第 2 周 TH 免疫荧光染色示右侧 SN 无明显 TH 阳性的 DN 细胞带,阳性细胞数减少且分布不均;杜越群等^[32]采用单侧 SNc+MFB 造模,两点各注射 12 $\mu\text{g}/4 \mu\text{L}$,术后 2、4 和 6 周 PD 大鼠毁损侧纹状体 DAT 相对放射计数较健侧分别降低了 16.8%、35.9%和 50.1%,且毁损侧 TH 阳性细胞数较健侧分别减少 75.22%、81.22%和 87.44%。

表 1 6-OHDA 模型的造模部位
Table 1 The molding site of the 6-OHDA model

注射部位 Injection site	单侧注射 Unilateral injection			双侧注射 Bilateral injection	总计 Total
	单点 Single point	双点 Two points	多点 Multiple points		
黑质 SN	36 (75.00%)	10 (20.83%)	1 (2.08%)	1 (2.08%)	48 (27.27%)
内侧前脑束 MFB	46 (86.79%)	6 (11.32%)	0 (0.00%)	1 (1.89%)	53 (30.11%)
纹状体 CPu	25 (49.02%)	19 (37.25%)	5 (9.80%)	2 (3.92%)	51 (28.98%)
复合部位 Multiple injection sites					24 (13.64%)

2.2.3 模型检测时间与持续时间

在应用 6-OHDA 模型的研究中,首次检测时间是一个关键的时间节点,根据大量研究发现,首次检测时间通常在造模 1 周以后,最广泛使用的时间是 1~3 周。在具体的实验操作中,模型动物首次旋转行为出现的时间与诸多造模因素密切相关,因此本文所综述内容仅供参考。李泽鸿等^[33]在术后第 1、2、3 周分别进行 APO 旋转实验,模型组在术后 1 周即可诱发旋转行为且次数随时间增加而升高;贾丛康等^[34]在术后 2、4、8、12 周分别对各组大鼠的行为进行检测,其中有 3 只大鼠于术后 2 周即诱发出了旋转行为,4 周后有 40% 的动物可诱发旋转行为,12 周时旋转圈数较 2、4、8 周组明显减少但仍符合模型成功的纳入标准,这提示造模 4 周时结果最为稳定,12 周以后模型具有自我恢复的倾向。此外,刘毅等^[35]在术后 4 周进行检测,造模成功率达 55.8%,且持续观察至术后 10 个月,模型大鼠仍可诱发出旋转行为,说明 6-OHDA 造成的模型损伤较为稳定,且持续时间长。

2.2.4 操作注意事项

关于药物的配置,要注意 6-OHDA 极易发生氧化反应,当溶液由透明变色至淡粉色或橘粉色时,说明药液已经氧化,应当弃用。因此在配置时要严格避光、低温操作,文献中往往以含 0.02%~0.2% 抗坏血酸的生理盐水溶液配置,完成后快速分装冻存,需要时取用。在进行注射操作时,进样针也应当采用锡纸包裹避光,尽量维持药物的效力。进针时应保持匀速缓慢,通常选择 0.5~1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$,留针时间选择 5~15 min,以使药液更好地扩散和吸收,退针时应同样注意匀速缓慢退出,防止药液溢出。此外,许多研究者采用预先腹腔注射地昔帕明(25 mg/kg)和帕吉林(5 mg/kg)来促进 6-OHDA 的吸收,其中地昔帕明可减少 6-OHDA 引起的去肾上腺素和 5-羟色胺减少,帕吉林可减少 6-OHDA 分解,因此常在注射造模前使用,提高 6-OHDA 的药效^[36-37]。术后通过连续 1 周腹腔注射青霉素,或者手术处涂抹红霉素软膏^[38]的方法来预防伤口感染。关于立体定位操作,要注意齿杆与耳杆的位置关系,牛朝诗等^[10]提出当门齿杆比耳杆低约 2.4 mm 时,可使 250 g 左右的 SD 大鼠前囟与后囟保持在一个平面。造模时,应当注意以上细节,以提高模型的成功率,减少动物的死亡率。

2.3 检测指标

通过观察动物的行为学、组织形态学、分子生

物学等变化,可以判断 6-OHDA 模型建立是否成功,并以此探讨该方法制备大鼠 PD 动物模型的可行性和成功率。

2.3.1 行为学检测指标

经统计,6-OHDA 模型常用的行为学检测方法包括阿扑吗啡诱导旋转实验(Apomorphine-induced rotation test)、苯丙胺诱导旋转实验(D-Amphetamine-induced rotation test)、圆筒实验(the cylinder test)、空场实验(the open field test)、转棒实验(the rotarod test)等。其中 46.63% 的研究选择了阿扑吗啡旋转实验,17.42% 的研究选择了苯丙胺旋转实验。旋转实验可用于评估动物的最大损伤程度,也是判断 6-OHDA 诱导的 PD 模型成功与否的金标准。据文献显示,在大部分研究中研究者通常采用旋转实验来鉴定模型的是否成功,另择 1~3 种行为学方法评估模型的其他行为学改变。详见表 2。

2.3.2 组织形态学检测

组织形态的改变通常选择尼氏染色法(Nissl's staining)和苏木精-伊红染色法(HE staining)。观察 6-OHDA 模型大鼠术后 48 h 的 SNc 部位,HE 染色可见神经细胞胞体肿胀、胞核变大、核呈空泡状,且部分出现核裂解以及部分胞体溶解等,术后 4 周和 8 周可见神经细胞凝固性坏死,伴有大量胶质细胞弥漫性或局限性增生^[38]。SN 区域可见神经元胞体形态不规则、结构模糊、数量减少^[48];尼氏染色中出现 SNc 及 VTN 区神经元数目显著减少,尼氏体模糊,着色较浅,有大量胶质细胞浸润^[49]。

2.3.3 分子生物学检测

为检测 6-OHDA 诱导的 PD 模型引起的一系列的分子生物学的改变,最常用的检测方法有免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)、免疫荧光法(immunofluorescent staining, IF)、蛋白免疫印迹法(Western blot)、实时荧光定量聚合酶链式反应法(RT-PCR)等。文献表明,TH 是 DN 特有的多巴胺合成限速酶,黑质 TH 阳性神经元数量与 DA 的含量呈相同趋势,因此可作为 DN 的特异性标记物,通过 IHC 法对脑组织中的 TH 进行标记能很好地反映脑内 DN 数量的变化^[48]。临床患者和 PD 动物模型的相同特点之一就是脑组织中的 TH 合成减少,因此, IHC 法检测 TH 能很好地反映黑质多 DN 变化,是鉴定 6-OHDA 模型的重要方法。详见表 3。

2.3.4 生化指标检测

针对 6-OHDA 诱导的 PD 模型常引起一系列的

神经递质、激素、代谢产物的变化,最常用的检测方法有酶联免疫吸附测定法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)与分光光度计法(UV spectrophotometry)等。DA 是 PD 疾病发生发展过程中最重要的神经递质,HVA 和 DOPAC 是 DA 代谢产物,可以反映 DA 水平^[50]。通过文献可发现,ELISA 和 HPLC 检

测 DA 及其代谢产物的水平变化,是 6-OHDA 模型的一项重要检测指标。详见表 4。

2.4 6-OHDA 模型在中药药效研究中的应用

目前,6-OHDA 大鼠模型已广泛应用于抗 PD 中药药效研究中,本文收集近年来 6-OHDA 大鼠模型在单味药及复方研究中的应用情况。

表 2 6-OHDA 模型的常用行为学检测方法
Table 2 Common behavioral tests of the 6-OHDA model

实验名称 Name	实验原理 Theory	实验方法 Method	行为学表现 Expression
阿扑吗啡诱导旋转实验(83,46.63%) ^[39] Apomorphine induced rotations test (83,46.63%)	手术侧的纹状体内 DA 受体处于超敏状态,经过 DA 受体突触后膜激动剂刺激会使其发出的传出信号明显强于正常侧,使大鼠向正常侧旋转	腹腔注射 0.5 mg/kg 剂量的 APO,大鼠向健侧旋转数大于每分钟 7 圈定为成功,记录 30 min 动物的旋转圈数,平均旋转速度 ≥7 r/min 的为成功模型。	首尾相接、身体环曲,伴有觅食样嗅探行为。 向损伤对侧发生旋转
苯丙胺诱导旋转实验(31,17.42%) ^[40] D-Amphetamine-induced rotations (31,17.42%)	手术侧神经末梢可释放的 DA 含量比正常侧低,当给与促 DA 释放制剂时,正常侧 DA 效应占优势,使大鼠向手术侧发生旋转行为	腹腔注射单剂量苯丙胺(2.5 mg/kg),记录 2 h 的同侧旋转。	首尾相接、身体环曲,伴有觅食样嗅探行为。 向损伤同侧发生旋转
转棒实验(11,6.18%) ^[41] Rotarod test (11,6.18%)	大鼠在转棒上为不掉落,需向转棒反方向奔跑,通过分析动物运动路程、速度、跌落时间等指标,评价大鼠四肢协调性和运动能力	大鼠每天在转棒仪上训练 2 次,连续 3 d。试验时,将大鼠放置在转棒上,转棒在 20 s 内从 5 r/min 加速到 20 r/min,或在 200 s 内也以 5 r/min 加速到 45 r/min,自动记录衰减延迟和运动距离。	速度↓、持续时间↓、总路程↓
圆筒实验(16,8.99%) ^[36] Cylinder test (16,8.99%)	评估大鼠在垂直探索活动(直立)中前肢使用的不对称性	将动物放入一个透明的圆柱体中。每只大鼠记录 5 min。分别统计大鼠左、右及双上肢触壁次数。结果计算如下:右 upper 肢使用率=(右+0.5×双)/(左+右+双)×100%。	损伤同侧上肢使用率↑
空场实验(7,3.93%) ^[41-43] Open field test (7,3.93%)	观察记录大鼠在自主活动箱中的行为,反映 PD 大鼠的自主活动、精神状态和探索行为	将动物从检测箱中心放入,适应 1 min 后记录 5 min 的活动。记录运动路程、运动速度、运动时间、跨格次数、直立次数等。	中央区的僵滞时间↑ 理毛次数↓ 跨格次数↓、跨格次数↓、直立次数↓
爬杆实验(2,1.12%) ^[44] Pole test (2,1.12%)	通过记录大鼠在爬杆上爬行的时间评估其四肢协调能力	将大鼠置于爬杆使其自然爬下,双前肢接触爬杆底部平台为完成,记录爬杆时间,每只大鼠重复 3 次,取均值计算。	爬杆时间↑
悬挂实验(2,1.12%) ^[45] Traction test (2,1.12%)	通过记录大鼠在挂绳上悬挂的时间指标评估其四肢协调能力	将大鼠两前爪抓住水平悬挂绳使其并处于悬挂状态,记录保持时间并评分。	悬挂评分↓
跑步机测试(1,0.56%) ^[46] Treadmill test (1,0.56%)	通过训练后的测试衡量动物的学习记忆能力	测试前进行训练。将被测试大鼠放在跑步机转轴上,当大鼠不能与转轴一同旋转时,则会落在踏板上,此时计时结束。	跑步时间↓
糖水偏爱测试(1,0.56%) ^[47] Sucrose preference test (1,0.56%)	统计大鼠对糖水和非糖水的饮水量,通过反映动物快感缺失的情况来评价动物是否产生抑郁情绪	在 24 h 训练阶段,为每只大鼠提供两瓶水。训练结束后,将其中一个瓶子换成含有 3% 蔗糖溶液的瓶子,24 h 后将瓶子交换。根据公式计算蔗糖消耗百分比(%糖水偏爱=糖水摄入量/总摄入量)。	糖水偏爱指数↓

表 3 6-OHDA 模型的常用分子生物学检测方法及其指标
Table 3 Common molecular biological detection methods and indicators of the 6-OHDA model

实验名称 Name	检测指标 Test indicators
免疫组化 (43, 24. 16%) Immunohistochemistry (43, 24. 16%)	黑质酪氨酸羟化酶 TH 的表达 ↓、小胶质细胞 CD11b ↑、星形胶质细胞 GFAP ↑
蛋白免疫印迹法 Western blot (10, 5. 62%)	脑组织中 TH 蛋白 ↓、ND1、ND4 蛋白 ↓、中脑组织中 Beclin-1 蛋白 ↑、HSP70、HSC70、MEF2D 蛋白 ↓、海马 α-Synuclein 蛋白 ↑、环氧化酶-2 (COX-2) ↑、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) ↑、IL-1β ↑、Caspase-3 ↑、Caspase-9 ↑、细胞色素 c ↑、Bcl-2 ↓、Bax ↑、BDNF ↓、TrkB ↓、磷酸肌醇-3-激酶 PI3K ↓、海马脑源性神经营养因子 (BDNF)、TrkB、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 蛋白 ↓
免疫荧光法 (3. 37%) Immunofluorescent staining (3. 37%)	黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达 ↓、小胶质细胞 (IBA-1) ↑
实时荧光定量聚合酶链式反应 法 (6, 3. 37%) RT-PCR (6, 3. 37%)	黑质 TH mRNA ↓、编码线粒体呼吸链酶复合物 I 的 ND1、ND4 mRNA ↓、下丘脑组织中 Beclin-1 mRNA ↑、HSP70、HSC70、MEF2D mRNA ↓、黑质及纹状体中 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b 蛋白 ↑
MTT 比色法 (2, 1. 12%) MTT assay (2, 1. 12%)	脑线粒体呼吸链酶复合物 I、II、III 和 IV 的活性 ↓、线粒体活性 ↓

表 4 6-OHDA 模型的常用生化检测方法及其指标
Table 4 Common biochemical detection methods and index of 6-OHDA model

实验名称 Name	检测指标 Test indicators
酶联免疫吸附测定法 (11, 6. 18%) ELISA (11, 6. 18%)	5-羟色胺 (5-HT)、DOPAC 和 HVA 的表达 ↓、MAO-B ↑、中脑中 α-syn ↑、TH ↓、LAMP-2A ↓、HSP70 ↓、MEF2D ↓、脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) ↓、GSH ↓、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) ↓、一氧化氮合酶 (NOS) 水平 ↓、黑质及纹状体中 DNA 总体甲基化水平 ↓、纹状体 TNF-α、IL-1β、IFN-γ、IL-4 的含量 ↑、中脑黑质中 TNF-α、IL-6 ↑、纹状体 DA 含量 ↓、Ach 含量 ↑、NO ↑、ROS ↑、MDA ↑
高效液相色谱 (11, 7. 30%) HPLC (11, 7. 30%)	黑质及纹状体组织细胞嘧啶 ↑、5-甲基胞嘧啶 ↓、纹状体 DA 含量 ↓、纹状体 Glu、GABA 的浓度 ↓、去甲肾上腺素 (NE) ↓、海马中多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE) ↓
分光光度计法 (1, 0. 56%) Spectrophotometer (1, 0. 56%)	SOD ↓、GSH-Px ↓、NOS ↓、丙二醛 (MDA) ↑
高效液相色谱-荧光检测法 (1, 0. 56%) HPLC-fluorescence analysis (1, 0. 56%)	脑组织中 5-HT 水平 ↓
高压液相色谱法 (1, 0. 56%) HPLC (1, 0. 56%)	DA、3,4-二羟基苯甲酸 (DOPAC)、高香草酸 (HVA)、5-羟色胺 (5-HT) ↓
反相色谱柱法 (1, 0. 56%) RPC (1, 0. 56%)	DA 水平 ↓

2. 4. 1 6-OHDA 模型在单味中药提取物及有效组分对 PD 防治作用研究中的应用

崔爽等^[44]采用右侧黑质单点注射 6-OHDA 建立模型,造模成功后予以杜仲醇提取物联合左旋多巴治疗,在给药 7 d 后发现联合治疗显著改善了模型大鼠运动功能的损伤,提高了黑质 TH 蛋白表达和 DA 水平,并恢复 SOD、GSH-Px 及 NOS 水平,降低了 MDA 水平;陈子方等^[51]采用 SN+VTA 注射 6-OHDA 建立模型,持续 21 d 灌胃天麻提取物,发现

天麻提取物低中高剂量组均有降低阿扑吗啡导致的 PD 大鼠旋转圈数的趋势,其中高剂量还可以显著增加水迷宫实验中平台象限距离百分比 (PT%) 和停留时间百分比 (T%),证明了天麻提取物能显著改善 PD 大鼠的运动障碍和学习记忆能力;文晓东等^[52]采用单侧 CPu 注射,对各组大鼠脑组织中线粒体呼吸链酶复合物 I、II、III、IV 的活性进行了检测,发现乌梅总黄酮高剂量组可恢复 PD 模型脑组织中线粒体呼吸链酶复合物活性的下降,可能通过

调节线粒体功能障碍等途径来保护 PD 大鼠的 DN 神经元;池彬彬等^[53]采用单侧 MFB 损伤 14 d 后造成 PD 模型,研究发现人参皂苷 Rb 与左旋多巴联用可预防 PD 异动症的发生,且 Rb 能显著改善大鼠纹状体内 mGluR1 和 PV 表达水平的下降;尹帅领等^[54]将 6-OHDA 注入右侧 CPu 建立模型,予以造模成功大鼠肉苁蓉多糖灌胃治疗,持续 10 d,结果显示肉苁蓉多糖可显著恢复模型动物游泳不动时间缩短,自主活动站立次数下降的现象,增加 Wnt1、 β -catenin 蛋白水平,降低 GSK-3 β mRNA 水平;没食子酸是茯苓的主要活性成分提取物之一,秦劭晨等^[55]通过右侧 VTA 注射制备 PD 模型,发现没食子酸可显著减少 PD 大鼠的旋转圈数,增加转棒停留时间,并可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路来降低 PD 大鼠的氧化应激损伤。

2.4.2 6-OHDA 模型在中药复方对 PD 防治作用研究中的应用

王伟为等^[50]采用单侧 SNc+VTA 注射建立 6-OHDA 模型探究补肾止颤方(熟地、山茱萸、山药、肉苁蓉)的抗 PD 作用,在给药 10 d 和 20 d 后分别进行行为学检测,发现补肾止颤方可以在损伤早期降低 PD 大鼠阿扑吗啡诱导的转圈次数,增加 PD 大鼠 DN 的表达,降低神经损伤;李晓明等^[56]采用 6-OHDA 单侧损毁 SN 联合附子汤灌胃建立肝阳上亢型 PD 模型,探究镇肝熄风汤(怀牛膝、代赭石、生牡蛎、生龙骨、生龟板、生白芍、元参、天冬、生麦芽、川楝子、茵陈、甘草)的抗 PD 作用机制,结果表明镇肝熄风汤可以显著降低 PD 大鼠中脑 MDA 含量,上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达;常学辉等^[57]采用单侧 SNc 注射造模,予以龟龄帕安丸(由龟板、羚羊角、全蝎、威灵仙、厚朴等药物组成郑卫制剂 Z04010162)持续 30 d 灌胃治疗,结果显示龟龄帕安丸可有效提高 PD 大鼠中脑黑质 Beclin1 和 LC3 II 蛋白表达,降低 P62 的表达,提高细胞自噬活性;邵跃斌^[58]采用单侧两点 SN 注射,模型成功后给与杞菊地黄丸 2 g/kg(枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻)灌胃联合针刺阳陵泉穴治疗,连续治疗 4 周后,联合治疗组大鼠的 GSH、SOD 含量,BDNF 表达量均显著升高;霍绮雯等^[59]利用 CPu 两点注射 6-OHDA 模型探究《证治准绳·类方》中经典方剂定振丸(天麻、秦艽、全蝎、生地、熟地、当归、川穹、白芍、防风、白术、黄芪、石决明、生牡蛎、钩藤)对 PD 的改善作用,结果显示,定振丸能显著增高

PD 大鼠 DA、DOPAC、HVA、5-HT、SOD、GSH-Px 水平,具有改善儿茶酚胺类神经递质及黑质 DN 氧化应激的作用,下调 Bax、Caspase-3 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白表达,具有抑制 DN 凋亡的作用;滕龙等^[60]采用单侧 SN 两点注射,腹腔注射左旋多巴+苄丝肼建立阴虚动风证异动症模型,予以中药复方地黄方(熟地黄、钩藤、珍珠、白芍、丹参、石菖蒲、全蝎、绿茶),发现中药复方地黄方可降低 AIM 评分,改善左旋多巴诱发的异动症现象。

3 小结

PD 是以震颤、肌强直、运动迟缓为主要临床表现的神经退行性疾病,为了进一步探究其病因及治疗,研究者们根据 PD 的临床和病理表现建立不同的动物模型,本综述总结了 6-OHDA 模型的特点,为选择 6-OHDA 模型的研究者提供一些参考:(1)6-OHDA 模型最常用的品系是 SD 或 Wistar 大鼠,为避免雌性大鼠激素周期等对行为学实验的干扰,若无特殊研究需求,可选雄性大鼠;(2)造模大鼠的品系及体重应当与注射位点坐标所参考的脑立体定向图谱基本一致,尽量避免因种属和重量带来的造模不稳定性,提高成功率。(3)双侧损伤创伤较大,死亡率高,推荐使用单侧损伤。(4)6-OHDA 注射部位、剂量的不同,可诱导不同的损伤类型,SN 和 MFB 部位注射所导致的 DA 能神经元损伤较大,通常用于制备晚期 PD 模型;CPu 注射部位造成的 DN 损伤较低,可用于制作早中期 PD 模型;VTA 部位通常与 SNc 或 MFB 联合注射,增加模型的成功率。(5)6-OHDA 注射后导致 DN 发生渐进性损伤,腹腔或皮下注射 DA 受体激动剂 APO 或释放剂 D-amp 会诱导动物产生向健侧或患侧旋转的行为,通常以旋转实验中的评价转圈次数(r/min)指标来作为模型是否成功的标准。(6)6-OHDA 操作简单、动物成本低、行为学变化持续时间长,不易自行恢复,但无法模拟 PD 患者产生 LB 的病理特征,因此在选择该模型时需要注意,若要探究 LB 的相关成因和机制,不宜选择 6-OHDA 模型。(7)抗 PD 中药研究的应用中,通常采用灌胃给药的干预方式,少数采取腹腔注射的干预方式。部分研究选择造模完成后,先通过旋转实验将造模成功的动物纳入,再行分组干预,也有部分研究选择在造模前提前干预,以探究药物的预防作用,但不管选种方式,应注意 6-OHDA 造成的模型损伤较大,因此干预周期不可太短。

综上所述,通过分析 6-OHDA 大鼠模型的动物品系、性别、体重、造模部位和检测方法,以期抗 PD 中药的药效研究提供模型方案参考。

参考文献:

- [1] Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease; animal models and dopaminergic cell vulnerability [J]. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 155.
- [2] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386(9996): 896-912.
- [3] Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease [J]. *FEBS J*, 2012, 279(7): 1156-1166.
- [4] Jagmag SA, Tripathi N, Shukla SD, et al. Evaluation of models of Parkinson's disease [J]. *Front Neurosci*, 2016, 92: 503.
- [5] Ungerstedt U, Ljungberg T, Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons [J]. *Adv Neurol*, 1974, 5: 421-426.
- [6] Litvan I, Halliday G, Hallett M, et al. The etiopathogenesis of Parkinson disease and suggestions for future research [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2007, 66(4): 251-257.
- [7] Rodríguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, et al. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2001, 169: 163-181.
- [8] Fine JM, Forsberg AC, Renner DB, et al. Intranasally-administered deferoxamine mitigates toxicity of 6-OHDA in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2014, 1574: 96-104.
- [9] Olds ME, Jacques DB, Kopyov O. Behavioral and subthalamic effects of combining a fetal ventral mesencephalic transplant in striatum with an electrolytic lesion of the entopeduncular nucleus in the rat with a unilateral 6-OHDA lesion of substantia nigra [J]. *Synapse*, 2003, 48: 90-99.
- [10] 牛朝诗, 杨艳艳. 双靶点注射 6-OHDA 建立帕金森病大鼠模型并提高成功率 [J]. *立体定向和功能神经外科杂志*, 2008, 21(5): 257-262.
- [11] Tsang KL, Ho SL, Lo SK. Estrogen improves motor disability in Parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations [J]. *Neurology*, 2000, 54(2): 2292-2298.
- [12] 杨黎江, 孔淑贞, 马元怡, 等. 帕金森氏病发病率的性别差异及机制的动物实验研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2009, 30(11): 23-27.
- [13] Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat [J]. *Exp Neurol*, 1998, 152(2): 259-277.
- [14] Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits; how relevant is the rat [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(7): 574-579.
- [15] Wang JY, Yang JY, Wang F, et al. Neuroprotective effect of pseudoginsenoside-f11 on a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 152798.
- [16] 李进, 孙杰, 赵楠, 等. 3 种不同脑区定点注射 6-OHDA 单侧损伤大鼠帕金森病模型的比较研究 [J]. *河北医科大学学报*, 2016, 37(6): 667-671.
- [17] 范凯, 马坚妹, 马晓凯, 等. 6-羟多巴胺脑内注射制备帕金森病大鼠模型的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(1): 20-22.
- [18] Deumens Ronald, Blokland Arjan, Prickaerts Jos. Modeling Parkinson's disease in rats; an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway [J]. *Exp Neurol*, 2002, 175: 303-17.
- [19] Seeger-Armbruster S, von Ameln-Mayerhofer A. Short- and long-term unilateral 6-hydroxydopamine lesions in rats show different changes in characteristics of spontaneous firing of substantia nigra pars reticulata neurons [J]. *Exp Brain Res*, 2013, 224(1): 15-24.
- [20] 罗蔚锋, 包仕尧, 刘春风, 等. 内侧前脑束不同部位注射 6-羟多巴胺建立帕金森病大鼠模型的对比性研究 [J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2007, 27(1): 66-68, 88.
- [21] 秦晓凌, 黄文娟, 陈国芳, 等. 单侧内侧前脑束注射 6-羟基多巴胺建立帕金森病大鼠模型的实验研究 [J]. *卒中与神经疾病*, 2011, 18(1): 34-37.
- [22] Lee CS, Sauer H, Bjorklund A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat [J]. *Neuroscience*, 1996, 72: 641-653.
- [23] Blandini F, Levandis G, Bazzini E, et al. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat; new clues from an old model [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25: 397-405.
- [24] 韩飞, 李成朋, 魏操, 等. 改良 6-OHDA 注射法建立早期帕金森病大鼠模型 [J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(3): 258-262.
- [25] 王晓晓, 付文玉, 庄文欣, 等. 改良纹状体内两点注射 6-OHDA 法制备大鼠帕金森病模型 [J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(2): 187-192.
- [26] 黄世明, 张锦明, 陈薇, 等. 大鼠单侧纹状体内四点注射 6-羟基多巴胺建立帕金森模型 [J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2017, 26(4): 290-293, 297.
- [27] Kelly PH, Seviour PW, Iversen SD. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus and corpus striatum [J]. *Brain Res*, 1975, 94: 507-522.
- [28] German DC, Manaye KF. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat [J]. *Comp Neurol*, 1993, 331(3): 297-309.
- [29] Iancu K, Mohapel P, Brundin P, et al. Behavioral characterization of unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 162

- (1): 1-10.
- [30] 宣吉浩, 董丽华. 帕金森病大鼠模型制备方法的改良 [J]. 中国实用医药, 2008, 2(5): 9-11.
- [31] 孙雪, 梁建庆, 何建成, 等. 神经毒素诱导帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(12): 21-24.
- [32] 杜越群, 陈文新, 林志毅, 等. 不同病程帕金森病大鼠纹状体多巴胺转运蛋白的动态变化 [J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(4): 399-402.
- [33] 李泽鸿, 陶英楠, 刘继阳, 等. 6-羟基多巴胺致帕金森病大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(12): 162-165.
- [34] 贾丛康, 杨新玲, 姜涛, 等. 6-羟基多巴胺所致帕金森病大鼠模型稳定性的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(5): 521-524.
- [35] 刘毅, 杨明会, 窦永起, 等. 6-羟基多巴胺诱发帕金森病大鼠模型的制作和评价 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(11): 1160-1162.
- [36] 韩飞, 夏克明, 杨斌, 等. 蛋白激酶 C δ 在 6-OHDA 诱导大鼠多巴胺能神经元损伤过程中的作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2021, 37(3): 323-328.
- [37] Chen JR, Yang ZQ, Hu TJ, et al. Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide from *potentilla anserina* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 1117-1124.
- [38] 孙玉芝, 赵贝贝, 雒晓东. 6-OHDA 诱导帕金森病大鼠模型行为学及脑内神经递质的动态变化 [J]. 新中医, 2016, 48(9): 225-230.
- [39] Pallavi S, Kumar V, Rizwana T, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24: 680-687.
- [40] Oscar S, Daniel LI, Jorge F, et al. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease [J]. *Synapse*, 2007, 61: 450-458.
- [41] Jalewa J, Sharma MK, Gengler S, et al. A novel GLP-1/GIP dual receptor agonist protects from 6-OHDA lesion in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 117: 238-248.
- [42] de Araújo DP, De Sousa CN, Araújo PV, et al. Behavioral and neurochemical effects of alpha-lipoic acid in the model of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic injection of 6-ohda in rat [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 571378.
- [43] 吕颖, 张念平, 徐丽萍, 等. 环孢菌素 A 结合神经干细胞移植对 6-OHDA 大鼠 PD 模型的作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(6): 723-730.
- [44] 崔爽, 陈岩岩, 周淑娟, 等. 杜仲乙醇提取物联合左旋多巴对 6-OHDA 诱导帕金森模型大鼠的抗氧化作用 [J]. 中医学报, 2020, 35(12): 2636-2641.
- [45] Metz GA, Tse A, Ballermann M, et al. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22: 735-744.
- [46] 王月平, 王举磊, 高国栋. 帕金森病大鼠丘脑底核的时间相关性放电模式分析 [J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23(5): 485-488.
- [47] Kinga K, Tomasz L, Jolanta K, et al. Depressive-like neurochemical and behavioral markers of Parkinson's disease after 6-OHDA administered unilaterally to the rat medial forebrain bundle [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69: 985-994.
- [48] Minaei A, Sarookhani MR, Haghdoust YH, et al. Hydrogen sulfide attenuates induction and prevents progress of the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat through activation of ATP-sensitive potassium channels and suppression of ER stress [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 15(423): 115558.
- [49] 尹丰, 田增民, 赵全军, 等. 6-羟基多巴胺内注射建立帕金森病大鼠模型的实验研究 [J]. 海军总医院学报, 2007, 6(2): 75-79.
- [50] 王炜为, 高晗, 李文涛. 补肾止颤方对 6-OHDA 诱导的帕金森病模型大鼠神经保护作用的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(9): 3270-3276.
- [51] 陈子方, 沈凡艺, 李江蕊, 等. 天麻提取物抗帕金森病作用的实验研究 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(22): 20-23, 27.
- [52] 文晓东, 罗宁, 王春玲, 等. 乌梅总黄酮对帕金森病大鼠脑线粒体呼吸链酶复合物影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(10): 27-31.
- [53] 池彬彬, 连晓媛. 人参皂苷组联合左旋多巴治疗 6-OHDA 诱导帕金森模型及其潜在机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(9): 702.
- [54] 尹帅领, 王海波, 杨硕. 肉苁蓉多糖通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路对 6-OHDA 致帕金森病大鼠的神经保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(8): 1227-1230.
- [55] 秦昉晨, 王爱梅, 万晓波. 没食子酸对 6-羟基多巴胺诱导帕金森模型大鼠的抗氧化作用机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(6): 86-90.
- [56] 李晓明, 张红宇, 綦艳秋, 等. 镇肝熄风汤对帕金森病肝阳上亢证大鼠脑组织氧化应激的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2588-2590.
- [57] 常学辉, 张良芝, 李天佛. 龟龄帕安丸对帕金森病大鼠中脑黑质病, Beclin1, P62 及 LC3 II 影响的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 5-7, 261-264.
- [58] 邵跃斌. 杞菊地黄丸配合针刺阳陵泉对帕金森大鼠神经保护机制研究 [J]. 数理医药学杂志, 2020, 33(11): 1668-1670.
- [59] 霍绮雯, 谭峰, 林东雄, 等. 定振丸对帕金森病大鼠神经递质及黑质多巴胺能神经元氧化应激的改善作用 [J]. 中成药, 2020, 42(3): 604-610.
- [60] 滕龙, 洪芳, 何建成. 中药复方地黄方对帕金森病异动症模型大鼠神经行为学动态变化的研究 [J]. 浙江中医杂志, 2016, 51(6): 411-413.

陈婷玉, 苏凯奇, 阮晓迪, 等. 中药调控缺血性脑卒中后紧密连接的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 103-112.
Chen TY, Su KQ, Ruan XD, et al. Research progress of Chinese medicine in regulating tight junction after ischemic stroke [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 103-112.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.013

中药调控缺血性脑卒中后紧密连接的研究进展

陈婷玉¹, 苏凯奇^{1,2}, 阮晓迪¹, 房璐¹, 张钰涵¹, 刘昊¹, 冯晓东^{1,2*}

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院康复中心, 郑州 450000)

【摘要】 缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是脑血管疾病的主要类型,通常导致全球老龄人口残疾或死亡。紧密连接(tight junction, TJ)与缺血性脑卒中密切相关。脑组织缺血后紧密连接的过度破坏与血脑屏障通透性的增大将加剧缺血性脑损伤的病理进展。大量研究表明中药可以有效修复缺血性脑卒中后脑血管内皮细胞的紧密连接,进而减轻血脑屏障的破坏、促进脑损伤恢复。本综述主要通过阐明中药单体及其提取物、中药复方调控紧密连接来改善缺血性脑卒中神经功能损伤的可能机制,以期为临床治疗发现中药治疗缺血性脑卒中的新靶点提供理论思路。

【关键词】 缺血性脑卒中; 中药; 紧密连接; 血脑屏障

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0103-10

Research progress of Chinese medicine in regulating tight junction after ischemic stroke

CHEN Tingyu¹, SU Kaiqi^{1,2}, RUAN Xiaodi¹, FANG Lu¹, ZHANG Yuhuan¹, LIU Hao¹, FENG Xiaodong^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Rehabilitation Center the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Ischemic stroke is a common type of cerebrovascular disease and often leads to death or disability in the global aging population. Tight junction integrity is closely related to ischemic stroke. Excessive destruction of tight junctions and increased permeability of the blood-brain barrier after brain tissue ischemia aggravates the pathological progression of ischemic brain injury. A large number of studies have shown that traditional Chinese medicine can effectively repair the tight junctions between cerebral vascular endothelial cells after ischemic stroke, thereby reducing damage to the blood-brain barrier and promoting recovery after brain injury. This review elucidates the possible mechanisms of the active components of traditional Chinese medicine, including monomers and monomers their extracts, and other compounds, in improving the neurological damage of ischemic stroke by regulating tight junctions. Progress in the discovery of clinical uses of traditional Chinese medicine for ischemic stroke are reviewed, including the new target of cerebral apoplexy.

【Keywords】 ischemic stroke; traditional Chinese medicine; tight junction; blood-brain barrier

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

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)在所有卒中类型中发病率最高,约占 79.1%^[1],并有逐年递增的趋势。高血压、糖尿病、高脂血症、肥胖、吸烟、缺乏运动等,均是引发 IS 的危险因素^[2]。生理条件

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82174473);国家自然科学基金联合基金(U2004131);河南省科技攻关计划(202102310167)。

【作者简介】 陈婷玉(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治脑卒中后认知障碍的机制研究。E-mail:ctyza@163.com

【通信作者】 冯晓东(1968—),男,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:常见功能障碍的中西医结合康复的机制和临床研究。

E-mail:fxd0502@163.com

下,由多种蛋白质相互作用形成的紧密连接通过参与调节相邻内皮细胞之间的溶质运动(即细胞旁扩散)来维持内环境稳态^[3-4]。而脑组织在缺氧缺血环境中通过炎症反应和氧化/亚硝化应激产生大量的促炎介质和氧化因子,严重破坏血脑屏障中 TJ 链的完整性^[5];TJ 链断裂导致内皮细胞的细胞旁扩散屏障通透性大大增加,进一步加重了脑血管源性水肿和出血性转化,继而形成恶性循环^[6]。

中药被广泛应用于治疗脑血管疾病,且疗效显著。研究发现,中药及其活性成分可以多方位、多途径修复缺血性脑卒中后 TJ 损伤,降低脑梗死和水肿体积,进而改善 IS 的预后。因此,本文以脑微血管内皮细胞间的 TJ 为着眼点,对中药从炎症反应和氧化/亚硝化应激两个重要方面防治 BBB 损伤减轻 IS 后神经功能障碍的研究现状作一综述,以期为临床试验中发现中药干预 IS 发挥作用的新靶点提供理论依据。

1 TJ 的成分与结构基础

TJ 的形成主要涉及特定的跨膜蛋白,即密封蛋白(claudin)、闭合蛋白(occludin),二者通过与胞浆蛋白(zonula occludens, ZO)的相互作用与细胞骨架相连^[7],从而形成电荷选择性孔道,仅允许离子和不带电分子通过。

1.1 密封蛋白 claudin

claudin 是 TJ 中最为丰富的一类跨膜蛋白,通过同一膜内的顺式配对(在一个细胞的质膜内)或跨膜反式配对(跨相邻细胞的质膜)排列形成延伸链,跨越并封闭相邻内皮细胞^[8]。claudin 的 C 端与辅助蛋白 ZO 的 PDZ 结构域相连。目前已知人体中存在 23 种 claudin,其中 claudin-1、-3、-5、-12 广泛分布于脑微血管内皮细胞。在大鼠的脑毛细血管中,claudin-5 比 claudin-12 的 mRNA 表达水平大约高出 750 倍,主要控制分子量 $<0.8 \times 10^3$ 的小分子溶质的细胞旁扩散运动,是调节血脑屏障(blood brain barrier, BBB)内皮细胞运动和离子通透性的关键因子^[9-11]。脑组织缺血缺氧破坏了 claudin-5 蛋白的排列结构,导致 BBB 通透性增大,加重血管源性脑水肿。然而,有研究发现在脑水肿发生后,靶向抑制 claudin-5 通过增加了 BBB 选择通透性起到减轻水肿改善认知障碍的效果^[12]。因此,针对 IS 后不同时段开发靶向调控 claudin-5 的药物治理脑水肿可能具有很大前景。

1.2 闭合蛋白 occludin

occludin 是分子量为 $60 \times 10^3 \sim 65 \times 10^3$ 的完整膜蛋白,包括两个细胞外环(ECL)、一个细胞内环。occludin 的 ECL1 含有大量酪氨酸和甘氨酸残基,酪氨酸残基参与形成氢键发挥疏水作用,而甘氨酸残基则为 TJ 提供灵活性。ECL2 富含酪氨酸残基,含有两个半胱氨酸,在氧化环境中形成二硫键,在缺氧环境下发生同源寡聚化;其胞质内的 C 端形成卷曲螺旋结构与 ZO 和肌动蛋白细胞骨架相连^[13-14]。occludin 异常降解会增加血脑屏障通透性,加重中枢神经系统疾病的进程。

1.3 胞浆蛋白 ZO

ZO 是一种普遍存在的支架蛋白,其谷氨酸激酶区与 occludin 的 C 端相连,并通过 PDZ 区与 claudin 的 C 端共同参与 TJ 的组装。ZO 还调节内皮细胞顶端细胞骨架的组成和功能并连接周围的肌动蛋白。敲除大鼠肾上皮细胞中的 ZO-1,细胞接触形态发生显著改变,肌动蛋白定位重新分布,TJ 链的染色区域由曲变直,结构复杂性降低,对大于 $3.7 \text{ \AA}$ 溶质的渗透性增高;在重组 ZO-1 后,连接接触点的曲折度有所增加,降低了 BBB 的通透性^[15]。由此说明,ZO 不仅参与内皮细胞 TJ 的组成还维持了 TJ 正常的复杂结构。

2 缺血性脑卒中与 TJ

IS 后发生的炎症反应、氧化/亚硝化应激等均会影响 TJ 的数量和空间结构^[16],加重脑组织 BBB 屏障的损伤,提高死亡率。

2.1 炎症反应与 TJ

脑组织缺血时,促炎和抗炎细胞因子的表达迅速增加,其中肿瘤细胞坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)和干扰素- β (interferon- β , IFN- β)等均是影响 TJ 的关键介质^[17]。缺血因素增加基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2 的分泌进而松解 TJ 网状链但不改变其在内皮细胞裂隙内的位置,使得 BBB 通透性可逆性增加;继发的神经炎症产生多种炎性因子刺激 MMP-9 的分泌,起到进一步降解 occludin、ZO-1 以及诱导 claudin-5 重分布的作用^[18-20]。小胶质细胞分泌的 TNF- α 以剂量依赖性方式激活 MMP-2 和 MMP-9 直接或间接调节天冬氨酸半胱氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)介导的 TJ 损伤和 BBB 高渗透性^[21-22]。此外,研究者在培养人

脑微血管内皮细胞实验中发现, p38/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路密切参与了 TNF- α 和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)下调 occludin 磷酸化水平的过程^[23-24]。LPS 还通过激活蛋白激酶 C (protein kinase, PKC)、Rho 相关卷曲形成蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled forming protein kinase 1, ROCK1)破坏脑微血管内皮细胞 TJ 复合物的完整性^[25]。缺血性脑卒中后, IL-1 β 的上调一方面激活了磷脂酶 A2 降解花生四烯酸, 破坏内皮细胞磷脂双分子层结构; 另一方面, 诱导细胞核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)/p65 的核转位使周细胞分泌 MMP-9, 下调 occludin、claudin-5 和 ZO-1 的表达, 造成 TJ 结构紊乱^[26-27]。

由此可得, 促炎因子通过降解 TJ 或下调其表达和磷酸化水平增加 BBB 通透性加重脑缺血损伤。然而, 抗炎因子 IFN- β 1a 和 IFN- β 1b 则有效地防止了 IFN- γ 诱导的 TJ 解体, 维持 BBB 屏障作用^[28-29]。Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor 4, KLF4) 在 IS 发生后通过调节黏附分子的表达、抑制氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 条件下的 TNF- α 诱导的 NF- κ B 磷酸化, 上调 claudin-5 和 ZO-1 的表达水平, 进而减轻脑缺血引起的神经炎症^[30]。

2.2 氧化/亚硝化应激与 TJ

氧化应激和亚硝化应激可以通过多种途径强力破坏 TJ 组成的内皮细胞屏障。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 均是缺血诱导产生的自由基, 在氧化/亚硝化应激损伤中发挥关键作用。ROS 降低跨内皮电阻值 (transendothelial electrical resistance, TEER)、下调 ZO-1 和 claudin-5 的表达并中断了二者连续排列的共定位生理结构^[31]。一氧化氮 (NO) 和过氧亚硝酸盐 (ONOO⁻) 是典型的 RNS。脑组织缺血缺氧后 H₂O₂、NO 大量产生, 不仅降低了 ZO-1 和 occludin 的表达, 还将二者的相互作用部位从细胞间隙转移至细胞质内, 进一步加重 BBB 屏障功能的损伤^[32]。NO 还影响半胱氨酸与 Zn²⁺ 的相互作用, 暴露 Zn²⁺ 的活性位点进而活化 MMP-9; 与此同时, NO 与超氧阴离子发生反应生成 ONOO⁻, 激活 MMP-9 和 MMP-2 降解 TJ 和细胞外基质导致 BBB 结构的破坏^[5]。氧化应激还通过酪氨酸激酶途径诱导 occludin-ZO-1 和钙粘蛋白- β -连环蛋白复合物的酪氨酸磷酸化与 TJ 的重新分布^[33]。血管内皮生

长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在脑组织缺氧后表达增加, 与 VEGF 受体 (VEGFR)-2 结合后激活内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 通路下调 ZO-1 和 occludin 的表达发挥血管通透性调节剂的作用^[34-35]; 在 IS 急性期, VEGF 还可以剂量依赖性地增加 MMP-9 活性、降低 occludin 和 claudin-5 蛋白的表达^[36]。VEGF 对 MMP-9 活性和 TJ 损伤的增强效应可由血管紧张素-1 (angiotensin-1, Ang-1) 抑制^[37]。核转录因子-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 可以调节内源性抗氧化过程, 上调 ZO-1 和 occludin, 维持 BBB 的完整性^[38]。

由此可得, 在 IS 发生后, 炎症和氧化因子的释放继而引发的 MMPs 的激活是影响 TJ 降解和重塑的主要原因。明确上述病理过程与 TJ 的相互作用机制对于发现保护缺血性脑卒中后血脑屏障破坏、减轻神经系统损伤的新药物至关重要 (见图 1)。

3 中药干预对缺血性脑卒中后 TJ 的影响

中药可以更好的适应复杂的人体环境, 从宏观的角度发挥神经保护作用。近年来许多基础研究显示中药单体及其提取物、中药复方通过抑制炎症反应和氧化/亚硝化应激等过程修复缺血性脑卒中后 TJ 的损伤, 预防并减轻大脑功能损害。

3.1 中药单体及其提取物

现将保护缺血性脑卒中后 TJ 的中药活性成分依据不同的功效分类为清热类药、活血类药、补肾类药、升阳类药等, 并就其保护机制进行详述 (见表 1)。

3.1.1 清热类药

胡桃楸有清热解毒、止痢明目的功效。Liu 等^[39]用其提取物胡桃苷 (Juglanin) 预处理可通过抑制缺氧诱导的 VEGF 和 VEGFR2 的增加提高大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型小鼠的 occludin 和 ZO-1 蛋白的含量; 并将体外实验中细胞死亡率由 21.6% 降低至 12.3%。外源性 VEGF-A (属 VEGF 家族) 抵消了胡桃苷对内皮细胞以及 TJ 的保护作用, 证实胡桃苷作用于 VEGF/VEGFR2 信号通路恢复 occludin 和 ZO-1 的正常表达减少内皮细胞损伤。

黄芩有泻火解毒、止血安胎的功效。黄芩的提取物黄芩苷, 一方面抑制 LPS 诱导 IL-1 β 和 TNF- α 的产生引起的血脑屏障中 TJ 的减少, 起到“节流”的效果, 并上调 claudin-5 和 ZO-1 蛋白的表达发挥“开源”的作用; 另一方面激活 Nrf2 信号通路降低氧

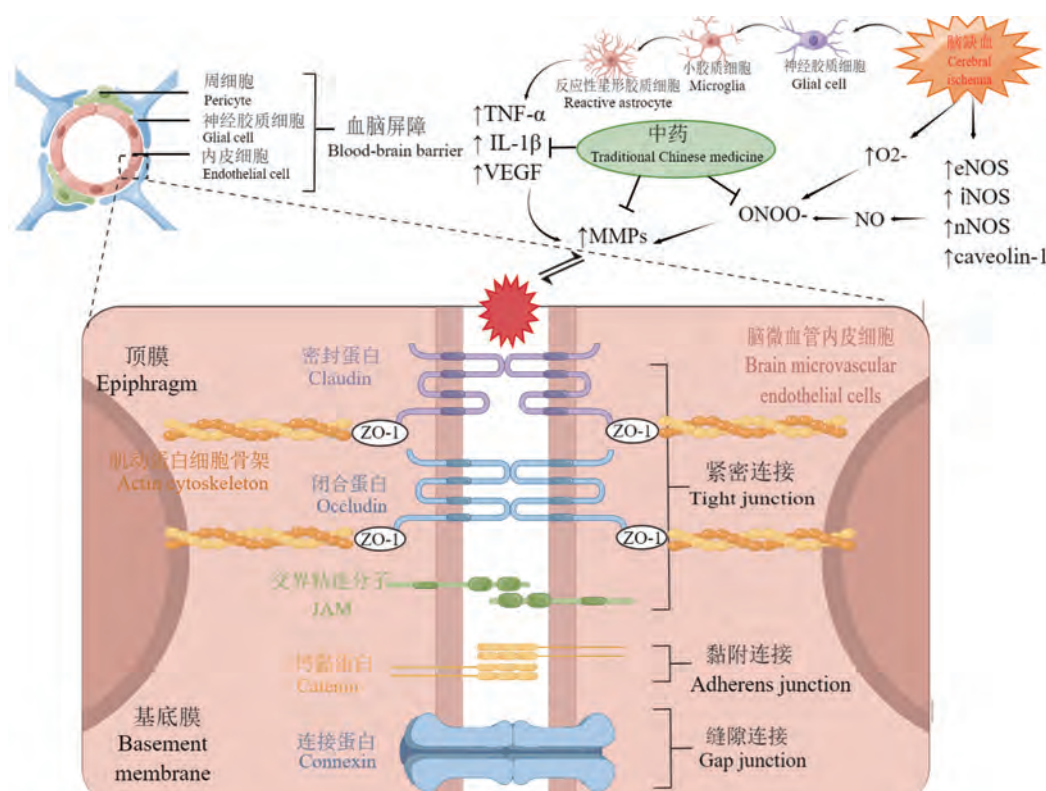


图1 中药对缺血性卒中 TJ 的保护机制

Figure 1 Protective mechanism of traditional Chinese medicine on tight junction in ischemic stroke

化应激水平,上调 Nrf2、HO-1 和醌氧化还原酶-1 (nadph quinone oxidoreductase 1, NQO-1) 的表达,以此来减轻炎症反应与氧化应激对脑组织的损伤^[40]。

冬凌草有消炎止痛、清热解毒、健胃活血的功效。冬凌草甲素有效增加缺血性卒中后血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和 Nrf-2 所调控的抗氧化因子 NQO-1 的表达,降低同侧大脑中的 ROS 水平,促进 Nrf-2 的核转位防止氧化应激诱导的内皮损伤。除此之外,冬凌草甲素还可防止外周炎性细胞浸润并减少 IS 后的神经炎症进而保护 TJ^[41]。

3.1.2 活血类药

灯盏花具有活血化瘀、通脉止痛的功效。灯盏花素注射液是以灯盏花乙素为主要成分的一种中药制剂。灯盏花注射液减少缺血引发的诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的合成,抑制 MMP-9 的活化;3,5-二咖啡酰奎宁酸 (灯盏花的化学成分之一) 通过减少 iNOS 的活化和自由基的生成两种途径抑制 MMP-9 的表达和活化,从而减少 claudin-5 的降解。由此得出,灯盏花素减轻脑缺血损伤的分子机制主要是通过 ROS/RNS-MMPs-TJ 信号通路保护血管内皮细胞间的 TJ 实现^[42-43]。

丹参有活血化瘀、通经止痛的功效,其提取物隐丹参酮通过抑制 MMP-9 上调 ZO-1、claudin-5 和 occludin 的表达,从而改善 OGD/R 诱导的 TEER 值的降低和内皮通透性的增加^[44]。

南蛇藤属有祛风除湿活血止痛、利尿解毒的功效。Luo 等^[45]以 OGD 诱导脑内皮细胞发生缺氧性损伤,发现南蛇藤素通过激活 MAPK 信号通路以浓度依赖性的方式恢复缺氧诱导的 TEER 损失,并上调内皮细胞中 occludin、claudin-5 和 ZO-1 的表达。

三七有活血祛瘀、通脉活络的功效。Liu 等^[46]发现体外实验中,三七皂苷 R1 激活质膜微囊 caveolin-1/MMP2/9 通路,恢复质膜中 ZO-1、claudin-5 的表达,并介导 occludin 和 caveolin-1 的重分布。此外,研究证实 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路在三七皂苷抑制 ROS 生成和 TJ 降解,保护脑微血管内皮细胞免受 OGD/R 诱导的 BBB 破坏中发挥重要作用^[47]。

藏红花有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神的功效。在脑缺血动物模型中,藏红花素预处理可以显著改善缺血所致的脑损伤,阻断 MMP-2 和 MMP-9 对 TJ 的破坏^[48]。同时,藏红花素还可以抑制氧化应激和炎症级联反应^[49],而这两者与 TJ 的损伤密不可分。

当归有补血和血、调经止痛、润燥滑肠的功效。当归根部 (*Angelica gigantis radix*, AGR) 通过激活 PI3K/Akt 通路显著增加 Ang-1、VEGF、酪氨酸蛋白激酶受体-2 (Tie-2)、ZO-1 和 occludin 的表达,降低了缺血诱导的 BBB 通透性和神经元死亡^[50]。

益母草有活血祛瘀、利尿消肿的功效。益母草碱是益母草的提取物,研究证实,通过调节组蛋白去乙酰化酶-(histone acetylation, HDAC-)/4/NOX4/MMP-9-TJ 信号通路,上调 claudin-5、occludin 和 ZO-1 改善神经功能缺损^[51]。

3.1.3 补肾类药

淫羊藿具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效。淫羊藿次苷 II (icariside II, ICS-II) 作为主要提取物之一,可以提高卒中后大鼠神经元存活率,维持海马、皮质、纹状体神经元的结构完整。分子对接结果显示 ICS-II 可以直接结合 MMP-2、MMP-9,调控皮质和纹状体中 MMP-2、MMP-9 与基质蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP1) 的平衡并抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 依赖的凋亡途径,显著增加 claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白表达^[52]。

地黄有滋肾阴、补肾阳和化痰开窍的功效。将地黄中提取的梓醇与 LPS、脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 共培养 24 h 后,梓醇显著逆转了 LPS 造成的 BMECs 核固缩、细胞轮廓模糊、肌动蛋白带锯齿状断裂、ZO-1 和 claudin-5 表达大幅减少的现象;增加了内皮细胞数目,恢复了细胞骨架形态,并重构细胞间的 TJ。该实验进一步发现梓醇拮抗 LPS 保护 TJ 蛋白的过程与其阻断 RhoA/ROCK2 信号通路的作用密不可分^[53]。

虫草有益肾壮阳、止血化痰、补肺平喘的功效。虫草素抑制 IL-1 β 、iNOS、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 和 MMP-9 的表达,降低创伤性脑损伤后 NOX1 的表达和活性,保护紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的丢失^[54]。

肉苁蓉有补肾壮阳的功效。研究者发现肉苁蓉总苷通过上调细胞核中 Nrf-2 的水平并下调其负调节因子 Keap1,增加 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,减轻氧化应激损伤,进而显著上调 claudin-5、occludin 和 ZO-1 的表达维持 BBB 的完整性^[55]。

3.1.4 升阳类药

黄芪具有补气升阳、固表止汗、脱毒排脓、利水消肿的功效。黄芪甲苷可以激活 Nrf2 信号通路减轻 LPS 对 ZO-1、occludin 和 claudin-5 的破坏,同时抑制炎症反应并阻止单核细胞的粘附,从而保护 BBB 的物理屏障^[56]。有研究发现,黄芪甲苷还参与调节 MMP-9 进而介导炎症性小体 NLRP3/caspase-1 信号通路减轻缺氧缺血诱导新生大鼠的脑损伤^[57]。因此可以合理的猜想黄芪甲苷对 TJ 的保护作用可能与其对 MMP-9 的调控存在时空交叉作用。

人参有强身益智、安神明目、延年益寿的功效。人参皂苷 Rb1 (GS-Rb1) 是 30 多种人参皂苷中含量最为丰富的一类。研究人员对 MCAO 模型小鼠腹膜内注射 GS-Rb1 后发现 GS-Rb1 可以有效抑制脑组织因缺血诱发的炎症和氧化反应。其不仅使促炎因子 IL-1 β 、MMP-9 表达下降、抗炎标志物 IL-10 表达增多;还抑制了 NOX 活性减轻了氧化损伤,起到保护同侧皮质中 occludin 和 ZO-1 的作用^[58]。

3.2 中药复方

大量基础研究表明,中药复方可以多方位多靶点地抑制炎症反应与氧化/亚硝化应激进而修复缺血性脑卒中后 TJ 的损伤,保护血脑屏障,减轻神经功能障碍 (见表 2)。

通心络胶囊由 12 种中药成分组成,有通络止痛、益气活血的功效。星形胶质细胞分泌的血浆素原因子 (shh) 与其受体 Patched 和 Smoothened (Smo) 蛋白共同构成 shh 通路。在缺血条件下 shh 诱导 Ang-1 的产生,修复脑微血管内皮细胞之间受损的 TJ,起到保护大鼠缺血性脑卒中后 BBB 屏障进而减轻脑水肿的作用^[59-60]。通心络胶囊可以激活 shh 通路,增加大脑内皮中 TJ 的表达。在环巴胺 (Smo 及其下游信号分子的阻断剂) 与通心络胶囊联合给药时,通心络胶囊对 TJ 的上调作用消失^[61]。此外,通心络胶囊还可以下调低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (LDL-receptor related protein 1, LRP-1) 的水平,继而增加 occludin、claudin-5 和 ZO-1 的表达,并减少梗死区 BBB 的渗漏^[62]。

黄芪赤风汤由黄芪、赤芍、防风 3 味中药配制而成,有行气活血、祛风通络的功效。黄芪赤风汤可以降低 MCAO 大鼠脑组织中 IL-1 β 含量,抑制炎症反应进程,下调 MMP-9 表达水平,提高 ZO-1、claudin-5 蛋白的表达,改善脑缺血状态^[63]。

表 1 中药单体及其提取物对缺血性脑卒中 TJ 调控的效应

Table 1 The effects of Chinese medicine monomers and their extracts on tight junction regulation of ischemic stroke.

中药单体 Chinese medicine monomer	提取物 Active ingredient	功效 Efficiency	效应分子 Effector molecule
胡桃楸 ^[39] <i>Juglans mandshurica</i>	胡桃苷 Juglanin	清热解毒、止痢明目 Clearing away heat and detoxifying, stopping dysentery	VEGF、VEGFR2、occludin、ZO-1
黄芩 ^[40] <i>Baikal skullcap root</i>	黄芩苷 Baicalin	泻火解毒、止血安胎 Purging fire, detoxifying, hemostasis and fetal arrest	LPS、IL-1 β 、TNF- α 、Nrf2、HO-1、 NQO-1、claudin-5、ZO-1
冬凌草 ^[41] <i>Blushred rabdosia leaf</i>	冬凌草甲素 Oridonin	消炎止痛、清热解毒、健胃活血 Anti-inflammatory, analgesic, clearing away heat and detoxicating, and invigorating stomach and promoting blood circulation	HO-1、Nrf-2、NQO-1、ROS、ZO-1、 occludin、claudin-5
灯盏花 ^[42-43] Denzhan flower	灯盏花乙素 Erigeron breviscapus	活血祛瘀、通脉活络 Promoting blood circulation to remove blood stasis and activating collaterals	iNOS、RNS、MMP-9、claudin-5
丹参 ^[44] Root of red rooted salvia	隐丹参酮 Cryptotanshinone	活血化瘀、通经止痛 Promoting blood circulation to remove blood stasis and relieving pain through meridians	MMP-9、ZO-1、claudin-5、occludin
南蛇藤属及雷公藤属 植物 ^[45] <i>Celastrus</i> and <i>Tripterygium</i> plants	南蛇藤素 Plant-derived triterpene celastrol	活血止痛、祛风除湿、利尿解毒 Activating blood and relieving pain, expelling wind and dampness, diuretic and detoxification	MAPK、occludin、claudin-5、ZO-1
三七 ^[46-47] <i>Panax Notoginseng</i>	三七皂苷 R1 Notoginsenoside R1	散瘀止血、消肿定痛 Dispelling blood stasis, relieving swelling and pain	caveolin1、MMP-2、MMP-9、ZO-1、 claudin-5、occludin、PI3K、Akt、 Nrf2、ROS
藏红花 ^[48-49] <i>Saffron</i>	藏红花素 Crocine	活血化瘀、凉血解毒、解郁安神 Promoting blood circulation and removing blood stasis, cooling blood and detoxification, relieving depression and tranquilizing mind	MMP-2、MMP-9、ZO-1、 claudin-5、occludin
当归 ^[50] Chinese angelica root	当归根部 <i>Angelica gigantis</i> radix	补血和血、调经止痛、润燥滑肠 Replenishing blood and blood, regulating menstruation and relieving pain, moistening intestines	PI3K、Akt、Ang-1、VEGF、Tie-2、 ZO-1、occludin
益母草 ^[51] <i>Leonurus heterophyllus sweet</i>	益母草碱 Leonurine	活血祛瘀、利尿消肿 Promoting blood circulation and removing blood stasis, diuresis and swelling	HDAC-4、NOX4、MMP-9、claudin- 5、occludin、ZO-1
淫羊藿 ^[52] <i>Shorthorned epimedium herb</i>	淫羊藿次苷 II Icariside II	补肾阳、强筋骨、祛风湿 Tonifying kidney yang, strengthening tendons and bones, dispelling wind and dampness	MMP-2、MMP-9、caspase-3 claudin-5、occludin、ZO-1
地黄 ^[53] <i>Rehmannia</i>	梓醇 Catalpol	滋肾阴、补肾阳、化痰开窍 Nourishing kidney yin, invigorating kidney yang, resolving phlegm	LPS、RhoA、ROCK2、ZO-1、 claudin-5
冬虫夏草 ^[54] <i>Cordyceps sinensis</i>	虫草素 Cordycepin	益肾壮阳、止血化痰、补肺平喘 Nourishing the kidney and strengthens yang, stopping bleeding and resolving phlegm, invigorating the lung and relieves asthma	IL-1 β 、iNOS、MPO、MMP-9、 NOX1、ZO-1、occludin
肉苁蓉 ^[55] <i>Cistanche</i>	肉苁蓉总苷 Total glycosides of Cistanche deserticola	补肾壮阳 Invigorating kidney and strengthening yang	Nrf-2、Keap1、SOD、GSH-Px、MDA、 claudin-5、occludin、ZO-1
黄芪 ^[56-57] <i>Astragalus membranaceus</i>	黄芪甲苷 Astragaloside	补气升阳、固表止汗、脱毒排脓、利水消肿 Nourishing qi and raising yang, strengthening the surface and stopping sweating, detoxifying and removing pus, inducing diuresis to alleviate edema	Nrf2、LPS、MMP-9、NLRP3、 caspase-1、ZO-1、occludin、 claudin-5
人参 ^[58] Ginseng	人参皂苷 Rb1 Ginsenoside Rb1	强身益智、安神明目、止惊悸、延年益寿 Strengthening the body and mind, soothing the mind and eyesight, stopping panic, prolonging life	IL-1 β 、MMP-9、IL-10、NOX、 occludin、ZO-1

参桂三生散,由人参、当归和肉桂组成,通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达以及 TJ 和钙粘蛋白(VE-Cadherin)的降解,增强内皮间连接复合物的稳定性。该过程伴随着血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)与其受体含量的增加,使用血管活性肠肽拮抗剂加剧了 BMECs 的细胞旁屏障损伤证实,参桂三生散保护 TJ 减轻脑缺血损伤除了作用于 MMPs 外,还与血管活性肠肽密切相关^[64]。

七十味珍珠丸,含有 70 多种药材,是治疗脑血管疾病常用的藏药方剂。七十味珍珠丸可激活脑缺血再灌注模型大鼠 p38/MAPK 信号通路下调其脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 MMP-9 水平,稳定 TJ 的成分^[65-66]。

参附汤是益气温阳固脱的代表方剂。张伟^[67]发现,参附汤通过上调脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)的限速酶肉碱棕榈酰转移酶 1A(carnitine palmitoyl transferase 1A, CPT1A)的水平保护缺血再灌注损伤大鼠的 TJ,且其作用优于人参和附子单味中药单独引发的保护效应。然而脂肪酸氧化与 TJ 的相互作用机制仍需进一步阐明。

麝香黄芪复方滴丸是在补阳还五汤的基础上添加麝香、冰片配置而成。张运克等^[68]发现麝香黄芪复方滴丸上调 MCAO 大鼠大脑中 occludin、claudin-5、ZO-1 的表达进而修复 BBB 损伤,实现保护脑组织、降低脑水肿的作用。

表 2 中药复方对缺血性脑卒中紧密连接调控的效应
Table 2 Effect of Chinese herbal compound on tight junction regulation of ischemic stroke

中药复方 Chinese herbal compound	成分 Component	功效 Efficiency	效应分子 Effector molecule
通心络胶囊 ^[61-62] Tongxinluo capsule	人参,水蛭,全蝎,赤芍,蝉蜕,土鳖虫,蜈蚣,檀香,降香,乳香(制),酸枣仁(炒),冰片 Ginseng, leech, whole scorpion, <i>Paeoniae radix rubra</i> , cicada slough, soil soft-shelled turtle, centipede, sandalwood, <i>Dalbergia odorifera</i> , frankincense (prepared), jujube seed (fried), borneol	通络止痛,益气活血 Dredging collaterals, relieving pain, replenishing qi and promoting blood circulation	shh、Patched、Smo、Ang-1、LRP-1、occludin、claudin-5、ZO-1
黄芪赤风汤 ^[63] Huangqi Chifengtang	黄芪,赤芍,防风 <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Paeoniae radix rubra</i> , <i>saposhnikoviae radix</i>	行气活血、祛风通络 Activating qi and promoting blood circulation, expelling wind and dredging collaterals	IL-1 β 、MMP-9、ZO-1、claudin-5
参桂三生散 ^[64] Shengui Sansheng Pulvis	人参、当归、肉桂 Ginseng, <i>Angelica</i> , Cinnamon	强身益智、补血和血、补火助阳 Strengthening the body and mind, nourishing blood and blood, nourishing fire and helping yang	MMP-2、MMP-9、claudin-5、ZO-1、occludin、VE-Cadherin VIP
七十味珍珠丸 ^[65-66] Tibetan Medicine Qishiwei Zhenzhu Pills	珍珠、檀香、降香、甘草、天竺黄、西红花、体外培育牛黄、人工麝香、珊瑚、玛瑙、九眼石、坐台等 70 味 70 flavors such as pearl, sandalwood, <i>Dalbergia odorifera</i> , licorice, Tianzhu yellow, saffron, bezoar cultivated <i>in vitro</i> , artificial musk, coral, agate, nine-eye stone, sitting table, etc	通经活络、调和气血、镇静安神、醒神开窍 Unblocking meridians, reconciling qi and blood, calming the mind, refreshing the mind	p38、MAPK、TNF- α 、IL-1 β 、MMP-9、claudin-5、occludin
参附汤 ^[67] Red Ginseng Aconite Soup	红参、附子 Red ginseng, aconite	益气、温阳、固脱 Nourishing Qi, warming yang, strengthening the surface and stopping perspiration	CPT1A occludin、claudin-5、ZO-1
麝香黄芪复方滴丸 ^[68] Shexiang Huangqi Dropping Pill	黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁、麝香、冰片 <i>Astragalus mernbranaceus</i> , <i>Angelica tail</i> , <i>Paoniae rodx rubra</i> , Dilong, Chuanxiong, safflower, peach kernel, musk, borneol	开窍祛浊、益气活血 Removing turbidity, nourishing Qi and activating blood	occludin、claudin-5、ZO-1

4 小结与展望

随着研究的深入,学者们逐渐证实 TJ 可作为中药治疗 IS 的效应靶点。本文经分类总结后发现,中药单体常选用清热类、活血类、补肾类、升阳类药物,其作用机制与抑制 IS 后炎症与氧化亚硝化反应、抑制 MMPs 的激活、上调抗氧化因子的表达等有关,对紧密连接蛋白 claudin、occludin、ZO 起到一定的保护作用。同时经归纳分析得出,对 IS 后上述 3 个蛋白起作用的中药复方大多具有通络止痛、益气活血、醒神开窍的功效。

中药疗法作为一种有效的保护血脑屏障 TJ 的防治手段,被广泛应用于基础研究,但是对其作用机制梳理过程中也发现很多不足之处:大部分研究仅观察了中药对脑内皮细胞间 TJ 蛋白表达的改变,其产生影响的复杂机制仍需深入探讨;其次,多数实验采用基因与人类同源性较高的鼠类作为研究 IS 与血脑屏障相互影响的对象^[69],仍缺乏临床试验研究,未来还需建立中医症候群模型实验与临床试验研究,以更进一步的揭示中药治脑病的科学作用。因此,在现有的研究基础上,明确中药调控 IS 后 TJ 的具体保护机制,进一步筛选和研发改善 IS 后神经功能损伤的药物至关重要。

参考文献:

- [1] Baron JC. Protecting the ischaemic penumbra as an adjunct to thrombectomy for acute stroke [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(6): 325–337.
- [2] Guzik A, Bushnell C. Stroke epidemiology and risk factor management [J]. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 2017, 23(1): 15–39.
- [3] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(1): 1–13.
- [4] Krause G, Winkler L, Mueller SL, et al. Structure and function of claudins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(3): 631–645.
- [5] Yang C, Hawkins KE, Doré S, et al. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C135–C153.
- [6] Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(2): 200–219.
- [7] Ronaldson PT, Davis TP. Targeting transporters: promoting blood-brain barrier repair in response to oxidative stress injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1623: 39–52.
- [8] Milatz S, Piontek J, Schulzke JD, et al. Probing the cis-arrangement of prototype tight junction proteins claudin-1 and claudin-3 [J]. *Biochem J*, 2015, 468(3): 449–458.
- [9] Daneman R, Zhou L, Agalliu D, et al. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13741.
- [10] Ohtsuki S, Sato S, Yamaguchi H, et al. Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(1): 81–86.
- [11] Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice [J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(3): 653–660.
- [12] Campbell M, Hanrahan F, Gobbo OL, et al. Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 849.
- [13] Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(6): 1777–1788.
- [14] Bellmann C, Schreivogel S, Günther R, et al. Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracellular loop [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(6): 855–867.
- [15] Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, et al. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(17): 3930–3940.
- [16] Du J, Yin G, Hu Y, et al. Coicis semen protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting angiogenesis via the TGFβ/ALK1/Smad1/5 signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(1): 877–893.
- [17] 霍晓川, 高峰. 急性缺血性卒中血管内治疗中国指南 2018 [J]. *中国卒中杂志*, 2018, 13(7): 706–729.
- [18] Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(4): 697–709.
- [19] Liu J, Jin X, Liu KJ, et al. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(9): 3044–3057.
- [20] Zhang S, An Q, Wang T, et al. Autophagy-and MMP-2/9-mediated reduction and redistribution of ZO-1 contribute to hyperglycemia-increased blood-brain barrier permeability during early reperfusion in stroke [J]. *Neuroscience*, 2018, 377: 126–137.
- [21] Chen AQ, Fang Z, Chen XL, et al. Microglia-derived TNF-α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10

- (7): 487.
- [22] Yang YN, Wang F, Zhou W, et al. TNF- α stimulates MMP-2 and MMP-9 activities in human corneal epithelial cells via the activation of FAK/ERK signaling [J]. *Ophthalmic Res*, 2012, 48(4): 165–170.
 - [23] Ni Y, Teng T, Li R, et al. TNF α alters occludin and cerebral endothelial permeability: role of p38 MAPK [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0170346.
 - [24] Qin LH, Huang W, Mo XA, et al. LPS induces occludin dysregulation in cerebral microvascular endothelial cells via MAPK signaling and augmenting MMP-2 levels [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 120641.
 - [25] He F, Yin F, Omran A, et al. PKC and RhoA signals cross-talk in Escherichia coli endotoxin induced alterations in brain endothelial permeability [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425(2): 182–188.
 - [26] Barnes J, Mondelli V, Pariante CM. Genetic contributions of inflammation to depression [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 81–98.
 - [27] Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(23): 11391–11415.
 - [28] Kraus J, Ling AK, Hamm S, et al. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells *in vitro* [J]. *Ann Neurol*, 2004, 56(2): 192–205.
 - [29] Minagar A, Long A, Ma T, et al. Interferon (IFN)- β 1a and IFN- β 1b block IFN- γ -induced disintegration of endothelial junction integrity and barrier [J]. *Endothelium*, 2003, 10(6): 299–307.
 - [30] Zhang X, Wang L, Han Z, et al. KLF4 alleviates cerebral vascular injury by ameliorating vascular endothelial inflammation and regulating tight junction protein expression following ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 107.
 - [31] Zehendner CM, Librizzi L, Hedrich J, et al. Moderate hypoxia followed by reoxygenation results in blood-brain barrier breakdown via oxidative stress-dependent tight-junction protein disruption [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82823.
 - [32] Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, et al. Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(14): 11916–11924.
 - [33] Rao RK, Basuroy S, Rao VU, et al. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin- β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress [J]. *Biochem J*, 2002, 368(2): 471–481.
 - [34] 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.
 - [35] Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, et al. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(6): 1977–1982.
 - [36] Li YN, Pan R, Qin XJ, et al. Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression [J]. *J Neurochem*, 2014, 129(1): 120–129.
 - [37] Valable S, Montaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia; both effects decreased by Ang-1 [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491–1504.
 - [38] Prasad S, Sajja RK, Kaisar MA, et al. Role of Nrf2 and protective effects of Metformin against tobacco smoke-induced cerebrovascular toxicity [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 58–69.
 - [39] Liu J, Chen L, Zhang X, et al. The protective effects of Juglanin in cerebral ischemia reduce blood-brain barrier permeability via inhibition of VEGF/VEGFR2 signaling [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3165–3175.
 - [40] Wang X, Yu JY, Sun Y, et al. Baicalin protects LPS-induced blood-brain barrier damage and activates Nrf2-mediated antioxidant stress pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96: 107725.
 - [41] Li L, Cheng SQ, Guo W, et al. Oridonin prevents oxidative stress-induced endothelial injury via promoting Nrf-2 pathway in ischaemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20): 9753–9766.
 - [42] Liu G, Liang Y, Xu M, et al. Protective mechanism of Erigeron breviscapus injection on blood-brain barrier injury induced by cerebral ischemia in rats [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 18451.
 - [43] Zhong X, Luo C, Deng M, et al. Scutellarin-treated exosomes increase claudin 5, occludin and ZO1 expression in rat brain microvascular endothelial cells [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 33–40.
 - [44] Zhao H, Zheng T, Yang X et al. Cryptotanshinone attenuates oxygen-glucose deprivation/recovery-induced injury in an in vitro model of neurovascular unit [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 381.
 - [45] Luo D, Zhao J, Rong J. Plant-derived triterpene celastrol ameliorates oxygen glucose deprivation-induced disruption of endothelial barrier assembly via inducing tight junction proteins [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(13): 1621–1628.
 - [46] Liu B, Li Y, Han Y, et al. Notoginsenoside R1 intervenes degradation and redistribution of tight junctions to ameliorate blood-brain barrier permeability by Caveolin-1/MMP2/9 pathway after acute ischemic stroke [J]. *Phytomedicine*, 2021, 90: 153660.
 - [47] Hu S, Wu Y, Zhao B, et al. Panax notoginseng saponins protect cerebral microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced barrier dysfunction via activation of PI3K/Akt/Nrf2 antioxidant signaling pathway [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2781.
 - [48] Zhang X, Fan Z, Jin T. Crocin protects against cerebral ischemia-induced damage in aged rats through maintaining the integrity of blood-brain barrier [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2017, 35(1): 65–75.

- [49] 温彬, 张琪, 靳丽丽, 等. 藏红花素预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤保护作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(3): 429-435.
- [50] Oh TW, Park KH, Jung HW, et al. Neuroprotective effect of the hairy root extract of *Angelica gigas* NAKAI on transient focal cerebral ischemia in rats through the regulation of angiogenesis [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 101.
- [51] Zhang QY, Wang ZJ, Sun DM, et al. Novel Therapeutic effects of leonurine on ischemic stroke: new mechanisms of BBB integrity [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 7150376.
- [52] Liu MB, Wang W, Gao JM, et al. Icariside II attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier dysfunction in rats via regulating the balance of MMP9/TIMP1 [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(12): 1547-1556.
- [53] Feng S, Zou L, Wang H, et al. RhoA/ROCK-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability [J]. Molecules, 2018, 23(9): 2371.
- [54] Yuan J, Wang A, He Y, et al. Cordycepin attenuates traumatic brain injury-induced impairments of blood-brain barrier integrity in rats [J]. Brain Res Bull, 2016, 127: 171-176.
- [55] Wang F, Li R, Tu P, et al. Total Glycosides of *cistanche deserticola* promote neurological function recovery by inducing neurovascular regeneration via Nrf-2/Keap-1 pathway in MCAO/R rats [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 236.
- [56] Li H, Wang P, Huang F, et al. Astragaloside IV protects blood-brain barrier integrity from LPS-induced disruption via activating Nrf2 antioxidant signaling pathway in mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2018, 340: 58-66.
- [57] 李娜. 黄芩甲苷调控 MMP-9 介导 NLRP3/Caspase-1 信号通路改善缺氧缺血性脑损伤的分子机制 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2021.
- [58] Chen W, Guo Y, Yang W, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 on integrity of blood-brain barrier following cerebral ischemia [J]. Exp Brain Res, 2015, 233(10): 2823-2831.
- [59] Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence [J]. Science, 2011, 334(6063): 1727-1731.
- [60] Xia YP, He QW, Li YN, et al. Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiopoietin-1 in stroke damage [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68891.
- [61] Liu S, Chang L, Wei C. The sonic hedgehog pathway mediates Tongxinluo capsule-induced protection against blood-brain barrier disruption after ischaemic stroke in mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 124(6): 660-669.
- [62] Chang L, Hu L, Wei C, et al. Chinese medicine Tongxinluo capsule protects against blood-brain barrier disruption after ischemic stroke by inhibiting the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 pathway in mice [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2020, 29(9): 105071.
- [63] 刘舒毓, 王秋月, 刘树民. 黄芩赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织 ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 26-33.
- [64] Xia ZY, Luo C, Liu BW, et al. Shengui Sansheng Pulvis maintains blood-brain barrier integrity by vasoactive intestinal peptide after ischemic stroke [J]. Phytomedicine, 2020, 67: 153158.
- [65] Xu M, Wu R, Liang Y, et al. Protective effect and mechanism of Qishiwei Zhenzhu pills on cerebral ischemia-reperfusion injury via blood-brain barrier and metabolomics [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110723.
- [66] Fu K, Zhang D, Song Y, et al. Tibetan Medicine Qishiwei Zhenzhu pills can reduce cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating gut microbiota and inhibiting inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 2251679.
- [67] 张伟. 参附汤对脑缺血后血脑屏障保护的协同增效作用以及机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [68] 张运克, 傅小欧, 李可. 麝香黄芩复方滴丸对缺血再灌注损伤大鼠脑组织紧密连接蛋白表达影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 1-5.
- [69] 钟高亮, 张晶晶. 多物种血脑屏障结构与功能研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 702-707.

[收稿日期] 2022-04-18

冯博,刘姿宇,李月,等. 岩藻糖基化与肿瘤多药耐药 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 113-118.

Feng B, Liu ZY, Li Y, et al. Fucosylation and multidrug resistance of tumors [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 113-118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.014

岩藻糖基化与肿瘤多药耐药

冯 博¹, 刘姿宇¹, 李 月¹, 刘立琨², 岳丽玲^{2*}

(1. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 岩藻糖基化是最常见的糖基化修饰之一,与癌症的发生发展及预后密切相关。有研究报道,岩藻糖基转移酶的变化与肿瘤多药耐药具有一定的相关性,肿瘤细胞多药耐药是影响临床化疗效果的最重要因素之一,常常导致治疗效果不佳、患者预后不良等。本文重点介绍了岩藻糖基转移酶家族成员及其催化的岩藻糖基化修饰与肿瘤多药耐药的相关性,简述了岩藻糖基化抑制剂对肿瘤的治疗作用,提出岩藻糖类物作为岩藻糖基化抑制剂有可能成为逆转肿瘤多药耐药的潜在药物,为将岩藻糖基化修饰作为临床肿瘤耐药逆转和增敏的药物靶点提供依据。

【关键词】 岩藻糖基化;岩藻糖基化抑制剂;多药耐药;恶性肿瘤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0113-06

Fucosylation and multidrug resistance of tumors

FENG Bo¹, LIU Ziyu¹, LI Yue¹, LIU Likun², YUE Liling^{2*}

(1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China.

2. Research Institute of Medical Sciences and Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006)

【Abstract】 Fucosylation is one of the most common glycosylation modifications that is closely related to the occurrence, development, and prognosis of cancer. A change in fucosyltransferase correlations with tumor multidrug resistance has been reported. Multidrug resistance of tumor cells is a major factor affecting chemotherapy efficacy, which often leads to a poor therapeutic effect and prognosis. This review focuses on the relationship between fucosyltransferase family members and their catalytic fucosylation modification and tumor multidrug resistance, briefly summarizes the therapeutic effect of fucosylation inhibitors on tumors, and describes fucosylation analogues as fucosylation inhibitors that may be potential drugs to reverse tumor multidrug resistance. This article provides a basis for fucosylation modification as a drug target to reverse and sensitize tumor drug resistance.

【Keywords】 fucosylation; fucosylation inhibitors; multidrug resistance; malignant tumor

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

糖基化是在酶的控制下,蛋白质或脂质附加糖类的过程,起始于内质网,结束于高尔基体。糖基化的异常改变能够促使肿瘤相关糖蛋白通过主动分泌释放入血,可作为一种非常理想的血清肿瘤生物标记物^[1]。蛋白质糖基化作为细胞内一种常见

的翻译后修饰^[2],对多种蛋白质的结构和功能产生影响。最近的研究表明,蛋白质糖基化的异常改变与多种肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)表型密切相关^[2]。

岩藻糖基化是蛋白质糖基化作用的一种重要

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81972491);黑龙江省省属本科高校中央支持地方高校改革发展基金(2020YQ06);黑龙江省卫生健康委科技计划(20220202040653)。

【作者简介】 冯博(1990—),女,硕士研究生,研究方向:药物抗肿瘤细胞多药耐药作用机制研究。E-mail:297375592@qq.com

【通信作者】 岳丽玲(1973—),女,教授,硕士生导师,研究方向:肿瘤分子药理学。E-mail:yuell1025@126.com

形式,与肿瘤的恶性进展密切相关^[3]。同时,有研究表明参与糖基化的酶即糖基转移酶(glycosyltransferase, GTs)在正常细胞和肿瘤细胞之间存在差异表达。一般情况下,肿瘤细胞中唾液酸转移酶和岩藻糖基转移酶的活力升高,而半乳糖基转移酶和乙酰氨基葡萄糖基转移酶的活力降低。使用化学药物治疗是肿瘤综合治疗过程中的一种重要手段,但肿瘤细胞在化学药物的作用下极易产生多药耐药导致化疗失败。本文重点就岩藻糖基化修饰在肿瘤多药耐药中的作用进行综述与分析,以期对指导临床化疗与研究提供参考。

1 岩藻糖基化与岩藻糖基转移酶家族

岩藻糖(fucose, Fuc)是细胞内的一种单糖,岩藻糖基化(fucosylation)是糖基化的一种表现形式,是在酶的控制下蛋白质或脂质附加上 Fuc 的过程。在结构上,聚糖中的岩藻糖分为三类:核心岩藻糖、Lewis 表位和 O-岩藻糖(O-FUT)。核心岩藻糖以 N-聚糖核心形式存在;Lewis 表位在 N-、O-聚糖或糖脂的非还原性末端表达;O-FUT 是通过将岩藻糖直接添加到多肽链中合成的。这些岩藻糖基化聚糖对于维持免疫和发育在内的多种细胞正常功能至关重要。此外,岩藻糖基化聚糖的异常表达或缺陷与疾病的发生发展密切相关,如慢阻肺、肿瘤和先天性糖基化障碍^[4-5]。

鸟苷二磷酸岩藻糖(GDP-L-fucose)是岩藻糖基化过程中的唯一底物,合成方法包括从头合成和补救合成。从头合成是岩藻糖合成中最重要的方法。D-葡萄糖是从头合成路线的底物,L-葡萄糖是补救合成路线的底物,两个途径经过一系列反应后都会生成 GDP-L-fucose,进入高尔基体内,在酶的催化下最终完成整个岩藻糖基化过程。在此过程中,涉及到几个限速酶:将鸟苷二磷酸甘露糖(GDP-D-mannose)转化为 GDP-L-fucose 的 GDP-L-岩藻糖合酶(Tissue specific transplantation antigen P35B, TSTA3, FX)以及在高尔基体中反应的限速酶—岩藻糖基转移酶(Fucosyltransferase, FUTs)。而在 FUTs 家族中,包括四个子家族,即 α -1,2 链接对应的 FUT1 和 FUT2, α -1,3、 α -1,4 链接对应的 FUT3、FUT4、FUT5、FUT6、FUT7、FUT9、FUT10 和 FUT11, α -1,6 键对应 FUT8 和蛋白质 O-FUT(包括 POFUT1 和 POFUT2 两种亚型),其中 FUT8 是 FUTs 家族中唯一催化核心岩藻糖基化的酶^[6]。

由 FUTs 家族催化的岩藻糖基化是糖蛋白重要的功能调控方式,直接影响细胞一系列生物学特性,研究表明,岩藻糖基化的异常改变通常与 FUTs 家族关系密切,且与肿瘤进展相关。FUT4 过表达可促进恶性肿瘤细胞的增值,而 FUT7 过表达可促进肝癌细胞生长,增强肝癌细胞凋亡敏感性^[7];FUT3 和 FUT6 表达降低抑制结肠癌细胞增殖^[8];FUT4 高表达促进肺癌侵袭、迁移、上皮-间质转化和细胞粘附,与肺腺癌患者的总体存活率低相关^[9];FUT7 具有高底物专一性,其通过合成唾液酸化的路易斯寡糖-X 抗原(sialyl Lewis-X, sLeX)而促进肿瘤细胞增殖、上皮-间质转化以及细胞迁移和侵袭^[10-11]。FUT6 和 FUT8 在肝癌细胞中高表达,与肿瘤的恶性进展呈正相关^[12]。在肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中, FUT8 基因以及核心岩藻糖修饰水平都有着明显的升高^[13],并且在肝癌和肺癌患者血清中可以检测到显著增加的核心岩藻糖修饰,表明核心岩藻糖基化可能为肿瘤的早期检测提供新的循环生物标志物^[14-15]。

2 岩藻糖基化与多药耐药

众所周知,在恶性肿瘤细胞接触一种抗癌药后,继而对两种甚至更多的结构不同、作用机制各异的其他抗癌药产生耐药现象,这种现象被称为多药耐药(MDR),而对于多数癌症的治疗来说 MDR 仍然是一大难关,已经成为癌症化疗失败的重要原因。越来越多的研究支持蛋白质糖基化在肿瘤耐药中发挥重要作用^[16]。

2.1 肺癌

吉非替尼(Gefitinib)是一种常用的肺癌化疗药物,它是一种表皮生长因子受体-酪氨酸激酶(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, EGFR-TK)抑制剂,是非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)的一线治疗药物^[17],这种药物的初始效果是比较让人满意的,但是在治疗后 1~2 年内会显现出耐药性,导致最终治疗效果不佳和预后不良^[18]。值得注意的是,在酪氨酸激酶抑制剂耐药的肺癌细胞中,表皮生长因子受体(EGFR)的核心岩藻糖基化增加了 EGF 介导的细胞生长和对吉非替尼的敏感性^[19],表明 EGFR 岩藻糖基化状态可能是决定吉非替尼敏感性的一个重要因素。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是经典的肿瘤耐药相关分子,研究表明,糖基化修饰可通过稳定 P-gp 蛋白功

能活性构象、增加细胞膜定位等机制,增强 P-gp 蛋白外排能力,最终导致肿瘤细胞耐药性的产生^[20-21]。Ding 等^[22]证实在紫杉醇耐药肺癌 A549/T 细胞中 FUT4 和 P-gp 的表达远高于亲本 A549 细胞,是与耐药性相关的潜在治疗靶点,而倍半萜内酯可通过抑制肺癌细胞肺腺癌转移相关转录物 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma tran 1, MALAT1)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)/FUT4 轴和 P-gp 转运体克服紫杉醇耐药性。

2.2 乳腺癌

在乳腺癌的治疗中,化疗耐药仍然是临床治疗中的重要阻碍,如曲妥珠单抗(Trastuzumab)是乳腺癌治疗中的常用药物,这种药物主要用于治疗人表皮生长因子受体 2 (epidermal growth factor receptor 2, erbB-2, HER2) 阳性表型的乳腺癌,可以降低手术患者的死亡风险,但是,多数患者会在治疗一年之内表现出耐药性^[23]。有报道称一些乳腺癌不良预后的预测标志物在乳腺癌中的表达过度增加,这些标志物的表达升高可能与细胞的多药耐药性相关^[24]。还有报道称 FUT4 调节的岩藻糖基化可促进乳腺癌细胞的多药耐药^[25]。对乳腺癌 T47D 和 T47D/ADR 细胞的岩藻糖基转移酶基因表达谱分析表明,FUT4 在阿霉素耐药细胞 T47D/ADR 中表达显著升高,并在体内影响乳腺癌的耐药表型,其机制可能是 miR-224-3p 通过靶向 FUT4 介导了乳腺癌细胞的多药耐药。同时,FUT4 的过表达也显著增强了 T47D 细胞对长春新碱、阿霉素和紫杉醇的耐药性^[25]。

2.3 肝癌

肝癌的一线治疗药物索拉菲尼(Sorafenib),这是一种多靶点的激酶抑制剂,但是患者常在 6 个月内就产生获得性耐药性(区别于天然耐药,获得性耐药是指对药物治疗有初始反应,但在接受治疗后,肿瘤产生了耐药性,这可能与肿瘤微环境的改变有关),因而降低了药物的疗效^[26-27];另一种治疗肝癌的药物多西紫杉醇,这种药物可以抑制肿瘤细胞的有丝分裂,有研究表明,FUT 家族通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (Phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路介导人肝癌多药耐药,调节肝癌细胞对多西紫杉醇的敏感性;还有一种抗肿瘤的常见药物 5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU),这种药物是通过抑制 DNA 合

成发挥作用,但是对于 5-FU 而言,耐药性也是临床上亟待解决的问题,研究发现,FUT4、FUT6 和 FUT8 的过度表达是肝癌 BEL7402 细胞和 5-FU 耐药 BEL/FU 细胞体外和体内耐药表型改变的原因,FUTs 所介导的多药耐药是通过激活 PI3k/Akt 通路和多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance associated protein 1, MRP1) 的表达增加肝癌细胞对 5-FU 的耐药性^[28]。

2.4 卵巢癌

在卵巢癌的治疗中,顺铂(cisplatin, cDDP)是一线常用的药物,这种药物会对 RNA、蛋白质、DNA 都有不同程度的作用,会导致 DNA 损伤和细胞骨架结构的改变^[29]。在使用铂类药物的治疗过程中,大多数患者效果良好,但是复发率高且复发后耐药性会大幅度提升^[30]。有研究表明高核心岩藻糖基化抑制了铜转运蛋白 1 (copper transporter 1, CTR1) 与 cDDP 之间的相互作用,从而影响了 cDDP 的摄取,导致 cDDP 耐药性的产生^[31],而在耐 cDDP 卵巢癌患者血清中的 CTR1 核心岩藻糖基化水平显著增加,这对 cDDP 耐药患者的判断具有指导意义。晚期卵巢癌的治疗以紫杉醇联合铂类化合物为主^[32],而癌细胞对于紫杉醇的耐药性也在近年来受到了广泛的关注,其中 FUTs 也可能通过抑制半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族的激活来增强卵巢癌细胞的紫杉醇耐药性。此外,FUT1 和 FUT2 的过度表达促进了人卵巢癌细胞的增殖和对 5-FU、卡铂(Carboplatin, CBP)等抗癌药物的耐药^[33]。

除上述列举的几种癌症外,其它癌症如前列腺癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌等在治疗过程中产生的多药耐药也是临床上影响患者生存和预后的重要阻碍,但其与 FUTs 家族的关系尚不完全明确。

3 岩藻糖类似物与含岩藻糖的天然药物

3.1 岩藻糖类似物

岩藻糖类似物(fucose analogues)是一类用化学修饰的方法对岩藻糖进行结构改造后得到的与细胞内岩藻糖结构相似的产物,这类物质可以用来标记识别细胞内的岩藻糖基化,更重要的是,现今开发出的一些岩藻糖类似物可能对细胞内岩藻糖异常糖基化有抑制作用,达到抗肿瘤增值或侵袭的目的。

随着对细胞内 Fucosylation 研究的逐渐深入,对于 Fucose analogues 的研究也逐渐火热。2016 年,

Kizuka 等^[34]发现 7-呋基-Fuc (7-Alk-Fuc) 在细胞中可以标记岩藻糖且细胞毒性较低;2017 年他们又报道了 6-Alk-Fuc 可被广泛用作岩藻糖基化检测的探针,在研究中发现,它还是一种有效地岩藻糖基化抑制剂(fucosylation inhibitor),可以有效的抑制细胞内的岩藻糖基化进程,且其效力强于 2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖 (2-Deoxy-2-fluoro-L-fucose, 2-F-Fuc, 2FF)^[4]。这种抑制剂直接作用于 FX 阻止肝癌的侵袭,说明岩藻糖基化对于癌症的早期诊断和治疗具有潜在的用途^[4]。

2-F-Fuc 是一种含氟基的岩藻糖基化抑制剂,可以影响细胞的迁移和侵袭能力。给小鼠注射 2-F-Fuc 后,细胞的 Fucosylation 水平降低,肿瘤细胞的生长受到显著抑制,用高浓度 2-F-Fuc 培养的 CHO 细胞核心岩藻糖基化显著降低^[35]。研究表明,过乙酰化的 2-F-Fuc 处理后 TSTA3 表达降低,其原因可能是通过补救途径从 2-F-Fuc 积累的 GDP-2F-Fuc 通过负反馈回路关闭了 GDP-L-岩藻糖的从头合成,从而导致核岩藻糖基化结构的减少,并证明岩藻糖基化抑制剂可通过阻断食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)异常岩藻糖基化抑制肿瘤转移^[36]。同时,Fucosylation 抑制剂在动物试验中也显示出效用,如 2-F-Fuc 治疗的小鼠血清含有更有效地介导肿瘤细胞溶解的非岩藻糖基化抗体(Non fucosylated antibody)(岩藻糖基化抗体是指在岩藻糖基化相关酶的催化下在抗体蛋白上加入岩藻糖,非岩藻糖基化抗体则与之相对),2-F-Fuc 治疗小鼠外周血中产生的肿瘤特异性 I 型 T 细胞可增强抗肿瘤活性,所以,口服 2-F-Fuc 可以抑制或预防小鼠的癌症发展,表明在癌症预防或辅助治疗方面有潜在的用途^[37]。还有一种 6-三氟代甲基岩藻糖(6,6,6-3F-Fuc)也可以在一定程度上阻断细胞内的 Fucosylation^[38]。6,6,6-3F-Fuc 通过降低细胞中表达的重组抗体岩藻糖基化程度,抑制 GDP-甘露糖 4,6 脱氢酶(GDP-mannose 4,6-dehydrogenase, GMD)在 Fuc 从头合成中的活性^[39]。

3.2 岩藻糖的天然药物

海参硫酸软骨素(sea cucumber chondroitin sulfate, SC-CHS)是一种海参多糖,研究发现,SC-CHS 作为一种带有岩藻糖支链的天然酸性黏多糖,硫酸化程度高,有着不同于其它动物体内硫酸软骨素的生物活性。在很早的研究中发现,SC-CHS 具有抗凝血作用,这种作用依赖于其成分中的岩藻糖

支链和硫酸酯含量较高,这两种成分正是 SC-CHS 发挥作用的关键。

近年来的研究发现,刺参硫酸软骨素也能显著抑制小鼠乳腺癌细胞的生长,动物实验表明,它能抑制肿瘤细胞向小鼠肺组织的转移。研究还表明,海参硫酸软骨素经化学处理后,体内外对岩藻糖支链的抑制作用消失,表明岩藻糖支链在海参硫酸软骨素的生理活性中起着关键作用^[40]。还有研究表明,SC-CHS 具有体外抗肿瘤活性、促进细胞凋亡、抗肿瘤转移以及抑制肿瘤血管新生的作用,而在小鼠体内实验中也具有抑制肿瘤生长和转移的作用^[41]。这些研究为含岩藻糖药物对肿瘤的抑制作用提供了实验依据,为研究含岩藻糖药物是否可能通过抑制肿瘤细胞中的岩藻糖基化对肿瘤 MDR 产生抑制作用开拓了新的思路,为开发新的抗肿瘤生物因子提供了理论依据。

4 小结和展望

总的来说,糖基化作为蛋白翻译后修饰的方式之一,参与肿瘤细胞对化疗药物的泵出、摄入及吸收代谢,细胞凋亡、DNA 损伤修复、上皮细胞-间充质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)等多种肿瘤耐药机制^[42]。尤其是近年来对于 FUTs 家族的关注更加广泛,它们通过多种信号通路及机制促进肿瘤细胞的 MDR,导致患者治疗效果不佳或预后不良,为临床治疗增加了难度。

虽然在体外实验中,对岩藻糖基化抑制剂的研究显示其对肿瘤 MDR 有一定的抑制作用,但仍然需要更多的体内实验来证明药物的效果和安全性。含岩藻糖的天然药物和岩藻糖基化抑制剂作为有潜力的抗肿瘤药物,有望为继续研究蛋白质糖基化修饰与肿瘤 MDR 的分子机制以及两者之间的关联提供更好的选择,也可为开发新的肿瘤分子靶点、肿瘤临床疗效评定、治疗肿瘤 MDR 提供更好的策略。

参考文献:

- [1] Bastian K, Scott E, Elliott DJ, et al. FUT8 α -(1,6)-fucosyltransferase in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(1): 455.
- [2] Oliveira-Ferrer L, Legler K, Milde-Langosch K. Role of protein glycosylation in cancer metastasis [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44: 141-152.
- [3] Scott DA, Drake RR. Glycosylation and its implications in breast cancer [J]. Expert Rev Proteomic, 2019, 16(8): 665-680.

- [4] Kizuka Y, Nakano M, Yamaguchi Y, et al. An Alkynyl-Fucose halts hepatoma cell migration and invasion by inhibiting GDP-fucose-synthesizing enzyme FX, TSTA3 [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(12): 1467–1478.
- [5] Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, et al. Fucosylated antigens in cancer: An alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 39.
- [6] Fujita K, Hatano K, Hashimoto M, et al. Fucosylation in urological cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 133.
- [7] Cong J, Gong J, Yang C, et al. MiR-200c/FUT4 axis prevents the proliferation of colon cancer cells by downregulating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 2.
- [8] Yang X, Zhang Z, Jia S, et al. Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2007, 39(9): 1722–1730.
- [9] Lu H, Lin S, Weng RR, et al. Fucosyltransferase 4 shapes oncogenic glycoproteome to drive metastasis of lung adenocarcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2020, 57: 102846.
- [10] Qin H, Liu J, Yu M, et al. FUT7 promotes the malignant transformation of follicular thyroid carcinoma through α 1, 3-fucosylation of EGF receptor [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 393(2): 112095.
- [11] Liang J, Gao W, Cai L. Fucosyltransferase VII promotes proliferation via the EGFR/AKT/mTOR pathway in A549 cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 3971–3978.
- [12] Li C, Xin Z, He L, et al. eFUT8 promotes liver cancer progression by miR-548c/FUT8 axis [J]. *Signal Transduct Tar*, 2021, 6(1): 30.
- [13] Liu D, Gao Z, Yue L. Fucosyltransferase 8 deficiency suppresses breast cancer cell migration by interference of the FAK/integrin pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2019, 25(4): 303–311.
- [14] Norton PA, Mehta AS. Expression of genes that control core fucosylation in hepatocellular carcinoma: systematic review [J]. *World J Gastroentero*, 2019, 25(23): 2947–2960.
- [15] Leng Q, Tsou J, Zhan M, et al. Fucosylation genes as circulating biomarkers for lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin*, 2018, 144(11): 2109–2115.
- [16] Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, et al. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: adding glycosylation to the equation [J]. *Drug Resist Update*, 2016, 24: 34–54.
- [17] Hsiue EH, Lee J, Lin C, et al. Safety of gefitinib in non-small cell lung cancer treatment [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2016, 15(7): 993–1000.
- [18] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380–2388.
- [19] Liao C, An J, Yi S, et al. FUT8 and protein core fucosylation in tumours: from diagnosis to treatment [J]. *J Cancer*, 2021, 12(13): 4109–4120.
- [20] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 48–58.
- [21] Molnár J, Kars MD, Gündüz U, et al. Interaction of tomato lectin with ABC transporter in cancer cells; glycosylation confers functional conformation of P-gp [J]. *Acta Histochem*, 2009, 111(4): 330–334.
- [22] Ding Y, Zhen Z, Nisar MA, et al. Sesquiterpene lactones attenuate paclitaxel resistance via inhibiting MALAT1/STAT3/FUT4 axis and P-Glycoprotein transporters in lung cancer cells [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 795613.
- [23] Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 [J]. *New Engl J Med*, 2001, 344(11): 783–792.
- [24] Aloia A, Petrova E, Tomiuk S, et al. The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features [J]. *Breast Cancer Res Tr*, 2015, 17(1): 146.
- [25] Feng X, Zhao L, Gao S, et al. Increased fucosylation has a pivotal role in multidrug resistance of breast cancer cells through miR-224-3p targeting FUT4 [J]. *Gene*, 2016, 578(2): 232–241.
- [26] Cheng A, Kang Y, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10(1): 25–34.
- [27] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *New Engl J Med*, 2008, 359(4): 378–390.
- [28] Li BO, Su S, Zhang M, et al. Effect of GnT-V knockdown on the proliferation, migration and invasion of the SMMC7721/R human hepatocellular carcinoma drug-resistant cell line [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 469–476.
- [29] Zeng W, Zheng S, Mao Y, et al. Elevated N-Glycosylation contributes to the cisplatin resistance of non-small-cell lung cancer cells revealed by membrane proteomic and glycoproteomic analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 805499.
- [30] Markman M. Combination versus sequential cytotoxic chemotherapy in recurrent ovarian cancer: Time for an evidence-based comparison [J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 118(1): 6–7.
- [31] Lv X, Song J, Xue K, et al. Core fucosylation of copper transporter 1 plays a crucial role in cisplatin-resistance of epithelial ovarian cancer by regulating drug uptake [J]. *Mol Carcinogen*, 2019, 58(5): 794–807.
- [32] González-Martín A, Sánchez-Lorenzo L, Bratos R, et al. First-line and maintenance therapy for ovarian cancer: Current status and future directions [J]. *Drugs*, 2014, 74(8): 879–889.
- [33] Iwamori M, Tanaka K, Kubushiro K, et al. Alterations in the glycolipid composition and cellular properties of ovarian carcinoma-derived RMG-1 cells on transfection of the α 1, 2-fucosyltransferase gene [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(1): 26–30.
- [34] Kizuka Y, Funayama S, Shogomori H, et al. High-sensitivity

- and low-toxicity fucose probe for glycan imaging and biomarker discovery [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(7): 782–792.
- [35] Burkart MD, Vincent SP, Duffels A, et al. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 8(8): 1937–1946.
- [36] Zhang L, Gao Y, Zhang X, et al. TSTA3 facilitates esophageal squamous cell carcinoma progression through regulating fucosylation of LAMP2 and ERBB2 [J]. *Theranostics*, 2020, 10(24): 11339–11358.
- [37] Disis ML, Corulli LR, Gad EA, et al. Therapeutic and prophylactic antitumor activity of an oral inhibitor of fucosylation in spontaneous mammary cancers [J]. *Mol cancer ther*, 2020, 19(5): 1102–1109.
- [38] Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT, et al. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome [J]. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(7): 661–668.
- [39] Allen JG, Mujacic M, Frohn MJ, et al. Facile modulation of antibody fucosylation with small molecule fucostatin inhibitors and cocrystal structure with GDP-mannose 4, 6-dehydratase [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(10): 2734–2743.
- [40] Borsig L, Wang L, Cavalcante MCM, et al. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20): 14984–14991.
- [41] 李辉. 岩藻糖基化海参硫酸软骨素抑制肿瘤生长和转移作用及其机制的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- [42] 胡一, 何东, 曹科, 等. 蛋白糖基化修饰在肿瘤多药耐药中的作用 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(23): 1223–1226.
- [收稿日期] 2022-04-21

(上接第 84 页)

也方便了缺乏超声经验的研究人员更快的操作超声检测大鼠甲状腺疾病,为进一步研究甲状腺疾病动物模型的发病机制和药物筛选提供了保障。

参考文献:

- [1] 赖倚文. 癭肿消软膏剂开发及穴位贴敷治疗结节性甲状腺肿的临床研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [2] 潘雅婧, 张秋娥, 张程斐, 等. 甲炎康泰颗粒剂对自身免疫性甲状腺炎大鼠免疫相关细胞因子的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 77–83.
- [3] 李咏泽. 中国成人甲状腺疾病与糖尿病患病率及危险因素的流行病学研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [4] 连小兰. 美国《甲状腺结节和分化型甲状腺癌诊治指南 (2006)》解读 [J]. *中国实用外科杂志*, 2007, 22(12): 933–936.
- [5] 白耀. 甲状腺病学 [M]. 北京: 科学技术文献出版社; 2003.
- [6] 周建桥, 詹维伟. 2020 年中国超声甲状腺影像报告和数据系统 (C-TIRADS) 指南解读 [J]. *诊断学理论与实践*, 2020, 19(4): 4.
- [7] 顾诗瑶, 黄瑛. 应用超声引导下甲状腺细针穿刺技术比较四种临床指南的诊断效果 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2019, 27(11): 5.
- [8] Tamura M, Kimura H, Koji T, et al. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. a possible involvement of Fas system [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(8): 3646–3653.
- [9] 刘彤华. 诊断病理学. 第三版 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2013.
- [10] 夏宗霄, 刘海鹏, 张艳娇, 等. 甲状腺疾病动物模型的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(2): 87–93.
- [11] Sun J, Hui C, Xia T, et al. Effect of hypothyroidism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive function of pregnant rats [J]. *BMC Endocr Disord*, 2018, 18(1): 30.
- [12] Alayoubi A, Sullivan RD, Lou H, et al. *In vivo* evaluation of transdermal iodide microemulsion for treating iodine deficiency using sprague dawley rats [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2016, 17(3): 618–30.
- [13] Li J, Liu Z, Zhao H, et al. Alterations in atrial ion channels and tissue structure promote atrial fibrillation in hypothyroid rats [J]. *Endocrine*, 2019, 65(2): 338–347.
- [收稿日期] 2022-05-05

吴芳杉,马科锋,崔博. GLAST 与神经系统疾病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 119-124.
Wu FS, Ma KF, Cui B. Research progress of GLAST and nervous system diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 119-124.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.015

GLAST 与神经系统疾病的研究进展

吴芳杉^{1,2}, 马科锋¹, 崔博^{1,2*}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050;
2. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053)

【摘要】 谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性神经递质。生理情况下,谷氨酸发挥信号传导等重要功能;病理情况下,细胞外谷氨酸异常堆积,易造成细胞毒性水肿、神经元变性死亡等一系列兴奋性毒性损伤,导致各种神经系统疾病,如帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫、视网膜损伤和听力损失等。谷氨酸-天冬氨酸转运蛋白 (glutamate-aspartate transporter, GLAST) 作为主要的兴奋性谷氨酸转运蛋白之一,可以维持谷氨酸浓度使其呈最适细胞外水平,防止谷氨酸在突触间隙堆积产生兴奋性毒性。本篇综述对 GLAST 在神经系统疾病的研究进展进行了归纳,以便增加对 GLAST 相关机制的了解。

【关键词】 谷氨酸;兴奋性毒性;谷氨酸-天冬氨酸转运蛋白;神经系统疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0119-06

Research progress of GLAST and nervous system diseases

WU Fangshan^{1,2}, MA Kefeng¹, CUI Bo^{1,2*}

(1. Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Tianjin 300050, China. 2. School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang 261053)

【Abstract】 Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system. Under physiological conditions, glutamate plays an important role in signal transduction. Under pathological conditions, abnormal accumulation of extracellular glutamate can easily cause a series of excitotoxic injuries such as cytotoxic edema, degeneration and death of neurons, leading to various nervous system diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, epilepsy, retinal damage, and hearing loss. Glutamate-aspartate transporter (GLAST) is one of the main excitatory glutamate transporters that maintains the concentration of glutamate at the optimal extracellular level, which prevents glutamate from accumulating in the synaptic space to produce excitotoxicity. This review clarifies the research progress of GLAST in nervous system diseases to understand GLAST-related mechanisms.

【Keywords】 glutamate; excitotoxicity; glutamate-aspartate transporter; nervous system disease

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

谷氨酸是一种神经系统兴奋性神经递质,它可以启动快速信号转导,参与学习、记忆以及突触可塑性^[1-2]。然而若细胞外谷氨酸异常堆积,过度刺激谷氨酸受体,可导致 Ca^{2+} 和 Na^{+} 持续内流,细胞内钙超载,水分增加,进而造成细胞毒性水肿,神经元

变性死亡等^[3]。这会造成一系列的神经系统疾病,如:帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫等^[4]。显然,维持谷氨酸稳态是抵抗谷氨酸兴奋性毒性的有效途径。

Na^{+} 依赖的兴奋性氨基酸转运蛋白 (excitatory

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81673136); 军事医学研究院创新基金 (2018CXJJ05)。

【作者简介】 吴芳杉 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 噪声性听力损失的研究。E-mail: 3448780652@qq.com

【通信作者】 崔博 (1978—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 军事作业医学研究。E-mail: iamcuib@sina.com

amino acid transporters, EAAT) 是细胞外谷氨酸转运的重要蛋白,起到谷氨酸再摄取的作用,维持细胞外间隙谷氨酸水平的稳定。目前,EAAT 已被克隆出 Na^+ 依赖的 5 种亚型:EAAT1 (GLAST)、EAAT2 (glutamate transporter-1, GLT-1)、EAAT3 (excitatory amino acid carrier, EAAC1)、EAAT4 和 EAAT5^[5-6]。在中枢神经系统中 GLAST 和 GLT-1 主要在星形胶质细胞中表达,EAAC1、EAAT4 和 EAAT5 主要在神经元中表达^[7]。在神经系统中,一些谷氨酸转运蛋白的定位与表达在不同脑区可能是不同的,调控谷氨酸传递的作用也是不同的^[8]。其中,星形胶质细胞通过 GLT-1 和 GLAST 摄取突触间隙中高达 80% 的谷氨酸^[3]。生理情况下,GLAST 再摄取谷氨酸的能力略次于 GLT-1,但是当 GLT-1 再摄取能力被阻断时,GLAST 再摄取谷氨酸的能力却增加了^[9]。对于谷氨酸的调控是预防兴奋性毒性的关键,而谷氨酸转运蛋白如 GLAST 的调节恰恰是其中的关键一环。

1 GLAST 结构与功能

早期研究发现,GLAST 在分子学层面是一种膜拓扑学结构,可能由 6 个跨膜的 α -螺旋和 4 个较短的跨膜结构域形成 1 个 β -折叠结构^[10]。GLAST 的人类同源物为 EAAT1,人类基因根据 SLC 家族命名,SLC1A3 编码 EAAT1^[11]。其在小脑中表达最高,定位于星形胶质细胞膜表面^[12]。

GLAST 是一种膜溶质载体蛋白,它通过转运三个钠离子(Na^+) 和一个质子(H^+) 以及反向转运一个钾离子(K^+) 来介导细胞对谷氨酸的再摄取,以参与神经元兴奋性毒性损伤的调节^[13-14]。GLAST 与 GLT-1 重摄取胞外谷氨酸,在谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 的作用下转变为无毒的谷氨酰胺。而目前发现似乎 GS 只定位在星形胶质细胞上。在细胞外没有发现专门用于分解谷氨酸的酶。细胞外谷氨酸可以维持在正常水平完全依赖于 Na^+ 依赖的谷氨酸转运蛋白^[3]。在外周神经系统中则主要是 GLAST 的再摄取作用。GLAST 作为调节胞外谷氨酸浓度的主要转运蛋白之一,其在谷氨酸兴奋性毒性的调节方面,作用不容小觑。

2 GLAST 与神经系统疾病

在神经系统中,兴奋性神经元与抑制性神经元维持平衡,才可以使神经系统维持正常功能。平衡

被打破,然后造成一系列的神经系统病变。正常情况下,胶质细胞中谷氨酸转运蛋白可以维持谷氨酸稳态,阻止谷氨酸兴奋性毒性损伤^[15]。若胶质细胞对谷氨酸的再摄取和反应能力受损,会产生相应神经系统疾病^[16]。

2.1 GLAST 与中枢神经系统疾病

2.1.1 GLAST 与帕金森病 (Parkinson's disease, PD)

PD 是一种常见的神经系统变性疾病,中脑黑质多巴胺 (Dopamine, DA) 能神经元的变性死亡是其典型的病理改变^[17]。而多巴胺缺乏会导致丘脑底核的去抑制,丘脑底核神经元为黑质致密部中含有谷氨酸受体的 DA 能神经元提供兴奋性神经支配,其中谷氨酸作为兴奋性递质的角色存在。这又加重了 DA 能神经元的变性^[18]。说明谷氨酸稳态失衡与帕金森病发病机制相关。谷氨酸被释放到细胞外,作用于突触后受体发挥作用。N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体是最有代表性的介导兴奋性毒性的离子型受体之一,过度活化的 NMDA 受体引起大量 Ca^{2+} 流入神经元,最终引起 DA 能神经元损伤。临床上 NMDA 受体拮抗剂药物的应用,表明抑制谷氨酸能过度活化是治疗帕金森病的有效策略^[19]。Salvatore 等^[9] 发现,在 PD 模型中,黑质纹状体神经元丢失,谷氨酸浓度增加,GLT-1 介导的主要的谷氨酸再摄取途径被阻断,然而却发现 GLAST 的再摄取能力出现短暂增强,也增加了整体谷氨酸摄取能力。这可以抵抗发病初期谷氨酸浓度的增加,使神经元损伤得到缓解,这为 GLAST 介导的谷氨酸再摄取提供了新思路。

2.1.2 GLAST 与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)

AD 是一种以认知功能下降为主的神经系统退行性疾病,一般起病时不易被察觉。AD 发病时,病理上表现为神经元变性丢失和淀粉样蛋白斑块的形成^[20]。中枢神经系统的兴奋性调节主要靠星形胶质细胞调节 Na^+ 依赖的兴奋性氨基酸转运蛋白 GLT-1 和 GLAST 来实现的^[21]。Schallier 等^[22] 研究发现 8 月龄 APP23 小鼠皮层和海马中,GLAST 和 GLT-1 表达降低,而皮层中囊泡谷氨酸转运蛋白 1 (the vesicular glutamate transporters, vGLUT1) 表达显著增加。谷氨酸释放增多、转运蛋白表达减少,理论上细胞外谷氨酸浓度是增加的。但是与野生型小鼠相比,其细胞外谷氨酸水平是降低的,说明谷

氨酸转运蛋白的活性可能并不只受到表达变化这一种调控。而 18 月龄 APP23 小鼠皮层和海马中 GLT-1 表达与野生型小鼠相比是降低的,但是 GLAST 的表达基本不变,这表明 AD 中谷氨酸改变可能主要通过 GLT-1 实现,但是显然在 AD 发病初期, GLAST 也是参与其中的。Han^[23] 等研究发现 $A\beta_{1-42}$ 的低聚物可以降低 EAAT1 的表达,而胰岛素可以恢复这一趋势,提高 EAAT1 的表达。而目前人们已认可淀粉样蛋白 β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$) 是 AD 的潜在生物学标志物之一^[24]。AD 因与糖尿病具有许多共同的病理特征,被称为“3 型糖尿病”,胰岛素信号传导受损出现在 AD 早期阶段,胰岛素对于 AD 有一定的保护作用^[25]。由此可见,EAAT1 在 AD 的预防与治疗方面都有潜在作用^[26]。

2.1.3 GLAST 与癫痫(Epilepsy)

癫痫发作代表着整个兴奋性神经元群的同步放电失控,会导致大量谷氨酸释放和兴奋性神经毒性^[27]。早在 1993 年,During 等^[28]通过微透析探针的方法检测发现癫痫患者发病时透析液中谷氨酸盐浓度持续增加,从而指出谷氨酸浓度过高与癫痫发病机制相关。Watanabe 等^[29]发现,诱导谷氨酸转运蛋白 GLAST 缺陷小鼠模型会导致癫痫发作。Doi 等^[30]发现点燃癫痫模型中,完全点燃的 SD 大鼠在最后一次癫痫发作 1 d 和 30 d 分别检测海马 GLAST、GLT-1 等的表达,发现在 1 d 它们表达均显著升高,而 30 d 谷氨酸转运蛋白与对照组相比没有变化。这些结果表明 GLAST、GLT-1 等可能参与了癫痫的发生,但是与癫痫的维持状态无关。Sun 等^[31]发现,Neo1 (neogenin) 在癫痫患者海马中表达是降低的,动物模型中显示 Neo1 条件性敲除 (Neo1KO) 会增加小鼠癫痫易感性,而 Neo1KO 鼠海马星形胶质细胞中 GLAST 也是降低的。免疫共沉淀显示 Neo1KO 与 GLAST 形成了复合物。过表达 Neo1 GLAST 恢复;过表达 GLAST 可以恢复谷氨酸摄取和谷氨酰胺合成,并且降低了癫痫反应。由此可见, GLAST 表达的变化与癫痫发作密切相关,很有可能是癫痫的易感因素之一。Taspinar 等^[32]研究发现点燃癫痫模型中, GLAST 等表达在前期增加,但再摄取谷氨酸时间延长,说明增加的谷氨酸转运蛋白的表达已不足以清除多余的谷氨酸。而丙戊酸或头孢曲松治疗组, GLAST 蛋白表达是增加的,并将再摄取时间缩短到几乎和对照组相当,说明丙戊酸或头孢曲松可能是通过增加 GLAST 等谷氨酸

转运蛋白的表达,来调节谷氨酸,进而治疗癫痫的。

2.2 GLAST 与外周神经系统疾病

2.2.1 GLAST 与视网膜病变

研究发现视觉、听觉感受器的突触功能是有调节性的,需要感受细胞持续、分级释放囊泡,由此进化出带状突触结构^[33]。光感受器的带状突触结构持续性释放谷氨酸,使突触间隙谷氨酸持续升高,持续有效的谷氨酸摄取显得尤为重要,因此在视网膜中 EAAT 是高度表达的。Müller 细胞是调节细胞外递质、保持突触正常传递的重要细胞,视网膜的谷氨酸摄取主要是通过 Müller 细胞上的 GLAST 实现的^[34]。研究表明 GLAST 缺陷小鼠出现了正常眼压青光眼样表型,表明 GLAST 功能障碍可能是青光眼患者视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGC) 丢失的原因^[35]。Ma 等^[36]发现高糖环境,活性氧产生增加,降低了 GLAST 的表达,降低了 Müller 细胞对谷氨酸的摄取。于是通过继续下调 TRPC6 通道,抑制高糖条件下活性氧的产生,发现这种情况下促进了 GLAST 的表达,提高了高糖条件下 Müller 细胞对谷氨酸的摄取活性,减缓了视网膜损伤,证明 GLAST 对 RGC 的保护作用。

2.2.2 GLAST 与听力损失

耳蜗中存在重要的谷氨酸循环机制:谷氨酸自内毛细胞释放后,由耳蜗支持细胞上的 GLAST 再摄取到支持细胞中,在谷氨酰胺合成酶的作用下谷氨酸转变为无毒的谷氨酰胺。谷氨酰胺被释放出细胞后,又被内毛细胞摄取,在磷酸化的谷氨酰胺酶的作用下变为谷氨酸,来填补谷氨酸递质池,完成谷氨酸-谷氨酰胺循环^[37-38]。谷氨酸过度堆积,产生兴奋性毒性,造成耳蜗带状突触损伤^[39]。GLAST 作为此循环的重要转运蛋白可以维持细胞外谷氨酸平衡,避免耳蜗细胞的兴奋性毒性损伤^[40]。因此, GLAST 缺陷小鼠提供了一个体内模型,用于研究听力损失的兴奋性毒性机制。Hakuba 等^[41]发现, GLAST 缺陷小鼠外淋巴液中谷氨酸的浓度增加,其听力损失会加重,这与 GLAST 参与的谷氨酸循环被抑制有关。Tserga 等^[42]发现 GLAST 敲除小鼠与野生型小鼠相比,听性脑干反应 (auditory brainstem response, ABR) I 波振幅降低,小鼠突触对减少。最近研究发现短时中等强度的噪声暴露会导致暂时性听力阈移,损伤耳蜗带状突触,这一般认为是谷氨酸毒性造成的^[43]。研究中发现小鼠在噪声暴露后先出现 GLAST 增高趋势,虽然并无显著

差异,但是在 GLAST 增高时兴奋性毒性是降低的。所以对于隐性听力损失中 GLAST 表达的深入研究是有必要的。

3 GLAST 作用机制

目前对于 GLAST 调控机制的了解并不十分清楚,以往研究发现许多 GLAST 的正性和负性调控因子,也发现参与调控的相关通路,这表明 GLAST 是复杂的、多通路共同调节的。

3.1 JAK-STAT 通路

JAK-STAT 通路是多种细胞因子和生长因子的主要信号传导机制。一些研究发现 JAK-STAT 通路在神经系统疾病中发挥重要作用。JAK2 和 STAT3 在神经系统胶质细胞和海马神经元中有表达,与一些神经退行性疾病的发展密切相关^[44]。在单次延长应激 (single-prolonged stress, SPS) 干预的创伤后应激障碍 (post-traumatic stress disorder, PTSD) 的大鼠模型中,大鼠脑脊液中谷氨酸浓度升高, GLAST 表达降低, JAK/STAT 3 通路被抑制。而成纤维细胞生长因子 2 (Fibroblast growth factor 2, FGF2) 可以改善这一现象^[45]。说明 FGF2 可能也是 GLAST 的正性调控因子,并且可能是通过 JAK/STAT 通路来调节 GLAST 的。在大鼠注射红藻氨酸 (kainic acid, KA) 诱发的癫痫模型中发现,与未进行任何处理的对照组相比, p-JAK1 和 p-STAT3 的表达有所增加, GLAST 的表达也是增加的;而与 KA 或 NC + KA (NC:空白载体) 相比,过表达 UCA1 (一类长链非编码 RNA) 组抑制了 p-JAK1 和 p-STAT3 的表达,也抑制了海马星形胶质细胞中 GLAST 的表达^[46]。许多研究提示谷氨酸通过激活 STAT3 (p-STAT3) 在触发 GLAST 表达上调中起作用, JAK/STAT 失活抑制星形胶质细胞功能^[45-47]。

3.2 DAG-PKC 通路

研究发现,鸡的贝格曼胶质细胞谷氨酸暴露培养后, PKC 激活剂可显著降低 GLAST 转运蛋白的活性,并降低其 mRNA 水平;而 PKC 抑制剂可以阻断这种变化。且发现谷氨酸受体激活介导了 chglast 启动子的转录活性^[48]。GLAST 长期调节显然涉及转录调控。Gosselin 等^[49]发现 PKC 的激活导致星形胶质细胞谷氨酸转运减少,与 EAAT1 分布发生变化有关;并证明 PKC 控制 EAAT1 到细胞外微泡的途径。

3.3 P38-MAPK 通路

Yadav 等^[50]综述中指出肌萎缩侧索硬化的致

病机制有多种,其中包括谷氨酸兴奋性毒性。而 p38- α MAPK 主要调节 p38 MAPK 通路激活产生的一些对机体不利影响,其中包括调节兴奋性毒性、活性氧反应和神经元凋亡等。可见, p38- α MAPK 的上调与谷氨酸兴奋性毒性之间存在调节关系。Wu 等^[51]发现糖尿病视网膜病变状态下 GLAST 和 GS 的表达下调。Raf-1 激酶抑制蛋白 (Raf-1 kinase inhibition protein, RKIP) 的表达导致 GLAST 表达上调,提示 RKIP 与兴奋性毒性调节有关。而研究中还表明 RKIP 调节 p38-MAPK 信号通路。但是 GLAST 与 MAPK 之间是否有直接调节关系还需进一步研究。

3.4 NF- κ B 通路

Karki 等^[52]发现 GLAST 启动子区域含有两个 NF- κ B 结合位点,在 EGF 诱导大鼠和人星形胶质细胞 EAAT1 (或啮齿类动物中的 GLAST) 表达中, NF- κ B 也起关键作用。过表达 NF- κ B p65 增加了 EAAT1 启动子的活性,也增加了 EAAT1 mRNA 和蛋白质水平。过表达 NF- κ B 抑制剂降低了 EAAT1 启动子活性、mRNA 和蛋白质水平。且在大鼠星形胶质细胞和人星形胶质细胞 H4 细胞中效果相同。研究结果表明, NF- κ B 对于 EAAT1 (GLAST) 起正性调节作用,通过激活 NF- κ B 途径,诱导其与 EAAT1 启动子结合,来正向调节表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 对 EAAT1 表达的促进作用。Karki 等^[53]首次证明阿伦酸是通过激活 NF- κ B 途径来增强 EAAT1 的表达和功能。NF- κ B 途径可能是调控 EAAT1 表达与功能的关键之一。

3.5 GLAST 的重要调控因子

GLAST 的转录调控中一些因子发挥着重要作用。转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF α)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 和胶质细胞源神经生长因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 等能增加 GLAST 的 mRNA 和蛋白水平,起到正性调控的作用^[54]。锰诱导的神经毒性模型^[52]中, EAAT1 mRNA 和蛋白质水平降低,转录因子 YY1 (Ying Yang 1, YY1) 缺失减弱了这一表现,过表达 YY1 导致这一现象。Karki 等^[52]发现 YY1 是 EAAT1 的关键阻遏因子,锰对 EAAT1 表达的抑制作用通过 YY1 介导。此外, YY1 还招募组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 共同抑制

EAAT1 以阻断 NF- κ B 与 EAAT1 启动子结合引发正性调控作用。阿伦酸通过抑制锰诱导的 YY1 表达而解除了 YY1 对 EAAT1 的抑制^[53]。Pajarillo 等^[55]研究中发现 17 β -雌二醇和他莫昔芬可以逆转锰对 GLAST 表达和功能造成的影响,而 TGF- α 可能是这一保护机制的重要介质。以上众多因子参与 GLAST 调控过程,但是参与 GLAST 调控的远不止于此,还需进一步探索。

4 结语

谷氨酸毒性的调控是复杂的,多方面相互作用调节的。谷氨酸转运蛋白的表达失衡是关键之一,它与多种神经系统疾病的发病机制密切相关。因此阐明 GLAST 的作用机制对进一步了解谷氨酸兴奋性毒性至关重要。GLAST 在啮齿动物的耳蜗中也有表达,中枢神经系统中的谷氨酸-谷氨酰胺循环与耳蜗中的谷氨酸-谷氨酰胺循环本质上是相似的。因此对 GLAST 与神经系统疾病的相关进展进行阐明,有望为听力领域 GLAST 的研究找到新思路。

参考文献:

- [1] Willard SS, Koochekpour S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9 (9): 948-959.
- [2] Malik AR, Willnow TE. Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the central nervous system [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5671.
- [3] Sun Q, Liao Y, Wang T, et al. Alteration in mitochondrial function and glutamate metabolism affected by 2-chloroethanol in primary cultured astrocytes [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, 37: 50-60.
- [4] Danbolt NC. Glutamate uptake [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 65 (1): 1-105.
- [5] Green JL, Dos Santos WF, Fontana ACK. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: opportunities for novel therapeutics development [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 193: 114786.
- [6] Sery O, Sultana N, Kashem MA, et al. GLAST but not least-distribution, function, genetics and epigenetics of L-glutamate transport in brain-focus on GLAST/EAAT1 [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(12): 2461-2472.
- [7] Parkin GM, Udawela M, Gibbons A, et al. Glutamate transporters, EAAT1 and EAAT2, are potentially important in the pathophysiology and treatment of schizophrenia and affective disorders [J]. *World J Psychiatry*, 2018, 8(2): 51-63.
- [8] Eulenburg V, Gomeza J. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function [J]. *Brain Res Rev*, 2010, 63(1-2): 103-112.
- [9] Salvatore MF, Davis RW, Arnold JC, et al. Transient striatal GLT-1 blockade increases EAAC1 expression, glutamate reuptake, and decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation at ser(19) [J]. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 428-436.
- [10] Wahle S, Stoffel W. Membrane topology of the high-affinity L-glutamate transporter (GLAST-1) of the central nervous system [J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(6): 1867-1877.
- [11] Rose CR, Ziemens D, Untiet V, et al. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 136: 3-16.
- [12] Kim K, Lee SG, Kegelman TP, et al. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(10): 2484-2493.
- [13] Pajarillo E, Rizzor A, Lee J, et al. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: potential targets for neurotherapeutics [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 161: 107559.
- [14] Robinson MB, Lee ML, Dasilva S. Glutamate transporters and mitochondria: signaling, co-compartmentalization, functional coupling, and future directions [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45 (3): 526-540.
- [15] 牛廷献, 罗晓红, 史智勇. Taq Man 探针定量 PCR 对癫痫大鼠脑组织 GLAST、GLT-1 表达变化的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(9): 522-528.
- [16] Iovino L, Tremblay ME, Civiero L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2020, 144(3): 151-164.
- [17] 蒙健林, 梁健芬, 张兴博, 等. 帕金森病实验动物模型的研究进展及评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3): 399-404.
- [18] Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(3): S175-S188.
- [19] Oster S, Radad K, Scheller D, et al. Rotigotine protects against glutamate toxicity in primary dopaminergic cell culture [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724: 31-42.
- [20] 李少创, 韩诚, 秦亚莉, 等. 阿尔茨海默病实验动物模型评述 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1): 131-145.
- [21] Dematteis G, Restelli E, Chiesa R, et al. Calcineurin controls expression of EAAT1/GLAST in mouse and human cultured astrocytes through dynamic regulation of protein synthesis and degradation [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2213.
- [22] Schallier A, Smolders I, Van Dam D, et al. Region- and age-specific changes in glutamate transport in the AbetaPP23 mouse model for Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 24 (2): 287-300.
- [23] Han X, Yang L, Du H, et al. Insulin attenuates β -amyloid-associated insulin/Akt/EAAT signaling perturbations in human astrocytes [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(6): 851-864.
- [24] Park JE, Gunasekaran TI, Cho YH, et al. Diagnostic blood biomarkers in Alzheimer's disease [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (1): 169.

- [25] Yan F, Liu J, Chen MX, et al. Icarin ameliorates memory deficits through regulating brain insulin signaling and glucose transporters in 3×Tg-AD mice [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 183–188.
- [26] Paciello F, Rinaudo M, Longo V, et al. Auditory sensory deprivation induced by noise exposure exacerbates cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Elife*, 2021, 10: e70908.
- [27] Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system [J]. *Neuron*, 1988, 1(8): 623–634.
- [28] During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain [J]. *Lancet*, 1993, 341(8861): 1607–1610.
- [29] Watanabe T, Morimoto K, Hirao T, et al. Amygdala-kindled and pentylenetetrazole-induced seizures in glutamate transporter GLAST-deficient mice [J]. *Brain Res*, 1999, 845(1): 92–96.
- [30] Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, et al. Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylenetetrazol-kindling [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(7): 1324–1331.
- [31] Sun D, Tan ZB, Sun XD, et al. Hippocampal astrocytic neogenin regulating glutamate uptake, a critical pathway for preventing epileptic response [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(16): e2022921118.
- [32] Taspinar N, Hacimuftuoglu A, Butuner S, et al. Differential effects of inhibitors of PTZ-induced kindling on glutamate transporters and enzyme expression [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021, 48(12): 1662–1673.
- [33] Matthews G, Fuchs P. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 812–822.
- [34] Niklaus S, Cadetti L, Vom Berg-Maurer CM, et al. Shaping of signal transmission at the photoreceptor synapse by EAAT2 glutamate transporters [J]. *eNeuro*, 2017, 4(3): 0339–16. 2017.
- [35] Harada T, Harada C, Nakamura K, et al. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(7): 1763–1770.
- [36] Ma M, Zhao S, Zhang J, et al. High glucose-induced TRPC6 channel activation decreases glutamate uptake in rat retinal Muller cells [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1668.
- [37] 李国庆, 吕萍, 王秋菊. 隐性听力损失的发病机制及听力学表现 [J]. *中华耳科学杂志*, 2017, 15(2): 185–190.
- [38] 戚国伟, 于宁, 杨仕明. 隐性听力损失的发病机制与防护 [J]. *中国听力语言康复科学杂志*, 2018, 16(4): 275–279.
- [39] 于宁, 刘军, 谭祖林, 等. 外源性谷氨酸对豚鼠耳蜗复合动作电位及微音电位的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2002, 27(3): 239–240.
- [40] 马科锋, 余晓俊, 崔博. 隐性听力损失的发生与内耳 GLAST 相关性的研究进展 [J]. *中华耳科学杂志*, 2021, 19(6): 973–976.
- [41] Hakuba N, Koga K, Gyo K, et al. Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(23): 8750–8753.
- [42] Tserga E, Damberg P, Canlon B, et al. Auditory synaptopathy in mice lacking the glutamate transporter GLAST and its impact on brain activity [J]. *Prog Brain Res*, 2021, 262: 245–261.
- [43] Ma K, Zhang A, She X, et al. Disruption of glutamate release and uptake-related protein expression after noise-induced synaptopathy in the cochlea [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 720902.
- [44] 张克英, 唐君, 方相春, 等. JAK-STAT 信号转导通路在神经系统疾病中作用的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(2): 237–240.
- [45] Feng D, Guo B, Liu G, et al. FGF2 alleviates PTSD symptoms in rats by restoring GLAST function in astrocytes via the JAK/STAT pathway [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25(8): 1287–1299.
- [46] Wang H, Yao G, Li L, et al. LncRNA-UCA1 inhibits the astrocyte activation in the temporal lobe epilepsy via regulating the JAK/STAT signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(10): 4261–4270.
- [47] Raymond M, Li P, Mangin JM, et al. Chronic perinatal hypoxia reduces glutamate-aspartate transporter function in astrocytes through the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(49): 17864–17871.
- [48] Lopez-Bayghen E, Ortega A. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC [J]. *J Neurochem*, 2004, 91(1): 200–209.
- [49] Gosselin RD, Meylan P, Decosterd I. Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation [J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 7: 251.
- [50] Yadav RK, Minz E, Mehan S. Understanding abnormal c-JNK/p38MAPK signaling in amyotrophic lateral sclerosis: potential drug targets and influences on neurological disorders [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2021, 20(5): 417–429.
- [51] Wu C, Xu K, Liu W, et al. Protective effect of Raf-1 kinase inhibitory protein on diabetic retinal neurodegeneration through P38-MAPK pathway [J]. *Curr Eye Res*, 2022 47(1): 135–142.
- [52] Karki P, Kim C, Smith K, et al. Transcriptional regulation of the astrocytic excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) via NF-kappaB and Yin Yang 1 (YY1) [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(39): 23725–23737.
- [53] Karki P, Hong P, Johnson J, et al. Arundic acid increases expression and function of astrocytic glutamate transporter EAAT1 Via the ERK, Akt, and NF-kB pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(6): 5031–5046.
- [54] Martinez-Lozada Z, Guillem AM, Robinson MB. Transcriptional regulation of glutamate transporters: from extracellular signals to transcription factors [J]. *Adv Pharmacol*, 2016, 76: 103–145.
- [55] Pajarillo E, Johnson J, Jr Kim J, et al. 17β-estradiol and tamoxifen protect mice from manganese-induced dopaminergic neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 65: 280–288.

[收稿日期] 2022-03-16

刘晓蕾,姜树原,邵国,等. NR2B 亚基磷酸化在缺血/低氧神经保护中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 125-129.

Liu XL, Jiang SY, Shao G, et al. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor NR2B phosphorylation on ischemic/hypoxic neuroprotection [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 125-129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.016

NR2B 亚基磷酸化在缺血/低氧神经保护中的作用

刘晓蕾^{1,2,3#}, 姜树原^{1,2,3#}, 邵国^{2,3,4*}, 谢雅彬², 贾小娥², 谢伟^{2,3*}

(1.包头医学院药学院,内蒙古 包头 014040;2.内蒙古自治区低氧转化医学重点实验室,内蒙古 包头 014040;
3.泰国格乐大学国际学院公共卫生学系,泰国 曼谷 10220;4.深圳市龙岗区第三人民医院转化医学中心检验科,广东 深圳 518112)

【摘要】 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体在神经系统功能中起着关键作用。NR2B 亚基是 NMDA 受体的调节亚单位,在低氧/缺血神经保护中有重要作用。NR2B 磷酸化是调节 NMDA 受体功能的重要机制,通过磷酸化的变化在缺血/低氧神经保护中发挥重要作用。本文综述了 NMDA 受体 NR2B 亚基的结构、功能、磷酸化、信号通路与缺血/低氧神经保护的关系,为以 NR2B 亚基为靶点进行低氧/缺血脑疾病的防治工作提供思路。

【关键词】 NMDA; NR2B; 缺血/低氧; 磷酸化; 神经保护

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0125-05

Effects of N-methyl-D-aspartate receptor NR2B phosphorylation on ischemic/hypoxic neuroprotection

LIU Xiaolei^{1,2,3#}, JIANG Shuyuan^{1,2,3#}, SHAO Guo^{2,3,4*}, XIE Yabin², JIA Xiaoe², XIE Wei^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014040, China. 2. Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine, Baotou 014040. 3. Department of Public Health, International College, Krirk University, Bangkok 10220, Thailand. 4. Center for Translational Medicine and Department of Laboratory Medicine, the Third People's Hospital of Longgang District Shenzhen, Shenzhen 518112)

【Abstract】 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor plays an important role in the function of the nervous system. The NR2B subunit is the regulatory subunit of NMDA receptor, which is closely related to the neuroprotection of hypoxia/ischemia. Phosphorylation of NR2B is considered to be an important mechanism to regulate the NMDA receptor function and plays an important role in ischemic/hypoxic neuroprotection through the change in phosphorylation. This review discusses the development of the NR2B subunit of NMDA receptor and the relationships between the structure, function, phosphorylation, signaling pathway and ischemic/hypoxic neuroprotection to provide a theoretical foundation to prevent and treat hypoxic/ischemic brain diseases with NR2B subunit as the target.

【Keywords】 NMDA; NR2B; ischemic/hypoxic; phosphorylation; neuroprotection

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

【基金项目】 国家自然科学基金(82060337,82071479,31860307);内蒙古自然科学基金项目(2020MS08171,2020MS08172,2020MS08006);
深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS2021000033);深圳市科技计划项目基础研究面上项目(JCYJ20220531092412028);包头医学院科学研究基金资助项目(BYJJ-YF201719,BYJJ-QM-2018004)。

【作者简介】 刘晓蕾(1988—),女,硕士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: lory1988@163.com

姜树原(1980—),女,硕士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: jiang_shuyuan_800@163.com *共同第一作者

【通信作者】 邵国(1972—),男,博士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: shao_guo_china@163.com

谢伟(1985—),男,博士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail: xiewei19850218@sina.com *共同通信作者

N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的离子型谷氨酸受体, 介导广泛的脑过程, 例如突触可塑性和兴奋性毒性^[1-2]。NMDA 受体存在于神经元和神经胶质细胞中, 由不同亚基组成的异聚体组装而成的, 包含结构亚基 NR1, 调控亚基 NR2 (NR2A、NR2B、NR2C 和 NR2D), 以及 NR3 亚基 (NR3A 和 NR3B)^[3]。其中 NR2B 的 C 端区域, 有多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基, 是敏感的磷酸化位点。此外, NR2B 磷酸化的变化可能是缺血/低氧神经保护的重要表现形式, NR2B 通过磷酸化影响与其相互作用的蛋白活性, 进而调控的下游分子来实现对抗低氧/缺血脑损伤, 并可能成为治疗低氧/缺血疾病的潜在靶点。但由于 NR2B 的磷酸化位点众多, 其磷酸化与低氧/缺血神经保护间的关系复杂, 还需要更多的研究来阐明。本文综述了 NR2B 的磷酸化及信号通路在缺血/低氧神经保护中作用, 以期将 NR2B 亚基作为调控靶点进行低氧/缺血脑疾病的防治工作奠定理论基础。

1 NR2B 亚基结构、分布

NR2B 亚基是 NMDA 受体的调节亚单位, 由 1456 个氨基酸组成, 分子量约为 170~180 kDa, 包含 4 个不连续的结构: (1) 胞外 N-末端结构域 (N-terminal domain, NTD), 在谷氨酸受体寡聚化和调节中起作用; (2) 胞外配体结合结构域 (ligand-binding domain, LBD), 结合激动剂; (3) 膜区, 包括三个跨膜螺旋 (M1、M3 和 M4) 和一个环状结构 (M2), 形成离子通道; (4) 参与连接受体的胞内 C-末端结构域 (C-terminal domain, CTD), 参与细胞运输和耦合到各种细胞内信号通路^[4-7]。

NR2 亚基基因表现出不同的区域和发育表达模式。许多研究者已经在不同的大脑区域 (如皮层、海马、小脑和下丘脑) 的不同发育阶段检测了 NR2B 的表达和定位^[8]。对啮齿类动物大脑中 NR2B 亚基基因表达的进一步检测表明, 胚胎第 14 天, 在脊髓和下丘脑 NR2B mRNA 低水平表达, 到胚胎第 17 天, NR2B 转录本表达显著增加, 在大脑皮层 (特别是第 1 层)、丘脑和脊髓中表达量高, 而在海马、丘和下丘脑中表达量低。出生时, NR2B mRNA 的表达在大脑皮层、海马、隔、新纹状体和丘脑核中明显增加, 但在小脑中水平较低。出生后第 7~12 天, NR2B 在大脑皮层和海马中表达量高, 在新纹状体、隔、丘脑核和小脑中表达量中等^[3]。NR2B 亚基 mRNA 在 3~30 月龄时在大脑皮层大部

分区域和齿状回颗粒细胞中显著降低。在成人大脑中, NR2B 在皮层 (尤其是 II/III 层)、海马、杏仁核、丘脑腹侧核和嗅球中表达最高^[9]。亚细胞水平, NR2B 在突触, 突触周围和突触外位点检测到。然而, 在大多数神经元中, 突触后密度的树突棘高于树突轴和体细胞膜。在未成熟的谷氨酸突触中 NR2B 的受体占主导地位并直接介导突触传递^[10]。

2 缺氧/缺血神经保护与 NR2B 关系

缺氧是指细胞维持内在生命活动的氧气浓度的下降。由于限制组织的血液供应而导致的缺氧被称为缺血。脑缺血的主要特征之一是兴奋性毒性, 当缺氧/缺血发生时, 导致谷氨酸大量释放, 过度激活 NMDA 受体, 并导致大量钙离子流入离子受体。然后, 钙依赖的死亡信号蛋白的激活引发了大量的兴奋毒性信号级联反应, 并诱导神经元死亡^[11]。NR2B 主要分布于突触外 NMDA 受体位点, NR2B 亚基的 CTD 在促进脑缺血中的神经元死亡方面至关重要^[12]。有研究证明, 在缺氧缺血 6 h 后, 脑室下区 (subventricular zone, SVZ) NR2B 的表达量升高, 在缺氧缺血 24 h 时达到最大值^[13], 表明缺氧缺血促进了 NR2B 表达, 导致了脑损伤。Zhang 等^[14]使用四血管闭塞缺血模型评估了严重缺血后大鼠受体基因表达、蛋白水平和功能。缺血后 12 h 和 24 h, CA1 和海马其他亚区 NR2A、NR2B mRNA 表达下降, 与对照组相比, NR2A/B 蛋白 (海马总) 在缺血后 6 h 和 24 h 均显著降低。然而缺氧 1 h 后, 额叶皮质、海马、丘脑、基底节或小脑区域的 NR2B 的表达没有变化^[15]。缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 后, CA1 区 NR2B 的 mRNA 表达在 12 h 时下降到最低水平, 然后开始恢复, 到 48 h 达到峰值, 然后持续下降到第 7 天。在 CA3 区和齿状回中, mRNA 表达的变异范围逐渐显著减小。TUNEL 染色显示 IR 24 h 时, 凋亡阳性细胞主要分布在 CA1 区。随后凋亡阳性细胞数量持续增长, 在 IR 48 h 时急剧增加, 72 h 时达到峰值, 随后凋亡阳性细胞数量开始减少, 到第 7 天时凋亡阳性细胞仍然存在。表明脑缺血大鼠海马中 NR2B mRNA 的表达与凋亡之间存在特定的关系^[16]。可能由于低氧/缺血过度刺激了突触外 NMDA 受体, 导致钙超载和线粒体功能障碍, 从而触发一系列下游神经毒性级联反应, 损害神经元功能或引起谷氨酸兴奋毒性导致细胞死亡^[17]。其中, NR2B-PSD95-nNOS 通路是缺血性卒中特征明确的死亡信号通路, 在这个通路中, 脚手架蛋白突触后密度-95 (g protein postsynaptic

density-95, PSD95)将 NMDA 受体连接到下游分子,包括一氧化氮合酶(nNOS)。PSD95 包含 3 个 PDZ 结构域,PSD95 的 PDZ1 和 PDZ2 结构域直接结合在 NR2 NMDA 受体亚基的胞内 C 端苏氨酸/丝氨酸-X-缬氨酸 - COOH (threonine/serine-X-valine-COOH, T/SXV) 基序上^[18]。PSD95 的 PDZ2 结构域也与 nNOS 的 N 端结合^[19]。这种分子结构允许过度激活的 NMDA 受体的 Ca^{2+} 内流导致 nNOS 的过度激活,然后产生一氧化氮(NO),这是一种已知的兴奋毒性效应^[20]。nNOS 促进一氧化氮的产生,进而诱导 s-亚硝基化和基质金属蛋白酶 (matrix metalloprotein-9, MMP-9) 的激活,最终诱导神经元凋亡。干扰 NR2B-PSD95-nNOS 复合物可抑制 NMDA 介导的 NO 生成,保护神经元免受兴奋性毒性^[21]。

相反,亚毒性 NMDA 通过激活促存活的磷酸肌醇 3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) /Akt 通路对抗缺血性脑损伤从而发挥神经保护作用。NMDA 受体打开后, Ca^{2+} 和钙调素激活 PI3K,使膜磷脂 PtdIns (4, 5) P2 磷酸化至 PtdIns (3, 4, 5) P3^[22]。然后, PtdIns (3, 4, 5) P3 相互作用的磷酸肌醇依赖蛋白激酶 1 (phosphoinositide dependent protein kinase1, PDK1) 被招募到细胞膜上,通过磷酸化激活 Akt^[23]。Akt 通过磷酸化一些下游靶点来促进细胞存活。突触 NMDA 受体的激活也可诱导促生存基因的表达。突触 NMDA 受体活性以及 Ca^{2+} 内流激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, Ras/ERK) 信号和核 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖蛋白激酶 (Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase, CAMKs), 然后磷酸化并激活环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)。CREB 的激活可诱导促生存基因的表达,从而保护神经元免受凋亡的损害^[24]。脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) - 酪氨酸受体激酶 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 信号和钙依赖性钙调素级联有助于 NMDA 诱导的 PI3K/Akt 通路激活^[25]。缺血预处理的实验中,通过下调 NR2B,胞浆 Ca^{2+} 降低,触发 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路,抑制 MMPs 活性,减少细胞凋亡^[26],从而在体内保护大脑免受损伤,改善新生儿缺氧缺血脑损伤的长期学习和记忆能力,同时在体外也能保护海马神经元^[27]。尽管大多数研究表明 NR2B 在缺氧缺血性脑病中具有促死亡作用,但也有证据表明 NR2B 在发育过程中可以促进神经元的发生,保护神经元免

受凋亡^[13,28]。由于含有 NR2B 的 NMDA 受体是早期发育中的主要亚型,因此 NR2B 是否在缺氧缺血性脑病中起双重作用仍有待确定。

3 低氧/缺血神经保护与 NR2B 磷酸化关系

3.1 丝氨酸/苏氨酸

蛋白质磷酸化是调节 NMDAR 功能的重要机制。NR2B 的 CTD 区域,是磷酸化的关键区域,包含很多能被磷酸化修饰的氨基酸,如丝氨酸、苏氨酸等,如: S886、S917、S1303、S1323^[29]、S1284^[30]。NR2B 的磷酸化变化在神经保护中起着重要的作用。

神经元缺血时, NR2B 亚单位 S1284 受细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, Cdk5) 调节,培养海马神经元的氧-葡萄糖剥夺 (OGD) 和小鼠的短暂全脑缺血都会导致 S1284 处 NR2B 磷酸化水平的显著下降^[30]。再灌注后 24 h 内, NR2B 的表达随着时间的推移而降低,酪蛋白激酶 2 α (casein kinase 2 α , CK2 α) 介导的丝氨酸 S1480 磷酸化逐渐降低, S1480 的磷酸化破坏了 NR2B 与 PSD-95 之间的相互作用^[29]。Tu 等^[31]发现激活的死亡相关蛋白激酶 1 (death-associated protein kinase 1, DAPK1) 通过磷酸化 NR2B 上的 S1303 位点来提高 NR2B 受体通道的电导。在该研究中,研究者发现缺血损伤后激活 DAPK1 可使 NR2B 的 S1303 磷酸化,并且 OGD 和缺血处理的小鼠和皮质神经元细胞,都会引起 DAPK1 的活性增高并提高 NR2B 的 S1303 位点的磷酸化水平,从而导致神经元死亡。通过 S1303 位点附近基序的多肽干扰 DAPK1 和 NR2B 的相互作用,可以减少脑缺血带来的损伤。综上, NR2B 上丝氨酸位点的磷酸化参与调控了 NMDA 受体的通道特性,在低氧/缺血类脑病中,不同丝氨酸位点的磷酸化变化不尽相同,如 S1303 处 NR2B 的磷酸化水平会升高,而 S1284 处 NR2B 磷酸化水平会下降,通过改变这些位点的磷酸化水平,对低氧/缺血类脑病,特别是脑卒中有积极的治疗作用。

3.2 酪氨酸

酪氨酸磷酸化在低氧/缺血类疾病中,特别是脑卒中,发挥着重要作用。Nakazawa 等^[32]通过一系列方法鉴定出了 NR2B 上许多酪氨酸磷酸化位点,主要包括酪氨酸 Y1070、Y1472、Y1252、Y1336 等。为了探究酪氨酸磷酸化在脑卒中之中的变化,大量研究通过建立低氧/缺血模型,模拟脑卒中。有研究表明,在成年大鼠中,短暂性缺血会显著增加海

马内 NMDAR 亚基 NR2A 和 NR2B 的酪氨酸磷酸化 (NR2A 的酪氨酸磷酸化显著、快速和持续增加,而 NR2B 的酪氨酸磷酸化较小^[33])。这种上调部分是由 Src 家族酪氨酸激酶 Src 和 Fyn 介导的^[34]。Fyn 在大脑中许多底物,包括 NR2B,它是发育中大脑中的主要调节亚单位。Fyn 在其 C 末端的 7 个酪氨酸 (Y932、Y1039、Y1070、Y1109、Y1252、Y1336、Y1472) 残基上介导 NR2B 磷酸化,其中 Y1472 为主要位点^[32]。Fyn 优先磷酸化新生皮质中 Y1472 和 Y1252 处的 NR2B。此外,Y1472 处 NR2B 的磷酸化 (pY1472 NR2B) 和 Y1252 处 NR2B 的磷酸化 (pY1252 NR2B) 在 Fyn 过表达小鼠的突触膜中上调,其中 Src 家族激酶 (SFK) 活性也增加。在脑缺血的成年大鼠中,pY1472 NR2B 显著且持续上调^[35]。出生后第 7 天 (P7) 大鼠和小鼠缺氧缺血 hypoxia ischemia, HI) 后 pY1472 NR2B 增加^[36]。研究表明,再灌注后 24 h 内, NR2B 的表达随着时间的推移而降低, Fyn 介导的 Y1472 磷酸化增加,而 NR2B 上另一个 Fyn 靶点 Y1336 的磷酸化保持不变^[37]。在 WT 动物中, HI 后 6 h 内 pY1472 NR2B 和 pY1252 NR2B 增加,但 pY1336 NR2B 没有增加^[36]。Wu 等^[38]发现 Fyn 对 pY1336 在体外谷氨酸毒性模型中促进 NR2B 的钙蛋白酶裂解,然而 HI 后没有观察到 pY1336 产生的钙蛋白酶裂解片段^[36]。据报道,pY1336 还介导 NR2B 与 PI3K 的相互作用,该相互作用在成年大鼠短暂缺血后增加^[39-40]。新生儿低氧/缺血性脑病与 NR2B 酪氨酸磷酸化的增强有关。新生儿缺氧缺血后 pY1472 NR2B 上调参与了超氧化物介导的氧化应激,并促进了脑损伤。HI 后,pY1472 NR2B 的上调,可能启动了下游细胞死亡信号通路,促进了脑损伤的形成,而 pY1336 可能参与钙剪切酶对 NR2B 胞内端剪切的调控。综上,在脑卒中和新生儿低氧/缺血性脑病中, NR2B 上酪氨酸位点的磷酸化水平的变化不同,但是 NR2B 主要的酪氨酸磷酸化位点的磷酸化水平是升高的,通过改变这些位点的磷酸化水平,可以为治疗缺血缺氧性脑病奠定基础。

4 结语

总之, NR2B 的磷酸化影响了 NMDA 受体的功能,酪氨酸的磷酸化改变很可能影响 NR2B 复合体在初始状态和损伤后的蛋白质招募^[41],丝氨酸和苏氨酸的磷酸化调控 NMDA 受体通道特性和膜转运过程,这为以 NR2B 的磷酸化位点进行低氧神经保护提供了思路,若进一步研究 NR2B 的磷酸化位点

氧/缺血神经保护间的关系,能为缺血性卒中等疾病的诊断、治疗开辟更广阔的天地。

参考文献:

- [1] Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity [J]. Cell Calcium, 2010, 47(2): 122-129.
- [2] Lai TW, Shyu WC, Wang YT. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond [J]. Trends Mol Med, 2011, 17(5): 266-275.
- [3] Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications [J]. Pharmacol Ther, 2003, 97(1): 55-85.
- [4] Pan M, Neilson MP, Grunfeld AM, et al. A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis [J]. PLoS Biol, 2018, 16(5): e2005754.
- [5] Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, et al. Structure, Function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(4): 298-487.
- [6] Amin JB, Gochman A, He M, et al. NMDA receptors require multiple pre-opening gating steps for efficient synaptic activity [J]. Neuron, 2021, 109(3): 488-501.
- [7] Ni L. The structure and function of ionotropic receptors in drosophila [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 638839.
- [8] Ismail CaN, Suppian R, AbdAziz CB, et al. increased nociceptive responses in streptozotocin-induced diabetic rats and the related expression of spinal NR2B subunit of N-Methyl-D-Aspartate receptors [J]. Diabetes Metab J, 2019, 43(2): 222-235.
- [9] Wang J, Swanson RA. Superoxide and non-ionotropic signaling in neuronal excitotoxicity [J]. Front Neurosci, 2020, 4: 861.
- [10] Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, et al. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(8): 1301-1317.
- [11] Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death [J]. Apoptosis, 2010, 15(11): 1382-1402.
- [12] Vieira MM, Schmidt J, Ferreira JS, et al. Multiple domains in the C-terminus of NMDA receptor GluN2B subunit contribute to neuronal death following *in vitro* ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2016, 89: 223-234.
- [13] Lai Q, Hu P, Li Q, et al. NMDA receptors promote neurogenesis in the neonatal rat subventricular zone following hypoxicischemic injury [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 206-212.
- [14] Zhang L, Hsu JC, Takagi N, et al. Transient global ischemia alters NMDA receptor expression in rat hippocampus: correlation with decreased immunoreactive protein levels of the NR2A/2B subunits, and an altered NMDA receptor functionality [J]. J Neurochem, 1997, 69(5): 1983-1994.
- [15] Kim WT, Kuo MF, Mishra OP, et al. Distribution and

- expression of the subunits of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors; NR1, NR2A and NR2B in hypoxic newborn piglet brains [J]. *Brain Res*, 1998, 799(1): 49–54.
- [16] Liu Z, Zhao W, Xu T, et al. Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia [J]. *Brain Res*, 2010, 1361: 133–139.
- [17] Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(6): 1147–1160.
- [18] Cui H, Hayashi A, Sun HS, et al. PDZ protein interactions underlying NMDA receptor-mediated excitotoxicity and neuroprotection by PSD-95 inhibitors [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(37): 9901–9915.
- [19] Tochio H, Mok YK, Zhang Q, et al. Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger structure from the nNOS PDZ domain [J]. *J Mol Biol*, 2000, 303(3): 359–370.
- [20] Sattler R, Xiong Z, Lu WY, et al. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein [J]. *Science*, 1999, 284(5421): 1845–1848.
- [21] Wang Z, Chen Z, Yang J, et al. Treatment of secondary brain injury by perturbing postsynaptic density protein-95-NMDA receptor interaction after intracerebral hemorrhage in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(8): 1588–1601.
- [22] Joyal JL, Burks DJ, Pons S, et al. Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(45): 28183–28186.
- [23] Alessi DR, James SR, Downes CP, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α [J]. *Curr Biol*, 1997, 7(4): 261–269.
- [24] Impey S, Fong AL, Wang Y, et al. Phosphorylation of CBP mediates transcriptional activation by neural activity and CaM kinase IV [J]. *Neuron*, 2002, 34(2): 235–244.
- [25] Xu J, Zhang QG, Li C, et al. Subtoxic N-methyl-D-aspartate delayed neuronal death in ischemic brain injury through TrkB receptor- and calmodulin-mediated PI-3K/Akt pathway activation [J]. *Hippocampus*, 2007, 17(7): 525–537.
- [26] Liu Y, Wang H, Liu N, et al. Oxymatrine protects neonatal rat against hypoxic-ischemic brain damage via PI3K/Akt/GSK3 β pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116444.
- [27] Lai Z, Zhang L, Su J, et al. Sevoflurane postconditioning improves long-term learning and memory of neonatal hypoxia-ischemia brain damage rats via the PI3K/Akt-mPTP pathway [J]. *Brain Res*, 2016, 1630: 25–37.
- [28] Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(1): 334–343.
- [29] Ghafari M, Hoger H, Keihan Falsafi S, et al. Mass spectrometrical identification of hippocampal NMDA receptor subunits NR1, NR2A-D and five novel phosphorylation sites on NR2A and NR2B [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1891–1896.
- [30] Lu W, Ai H, Peng L, et al. A novel phosphorylation site of N-methyl-D-aspartate receptor GluN2B at S1284 is regulated by Cdk5 in neuronal ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2015, 271: 251–258.
- [31] Tu W, Xu X, Peng L, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010, 140(2): 222–234.
- [32] Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, et al. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 693–699.
- [33] Takagi N, Shinno K, Teves L, et al. Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B [J]. *J Neurochem*, 1997, 69(3): 1060–1065.
- [34] Cheung HH, Takagi N, Teves L, et al. Altered association of protein tyrosine kinases with postsynaptic densities after transient cerebral ischemia in the rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(3): 505–512.
- [35] Zhang F, Guo A, Liu C, et al. Phosphorylation and assembly of glutamate receptors after brain ischemia [J]. *Stroke*, 2013, 44(1): 170–176.
- [36] Knox R, Zhao C, Miguel-Perez D, et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 51: 113–119.
- [37] Shao G, Wang Y, Guan S, et al. Proteomic analysis of mouse cortex postsynaptic density following neonatal brain hypoxia-ischemia [J]. *Dev Neurosci*, 2017, 39(1–4): 66–81.
- [38] Wu HY, Hsu FC, Gleichman AJ, et al. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20075–20087.
- [39] Kim NS, Ringeling FR, Zhou Y, et al. CYFIP1 dosages exhibit divergent behavioral impact via diametric regulation of NMDA receptor complex translation in mouse models of psychiatric disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2022, 92(10): 815–826.
- [40] Zhang X, Peng K, Zhang X. The Function of the NMDA receptor in hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 567665.
- [41] Knox R, Brennan-Minnella AM, Lu F, et al. NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 contributes to brain injury in a rodent model of neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Stroke*, 2014, 45(10): 3040–3047.

楼金成,苗镡允,苏嘉琪,等. 过敏性哮喘大鼠模型的建立方法与评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 130-137.

Lou JC, Miao XY, Su JQ, et al. Establishment and evaluation of rat model of allergic asthma [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 130-137.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.017

过敏性哮喘大鼠模型的建立方法与评价

楼金成¹, 苗镡允¹, 苏嘉琪¹, 胡 情¹, 翟春涛^{1*}, 吕玉娥²

(1.山西中医药大学,山西 晋中 030600;2.山西省针灸医院,太原 030006)

【摘要】 过敏性哮喘是一种 2 型炎症反应介导的超敏反应所引起的气道慢性损伤性炎症疾病。目前尚无任何一种哮喘动物模型能完全概括人类过敏性哮喘的发生发展过程,因此构建一个较为完善且稳定的、符合临床患者病理表现的过敏性哮喘动物模型尤为重要。本文就近 5 年过敏性哮喘模型大鼠的品系选择、造模方法、模型评价指标等方面做简要的分析。

【关键词】 过敏性哮喘;大鼠模型;模型建立;评价指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0130-08

Establishment and evaluation of rat model of allergic asthma

LOU Jincheng¹, MIAO Xinyun¹, SU Jiaqi¹, HU Qing¹, ZHAI Chuntao^{1*}, LYU Yue²

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030600, China.

2. Shanxi Province Acupuncture Hospital, Taiyuan 030006)

【Abstract】 Allergic asthma is a chronic airway inflammatory disease caused by type 2 inflammatory response-mediated hypersensitivity. At present, no animal model of asthma that completely recapitulates the occurrence and development of allergic asthma in humans is available. Therefore, it is particularly important to establish a relatively complete and stable animal model of allergic asthma that conforms to the pathological manifestations of patients. This review briefly analyzes the strain selection, modeling method, and model evaluation indicators of allergic asthma model rats in the past 5 years.

【Keywords】 allergic asthma; rat model; model establishment; evaluation index

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

过敏性哮喘(allergic asthma, AS)是一种由 2 型炎症反应介导的超敏反应所引起的气道慢性损伤性炎症疾病^[1]。一系列潜在机制导致气道炎症,导致可变气流受限和呼吸道症状如喘息、气短、胸闷和咳嗽等是过敏性哮喘最典型的特征^[2]。在过去几十年中,其流行率大幅上升,全世界有大约 3.5 亿人受其影响,尤其是在儿童中,患病率显著增加^[3]。

目前尚无完全治愈方法,但可以通过医生和患者教育、避免环境过敏原暴露、规范化药物治疗和变应原特异性免疫治疗(allergen specific immunotherapy, AIT)等方式来帮助控制症状^[4]。

目前过敏性哮喘动物模型的实验动物种属的选择主要集中在豚鼠、小鼠和大鼠三大类^[5]。其中豚鼠作为最经典的过敏性哮喘动物选择,可以诱导

【基金项目】 山西中医药大学创新团队—吕景山针药结合科技创新团队(2019TD-003);山西中医药大学创新团队—吕景山针灸与生物电子医学创新团队(2022TD1006);山西省“四个一批”科技兴医创新计划重点攻关专项(2022XM35);山西省科技创新人才团队建设(200204051002011)。

【作者简介】 楼金成(1995—),男,硕士研究生,研究方向:针灸防治机体免疫性疾病的基础与临床研究。

E-mail: 1761162493@qq.com

【通信作者】 翟春涛(1981—),男,副教授,博士研究生,硕士研究生导师,研究方向:针灸防治机体免疫性疾病的基础与临床研究。

E-mail: 709966203@qq.com

与人类最相似的炎症反应和气道高反应性。但通常诱导的过敏性哮喘豚鼠模型是由 IgG 介导的是 I 型变态反应,同时个体反应差异较大,同一批豚鼠同一致敏浓度会出现不致敏或过度致敏导致死亡共存的现象^[6]。此外,较少的相关生物学抗体和昂贵的价格使豚鼠不再是构建过敏性哮喘的理想动物模型。大鼠和小鼠的过敏性哮喘动物模型同样具有许多人类过敏性哮喘的特征。然而,过敏性哮喘的主要症状,如气道高反应性和炎症,在大鼠中比在小鼠中更容易再现^[7]。此外,与小鼠相比,大鼠体型更大更加容易处理,且能收集到更多的样本。因此,过敏性哮喘大鼠模型的重要性日益增加^[8]。本文就近 5 年国内外通过大鼠构建过敏性哮喘模型的文献进行汇总,从大鼠的品系、造模方法、模型评价等方面对过敏性哮喘大鼠模型的构建

进行比较分析。

1 文献来源

以(“过敏性哮喘”或“变应性哮喘”)和“大鼠”为主题,时间设定为 2017 年 1 月~2022 年 4 月在中国知网(CNKI)、万方医学网、维普期刊全文数据库,并在 PubMed 数据库(2017~2022)上以“Allergic Asthma”和“Rat”为关键词进行检索,其中 CNKI 数据库检索到文献 105 篇,万方数据库 38 篇,维普数据库 17 篇,PubMed 数据库 159 篇,选择通过过敏性哮喘大鼠模型进行研究的实验文献、硕博论文,排除综述、科技成果、会议类文献和重复类文献,共有 18 篇文献符合要求。以下就文献从大鼠的品系、造模方法、模型评价指标等方面进行整理,详见表 1。

表 1 过敏性哮喘大鼠模型构建方法
Table 1 Construction method of allergic asthma rat model

大鼠品系 Rat strain	致敏原(批号) Allergen (Lot number)	致敏剂量 Sensitizing dose	佐剂 Adjuvant	造模方法 Modeling method
雄性 SD 大鼠 ^[9] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5253)	OVA(10%)	10 g OVA 溶于 100 mL 生理盐水中(5 mL/kg) 10 g OVA in 100 mL saline(5 mL/kg)	第 1、8 天腹腔注射 D1, D8 i. p.
		-	OVA(1%)	第 15 天开始,每天雾化 1 次,每次 7 min, 共 14 d From D15, aerosol once a day, 7 min each time, for a total of 14 days
雄性 Wistar 大鼠 ^[10] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (AL125)	10 mg	10 mg OVA 溶于 1 mL 含 100 mg Al(OH) ₃ 的 生理盐水中 10 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、2、3、8 天腹腔注射 D1, 2, 3, 8 i. p.
		-	OVA(1%)	第 15 天开始,每次雾化 40 min,隔天 1 次, 共 6 次 From D15, aerosol 40 min each time, once every two days, 6 times
雄性 SD 大鼠 ^[11] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A8041)	100 mg	100 mg OVA 溶于 1 mL 含 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 100 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹腔注射 D1, D 8 i. p.
		-	OVA(1%)	第 15~22 天,每天雾化 1 次,每次 20 min From D15~D22, aerosol once a day, 20 min each time
雄性 Wistar 大鼠 ^[12] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	2 mg	2 mg OVA 溶于 1 mL 含 10 mg Al(OH) ₃ 的生 理盐水中 2 mg OVA in 10 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、7 天腹腔注射 D1, D7 i. p.
		-	OVA(5%)	第 17~35 天,每次雾化 40 min,隔日 1 次 From D17~D35, aerosol 40 min each time, once every two days
雄性 SD 大鼠 ^[13] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	10 mg	10 mg OVA 溶于 1 mL 含 10 mg Al(OH) ₃ 的 生理盐水中 10 mg OVA in 10 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹腔注射 D1, D8 i. p.
		-	OVA(2%)	第 15 天开始,每天雾化 1 次,每次 30 min, 共 7 次 From D15, aerosol once a day, 30 min each time, for a total of 7 times

续表 1

大鼠品系 Rat strain	致敏原(批号) Allergen (Lot number)	致敏剂量 Sensitizing dose	佐剂 Adjuvant	造模方法 Modeling method
雄性 Wistar 大鼠 ^[14] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	10 mg	10 mg OVA 溶于 1 mL 含 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 10 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天皮下多点注射 D1, D8 s. c.
		—	OVA(1%)	第 18~36 天, 每次雾化 30 min, 隔日 1 次 From D18~D36, aerosol 30 min each time, once every two days
雄性 Wistar 大鼠 ^[15] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 0.5 mL 含 200 μg Al(OH) ₃ 的磷酸盐缓冲盐水中 1 mg OVA in 200 μg Al(OH) ₃ in 0.5 mL PBS	第 0、7 天腹膜内注射 D0, D7 i. p.
		—	OVA(1%)	第 15~42 天, 每次雾化 30 min, 隔日 1 次 From D15~42, aerosol 30 min each time, once every two days
雄性 SD 大鼠 ^[16] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 200 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 1 mg OVA in 200 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 0、8 天皮下注射 D0, D8 s. c.
		—	OVA(1%)	第 15 天开始, 每天雾化 1 次, 每次 60 min, 共 14 d From D15, aerosol once a day, 60 min each time, for a total of 14 days
雄性 SD 大鼠 ^[17] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A16951)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 30 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中+0.2 mL 0.0023%百日咳类毒素 1 mg OVA in 30 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline and 0.2 mL 0.0023% pertussis toxoid	第 1、8 天皮下注射致敏液和腹腔注射百日咳类毒素 D1, D8 OVA s. c. and pertussis toxoid i. p.
		—	OVA(1%)	第 15 天开始, 每天雾化 1 次, 每次 20 min, 共 7 d From D15, aerosol once a day, 20 min each time, for a total of 7 days
雄性 SD 大鼠 ^[18] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 10 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 1 mg OVA in 10 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹腔注射 D1, 8 i. p.
		—	OVA(1%)	第 9~23 天, 每次雾化 30 min, 隔日 1 次 From D9~D23, aerosol 30 min each time, once every two days
雄性 Wistar 大鼠 ^[19] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 200 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 1 mg OVA in 200 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹膜内注射 D1, 8 i. p.
		—	OVA(4%)	第 14 天开始, 每天雾化 1 次, 每次 5 min, 共 18 d From D14, aerosol once a day, 5 min each time, for a total of 18 days
雄性 SD 大鼠 ^[20] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A8041)	100 mg	100 mg OVA 溶于 1 mL 含 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 100 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹腔注射 D1, D8 i. p.
		—	OVA(5%)	第 15~20 天, 每天雾化 1 次, 每次 30 min From D15~D20, aerosol once a day, 30 min each time

续表 1

大鼠品系 Rat strain	致敏原(批号) Allergen (Lot number)	致敏剂量 Sensitizing dose	佐剂 Adjuvant	造模方法 Modeling method
雄性 SD 大鼠 ^[21] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	2 mg	2 mg OVA 溶于 1 mL 含有 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 2 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 0、5 天, 其中 0.5 mL 皮下注射, 剩下 0.5 mL 腹腔注射 D0, D5, 0.5 mL s. c. and 0.5 mL i. p. 第 14 天开始, 每天雾化 1 次, 每次 30 min, 共 7 d
		—	OVA(1%)	From D14, aerosol once a day, 30 min each time, 7 days
雄性 Wistar 大鼠 ^[22] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	10 μg	0.2 mL 致敏液含有 10 μg 的 OVA 和 1 mg 的 Al(OH) ₃ 10 μg OVA in 1 mg Al(OH) ₃ in 0.2 mL alum-precipitated antigen	第 1、5、8、12 天腹膜内注射 0.2 mL 致敏液, 第 15 天开始连续 7 d 鼻内滴注 20 μL 1% 的 OVA 加强致敏 Sensitizations were undertaken on D1, D5, D8 and D12 by intraperitoneal injection of 0.2 mL of alum-precipitated antigen, from D15, rats were administered (i. n.) 20 μL of 1% OVA diluted in PBS for 7 consecutive days
		—	OVA(1%)	第 28~32 天, 每天雾化 1 次, 每次 30 min From D28~D32, aerosol once a days, 30 min each time
雄性 Wistar 大鼠 ^[23] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 200 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 1 mg OVA in 200 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 0、7、14、21 天腹膜内注射 D0, D7, D14, D21 i. p.
		—	OVA(1%)	第 22~42 天开始, 隔日 1 次, 每次雾化 20 min From D22~D42, once every two days, aerosol 20 min each time
雄性 SD 大鼠 ^[24] Male SD rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	1 mg	1 mg OVA 溶于 1 mL 含有 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 1 mg OVA in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 1、8 天腹腔注射 D1, D8 i. p.
		—	OVA(1%)	第 15 天开始, 隔日 1 次, 每次雾化 30 min, 共 8 周 From D15, once every two days, aerosol 30 min each time, 8 weeks
雄性 Wistar 大鼠 ^[25] Male Wistar rats	卵清蛋白 OVA	20 μg	20 μg OVA 和 2 μg 脂多糖分别溶于 1 mL 含有 100 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中 20 μg OVA and 2 μg LPS in 100 mg Al(OH) ₃ in 1 mL saline	第 7、14、21 天腹腔注射 D7, D14, D21 i. p.
		—	OVA(0.5%)+LPS(0.5%)	第 23~39 天, 隔日 1 次, 每次雾化 30 min From D23~D39, once every two days, aerosol 30 min each time
雌性 BN 大鼠 ^[26] Female Brown Norway rats	卵清蛋白 OVA (A5503)	50 μg	50 μg OVA 溶于 0.5 mL 含 20 mg Al(OH) ₃ 的生理盐水中+50 ng 的百日咳毒素 50 μg OVA in 20 mg Al(OH) ₃ in 0.5 mL saline + 50 ng pertussis toxoid	第 0 天腹腔注射, 第 7 天不加百日咳毒素后同剂量腹腔注射 D0 i. p., D7 i. p. without pertussis toxoid
		—	OVA(5%)	第 28 天内鼻内滴注 300 μL OVA 溶液 D28, 300 μL OVA i. n.

2 大鼠品系

雄性 SD 大鼠和雄性 Wistar 大鼠是过敏性哮喘大鼠模型中最常用的品系,两种大鼠致敏后产生的迟发性过敏反应的时间与临床患者时间接近^[27]。其中雄性 SD 大鼠应用较多,可能与其可长时间耐受高浓度激发,从而出现典型的过敏性炎症反应有关^[28]。其中,也有文献^[26]提到的用雌性 BN 大鼠造模,并提出与前两种大鼠相比,过敏原致敏后的 BN 大鼠能更加容易的产生 IgE 反应,是研究过敏性哮喘最合适的大鼠品系,在国际上使用率越来越高。但较低的繁殖率和高昂的价格,在国内的使用率较少(表 2)。

3 造模方式

过敏性哮喘是一种环境与机体相互影响的疾病,其发病机制主要分为致敏即免疫记忆阶段和效应阶段两方面^[4]。免疫记忆阶段:当过敏原首次进入气道时,会被抗原提呈细胞(如树突状细胞)识别并把他们加工成小肽后与细胞膜表面的主要组织相容性复合体(MHC)II 类分子结合形成复合物,并通淋巴管向幼稚的 CD4⁺Th 细胞提供过敏原成分,在存在 2 型细胞因子的情况下,产生过敏原特异性 Th2。由 Th2 细胞产生的 IL-4 可以促进 B 细胞成熟并分化为浆细胞,生成抗原 sIgE, sIgE 与肥大细胞表面的高亲和力 IgE 受体 FcεRI 结合,生成 IgE 抗体,

表 2 过敏性哮喘模型所用大鼠品系的频数及占比

Table 2 Frequency and proportion of rat strains used in allergic asthma models

大鼠品系 Rat strain	频数 Frequency	占比 Proportion
雄性 SD 大鼠 Male SD rats	9	50.0%
雄性 Wistar 大鼠 Male Wistar rats	8	44.4%
雌性 BN 大鼠 Female BN rats	1	5.6%

表 3 过敏性哮喘大鼠模型各致敏浓度的频数和占比

Table 3 Frequency and proportion of each sensitizing concentration in allergic asthma rat model

致敏浓度 Sensitizing Concentration	10 μg	20 μg	50 μg	1 mg	2 mg	10 mg	100 mg
产品 目录号 Catalog number	(A5503)	-	(A5503)	(A5503) (A16951)	(A5503)	(A5503) (A1125)	(A8041) (A5253)
频数 Frequency	1	1	1	7	2	3	3
占比 Proportion	5.6%	5.6%	5.6%	38.9%	11.1%	16.6%	16.6%

注:-;在文献中没有说明其所使用卵清蛋白的产家及批号。

Note. -, Producer and batch number of the ovalbumin used were not specified in the literature.

使机体致敏,其中部分增殖的效应 Th2 成为过敏原特异性记忆 T 淋巴细胞^[4]。效应阶段:当过敏原再次进入机体时,被血液内的 IgE 识别并结合,促使肥大细胞(Mast Cell, MC)脱颗粒,释放炎症介质产生早期过敏反应^[6,29],表现为血管扩张和支气管收缩等,导致支气管结构功能改变,形成急性哮喘症状^[30]。气道慢性炎症反应是效应阶段的延续,Th2 细胞向气道炎症部位迁移,在炎症部位受到过敏原攻击时,气道局部释放的趋化因子使 Th2 细胞释放 2 型细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-13 等。IL-5 对促进组织嗜酸性粒细胞增多和肥大细胞增生至关重要,而 IL-13 可以刺激杯状细胞产生粘液并诱发气道高反应(Airway Hyper Reactivity, AHR)^[31]。故在过敏性哮喘动物模型的造模时,主要也分为两个阶段,分别是致敏期和激发期。

3.1 致敏期

卵清蛋白(OVA)是使用最多的致敏原^[32],主要分为单纯 OVA 和复合 OVA(含佐剂,主要包括 Al(OH)₃等)两大类,具有较强的抗原性和免疫原性。

3.1.1 致敏浓度

分析前文筛选的文献发现,所选文献中共出现了 7 种不同的 OVA 致敏浓度。在 7 种致敏浓度中,最常用的是将 1 mg OVA 溶于含有一定量佐剂(Al(OH)₃)中(7 篇,38.9%)。致敏浓度及频数见表 3。随后将所有文献中所提的 OVA 的产品目录号及所对应纯度进行检索并整理,发现在一定程度上,致敏浓度的选择与所选 OVA 的纯度有关,所以过敏性哮喘大鼠模型致敏期间所用的具体造模浓度的选择应根据自身所拥有 OVA 的纯度来决定。

3.1.2 致敏方法

致敏操作方法主要分为 3 种,分别是腹腔注射、皮下注射和皮下注射联合腹腔注射。见表 1。同时发现致敏时适当地使用特殊佐剂如脂多糖(LPS)^[25]或百日咳毒素^[17,26]可以有效的加强致敏效果。

表 4 过敏性哮喘大鼠模型评价指标
Table 4 Evaluation index of allergic asthma rat model

一般行为学观察 General behavioral observations	肺组织病理形态学 观察 (HE 染色) Pathological observation of lung tissue (HE staining)	肺功能检测 Pulmonary function test	Th2 型细胞因子 Th2 cytokines	血清免疫球蛋白 IgE Serum immunoglobulin IgE	嗜酸性粒细胞 浸润情况 Eos infiltration	参考文献 References
-	+	-	+	+	-	[9]
+	+	+	-	-	-	[10]
+	+	-	+	-	-	[11]
+	+	-	+	-	+	[12]
+	+	+	+	+	+	[13]
+	+	-	-	-	-	[14]
-	+	-	+	-	-	[15]
+	+	-	+	+	-	[16]
+	+	+	-	-	+	[17]
+	+	+	-	-	+	[18]
-	+	+	-	-	+	[19]
-	+	-	-	-	+	[20]
-	+	+	-	+	+	[21]
+	+	-	+	+	+	[22]
-	+	-	-	-	+	[23]
-	+	+	+	+	+	[24]
+	+	-	+	-	+	[25]
+	+	+	+	+	-	[26]

注：“+”：表示在文献中有提及与指标相关内容；“-”表示在文献中未提及。

Note. +, Indicates that there are references to indicators in the literature. -, Indicates that it is not mentioned in the literature.

3.2 激发期

最常用来激发哮喘的方式是通过 OVA 雾化激发, OVA 的浓度范围通常在 1%~5% 之间, 雾化次数在 7~14 次不等。也有文献^[26]提示可以通过鼻内滴注的方式来激发哮喘。有研究将相同致敏方式和致敏浓度的大鼠分别用同一浓度的 OVA 分别雾化激发 4 周和 8 周, 发现两组大鼠气道损伤情况虽然有些许差异, 但差异无统计学意义^[33]。

4 模型的评价指标

分析前文筛选的文献, 总结文献中关于造模后模型的评价指标主要包括: (1) 发作时一般行为学观察; (2) 肺组织病理形态学观察; (3) 肺功能检测; (4) Th2 型细胞因子; (5) 血清免疫球蛋白 IgE; (6) 炎性细胞浸润情况 (表 4)。

4.1 发作时一般行为学观察

过敏性哮喘大鼠模型哮喘发作期的典型症状

表现为造模期间频繁并持续的出现呼吸加快并伴有喘息、口唇黏膜发绀、腹肌痉挛、毛色暗淡并伴有竖起、抓耳挠腮等, 并随着激发次数的增多, 症状会加重且出现的频率逐渐增加。金禹彤等^[14]通过记录各组大鼠引喘潜伏期与发作总持续时间比较; 李潘营等^[13]通过雾化磷酸组胺和 2% 的氯化乙酰胆碱等量的混合液后, 从第 1 次喘息开始记录大鼠 2 min 内的喘息次数来对过敏性哮喘大鼠模型进行评价。

4.2 肺组织病理形态学观察 (HE 染色)

肺组织的病理形态学观察可以直观的反映在过敏性哮喘发病及持续过程中, 肺组织在炎性细胞的浸润下, 不断的损伤和修复后产生的病理结构性改变。在过敏性哮喘大鼠模型的肺组织 HE 染色中, 可以看到大鼠支气管周围会出现大量的炎性细胞浸润, 部分细支气管上皮坏死, 杯状细胞增生、肥大, 支气管壁增厚和肺泡严重变形等一系列表现。

4.3 Th2 型细胞因子

过敏性哮喘是一种由 2 型炎症反应介导的慢性肺损伤性炎症, Th2 细胞在 2 型炎症反应的启动、维持和增殖中发挥重要作用。当过敏原暴露并进入呼吸道时, 树突状细胞摄取这些过敏原并引导 Th2 细胞的增殖分化, 从而导致 Th2 型细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-13 等的分泌增加。Th2 反应是 IgE 介导的致敏、气道高反应性 (AHR) 和嗜酸性粒细胞浸润的基础, 这些都是过敏性气道疾病的标志。

4.4 血清免疫球蛋白 IgE

IgE 在过敏性哮喘的发病过程其起着非常重要的作用。Th2 细胞通过分泌 IL-4 和 IL-13 来激活 B 细胞的发育并分化成分泌 IgE 的浆细胞。分泌的 IgE 与肥大细胞 (MC) 表面的 FcεRI 受体结合。再次暴露于该抗原会导致 IgE 结合的 FcεRI 受体的交联化, 继而导致 MC 脱颗粒, 再次释放先前合成的细胞因子 (IL-4 和 IL-13) 导致气道炎症的进行性加重, 以及合成新的炎症介质 (如组胺、趋化因子和白三烯等)^[6,29]。MC 释放的炎症介质刺激其他炎症细胞以及结构内皮细胞、上皮细胞和平滑肌细胞, 导致支气管痉挛和气道黏液分泌增加, 诱发气道高反应 (AHR), 加重过敏性哮喘的进程^[34]。

4.5 嗜酸性粒细胞浸润情况

Th2 细胞分泌的 IL-5 主要负责骨髓和组织中嗜酸粒细胞的生成和激活。在过敏性哮喘患者的支气管肺组织中存在大量炎症细胞浸润^[35], 嗜酸性粒细胞是其关键的炎症细胞, 在过敏性哮喘的气道高反应性、粘液产生和气道重塑中都发挥重要作用。有研究表明通过促进 EOS 的调亡, 可以有效减轻气道炎症, 从而达到缓解过敏性哮喘的目的^[36]。

4.6 肺功能检测

肺功能检测是诊断哮喘和评估哮喘控制程度的重要检查方法^[37]。最常用来进行哮喘模型肺功能检测的方式是肺功能气道反应性测试, 用梯度浓度的乙酰胆碱对哮喘模型进行激发并观察呼吸阻力情况。过敏性哮喘模型大鼠检测时可以发现, 各梯度乙酰胆碱激发模型组大鼠呼吸阻力较空白组升高明显 ($P < 0.01$)。同时, 李潘营等^[13]提出, 也可以通过氧合指数检测、肺通透指数等方面来对过敏性哮喘大鼠的肺功能进行评价。

5 总结

随着过敏性哮喘动物模型的出现, 大大加快了

过敏性哮喘的研究进程, 但现有的哮喘模型仅能表现过敏性哮喘某特定阶段的部分病理表现。虽然至今还没有任何一种哮喘动物模型能完全概括人类过敏性哮喘的发生发展过程, 但是通过动物实验过程中构建过敏性哮喘动物模型, 能使我们更好的研究药物及其他治疗方法对过敏性哮喘机制的影响, 为实验结果应用于临床提供可靠帮助。本文对近 5 年来制作过敏性哮喘大鼠模型时所选用的常用大鼠品系、不同的致敏方式和致敏浓度, 以及部分评价造模成功时的指标进行了综合阐述, 为后续研究人员在制作过敏性哮喘大鼠模型时, 能更准确地选择大鼠品系以及试剂种类, 并以此选择合适的造模方式及造模成功的评价方式, 提供了有力支持, 并推进实验顺利开展。

参考文献:

- [1] Al-Azzam N, Elsalem L. Leukotriene D (4) role in allergic asthma pathogenesis from cellular and therapeutic perspectives [J]. Life Sci, 2020, 260: 118452.
- [2] Morianos I, Semitekolou M. Dendritic cells: critical regulators of allergic asthma [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 7930.
- [3] Theofani E, Semitekolou M, Morianos I, et al. Targeting NLRP3 inflammasome activation in severe asthma [J]. J Clin Med, 2019, 8(10): 1615.
- [4] 中华医学会变态反应分会呼吸过敏学组, 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 中国过敏性哮喘诊治指南 (第一版, 2019 年) [J]. 中华内科杂志, 2019, 58(9): 636-655.
- [5] 李泳兴, 钟鸣, 王勇, 等. 常用哮喘动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 97-101.
- [6] 何婷, 钱佩瑶, 洪敏, 等. 诱发支气管哮喘动物模型气道重塑特征的方法和评价 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 117-123.
- [7] Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(7): 973-988.
- [8] Kucharewicz I, Bodzenta-Lukaszyk A, Buczek W. Experimental asthma in rats [J]. Pharmacol Rep, 2008, 60(6): 783-788.
- [9] 王艳宏, 樊建, 栾宁, 等. 白芥子散及其拆方对过敏性哮喘大鼠 Ig-E、IL-4、IFN-γ 和 TNF-α 的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(18): 1491-1496.
- [10] 李慧, 邢学勇, 王一新, 等. 基于 NF-κB/MAPK 信号通路研究鱼藤素对过敏性哮喘大鼠的作用机制 [J]. 中医学报, 2021, 36(10): 2183-2187.
- [11] 华金双, 邵素菊, 王培育, 等. 逆针灸对过敏性哮喘大鼠血清 IL-2 含量及肺组织 GATA-3 蛋白表达的影响 [J]. 中医研究, 2020, 33(5): 63-67.
- [12] 黄聪, 彭伟, 魏大能, 等. 清半夏多糖对过敏性哮喘模型大鼠肺组织 MUC5AC mRNA 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 15-21.
- [13] 李潘营, 袁培培, 侯颖, 等. 葶苈子活性组分通过调控气道

- 炎症和上皮损伤改善过敏性哮喘大鼠肺通透性 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 1009-1016.
- [14] 金禹彤, 吴凌韬, 陈姗, 等. 穴位贴敷对过敏性哮喘大鼠血清转化生长因子 $\beta 1$ 和尾加压素 II 的影响 [J]. 中医杂志, 2017, 58(22): 1957-1960.
- [15] Rajizadeh MA, Najafipour H, Samareh FM, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of myrtenol in the rats with allergic asthma [J]. Iran J Pharm Res, 2019, 18(3): 1488-1498.
- [16] Xiong Y, Hu S, Zhou H, et al. High-throughput 16S rDNA sequencing of the pulmonary microbiome of rats with allergic asthma [J]. Genes Dis, 2020, 7(2): 272-282.
- [17] 王铁柱. 从肠道菌群角度探讨温通方对过敏性哮喘大鼠的治疗作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [18] 赵叶. “三穴五针法”对过敏性支气管哮喘大鼠肺组织 MEK/ERK 通路的影响研究 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2017.
- [19] Heiran H, Ahmadi M, Rahbarghazi R, et al. C-Kit⁺ progenitors restore rat asthmatic lung function by modulation of T-bet and GATA-3 expression [J]. Exp Physiol, 2020, 105(9): 1623-1633.
- [20] Song J, Zhu XM, Wei QY. MSCs reduce airway remodeling in the lungs of asthmatic rats through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(21): 11199-11211.
- [21] Wang Y, Zhu H, Tong J, et al. Ligustrazine inhibits lung phosphodiesterase activity in a rat model of allergic asthma [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 1-10.
- [22] Xie A, Song J, Lu S, et al. Influence of diet on the effect of the probiotic lactobacillus paracasei in rats suffering from allergic asthma [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 737622.
- [23] Liu Y, Zhang L, Ma T, et al. Feishu acupuncture inhibits acetylcholine synthesis and restores muscarinic acetylcholine receptor m2 expression in the lung when treating allergic asthma [J]. Inflammation, 2018, 41(3): 741-750.
- [24] Zhou J, Bai W, Liu Q, et al. Silencing of ADAM33 restrains proliferation and induces apoptosis of airway smooth muscle cells in ovalbumin-induced asthma model [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(2): 1435-1443.
- [25] Azman S, Sekar M, Wahidin S, et al. Embelin alleviates severe airway inflammation in ova-LPS-induced rat model of allergic asthma [J]. J Asthma Allergy, 2021, 14: 1511-1525.
- [26] Pérez M, Pérez-Cano FJ, Rodríguez-Lagunas MJ, et al. development and characterization of an allergic asthma rat model for interventional studies [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3841.
- [27] 张睦涵, 朱振刚. 哮喘动物模型建立的研究进展 [J]. 实验动物科学, 2018, 35(4): 83-86.
- [28] 妥海燕, 王志旺, 任远, 等. 卵清白蛋白复制哮喘动物模型的方法及评价研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2016, 33(1): 71-74.
- [29] Giavina-Bianchi P, Aun MV, Takejima P, et al. United airway disease: current perspectives [J]. J Asthma Allergy, 2016, 9: 93-100.
- [30] Anto JM, Bousquet J, Akdis M, et al. Mechanisms of the development of allergy (McDALL): introducing novel concepts in allergy phenotypes [J]. J Allergy Clin Immunol, 2017, 139(2): 388-399.
- [31] Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2): S73-S80.
- [32] Khumalo J, Kirstein F, Scibiorek M, et al. Therapeutic and prophylactic deletion of IL-4Ra-signaling ameliorates established ovalbumin induced allergic asthma [J]. Allergy, 2020, 75(6): 1347-1360.
- [33] Liu F, Shang YX. Sirtuin 6 attenuates epithelial-mesenchymal transition by suppressing the TGF- $\beta 1$ /Smad3 pathway and c-Jun in asthma models [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 82: 106333.
- [34] Méndez-Enríquez E, Hallgren J. Mast cells and their progenitors in allergic asthma [J]. Front Immunol, 2019, 10: 821.
- [35] Oh J, Malter JS. Pin1-FADD interactions regulate Fas-mediated apoptosis in activated eosinophils [J]. J Immunol, 2013, 190(10): 4937-4945.
- [36] Yan Y, Bao H, Li C, et al. Wentong decoction cures allergic bronchial asthma by regulating the apoptosis imbalance of EOS [J]. Chin Med, 2018, 13(1): 1-11.
- [37] 郑凌霄, 于芬芳, 刘曼曼, 等. 哮喘小鼠动物模型的建立与评价 [J]. 热带病与寄生虫学, 2017, 15(4): 244-247.

[收稿日期]2022-05-19

刘洪刚,卓美娟,聂洪鑫,等. 出血性休克动物选择与并发其它疾病模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 138-143.

Liu HG, Zhuo MJ, Nie HX, et al. Progress in selection of animals for hemorrhagic shock and models of other concurrent diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 138-143.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.018

出血性休克动物选择与并发其它疾病模型的研究进展

刘洪刚¹, 卓美娟², 聂洪鑫³, 孟 辉^{1*}

(1. 遵义医科大学第五附属(珠海)医院胸心外科, 广东 珠海 519100; 2. 遵义医科大学第五附属(珠海)医院口腔颌面外科, 广东 珠海 519100; 3. 大连医科大学附属第二医院急诊科, 辽宁 大连 116000)

【摘要】 出血性休克是临床常见的死亡原因之一, 多见于创伤引起的四肢骨折及重要脏器破裂、动脉瘤破裂等原因所致大量出血。现如今, 有关出血性休克(hemorrhagic shock, HS)的原因、诱因和机制及动物模型的构建已基本明确, 但有关 HS 合并或并发其它疾病的动物模型还有待于进一步研究。因而, 本文就出血性休克模型不同动物的选择与应用与其合并或并发其它疾病动物模型的研究现状进行综述, 旨在为临床医生在 HS 相关的模型选择和应用方面提供参考。

【关键词】 出血性休克; 动物模型; 疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0138-06

Progress in selection of animals for hemorrhagic shock and models of other concurrent diseases

LIU Honggang¹, ZHUO Meijuan², NIE Hongxin³, MENG Hui^{1*}

(1. Department of CardioThoracic Surgery, the Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100, China. 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Fifth Affiliated (Zhuhai) Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai 519100. 3. Department of Emergency Medicine, the Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000)

【Abstract】 Hemorrhagic shock (HS) is one of the common causes of death, which is mostly due to trauma-induced fracture of limbs and rupture of vital organs, aneurysm rupture, and other causes of massive bleeding. The causes, triggers, and mechanisms of HS and establishment of animal models have been largely clarified, but animal models of HS combined with or complicated by other diseases need to be investigated further. Thus, we reviewed the current research status of the selection and application of various animals for HS models and their combination or complication with other disease models to provide researchers with a reference for the selection and application of HS-related models.

【Keywords】 hemorrhagic shock; animal models; diseases

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

休克是由于各种原因引起的机体有效循环血量减少、组织灌注不足而导致的细胞缺氧和功能受

损的临床综合征, 主要包括出血性休克(hemorrhagic shock, HS)、感染性休克、心源性休克、神经源性休

【基金项目】 贵州省科技厅基础研究项目(黔科合作基础-ZK[2021]一般 352); 遵义医科大学博士启动基金(BS2021-02)。

【作者简介】 刘洪刚(1994—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: cDCD 肺移植。E-mail: 1171402641@qq.com

【通信作者】 孟辉(1968—), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 肺移植。E-mail: mhgl2008@163.com

克和过敏性休克^[1]。出血性休克是临床常见的死亡原因,当机体内失血量超过全身总血量的 20% 时,即可出现一系列由于血容量灌注不足所致的临床表现。据报道,全世界每年约有 190 万人死于 HS,其中约 150 万人死于严重的机体创伤^[2]。如今,有关 HS 的发病原因、诱因和机制及动物模型的构建已基本明确,但有关 HS 合并或并发其它疾病如 HS 濒死期循环死亡(donation after circulation, DCD)、HS 心脏骤停的动物模型还有待于进一步研究。本文就出血性休克模型不同动物的选择与应用与其合并或并发其它疾病动物模型的研究现状综述如下。

1 出血性休克造模方法

出血性休克造模方法大致有定容性、定压性、非控制性 3 种类型^[3]。定容性出血性休克模型是在麻醉状态、规定时间内控制实验动物血容量进行建模,通过该模型可进一步研究动物的血流动力学,其不足之处在于不能控制低血压程度;定压性出血性休克模型是在麻醉状态下进行放血、将血压控制在预定的范围内维持一段时间,通过监测血压来准确地控制低血压的程度和持续时间;非控制性出血性休克模型是由标准化血管损伤(肝脾挤压/撕裂、动脉损伤)引起的出血,这种出血性休克模型更贴近创伤后临床患者的表现。与定容性模型相比,基于实验标准化和可重复性的特点,定压性方法是更可靠。Sondeen 等^[4]研究表明,非控制性出血性休克模型在一定程度上可以弥补控制性出血性休克在血容量丧失和血压变化方面上的不足。

2 不同动物出血性休克模型的选择及应用与其合并或并发其他疾病

2.1 小鼠出血性休克模型的选择及应用与其合并肠道损伤

接近交系实验小鼠分为 BALB/c 小鼠、C57BL 小鼠、C3H 小鼠和 615 小鼠。因小鼠与人类基因具有高度相似性、较高性价比,小鼠是出血性休克模型的首选实验动物。Takao 等^[5]研究发现小鼠的炎症基因表达模式与人类炎症基因表达模式非常相似,说明小鼠用作制备人类疾病的动物模型是有实验优越性。Oyama 等^[6]通过实验将小鼠分别暴露于标准室内光和强光后,然后对小鼠进行麻醉、气管插管和机械通气,经颈动脉插管进行血压监测和抽血,使平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)在

15 min 内降至 30~35 mmHg,达到出血性休克的血压标准;通过进一步分析支气管肺泡灌洗液的白蛋白和炎症因子指标,结果显示肺泡灌洗液的白蛋白、IL-6 和 IL-8 在强光实验中的表达水平显著降低,由此得出强光可能在小鼠出血性休克期降低对肺组织的进一步损伤。Gröger 等^[7]选择 C57BL 小鼠构建定压性出血性休克模型(MAP 35 mmHg, 60 min),研究 3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-MST)的基因突变对创伤性出血性休克小鼠在休克恢复期肺和肾损伤的影响,结果显示 3-MST 缺乏对创伤出血性休克小鼠的血流动力学和新陈代谢方面无影响。Dyer 等^[8]通过小鼠肝撕裂伤的方法建立了一种可靠、规范的非控制性出血性休克模型,通过向肝撕裂实验小鼠静脉注射合成血小板,发现此方法可以改善出血性休克小鼠的血流动力学,并且损伤后出现低血压的时间明显延长。严重多发性肠道损伤常伴有出血性休克,通过 HS 合并肠道损伤动物模型的建立,探索控制动物模型肠道损伤的途径。Kao 等^[9]通过建立 HS 合并肠道损伤小鼠模型,研究了 C-肽可通过减少 TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1 和巨噬细胞趋化蛋白-1 来降低小鼠的炎症反应,并进一步提高了存活率。因此,使用小鼠来建立 HS 合并肠道损伤的优势在于有身体较小易操作、小鼠成本较低以及小鼠易于护理等诸多优势。当然,小鼠也存在血容量较少、插管困难等劣势,因而小鼠并不适用于血流动力学方面模型的研究。

2.2 大鼠出血性休克模型的选择及应用与其合并肺损伤

实验大鼠常用的品系有 SD、Wistar、SHR 和 F344 大鼠等 4 种。SD 大鼠是最常用品系,用于模拟 HS、肺损伤、多发性创伤、脑震荡、长骨骨折和钝性胸部创伤,其次是 Wistar 以及其他品系大鼠^[10]。Yadav 等^[11]通过抽取约 50% 的 SD 大鼠循环血液来诱导出出血性休克建立了定容性出血性休克大鼠模型,证实了联苯二氟铜(EF24)在出血性休克期间可以减轻由于创伤出血引起的炎症反应。Chu 等^[12]等利用 SD 大鼠定压性出血性休克模型(MAP 40 mmHg, 60 min),研究发现早期静脉注射氨甲环酸可改善中性粒细胞在创伤出血性休克期间引起的肠道屏障损伤。Lee 等^[13]采用大鼠 80% 截尾法建立非控制性出血性休克模型,研究得出在治疗出血性休克复苏期间使用脂质体加压素的大鼠比使用加压素的大鼠有更好的结果。由于大鼠的血容量比

小鼠多,因而大鼠出血性休克模型的建立比小鼠相对更容易。此外,同小鼠一样,大鼠对出血性休克的部分免疫反应可能与人类相似,大鼠最实用的出血性模型也是固定压力出血。不过,大鼠的顺从性较差、血管壁脆、手术操作难度较高从而影响建模的成功率。目前关于建立 HS 合并大鼠肺损伤模型的方法主要是通过模拟肺部的撞击伤、坠落伤、挤压伤等。Ming 等^[14]在研究 HS 合并大鼠肺损伤(撞击伤致肺损伤模型)时发现,通过输注右美托咪定可以减轻肺水肿和炎症反应,证实右美托咪定对急性肺损伤有保护作用。Teng 等^[15]通过建立大鼠 HS 合并肺损伤模型,研究了静脉注射氨甲环酸后对支气管肺泡灌洗液和血清中炎症因子(IL-6、TNF- α)的影响,证明了静脉注射氨甲环酸可以减轻大鼠体内肺部炎症反应。

2.3 兔出血性休克模型的选择及应用与其合并脾损伤

新西兰大白兔、日本大耳白兔和中国白兔是实验兔主要的 3 种类型。兔是第一个应用于免疫学研究模型的动物,其优势在于它的体型介于啮齿类动物和更大、更昂贵的动物模型之间^[16]。同时,因兔的体型可以随时采集血液、更容易获取许多细胞和组织。此外,兔的寿命比啮齿类动物长,而且兔的免疫系统基因与啮齿类动物相比更接近于人类免疫系统的基因^[17]。Luo 等^[18]选用新西兰大白兔建立定压性出血性休克模型(MAP 45~50 mmHg, 3 min),研究激光多普勒成像在出血性休克期间对兔耳微循环的应用,揭示了激光多普勒成像是一种无创性、非接触性的微循环评价方法,可以为 HS 的诊断和治疗提供有益的帮助。Komori 等^[19]通过控制日本白化兔的出血量,按照 20 mL/min(循环血量的 10%~13%),每隔 3 min 放血 4 次,总出血量为 80 mL,成功制备了定容性出血性休克模型,研究羟乙基淀粉在出血性休克期间对实验兔微循环、中心静脉血氧饱和度和中心静脉-动脉二氧化碳的影响,并阐明了羟乙基淀粉对比晶体液在 HS 期间对机体复苏的优缺点。Hagisawa 等^[20]通过制备新西兰大白兔严重出血性休克模型(MAP (20 $\pm$ 2) mmHg, 10 min),研究发现通过骨骼内输注血红蛋白要比输注胶体、晶体液、全血或红细胞悬液输注在治疗严重出血性休克复苏时效果显著。脾破裂是临床上较常见的外科急症,占腹腔脏器损伤中的 45%左右,由于脾组织脆弱,血运丰富,稍受外力就

可破裂。一旦破裂将出现大出血的症状,导致患者发生出血性休克。Zhang 等^[21]通过新西兰大白兔脾损伤方法建立非控制性出血性休克模型,研究发现使用新型液体组合(高渗盐水溶液和乳酸林格液+羟乙基淀粉,比例为 2:1)的方式进行液体复苏会减少非控制性模型的失血量,同时在低血压时能够更好地稳定血流动力学。现如今,兔作为常用动物模型已经越来越多地被应用到人类疾病模型构建,同时兔具有与人类相似的心脏电生理学,可以更好地作为出血性休克模型。与其它大型动物模型相比,兔作为出血性休克模型具有操作方便、成本相对较低、妊娠期较短、后代数量多、大小相对合适等优点^[22]。

2.4 犬出血性休克模型的选择及应用与其合并多发损伤

比格犬、四系杂交犬、纽芬兰犬、墨西哥无毛犬是实验犬的 4 种分型。犬在休克血流动力学的反应方面与人类不经相同,进行犬的出血性休克模型前要提前将犬的脾切除,目的是为了消除自体回血的代偿性应激作用,但这可能会改变机体对损伤和休克的免疫反应。近年来,很多学者都在使用 Wiggers 创立的定压性出血性休克模型^[23],并不断地进行改良。Pavliko 等^[24]通过建立比格犬定压性出血性休克模型(MAP 55 mmHg, 5 min),研究超声引导下进行实验犬股动脉插管术,成功率达 80%,证明超声引导下行股动脉插管在急性比格犬出血性休克模型中的可行性。Ke 等^[25]也建立比格犬定压性出血性休克模型(MAP 40 mmHg, 20 min),验证通过硅管重新连接比格犬被横断的小肠是一种可行的控制损伤方法。Davis 等^[26]同样采用犬定压性出血性休克模型(MAP 40 mmHg, 60 min)研究白藜芦醇对肾的影响,结果发现白藜芦醇可能会影响出血性休克期间血凝块强度和凝血酶生成。现如今,交通、自然灾害、建筑工地等因素引起的 HS 多发伤发生率越来越多,如何快速现场一线救护、研究无电化救治装置?为解决这个问题就需要建立 HS 多发伤动物模型来初步验证。单一因素指标制作的动物模型不可能全面准确的反应自然灾害、恐怖袭击和非常规战争发生出血性休克的具体情况。孟辉等^[27]在国内首次用比格犬构建微创血气胸、失血休克模型与多根多段肋骨骨折、创伤性血胸、张力性气胸、失血性休克两种模型,结果显示本法制作的大动物胸部多发伤失血性休克模型成功率高、可重

复性强。由于该模型与临床十分贴近,因此更加符合临床创伤患者的进一步研究。犬作为出血性休克合并多发伤模型的优势在于遗传性能稳定、品种固定且优良、一般无遗传性神经疾患、对环境的适应力和抗病力较强,现已广泛应用于人类疾病模型。

2.5 猪出血性休克模型的选择及应用与其合并脑损伤

实验猪有哥根廷小型猪、明尼苏达-霍麦尔小型猪、皮特曼-摩尔小型猪、西藏小型猪、广西巴马小型猪、约克夏猪共 6 种。猪既是作为理想的出血性动物休克模型又是器官移植和人类疾病研究领域重要的动物模型。长期以来,猪一直用于外科手术模型,其原因在于它们体型适中、有与人类相似的心血管解剖学和生理学^[28]。Morris 等^[29]建立约克夏猪定压出血性休克模型(MAP (35±5) mmHg, 1 h),研究休克期肺中性粒细胞浸润可作为急性肺损伤的早期标志物,通过猪出血性休克模型的可重复性研究发现,其与人类 HS 的生理变化一致。Wu 等^[30]构建北京长白猪的定压出血性休克模型(MAP (40±3) mmHg, 60 min),研究参附注射液与生理盐水分别在 HS 后对大脑皮层组织 IL-6、TNF-α 等炎症因子的影响,证明参附注射液能改善出血性休克后脑微循环、减少脑损伤,还可以改善心脏骤停复苏后的肠系膜微血管血流变化。同年, Liang 等^[31]使用相同猪定压出血性休克模型(MAP 40 mmHg, 60 min)研究发现,参附注射液对出血性休克猪的肠道上皮细胞具有明显的保护作用。Yanala 等^[32]通过建立猪脾切除和肝损伤的方法建立非控制出血性休克模型进行研究发现,使用缓慢的输液速度进行液体复苏时可以减少出血性休克后的失血量。创伤性脑损伤是急症中心常见的损伤相关性疾病,外伤严重时由于无法及时、有效地止血处置常合并出血性休克。其原发性损伤不可逆转,继发性损伤导致的神经细胞死亡是创伤性脑损伤的病理生理机制和潜在的治疗靶点,如何减少神经元死亡是治其继发性损伤的关键策略之一。目前研究表明复苏时的精准液体治疗,保证脑组织灌注,维持脑氧供需平衡,可显著减少继发性脑损伤。但是,选用何种动物是建立 HS 合并创伤性脑损伤动物模型的研究重点。Dekker 等^[33]使用猪制备冲击伤模型探寻 HS 合并创伤性脑损伤时丙戊酸(一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂)对继发性脑损伤的影响。Mayer 等^[34]同样选用猪建立 HS 合并创伤性脑损伤模型,

该研究发现通过静脉输注 17α-乙炔雌二醇-3-硫酸酯(一种雌性激素)比选用 0.45% 氯化钠溶液在心血管恢复和保护神经方面效果更显著。猪作为出血性休克合并脑损伤模型的优势不仅在于心血管和血流动力学方面与人类有较高的相似度,而且在皮肤伤口愈合方面和新陈代谢方面亦与人类十分相似,在免疫方面的应用更越来越广泛^[35-36]。

2.6 灵长类动物出血性休克模型的选择及应用与其合并肾损伤

灵长类动物作为实验动物模型常用的品种主要有恒河猴、熊猴、短尾猴、食蟹猴、平顶猴。在遗传学方面,灵长类动物是最接近人类的动物;在压力和低血容量性休克方面具有与人类相似的生理反应,并在药物代谢方面与人类高度一致,所以灵长类动物作为人类理想的动物模型具有先天优势^[37]。Sheppard 等^[38]通过建立恒河猴定压性出血性休克模型(MAP 20~24 mmHg, 30 min),研究恒河猴在出血性休克期间生理、代谢、免疫和凝血反应,以及合并肌肉骨骼损伤和软组织损伤时的反应。证明恒河猴是一种更容易实现人类创伤的动物模型,以便用于未来临床治疗测试和评估。Crossland 等^[39]通过建立灵长类动物左半肝切除术的方法建立非控制性出血性休克模型,并证明了评估休克状态下严重程度的首要指标是组织氧饱和度(StO_2)、潮气末二氧化碳($ETCO_2$)和循环乳酸。急性肾损伤同样是出血性休克患者的最主要并发症之一,患者在急性肾损伤后可出现不可逆性肾功能下降以及慢性肾脏疾病,是导致出血性休克患者死亡的重要原因之一。Halbgebauer 等^[40]通过建立雄性食蟹猴定压性出血性休克模型(MAP 30 mmHg, 60 min),研究 Thirty-Eight-Negative Kinase 1 (TNK1)在出血性休克期间的表达对肾损伤的影响,说明体内补体 C_3 通过中和 TNK1 来抑制机体内炎性介质的释放和炎症反应。虽然灵长类动物是在遗传学、生理学和行为方面是与人类最接近的动物模型,但其主要缺点是创建急性和慢性损伤模型时成本和伦理问题的复杂性是主要限制因素^[41],因此,灵长类动物模型在临床应用方面相对较少。

3 展望

综上所述,尽管出血性休克动物模型应用十分广泛,但在选择适当的出血性休克动物模型时还应考虑实验动物的可用性、成本、伦理、与人体解剖学

和生理学的相似性等问题。为了研究与血性休克相关的病理生理学和治疗措施,通常优先出选择可控性和可重复性比较好的定压性和定容性的出血性休克模型。然而,对于非控制性出血性休克模型,特别是与其它创伤疾病相结合时,选择此模型则更具有临床意义,不过有关此类模型还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Glandl T, Annecke T, Cascorbi I, et al. The nomenclature, definition and distinction of types of shock [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2018, 115(45): 757-768.
- [2] Cannon JW. Hemorrhagic shock [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(4): 370-379.
- [3] Fülöp A, Turóczy Z, Garbais D, et al. Experimental models of hemorrhagic shock; a review [J]. *Eur Surg Res*, 2013, 50(2): 57-70.
- [4] Sondeen JL, Dubick MA, Holcomb JB, et al. Uncontrolled hemorrhage differs from volume- or pressure-matched controlled hemorrhage in swine [J]. *Shock*, 2007, 28(4): 426-433.
- [5] Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(4): 1167-1172.
- [6] Oyama Y, Shuff S, Maddry JK, et al. Intense Light pretreatment improves hemodynamics, barrier function and inflammation in a murine model of hemorrhagic shock lung [J]. *Mil Med*, 2020, 185(9-10): e1542-e1550.
- [7] Gröger M, Wepler M, Wachter U, et al. The effects of genetic 3-mercaptopurinate sulfurtransferase deficiency in murine traumatic-hemorrhagic shock [J]. *Shock*, 2019, 51(4): 472-478.
- [8] Dyer MR, Hickman D, Luc N, et al. Intravenous administration of synthetic platelets (SynthoPlate) in a mouse liver injury model of uncontrolled hemorrhage improves hemostasis [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2018, 84(6): 917-923.
- [9] Kao RLC, Xu X, Xenocostas A, et al. C-peptide attenuates acute lung inflammation in a murine model of hemorrhagic shock and resuscitation by reducing gut injury [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2017, 83(2): 256-262.
- [10] Morgan CE, Prakash VS, Vercammen JM, et al. Development and validation of 4 different rat models of uncontrolled hemorrhage [J]. *JAMA Surg*, 2015, 150(4): 316-324.
- [11] Yadav VR, Sahoo K, Roberts PR, et al. Pharmacologic suppression of inflammation by a diphenyldifluoroketone, EF24, in a rat model of fixed-volume hemorrhage improves survival [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 347(2): 346-356.
- [12] Chu C, Yang C, Wang X, et al. Early intravenous administration of tranexamic acid ameliorates intestinal barrier injury induced by neutrophil extracellular traps in a rat model of trauma/hemorrhagic shock [J]. *Surgery*, 2020, 167(2): 340-351.
- [13] Lee MT, Wang HM, Ho JA, et al. Resuscitation using liposomal vasopressin in an animal model of uncontrolled hemorrhagic shock [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130655.
- [14] Ming T, Yuan M, Kong Q, et al. Dexmedetomidine alleviates blunt chest trauma and hemorrhagic shock resuscitation induced acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2507-2515.
- [15] Teng Y, Feng C, Liu Y, et al. Anti-inflammatory effect of tranexamic acid against trauma-hemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats [J]. *Exp Anim*, 2018, 67(3): 313-320.
- [16] Pinheiro A, Neves F, Lemos DE, et al. An overview of the lagomorph immune system and its genetic diversity [J]. *Immunogenetics*, 2016, 68(2): 83-107.
- [17] Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf HM, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(5): 1-10.
- [18] Luo Z, Wang P, Zhang A, et al. Evaluation of the microcirculation in a rabbit hemorrhagic shock model using laser Doppler imaging [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116076.
- [19] Komori M, Samejima Y, Okamura K, et al. Effects of crystalloids and colloids on microcirculation, central venous oxygen saturation, and central venous-to-arterial carbon dioxide gap in a rabbit model of hemorrhagic shock [J]. *J Anesth*, 2019, 33(1): 108-117.
- [20] Hagiwara K, Kinoshita M, Saitoh D, et al. Intraosseous transfusion of hemoglobin vesicles in the treatment of hemorrhagic shock with collapsed vessels in a rabbit model [J]. *Transfusion*, 2020, 60(7): 1400-1409.
- [21] Zhang YM, Gao B, Wang JJ, et al. Effect of hypotensive resuscitation with a novel combination of fluids in a rabbit model of uncontrolled hemorrhagic shock [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66916.
- [22] Giraldo A, Talavera LJ, Brooks G, et al. Transthoracic echocardiographic examination in the rabbit model [J]. *J Vis Exp*, 2019, 1(148): e59457.
- [23] Mochhala S, Wu J, Lu J. Hemorrhagic shock; an overview of animal models [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14(12): 4631-4639.
- [24] Pavlisko ND, Soares JHN, Henao-Guerrero NP, et al. Ultrasound-guided catheterization of the femoral artery in a canine model of acute hemorrhagic shock [J]. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 2018, 28(6): 579-584.
- [25] Ke J, Wu W, Lin N, et al. A novel method for multiple bowel injuries: a pilot canine experiment [J]. *World J Emerg Surg*, 2017, 12(1): 44.
- [26] Davis J, Rasis AL, Sharp CR, et al. Improved cardiovascular tolerance to hemorrhage after oral resveratrol pretreatment in dogs [J]. *Vet Sci*, 2021, 8(7): 129.
- [27] 孟辉, 郑军, 李庆新, 等. 比格犬胸部多发伤出血性休克模型建立 [J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(12): 51-55.
- [28] Goes AMO, Chaves RHF, Furlaneto IP, et al. Comparative

- angiotomographic study of swine vascular anatomy: contributions to research and training models in vascular and endovascular surgery [J]. J Vasc Bras, 2021, 20: e20200086.
- [29] Morris MC, Kim Y, Blakeman TC, et al. Early identification of acute lung injury in a porcine model of hemorrhagic shock [J]. J Surg Res, 2020, 247: 453–60.
- [30] Wu J, Li Z, Yuan W, et al. Shenfu injection improves cerebral microcirculation and reduces brain injury in a porcine model of hemorrhagic shock [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2021, 78(2): 175–185.
- [31] Liang Y, Li C, Yuan W, et al. Protective effect of Shenfu on gut epithelium in a porcine model of hemorrhagic shock [J]. J Invest Med, 2021, 69(7): 1360–1366.
- [32] Yanala UR, Johanning JM, Pipinos II, et al. Fluid administration rate for uncontrolled intraabdominal hemorrhage in swine [J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0207708.
- [33] Dekker SE, Biesterveld BE, Bambakidis T, et al. Modulation of brain transcriptome by combined histone deacetylase inhibition and plasma treatment following traumatic brain injury and hemorrhagic shock [J]. Shock, 2021, 55(1): 110–120.
- [34] Mayer AR, Dodd AB, Rannou-Latella JG, et al. 17 α -Ethinyl estradiol-3-sulfate increases survival and hemodynamic functioning in a large animal model of combined traumatic brain injury and hemorrhagic shock: a randomized control trial [J]. Crit Care, 2021, 25(1): 428.
- [35] Grada A, Mervis J, Falanga V. Research techniques made simple: animal models of wound healing [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(10): 2095–2105.
- [36] Pabst R. The pig as a model for immunology research [J]. Cell Tissue Res, 2020, 380(2): 287–304.
- [37] Chen Y, Niu Y, Ji W. Genome editing in nonhuman primates: approach to generating human disease models [J]. J Intern Med, 2016, 280(3): 246–251.
- [38] Sheppard FR, Macko AR, Glaser JJ, et al. Nonhuman primate (*Rhesus macaque*) models of severe pressure-targeted hemorrhagic and polytraumatic hemorrhagic shock [J]. Shock, 2018, 49(2): 174–186.
- [39] Crossland RF, Mitchell A, Macko AR, et al. Rapid assessment of shock in a nonhuman primate model of uncontrolled hemorrhage: Association of traditional and nontraditional vital signs to mortality risk [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2016, 80(4): 610–616.
- [40] Halbgebauer R, Karasu E, Braun CK, et al. Thirty-eight-negative kinase 1 is a mediator of acute kidney injury in experimental and clinical traumatic hemorrhagic shock [J]. Front Immunol, 2020, 11: 2081.
- [41] Harding JD. Nonhuman primates and translational research: progress, opportunities, and challenges [J]. ILAR J, 2017, 58(2): 141–150.

〔收稿日期〕2022-05-06

李延康, 贺钢枫. Siglec-15 抗体在非小细胞肺癌中的调控机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 144-148.

Li YK, He GF. Role of anti-Siglec-15 in non-small cell lung cancer [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 144-148.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.019

Siglec-15 抗体在非小细胞肺癌中的调控机制研究

李延康, 贺钢枫*

(包头市中心医院(内蒙古医科大学包头临床医学院)心胸外科, 内蒙古 包头 014000)

【摘要】 唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素-15(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin, Siglec-15)作为新发现的一种免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs),其广泛表达于多种肿瘤细胞,并与程序性死亡受体 1(programmed cell death 1, PD-1)和程序性死亡受体-配体 1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)的表达互斥,可以作为一个新的 ICIs 治疗靶点,为 PD-1/PD-L1 治疗无响应的患者提供另一种治疗选择。本文拟从 Siglec-15 的特征通路、参与免疫调节机制以及在肿瘤相关的表达等方面的近期研究成果综述。分析研究 Siglec-15 抗体的临床应用结果,探讨 Siglec-15 在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗中的应用意义以及治疗前景。

【关键词】 免疫检查点抑制剂;唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素-15;非小细胞肺癌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0144-05

Role of anti-Siglec-15 in non-small cell lung cancer

LI Yankang, HE Gangfeng*

(Baotou Central Hospital (the Baotou Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University),
Department of Cardiothoracic Surgery, Baotou 014000, China)

【Abstract】 As a newly discovered ICI, Siglec-15 is widely expressed in various tumor cell types, and PD-1/PD-L1 expressions is mutually exclusive. Siglec-15 may be a new therapeutic target for PD-1/PD-L1 as a treatment option for patients who do not respond to therapy. This review discusses the recent research of the characteristic pathways of Siglec-15, its involvement in immune regulation mechanisms, and its tumor-related expression. Clinical application of an anti-Siglec-15 antibody was analyzed, and the therapeutic prospect of Siglec-15 for NSCLC treatment is discussed.

【Keywords】 ICIs; Siglec-15; NSCLC

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

2020 年全球统计新发肺癌患者近 220 万例,死亡人数占比达 18%。肺癌被认为是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一^[1]。手术行肺段、肺叶乃至全肺切除是 IA 期至 IIIA 期可耐受手术患者的第一选择。而针对无法耐受手术的患者或临床分期在 IIIB 期至 IV 期的患者,如果同时具备表皮因子生长受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞间质上皮转换因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)或 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(kirsten rat sarcoma viral oncogene

homolog, KRAS)等基因位点的阳性突变,可以根据突变结果选择针对性靶向治疗药物^[2-3]。但靶向治疗药物的获益群体仅限于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)驱动基因突变且有对应药物的患者,对于没有驱动基因获益的 NSCLC 患者群体和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)患者群体而言,免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICIs)是除去传统放疗、化疗治疗外,又一可选治疗策略(图 1)。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的程序性死亡受体-1

【基金项目】 内蒙古医科大学百万工程(YKD2017KJBW(LW)048-544)。

【作者简介】 李延康(1990—),男,在读硕士研究生,研究方向:胸外科。E-mail: lykang_1990@126.com

【通信作者】 贺钢枫(1963—),男,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:胸外科。E-mail: hgfdactor@126.com

(programmed cell death 1, PD-1)和程序性死亡受体-配体 1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)分子过度表达是部分实体肿瘤患者的主要免疫逃逸机制,抗体阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用可以使受损的免疫功能恢复正常,且不会产生其他过多的副作用。部分 PD-1/PD-L1 已经获批用于 NSCLC 和 SCLC 的一线使用^[4-6],是目前 ICI 治疗 NSCLC 的主要策略。但需要引起注意的是,多中心、多样本的统计回顾表明,PD-1/PD-L1 在 NSCLC 中的获益占比仅约为 20%^[7]。针对 PD-1/PD-L1 无应答或已产生耐药性的现状,后续抗肿瘤治疗策略如何选择陷入困境之中,目前已有众多相关试验开展,以寻求抗肿瘤治疗新方向。本文将就唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素-15(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin, Siglec-15)以及其相关抗体在小鼠与人源 NSCLC 中的调控机制和临床应用的研究进展作一综述。

1 Siglec-15 的生物学特征

Siglec 家族是一类免疫球蛋白样凝集素,其成员多含有免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM),通过识别含有唾液酸(sialic acid, SA)的糖链结构,介导抑制性受体信号,并在人类癌细胞和肿瘤浸润髓系细胞中广泛表达,在免疫调节动态平衡方面起着重要作用。Siglec 家族总体分为两类,一类是序列可变的,如 Siglec-7、Siglec-9;另一类是序列不可变的,如 Siglec-15^[8]。Siglec 家族作为 I 型跨膜蛋白,其胞外由两种免疫球蛋白样结构域组成,分别为数个 2 型免疫球蛋白恒定区(immunoglobulin constant 2, IgC2)和 1 个免疫球蛋白可变区(immunoglobulin variable, IgV),其间由跨膜结构域连接^[9]。Siglec-15 作为 Siglecs 家族的成员是非常独特的,仅包含 1 个 IgC2 和 1 个 IgV;而且其胞质内并没有 ITIM,在免疫细胞及组织中普遍缺失,仅选择性在髓系细胞和破骨细胞中表达^[10]。研究指出,当 Siglec-15 发挥免疫作用时,其跨膜区赖氨酸 274 位点可以与 DNAX 激活蛋白-12(DNAX activation protein-12, DAP-12)结合;而 DAP-12 自身拥有一个 ITIM,可以募集酪氨酸激酶并使其磷酸化,进而向下游传递信号^[11]。研究表明, Siglec-15 的 IgV 结构域中含保守的精氨酸(R143)基序,在与 SA 结合的过程中起到关键性作用^[12],其可以作为巨噬细胞受体,识别在肿瘤中广泛表达的 SA-

Tn 抗原。而 SA 作为一种人体上表达的糖类,可以用来区分自体和非自体,同时介导细胞与病原体之间的相互作用^[13]。另有研究表明,一些病原体包括恶性肿瘤细胞,可以通过抑制 Siglec 家族来抑制自体免疫反应,延长自身的存活周期^[14]。

2 Siglec-15 参与免疫调节

Siglec 家族成员作为抑制性受体在多种淋巴和髓系来源的免疫细胞上表达,通过在抗原呈递细胞上的相关实验证明, Siglec-15 的表达抑制了小鼠 T 细胞的增殖,同时削弱了细胞因子的分泌以及杀伤力^[15],而这些动物实验表明, Siglec-15 可能通过某种机制尚不完全明确的受体,达到抑制小鼠 T 细胞,进而可能影响人类的 T 细胞的工作(图 1)。由此进一步实验,建立实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠模型,验证 Siglec-15 对 T 细胞的体内作用。与对照组相比, Siglec-15 基因敲除(knock out, KO)小鼠和注射 Siglec-15 胞外区融合蛋白的小鼠中, EAE 程度加重明显, T 细胞反应显著增强。在另一方面,与 PD-L1 KO 小鼠表达类似的是: Siglec-15 KO 小鼠在鸡卵白蛋白多肽刺激下,在血液中表现出比野生型(wild type, WT)小鼠更多的 I 型 T 特异性识别鸡卵白蛋白(ovalbumin T-I, OT-I)细胞增殖。探究其作用机制,白介素-10(interleukin-10, IL-10)在其中可能起到关键的作用,因为 Siglec15 KO 小鼠的血清 IL-10 水平低于 WT 小鼠,而 IL-10 单抗消除了 WT 小鼠和 Siglec-15 KO 小鼠在 OT-I 型 T 细胞增殖方面的差异^[16](图 1)。分析细胞增殖以及利用流式细胞术检测细胞凋亡的实验可证实 Siglec-15 通过调节细胞生长抑制 T 细胞作用^[17]。另有研究指出, Siglec-15 的抗体可由核因子 κ B 受体活化因子配体和巨噬细胞集落刺激因子共同诱导的多核破骨细胞生成^[18]。因肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)中的 TNF- α 和 TNF- β 可由多种上皮细胞、基质细胞、干细胞释放,有理由推测 Siglec-15 上调巨噬细胞表达可能是自然免疫以及获得性免疫的负反馈调节途径。值得一提的是,一些病原体,例如乙型链球菌,甚至已经衍生出相关的蛋白质,与髓系细胞上的抑制性 Siglec 家族成员结合,从而逃避免疫介导的杀伤^[19]。

3 Siglec-15 参与肿瘤相关表达

不可手术的 NSCLC 的治疗策略一直是困扰临

床医生抉择的难题。不同病理类型的 NSCLC、不同患者的自身个体差异等诸多因素,使得肿瘤治疗策略的个体化制定尤为重要。尽管 PD-1/PD-L1 为主要代表的免疫治疗在全世界范围内取得了优良的治疗效果,但并不是所有患者都具备 PD-1/PD-L1 阳性获益,而且免疫治疗后期的耐药现象也不可避免^[20]。在一项入组 291 例患者的胰腺导管腺癌的队列研究中表明,Siglec-15 和 PD-L1 的单独阳性表达率分别为 18.6% 和 30.3%,Siglec-15 和 PD-L1 共同阳性表达率为 6.1%,而 PD-L1 阴性表达同时 Siglec-15 阳性表达率则为 18%^[21]。Siglec-15 作为近年来新发现的肿瘤免疫逃逸途径,有研究指出,PD-L1 的主要诱导剂干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 显著抑制了巨噬细胞中 Siglec-15 的表达,使得 Siglec-15 与 PD-L1 的表达互斥^[22] (图 1)。换言之,Siglec-15 会出现与 PD-L1 互补的表达谱,使其可能成为解决免疫抑制的新靶点。与各自正常组织相比,Siglec-15 mRNA 在肺癌、结肠癌以及肾癌等多种肿瘤中表达显著上调,通过定量免疫荧光对 200 余例 NSCLC 标本进行免疫组化分析的进一步细化研究表明,共有 25.7% 的样本表达 Siglec-15 蛋白^[15]。而一项多中心的针对超过 600 余例 NSCLC 标本的检测中发现,与 KRAS 突变相比,EGFR 突变的肿瘤中 Siglec-15 表达更高,且与其它病理学特征无关^[23]。具体到 NSCLC 中不同的病理分型而言,腺癌中的 Siglec-15 表达量显著高于鳞癌,而鳞癌中的 PD-L1 表达量却又高于腺癌^[24]。不同病理类型肿瘤中 TME 的免疫逃逸机制高度不同,其中 TME 由肿瘤细胞、成纤维细胞、血管细胞、肿瘤浸润性淋

巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) 等组成。而 TILs 含有不同的细胞亚群,并在 TME 中发挥不同的作用,拥有正向免疫调节的细胞中则包含树突细胞、自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK) 和 CD8⁺T 细胞 (cluster of differentiation 8 positive cell, CD8⁺T) 等。这类细胞可以识别肿瘤细胞,并达到杀伤和清理的目的。Hao 等^[24] 实验证明了 Siglec-15 在肺腺癌的表达与 TILs 中 CD8⁺T 细胞的密度呈正相关,但值得注意的是,Siglec-15 表达含量多寡并不能用来判断 NSCLC 预后,与 TME 中的 TILs 关系也尚不完全明了 (图 1)。与人患肿瘤相对的是,常见的小鼠肺癌、结肠癌和黑色素瘤的模型中,均未检测到 Siglec-15 mRNA 的表达。但在含有丰富的肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 浸润的 B16-粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (B16-granulocyte macrophage colony stimulating factor, B16-GMCSF) 模型 (PD-1 不敏感) 中,可以检测到 Siglec-15 mRNA 的表达^[25]。Siglec-15 KO 小鼠在移植了 B16-GMCSF 后,利用质谱流式细胞仪分析提示 TILs 中 CD8⁺T 细胞、NK 细胞和部分髓系细胞显著增加,而 TAM 减少;对比 WT 小鼠,KO 小鼠的肿瘤细胞生长速度减缓,其生存时间延长。上述相关实验结果表明,巨噬细胞以及 Siglec-15 在肿瘤免疫中具有重要的抑制作用。虽然在功能上与 PD-1/PD-L1 相似,但 Siglec-15 介导的免疫抑制机制却是与 PD-1/PD-L1 途径不同,这两条途径代表了各自独立的免疫调节机制,因此,阻断 Siglec-15 通路可以为 PD-1/PD-L1 途径失败的患者提供一个新的免疫治疗方向。

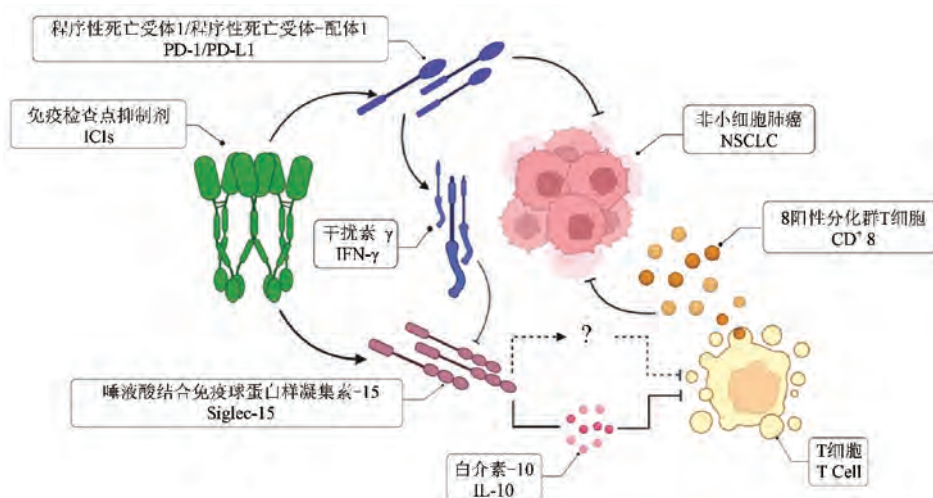


图 1 Siglec-15 对非小细胞肺癌的调控作用

Figure 1 Regulatory effect of Siglec-15 in non-small cell lung cancer

4 Siglec-15 作为免疫抑制分子的意义

Siglec-15 通路的发现在部分程度上解释了现阶段免疫治疗的困境:为什么 PD-1/PD-L1 治疗只对约 20% NSCLC 患者有效。这些研究从侧面证实 PD-1/PD-L1 是肿瘤免疫逃逸机制之一,而并非唯一通路。对于 PD-1/PD-L1 治疗失败或无应答的患者而言,抗 Siglec-15 可以作为一个新的治疗靶点:作为单药应用在临床抗实体肿瘤当中,亦或是寻求与 PD-1/PD-L1 联合使用,寻求双单抗联用的协同效应。Siglec-15 在体内的高表达提示在部分患者的 TME 中, Siglec-15 免疫抑制通路发挥主要作用^[16]。因为其 PD-1/PD-L1 天然的表达互斥,意味着此时 PD-1/PD-L1 通路并不是免疫抑制的主要因素,进而可以用 Siglec-15 的表达作为生物标记物,来预估 PD-1/PD-L1 的治疗效果。继 PD-1/PD-L1 信号通路获得成功之后,针对 Siglec-15 通路的发现及目前临床应用反馈而言,肿瘤免疫逃逸的潜在机制值得更深入的研究。利用免疫组化定量分析为进一步研究 TME 提供工具基础,积极寻找 TME 免疫调控的新方向,用以指导 NSCLC 的精准免疫治疗。

5 Siglec-15 抗体治疗 NSCLC 的探索

基于对 Siglec-15 的通路特征和表达模式的临床前研究,一款靶向 Siglec-15 的单克隆抗体 NC318 被投入到 I/II 期临床试验(NCT03665285)当中。NC318 通过 B 淋巴骨髓细胞杂交瘤制备,可以与人/鼠的 Siglec-15 特异性结合。此单抗可以在体外环境下与 Siglec-15 结合并破坏 TAM 介导的活动,例如促进肿瘤细胞的生长与转移、抑制 T 细胞作用以及刺激肿瘤血管生成,进而直接影响疾病的进展^[26]。对于人实体肿瘤而言,它可以阻断 Siglec-15 信号通路,使免疫环境正常化,恢复免疫系统对恶性肿瘤细胞的杀伤能力^[26]。在非随机、开放标签、多中心的 I/II 期临床试验中,主要以 NSCLC、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌以及黑色素瘤患者为入组对象,而针对于 PD-1 耐药的 NSCLC 患者群体,则单独分组治疗观察。根据公布的前期给药方式及剂量显示^[27],NC318 采用静脉注射的方式应用给所有入组的晚期实体肿瘤的患者,剂量为 8~1600 mg,每周 2 次(quaque 2 weekly, q2w)。值得注意的是,所有入组患者均未检测体内 PD-1 或 Siglec-15 的表达水平,而所有入组的 NSCLC 患者均曾接受过 PD-1/PD-L1 的单药或联合治疗。相关数据显示在 NSCLC 患者群体中应用 NC318 后,有 1 例患者完全

缓解,1 例患者部分缓解、3 例患者疾病稳定、7 例对 PD-1/PD-L1 治疗无效的受试者中,有 5 例观察到单药的抗肿瘤活性;统计分析其客观缓解率(objective response rate, ORR)为 29%,疾病控制率为 71%。在药物毒副作用方面,NC318 在多种剂量水平中表现出了良好的耐受性,没有涉及剂量限制性毒性的相关问题。常见的治疗不良事件包括了腹泻、淀粉酶升高、脂肪酶升高和瘙痒等;而免疫相关不良事件包括了葡萄膜炎、肺炎和白癜风等。在第 2 阶段临床试验中,调整 NC318 的应用剂量为 400 mg, q2w。2021 年 8 月,对 NC318 II 期临床试验做出调整,更改治疗方案为 800 mg, q1w。目前临床患者招募仍在进行中,更多相关试验结果有待进一步统计分析。

2022 年,美国癌症研究协会年会上报告了有关 Siglec-15 抗体的最新研究,表明另一款 Siglec-15 的单克隆抗体 BSI-060T 在体外及小鼠实验中获得了良好的数据,作为一款全人源的单克隆抗体,BSI-060T 与 NC-318 相比其在亲和力、生物活性和半衰期方面具有良好的数据回报^[27]。临床前研究指出,BSI-060T 与 Siglec-15 结合,在体外阻断了 Siglec-15 与其受体之间的相互作用;在体外 T 细胞反应测定中,BSI-060T 可减轻 Siglec-15 介导的 CD8⁺T 细胞的增殖抑制和 IFN γ 的释放;在人源化 Siglec-15 小鼠肿瘤模型中,BSI-060T 表现出对肿瘤细胞生长的显著抑制作用且耐受性良好;在非人灵长类动物的研究中,BSI-060T 展现出良好的药代动力学^[27]。目前 BSI-060T 正在申请开始 I 期临床试验,更多相关试验结果仍需进一步回报。期待 Siglec-15 抗体在 NSCLC 治疗中获得突破性进展。

6 Siglec-15 抗体治疗 NSCLC 的展望

确定哪些患者可以从 Siglec-15 单抗的治疗中获益最大,是目前临床相关研究中争论最多的一环。结合没有采用任何生物标志物检测的 NC318 I 期临床试验结果分析,在全部入组的实体瘤患者当中,NSCLC 的治疗效果最为明显^[28],而具体的反应机制尚未明确,初步分析可能与肿瘤内部 Siglec-15 表达水平有关。在对 NSCLC 的 Siglec-15 检测表明,有 25% 的样本呈现 Siglec-15 阳性表达^[15],而这一数据又与 NC318 在 NSCLC 中的 ORR 相近,结合 Siglec-15 与 PD-1/PD-L1 相反的表达模式特性,确定哪些生物标志物可以指导患者的治疗选择,以及预测 Siglec-15 单抗的疗效,仍需更多的临床数据和统计分析。Siglec-15 作为具有与 PD-1/PD-L1 不同

表达及功能的新一代肿瘤相关免疫抑制因子,可能在未来为 NSCLC 免疫治疗提供新的选择方向。进一步深入研究 Siglec-15 抗体的作用机制,探讨可能的治疗策略,将有助于设计双特异性抗体以及探索联合治疗方案,提高肿瘤患者的自身免疫力,完善对 PD-1/PD-L1 治疗不敏感的肿瘤免疫治疗。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–249.
- [2] Yun J, Lee SH, Kim SY, et al. Antitumor activity of amivantamab (JNJ-61186372), an EGFR-MET bispecific antibody, in diverse models of EGFR exon 20 insertion-driven NSCLC [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(8): 1194–1209.
- [3] Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, et al. Entrectinib in ROS1 fusion- positive non- small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(2): 261–270.
- [4] Goldberg SB, Schalper KA, Gettinger SN, et al. Pembrolizumab for management of patients with NSCLC and brain metastases: long-term results and biomarker analysis from a non-randomised, open-label, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(5): 655–663.
- [5] Hayashi H, Nakagawa K. Combination therapy with PD-1 or PD-L1 inhibitors for cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25(5): 818–830.
- [6] Konala VM, Madhira BR, Ashraf S, et al. Use of immunotherapy in extensive-stage small cell lung cancer [J]. *Oncology*, 2020, 98(11): 749–754.
- [7] Mazieres J, Drilon A, Lusque A, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the immunotarget registry [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(8): 1321–1328.
- [8] Duan S, Paulson JC. Siglecs as immune cell checkpoints in disease [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 365–395.
- [9] Rashid S, Song D, Yuan J, et al. Molecular structure, expression, and the emerging role of Siglec-15 in skeletal biology and cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(3): 1711–1719.
- [10] Stuiblé M, Moraitis A, Fortin A, et al. Mechanism and function of monoclonal antibodies targeting siglec-15 for therapeutic inhibition of osteoclastic bone resorption [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(10): 6498–6512.
- [11] Angata T. Siglecs that associate with DAP12 [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1204: 215–230.
- [12] Bornhöft KF, Goldammer T, Rebl A, et al. Siglecs: a journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins [J]. *Dev Comp Immunol*, 2018, 86: 219–231.
- [13] Van de Wall S, Santeogts KCM, Van Houtum EJH, et al. Sialoglycans and Siglecs can shape the tumor immune microenvironment [J]. *Trends Immunol*, 2020, 41(4): 274–285.
- [14] Barkal AA, Brewer RE, Markovic M, et al. CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy [J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 392–396.
- [15] Wang J, Sun J, Liu LN, et al. Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 656–666.
- [16] Sun J, Lu Q, Sanmamed MF, et al. Siglec-15 as an emerging target for next-generation cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(3): 680–688.
- [17] Liang H, Chen Q, Hu Z, et al. Siglec-15 facilitates the progression of non-small cell lung cancer and is correlated with spinal metastasis [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(6): 281.
- [18] National Center for Biotechnology Information. PubChem Patent Summary for WO-2017083354-A1 [P]. 2022–12–06 [2022–12–06].
- [19] Udagawa N, Koide M, Nakamura M, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways [J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1): 19–26.
- [20] Vuchkovska A, Glanville DG, Scurti GM, et al. Siglec-5 is an inhibitory immune checkpoint molecule for human T cells [J]. *Immunology*, 2022, 166(2): 238–248.
- [21] Chen X, Mo S, Zhang Y, et al. Analysis of a novel immune checkpoint, Siglec-15, in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *J Pathol Clin Res*, 2022, 8(3): 268–278.
- [22] Shergold AL, Millar R, Nibbs RJB. Understanding and overcoming the resistance of cancer to PD-1/PD-L1 blockade [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 145: 104258.
- [23] Maria Toki, Jon Zugazagoitia, Mehmet Altan, et al. Abstract 3151: Quantitative measurement of Siglec-15 expression in non-small cell lung cancer and its association with PD-L1, B7-H4 and tumor infiltrating lymphocytes [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(13): 3151.
- [24] Hao JQ, Nong JY, Zhao D, et al. The significance of Siglec-15 expression in resectable non-small cell lung cancer [J]. *Neoplasma*, 2020, 67(6): 1214–1222.
- [25] De Henau O, Rausch M, Winkler D, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3Kγ in myeloid cells [J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 443–447.
- [26] Poh A. Siglec-15: an attractive immunotherapy target [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(1): 7–8.
- [27] Peng ZY, Liu XD, Xia SK, et al. Abstract 5522: BSI-060T, a high affinity, fully human anti-siglec-15 antibody as an alternative immune checkpoint blocker [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(12): 5522.
- [28] Anthony T, Omid H, Jeffrey SW, et al. Single agent anti-tumor activity in PD-1 refractory NSCLC: phase 1 data from the first-in-human trial of NC318, a Siglec-15-targeted antibody [A]. 34th Annual Meeting [C]; 2019.

[收稿日期] 2022-06-21