

张怡,张弅宁,张紫微,等.雷帕霉素通过抑制细胞焦亡缓解缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤 [J].中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 9-15.

Zhang Y, Zhang XN, Zhang ZW, et al. Rapamycin alleviates HT22 cell injury after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting pyrolysis [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.002

雷帕霉素通过抑制细胞焦亡缓解缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤

张 怡,张弅宁,张紫微,周晓红,高维娟*

(河北中医学院 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室,石家庄 050091)

【摘要】 目的 观察自噬激活剂——雷帕霉素对缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞焦亡的影响。**方法** 取对数生长期的 HT22 细胞,随机分为 4 组:正常组、模型组、溶剂对照组、雷帕霉素组,除正常组外,其余各组细胞均进行缺氧缺糖 6 h、复氧复糖 24 h 处理。倒置显微镜观察细胞形态,CCK-8 法检测细胞活性,LDH 法检测细胞损伤情况,免疫荧光染色法观察细胞内 NLRP3 阳性表达,Western blot 法检测细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达。**结果** 正常组细胞胞体饱满、折光性强,细胞突触较多且相互间连接成网状;模型组及溶剂对照组细胞皱缩、变圆,大量脱落、漂浮,细胞间连接大幅减少;雷帕霉素组细胞损伤情况较模型组显著缓解。与正常组比较,模型组细胞活力显著降低,LDH 漏出率、NLRP3 阳性率、细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞活力显著升高,LDH 漏出率、NLRP3 阳性率、细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-18、IL-1 β 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。溶剂对照组与模型组比较无显著差异($P>0.05$)。**结论** 雷帕霉素可能通过抑制细胞焦亡发挥对缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞的保护作用。

【关键词】 雷帕霉素;缺氧缺糖/复氧复糖;焦亡;自噬

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 12-0009-07

Rapamycin alleviates HT22 cell injury after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting pyrolysis

ZHANG Yi, ZHANG Xuening, ZHANG Ziwei, ZHOU Xiaohong, GAO Weijuan*

(Hebei University of Chinese Medicine, Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050091, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the autophagy activator rapamycin (RAPA) on pyrolysis of neuronal HT22 cells after oxygen and glucose deprivation/reoxygenation. **Methods** HT22 cells in logarithmic growth phase were divided randomly into four groups: Control group, Model group, Solvent Control group and RAPA group. Apart from the Control group, cells in the other groups were reoxygenated 24 h after oxygen and glucose deprivation for 6 h. Cell morphology was observed under an inverted microscope. Cell viability was determined by Cell Counting Kit 8 assay, cell

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金项目(82104963);河北省普通高等学校青年拔尖人才计划项目(BJ2020027);河北中医学院优秀青年教师基础 Research 计划项目(YQ2020004);河北中医学院博士科研基金项目(BSZ2020013);河北省中医药管理局科研计划项目(2021103);河北中医学院基本科研业务费项目(YTZ2019002);河北中医学院科技能力提升项目(KTY2019052)。

【作者简介】 张怡(1988—),女,博士,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:734910343@163.com

【通信作者】 高维娟(1966—),女,博士,教授,研究方向:缺血性脑血管病的发生机制及中医药防治。E-mail:gwj6088@163.com

damage was determined by the lactate dehydrogenase method, and NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) protein expression was detected by immunofluorescence staining. NLRP3, Cleaved Caspase-1, interleukin (IL)-18 and IL-1 β expression in cells were detected by Western blot. **Results** Control cells were bipolar or multipolar with obvious synapses, multiple synapses were woven into a network, and cells showed obvious refractivity. In contrast, cells in the Model and Solvent Control groups showed decreased synapses, the cells were shrunken and rounded, a large number of cells float and fall off, and the number of intercellular connections was decreased. Cell damage was significantly relieved in the RAPA group compared with the Model group. Compared with the Control group, cell viability was significantly reduced and the LDH-leakage rate, NLRP3-positive rate, and intracellular NLRP3, Cleaved Caspase-1, IL-18 and IL-1 β protein expression levels increased significantly in the Model group ($P < 0.01$). Compared with the Model group, cell viability was significantly increased and the LDH leakage rate, NLRP3-positive rate, intracellular NLRP3, and Cleaved Caspase-1, IL-18 and IL-1 β protein expression levels were all significantly decreased in the RAPA group ($P < 0.01$). There was no significant difference between the Solvent Control group and the Model group ($P > 0.05$). **Conclusions** RAPA may protect HT22 cells following oxygen and glucose deprivation/reoxygenation by inhibiting cell pyrolysis.

【Keywords】 rapamycin; oxygen and glucose deprivation/reoxygenation; pyrolysis; autophagy

脑卒中(stroke)是一种由脑血管破裂或脑供血中断引起的脑损伤,是全球第二位、我国首位致死原因^[1]。其中导致脑供血中断的缺血性脑卒中是主要的卒中类型,约占所有脑卒中的 85%^[2]。目前,再灌注是恢复脑缺血血液供应和保护大脑免受缺血损伤的最佳方法。但大量研究显示,有时再灌注会对脑组织造成严重的继发性损伤,即脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[3]。细胞自噬(autophagy)是一种重要的生物学机制,可通过促进非功能蛋白和某些细胞器的更新来维持细胞稳态^[4]。细胞焦亡(pyroptosis)是一类程序性、溶解性细胞死亡方式,其激活涉及多个细胞因子和多条信号通路,其中经典焦亡途径依赖于Caspase-1激活后诱导的炎症反应,以细胞肿胀、破裂,胞膜破坏并释放促炎细胞因子为特征^[5]。研究表明,细胞自噬和细胞焦亡均是脑 I/R 损伤的重要机制^[6-7]。雷帕霉素(rapamycin, RAPA)为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抑制剂,可通过抑制 mTORC1 诱导自噬的发生,多应用于心脑血管疾病的治疗^[8]。我们前期研究证实,雷帕霉素可通过激活细胞自噬有效缓解脑 I/R 损伤后细胞凋亡从而发挥神经保护作用。近几年研究发现,细胞自噬和细胞焦亡间同样存在复杂串话,但自噬激活剂——雷帕霉素对脑 I/R 损伤后细胞焦亡的影响鲜有报道。因此,本研究采用小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞进行缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)处理,制备脑 I/R 损伤体外模型,探讨雷帕霉素对 OGD/R 损伤后细胞焦亡的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞

小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞(河北医科大学附属第一医院许顺江教授惠赠)。

1.2 主要试剂与仪器

雷帕霉素(rapamycin, RAPA),购于美国 Sigma 公司;DMEM 高糖、无糖培养基为美国 Gibco 公司产品;胎牛血清购买于浙江天杭生物科技股份有限公司;NLRP3 单克隆抗体(ab270449)、IL-18 单克隆抗体(ab207323)均购买于 Abcam 公司;IL-1 β 多克隆抗体(A11369)由 Abclonal 公司提供;Cleaved Caspase-1 多克隆抗体(AF4005)购自 Affinity 公司;CCK-8 试剂盒来自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;LDH 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

细胞培养箱、多功能微孔板读数仪(Thermo);倒置显微镜、荧光显微镜(Leica);电泳仪(Bio-Rad);双色红外激光成像系统(Licor)。

1.3 实验方法

1.3.1 HT22 细胞培养

将 HT22 细胞接种于含 4 mL 完全培养基(10% 胎牛血清+1%青链霉素混合液+89% DMEM 高糖培养基)的细胞培养瓶中、置于 37%、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。

1.3.2 HT22 细胞缺氧缺糖/复氧复糖模型的建立

弃去完全培养基,采用无菌 PBS 冲洗 2 次后,更换为 DMEM 无糖培养基并置于无氧环境(94%

$N_2+5\% CO_2+1\% O_2$ 的 $37^\circ C$ 三气培养箱) 中培养 6 h, 氧糖剥夺结束后, 加入完全培养基并放回 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 培养箱中继续培养 24 h^[9]。雷帕霉素组于氧糖剥夺结束后给予含雷帕霉素(终浓度为 250 nmol/L)的完全培养基, 溶剂对照组给予含等体积的 DMSO 的完全培养基。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活性

将 HT22 细胞接种于 96 孔板中, 不同实验组均设置 6 组重复, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 反应 45 min, 测定 OD_{450 nm} 值(A)。按照 $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 公式计算各组细胞活性。

1.3.4 LDH 活性检测

参照 LDH 试剂盒说明书, 收集细胞上清液与 LDH 试剂进行混匀, 反应 5 min 后于 450 nm 处测定上清液中 LDH 值(A)。采用 1% Tritonx-100 对细胞进行破膜, 将细胞破膜液与 LDH 试剂进行反应, 450 nm 处测定细胞破膜液 LDH 值(B)。LDH 漏出率 $(\%) = A / (A+B) \times 100\%$ 。

1.3.5 NLRP3 免疫荧光检测

将固定好的细胞爬片采用 1% Triton X-100 破膜; 随后加入 BSA 并在室温条件下孵育 30 min; 滴加配好的 NLRP3 抗体(1:50), $4^\circ C$ 避光孵育过夜; 加入二抗反应完毕后, 滴加 DAPI 避光孵育; 荧光显微镜拍照。

1.3.6 Western blot 检测相关蛋白表达

收集细胞, 低温条件下对细胞进行裂解后 12000 r/min, $4^\circ C$ 离心取上清; 蛋白样品定量后进行 SDS-PAGE 电泳, 电转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶室温封闭 2 h; 分别加入 NLRP3 抗体(1:1000), Cleaved Caspase-1 抗体(1:1000), IL-18 抗体(1:1000)及 IL-1 β 抗体(1:1000), $4^\circ C$ 孵育过夜; 加入二抗(1:3000)室温下孵育 40 min; 化学发光法对条带进行显影。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不同实验组之间的比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

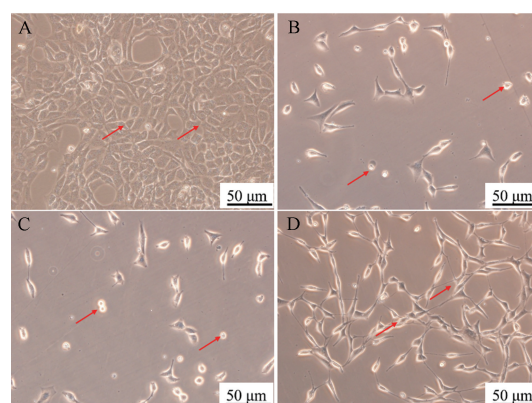
2.1 雷帕霉素显著改善缺氧缺糖/复氧复糖细胞损伤

正常组细胞贴壁生长, 细胞形态饱满、折光性

强, 胞体突触较多且相互间连接成网状; 与正常组细胞比较, 模型组及溶剂对照组细胞大量脱落, 细胞密度显著降低, 细胞皱缩、变圆, 突触断裂, 胞体折光性下降; 与模型组比较, 雷帕霉素组细胞损伤显著改善, 见图 1。

2.2 雷帕霉素有效提高缺氧缺糖/复氧复糖细胞活性

与正常组比较, 模型组细胞活性明显下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 雷帕霉素组细胞活性明显升高($P < 0.01$), 溶剂对照组细胞活性无差别($P > 0.05$), 见图 2。

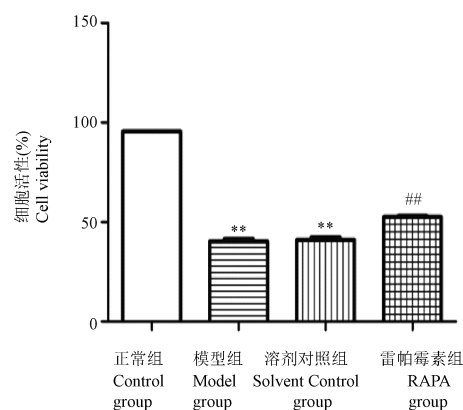


注: A: 正常组; B: 模型组; C: 溶剂对照组; D: 雷帕霉素组。

图 1 光学显微镜下各组细胞形态学观察

Note. A, Control group. B, Model group. C, Solvent Control group. D, RAPA group.

Figure 1 Morphological observation under optical microscope in each group



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 2 CCK-8 法检测各组细胞活性($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

Figure 2 Cell viability in each group was detected by CCK-8 method

2.3 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞 LDH 漏出率

与正常组相比,模型组细胞 LDH 大量漏出($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞 LDH 漏出率明显降低($P < 0.01$),溶剂对照组细胞 LDH 漏出率与模型组比较无显著差别($P > 0.05$),见图 3。

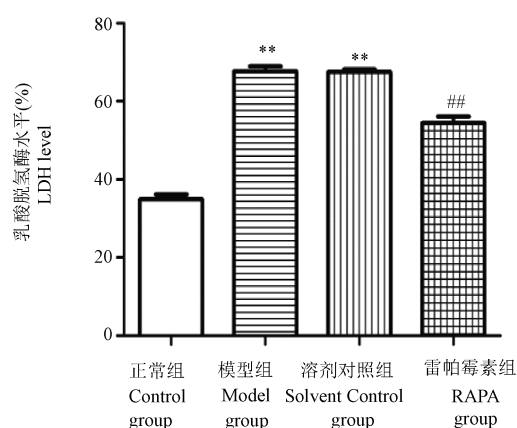
2.4 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞内 NLRP3 阳性表达

与正常组比较,模型组细胞中 NLRP3 荧光强度显著提高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞 NLRP3 荧光强度明显降低($P < 0.01$),溶剂对照组细胞 NLRP3 荧光强度与模型组无显著差别($P > 0.05$),见图 4。

2.5 雷帕霉素有效降低缺氧缺糖/复氧复糖细胞内焦亡相关蛋白 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 表达

与正常组比较,模型组细胞中 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达显著提高($P < 0.01$);与模型组比较,雷帕霉素组细胞中 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 及 IL-18 蛋白表达显著降

低($P < 0.01$),溶剂对照组与模型组比较无显著差异($P > 0.05$),见图 5。



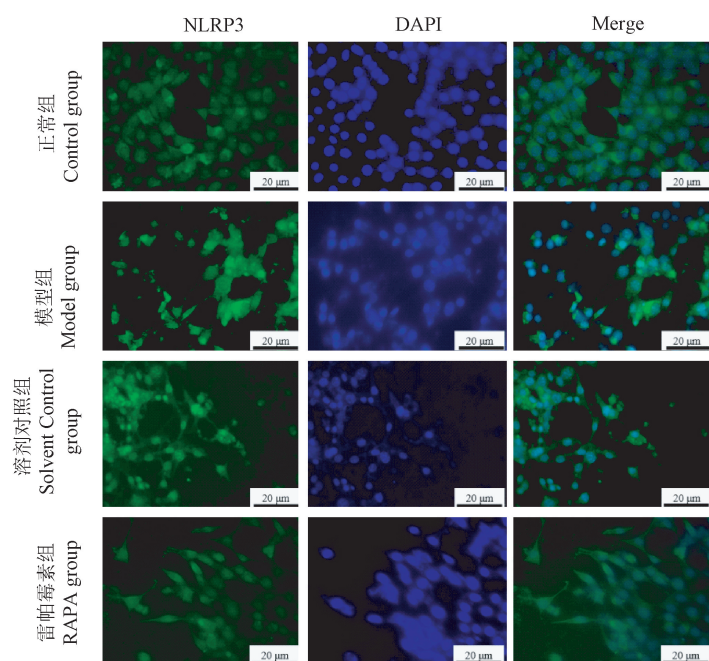
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 LDH 法检测各组细胞 LDH 漏出率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Compared with the model group, ## $P < 0.01$.

Figure 3 LDH leakage in each group of cells was detected by LDH method

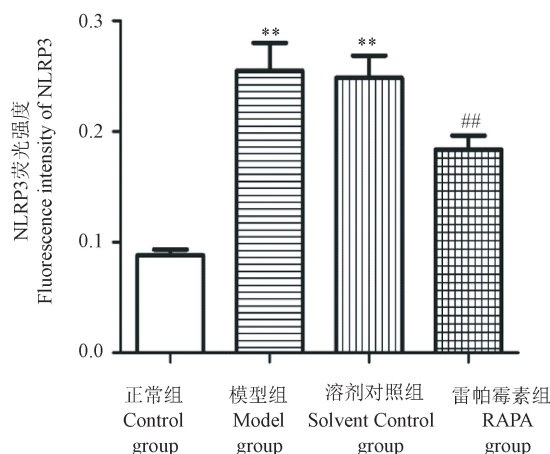


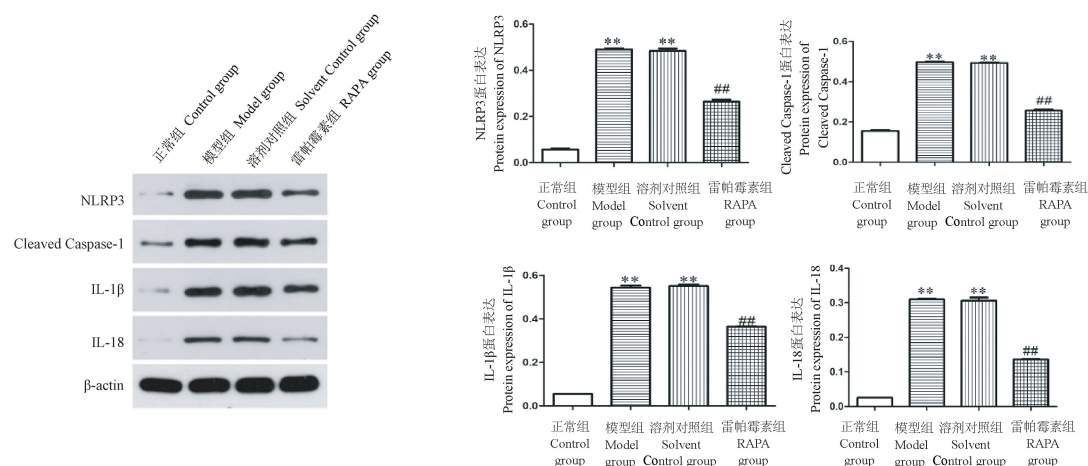
注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 4 免疫荧光染色法观察各组细胞 NLRP3 阳性表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 4 Expression of NLRP3 in each group of cells was detected by immunofluorescence staining





注:与正常组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 法观察各组细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

Figure 5 Expression of NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1β and IL-18 in each group of cells was detected by Western blot

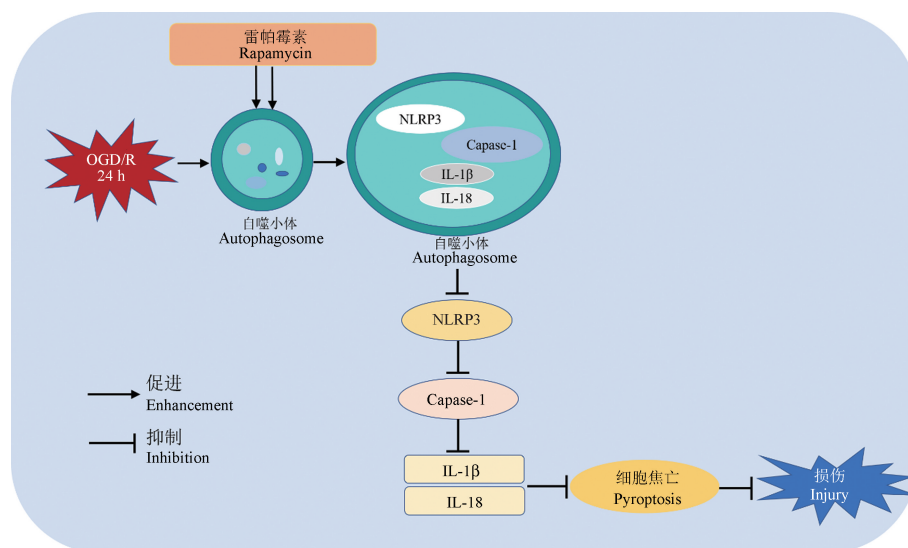


图 6 雷帕霉素抗缺氧缺血/复氧复糖损伤的作用机制

Figure 6 Mechanisms of rapamycin against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury

3 讨论

脑 I/R 损伤是缺血性脑卒中的常见并发症,是一种动态、复杂的病理生理过程^[10]。其发生机制复杂,涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、细胞自噬及细胞焦亡等多个方面。大量研究发现,脑 I/R 损伤过程中,不同发病机制间彼此重叠、相互影响,在一定程度上增加了本病的治疗难度,目前关于脑 I/R 损伤的有效治疗手段仍相对缺乏^[11-12]。缺氧缺血/复氧复糖 (OGD/R) 法是体外模拟脑 I/R 损伤的常用方法,可有效模拟脑 I/R 损伤的病理生理过

程^[13]。因此,本研究选用 HT22 细胞为研究对象,通过 OGD/R 法建立脑 I/R 损伤体外模型。研究显示,与正常组比较,模型组细胞大量脱落,细胞密度显著降低,细胞皱缩、变圆,突触断裂,胞体折光性下降,细胞活性显著降低,LDH 漏出率明显增加、细胞膜损伤严重。大量研究表明,雷帕霉素具有较好的神经保护作用,可促进缺血性脑卒中后神经血管单位的修复,但其具体作用机制仍待进一步探究^[14]。本研究发现,雷帕霉素能够有效提高 OGD/R 细胞活性,降低 LDH 漏出率,缓解 OGD/R 造成的细胞损伤。

细胞焦亡是脑 I/R 损伤的机制之一。研究表明, Caspase-1 介导的经典焦亡途径参与了脑 I/R 后神经元损伤, 采用药物或基因手段阻断 Caspase-1 表达后脑组织损伤得到显著缓解^[15]。一系列能形成炎症小体的模式识别受体会触发 Caspase-1 的激活, 其中 Nod 样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 是中枢神经系统中最丰富的炎症小体, 可被包括三磷酸腺苷、钾外流、线粒体 DNA 和活性氧等多种因素激活, 是脑 I/R 损伤的主要参与者之一^[16-17]。NLRP3 可通过炎症小体衔接蛋白 ASC 促进炎症小体的形成和 Caspase-1 的活化。Caspase-1 的激活可诱导细胞膜穿孔, 促进细胞溶解坏死, 引发早期炎症反应; 同时活化的 Caspase-1 调节促炎因子白介素 IL-1 β 和 IL-18 的释放, 导致细胞焦亡^[18]。秦灵芝等^[19]研究证实, 氧糖剥夺后的神经元中 NLRP3 表达升高, IL-1 β 和 IL-18 释放增加, 神经元大量焦亡。Hong 等^[20]研究发现, 抑制经典焦亡途径可有效缓解 MCAO/R 大鼠脑组织损伤。本研究发现, 对 HT22 细胞进行 OGD/R 处理后, 细胞内 NLRP3 阳性表达增多, NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 蛋白表达明显上调, 说明 Caspase-1 介导的经典焦亡途径参与了 OGD/R 导致的细胞损伤。

脑 I/R 损伤后, 大量活性氧、自由基等所引起的氧化应激等因素, 也会引发自噬的发生^[21]。自噬在脑 I/R 损伤不同时期可发挥不同作用。我团队前期研究证实, 细胞自噬在脑 I/R 损伤 24 h 明显增强, 进一步提高自噬水平可有效缓解脑组织及神经细胞损伤^[22]。大量研究发现, 细胞自噬和细胞焦亡间存在密切联系, 两者相互“串话”, 在减轻脑 I/R 损伤中发挥重要作用^[23]。脑 I/R 损伤后适度自噬, pro-IL-1 β 、pro-IL-18、ASC 和 NLRP3 等 NLRP3 炎症小体组件可被自噬双层膜识别并吞噬, 然后通过自噬溶酶体途径将这些炎症小体组件降解, 从而缓解细胞焦亡, 减轻脑组织损伤^[24]。雷帕霉素为 mTOR 通路抑制剂, 可与 mTOR 靶向结合, 阻滞信号向下传递, 从而对自噬起促进作用^[25]。大量研究证实雷帕霉素能够通过激活神经元自噬, 缓解缺血带来的脑损伤, 起到对脑组织的保护作用。本研究发现, 雷帕霉素可有效提高 OGD/R 细胞活性、减少细胞 LDH 漏出率、抑制细胞内 NLRP3、Cleaved Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 等焦亡相关蛋白表达, 缓

解 OGD/R 导致的细胞损伤。

综上所述, 雷帕霉素可能通过调控 Caspase-1 介导的经典焦亡途径缓解神经细胞焦亡, 实现对脑组织的保护作用(图 6), 为雷帕霉素对脑 I/R 损伤的治疗提供了实验基础。但细胞焦亡是受多信号通路及因子调控的复杂过程, 除经典焦亡途径外, 雷帕霉素是否可通过其他焦亡途径发挥抗脑 I/R 损伤的作用, 仍待深入探索。脑 I/R 损伤机制复杂, 雷帕霉素除我们前期研究已经证实的对脑 I/R 损伤后细胞自噬和凋亡具有调控作用, 以及本研究发现的对细胞焦亡具有抑制作用外, 其他相关作用以及机制有待进一步探究。

参考文献:

- [1] Cao Y, Zhang H, Lu X, et al. Overexpression of microRNA-9a-5p ameliorates NLRP1 inflammasome-mediated ischemic injury in rats following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 444: 106-117.
- [2] Liu B, Cao W, Xue J. LncRNA ANRIL protects against oxygen and glucose deprivation (OGD)-induced injury in PC-12 cells: potential role in ischaemic stroke [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1384-1395.
- [3] Hu L, Feng H, Zhang H, et al. Development of novel N-hydroxypyridone derivatives as potential anti-ischemic stroke agents [J]. *J Med Chem*, 2020, 63(3): 1051-1067.
- [4] 王瑜, 王天龙, 赵磊, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对小鼠 TMEM166 基因和神经细胞自噬的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7): 28-32.
- [5] 张钊, 葛乃嘉, 马新月, 等. 细胞焦亡在肝损伤微环境中的作用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(4): 133-136.
- [6] Sheng R, Zhang LS, Han R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning [J]. *Autophagy*, 2010, 6(4): 482-494.
- [7] 余颜, 胡雨琴, 张荆, 等. 细胞焦亡参与脑缺血再灌注损伤的初步研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(8): 1379-1386.
- [8] 巩江, 贺学, 沙莎, 等. 雷帕霉素介导丝裂原活化蛋白激酶信号通路对肝癌细胞的影响 [J]. *解剖学杂志*, 2021, 44(4): 307-311.
- [9] 张怡, 周晓红, 靳晓飞, 等. 黄芪甲苷通过抑制细胞凋亡减轻缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞损伤的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 46-51.
- [10] 丁实, 赵学荣, 李宝群, 等. 基于 Bcl-2/Beclin-1 复合体探讨黄连素对脑缺血再灌注损伤大鼠模型的保护作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 651-657.
- [11] Kotłęga D, Gołańb-Janowska M, Masztalewicz M, et al. The emotional stress and risk of ischemic stroke [J]. *Neurol*

- Neurochir Pol, 2016, 50(4): 265-270.
- [12] 石巧娟, 郭红刚, 楼琦, 等. 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调自噬减轻长爪沙鼠的全脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(1): 57-64.
- [13] Morán J, Perez-Basterrechea M, Garrido P, et al. Effects of estrogen and phytoestrogen treatment on an *in vitro* model of recurrent stroke on HT22 neuronal cell line [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(3): 405-416.
- [14] 吴致远, 邓仪昊, 张永杰, 等. 雷帕霉素促进缺血性脑卒中后神经血管单位修复 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(9): 1709-1714.
- [15] Fann DY, Lim YA, Cheng YL, et al. Evidence that NF- κ B and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1082-1096.
- [16] Jiang CT, Jiang LP, Li QN, et al. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells [J]. Toxicology, 2018, 410: 26-40.
- [17] Zhang L, Li X, Zhang H, et al. Agnuside alleviates synovitis and fibrosis in knee osteoarthritis through the inhibition of HIF-1 α and NLRP3 inflammasome [J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 5534614.
- [18] 张瑞芳, 李雅琦, 张广龙, 等. 从细胞焦亡角度探讨 6-姜酚、6-姜烯酚对化疗性小肠上皮细胞损伤的保护作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 26-31.
- [19] 秦灵芝, 李玮, 王晓娟, 等. 白藜芦醇预处理减轻神经元焦亡及对神经元缺血性损伤的保护作用 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(1): 38-41.
- [20] Hong P, Li FX, Gu RN, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in diabetic mice [J]. Neural Plast, 2018, 2018: 9163521.
- [21] Qin L, Wang Z, Tao L, et al. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy [J]. Autophagy, 2010, 6(2): 239-247.
- [22] Zhang Y, Zhang Y, Jin XF, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy [J]. Molecules, 2019, 24(9): 1838.
- [23] Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. Med Res Rev, 2022, 42(1): 259-305.
- [24] 胡笑桑, 张增乔, 何静, 等. 炎症小体介导细胞焦亡和自噬的相关研究 [J]. 现代免疫学, 2020, 40(5): 412-418.
- [25] 曹相玫, 徐辉, 武艳玮, 等. 雷帕霉素通过活化 MAPK 促进神经胶质瘤 U87-MG 细胞自噬 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(4): 654-660.
- [收稿日期] 2022-03-10

一例罕见大熊猫癌症的报道: 胰腺导管腺癌 (PDAC)

大熊猫为我国特有物种, 被誉为“中国国宝”。大熊猫对现生环境适应能力不佳是其濒危的重要内在因素之一, 其中, 疾病死亡也可能引起大熊猫数量减少。胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 属于胰腺癌中较为常见的一种组织分型, 恶性程度极高。在人类中, PDAC 的发生率约占胰腺癌的 90% 以上, 但 PDAC 在野生动物中并不常见。本文介绍了一例大熊猫 PDAC 病理诊断案例, 以期为今后野生动物肿瘤的诊断提供参考意见。

本病例, 雌性, 死亡时 32 岁。对其进行组织病理学观察, 胰腺组织内可见大量泡沫样管状腺癌结构; 腺上皮呈透明样, 细胞核大小差异明显; 腺管结构不规则, 呈乳头状生长, 乳头表面为单层上皮细胞; 部分胰腺导管上皮被高柱状黏液细胞取代, 黏液细胞呈假复层样柱状上皮结构。Masson 染色可以更清晰地观察到肿瘤组织中细胞核大小差异明显、核异型性、核分裂像, 以及杂乱、不规则的腺管结构。据此初步判定该胰腺为高分化或中分化导管腺癌, 伴随胰腺上皮内肿瘤的癌前病变。为进一步进行胰腺导管腺癌与慢性胰腺炎的鉴别诊断, 本研究进行了肿瘤特异性标记物 CK7、CK19 免疫组化染色, 结果显示胰腺组织 CK7、CK19 呈阳性表达, 据此判定该大熊猫患 PDAC。

近年来, 关于动物原发性 PDAC 的报道较为少见, 且报道以胰腺外分泌肿瘤为主, 患病动物多见于犬、牛等。野生动物未见相关报道, 这可能与野生动物 PDAC 罕见有关。现阶段关于大熊猫疾病的病理报告也很少见, 关于大熊猫肿瘤的文章则更少, 大熊猫肿瘤的患病风险至今仍是未知数, 导致大熊猫肿瘤发生的因素也不清楚, 这方面的工作应当进一步推进。

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): 582-586; <https://doi.org/10.1002/ame2.12269>)。