

赵玉兰,杨艺,李进涛,等. 2型糖尿病 db/db 小鼠骨强度和肠道内容物菌群的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 1-7.

Zhao YL, Yang Y, Li JT, et al. Changes of bone strength and gut microbiota in type 2 diabetic db/db mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.001

## 2型糖尿病 db/db 小鼠骨强度和肠道内容物菌群的变化

赵玉兰<sup>1#</sup>, 杨艺<sup>1#</sup>, 李进涛<sup>1</sup>, 王佩锦<sup>1</sup>, 角建林<sup>2\*</sup>, 郑红<sup>1\*</sup>

(1.昆明医科大学实验动物学部,昆明 650500;2.昆明医科大学科技成果孵化中心,昆明 650504)

**【摘要】** 目的 观察 db/db 小鼠血糖、骨强度和肠道菌群的变化。方法 20周龄雄性 db/db 小鼠及野生型小鼠各6只,检测空腹血糖,行三点弯曲实验检测股骨力学指标,采用16S rRNA高通量测序技术对小鼠肠道内容物基因V3-V4区进行测序及生物信息分析。结果 db/db 组小鼠体重( $P<0.01$ )和血糖( $P<0.05$ )均显著升高。db/db 小鼠胫骨刚度、最大位移、最大能量吸收、最大载荷均显著低于WT小鼠( $P<0.01$ )。db/db 小鼠 $\alpha$ 多样性指标中的Chao1指数、ACE指数和observed species均显著降低( $P<0.05$ );两者肠道细菌群落组成存在显著差异(ANOSIM; $P=0.02$ )。db/db 小鼠毛螺菌属(*Lachnospira*)显著降低( $P<0.01$ );变形菌门(*Proteobacteria*)、 $\delta$ -变形菌纲(*Deltaproteobacteria*)、脱硫弧菌目(*Desulfovibrionales*)显著升高( $P<0.05$ ),*Alloprevotella*属极显著升高( $P<0.01$ )。结论 本研究结果表明 db/db 小鼠高血糖且骨强度降低,是T2DOP的适宜动物模型。db/db 小鼠与WT小鼠肠道菌群的多样性及特定菌群丰度存在差异,为研究肠道菌群与糖尿病性骨质疏松提供了理论基础。

**【关键词】** db/db 小鼠;血糖;骨强度;肠道菌群;16S rRNA

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0001-07

## Changes of bone strength and gut microbiota in type 2 diabetic db/db mice

ZHAO Yulan<sup>1#</sup>, YANG Yi<sup>1#</sup>, LI Jintao<sup>1</sup>, WANG Peijin<sup>1</sup>, JIAO Jianlin<sup>2\*</sup>, ZHENG Hong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

2. Incubation Center of Scientific and Technological Achievements, Kunming Medical University, Kunming 650504)

**【Abstract】** **Objective** To observe changes in blood glucose, bone strength, and intestinal microflora in db/db mice. **Methods** Six male db/db mice and six wild-type (WT) mice at 20 weeks of age were used to assess fasting blood glucose. A three-point bending test was performed to assess mechanical parameters of the femur. 16S rRNA high-throughput sequencing technology was used to sequence the V3-V4 gene region of intestinal contents and analyze the bioinformation. **Results** The body weight ( $P<0.01$ ) and blood glucose ( $P<0.05$ ) of mice in the db/db group were

**【基金项目】**国家自然科学基金资助项目(81460647);云南省应用基础研究计划(202201AY070001-032);云南省教育厅科学研究基金项目(2021Y334)。

**【作者简介】**赵玉兰(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:2型糖尿病性骨质疏松。E-mail:1009451857@qq.com

杨艺(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:2型糖尿病性骨质疏松。E-mail:1665682708@qq.com \*共同第一作者

**【通信作者】**角建林(1966—),男,正高级实验师,研究方向:新型实验动物及疾病模型创制。E-mail:jiaojianlin66@163.com

郑红(1969—),女,教授,研究方向:2型糖尿病性骨质疏松。E-mail:847255170@qq.com \*共同通信作者

increased significantly. Tibial stiffness, maximum displacement, maximum energy absorption, and maximum load of db/db mice were significantly lower than those of WT mice ( $P < 0.01$ ). The Chao1 index, ACE index, and observed species in the  $\alpha$ -diversity index of db/db mice were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). There were significant differences in the intestinal bacterial community composition between the two groups (ANOSIM;  $P = 0.02$ ). Lachnospira was significantly decreased in db/db mice ( $P < 0.01$ ). Desulfovibrionales, Proteobacteria, and Deltaproteobacteria were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and Alloprevotella was increased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** db/db mice with hyperglycemia and decreased bone strength are suitable animal models of T2DOP. The diversity of intestinal flora and the abundance of specific flora were different between db/db and WT mice, which provides a theoretical basis to study intestinal flora and diabetic osteoporosis.

**【Keywords】** db/db mice; fasting plasma glucose; bone strength; intestinal flora; 16S rRNA

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

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 及其并发症是最常见严重威胁人类健康的慢性代谢性疾病<sup>[1]</sup>。在发达国家和发展中国家,其患病率都在迅速上升,根据世界卫生组织 (WHO) 和国际糖尿病联合会 (IDF) 的数据,到 2045 年,约有 6.29 亿人患有 2 型糖尿病。肠道菌群失调不仅影响胃肠道,也影响糖尿病等慢性疾病及其并发症<sup>[2]</sup>。与健康受试者相比,T2DM 患者的肠道菌群发生了变化<sup>[3]</sup>,同时 T2DM 不同疾病进程患者的肠道菌群特征也存在差异。肠道菌群是参与糖尿病及其并发症发病和进展的重要环境因素<sup>[4]</sup>。db/db 小鼠是瘦素受体基因缺失小鼠,由于瘦素信号通路障碍,小鼠在 1~2 周出现高胰岛素血症,3~4 周明显肥胖,4~8 周出现高糖血症<sup>[5]</sup>。相关文献报道,db/db 小鼠用于 T2DM 及糖尿病性肾病、视网膜病变、心血管疾病的研究,对糖尿病性骨病及其肠道菌群的系统研究报道较少<sup>[6]</sup>。因此,本研究检测 20 周龄 BKS-Lepr<sup>em2C4479</sup>/Gpt db/db 小鼠空腹血糖、骨强度,利用 16S rRNA 基因测序技术分析肠内容物菌群结构特征,探讨骨强度和肠道差异,对揭示 T2DM 性骨质疏松的发病机制及治疗具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验动物为雄性 8 周龄 SPF 级 C57BL/KsJ-db/db 小鼠,体重 ( $48.0 \pm 5.0$ ) g 和 WT 小鼠,体重 ( $26.0 \pm 2.0$ ) g,各 6 只,购买自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [SCXK (京) 2019-0010]。小鼠饲养于昆明医科大学实验动物学部屏障环境中 [SYXK (滇) 2020-0006] 至 20 周龄,室温 ( $22 \pm 2$ ) °C、相对湿度 ( $50 \pm 5$ ) %、光照周期为 12 h/12 h。动物自由采食和饮水,常规饲料喂养。实验操作符合动物福利伦理

要求,经昆明医科大学动物实验伦理委员会批准 (KMMU20211537),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (Biolabs, 英国); 胶回收试剂盒 (Qiagen, 德国); TruSeq<sup>®</sup> DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒 (四川瑞博特生物科技有限公司, 中国)。生物力学仪 (MUROMACHI KIKAI, 日本); 血糖测试仪 (三诺生物股份有限公司, 中国); BS-3000A 电子分析天平 (上海友声衡器有限公司, 中国); 电泳仪 (Tanon-EP300, 中国); 凝胶成像仪 (Tanon-2500, 中国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及处理

将小鼠分为 db/db 组 (db/db) 和对照组 (WT 组) ( $n = 6$ ), 动物禁食 12 h 后, 检测血糖, 称重, 3% 戊巴比妥钠 0.1 mL/10 g 腹腔注射麻醉后, 脱颈椎处死小鼠。无菌取肠内容物、小鼠胫骨。肠内容物分装至 2 mL 无菌 EP 管中, 每管样品量 0.5~2.0 g, 液氮速冻, -80°C 保存备检。取右胫骨用生理盐水浸润的纱布包裹, 置于 4°C 冰箱过夜。

#### 1.3.2 小鼠胫骨骨生物力学测试

用生物力学实验仪器进行三点弯曲试验。胫骨标本在室温放置 1 h 后, 放置三点弯曲平台上, 调整支架的跨距为 10 mm, 以 20 mm/min 的速度对胫骨施压至断裂, 记录最大载荷、最大位移、刚度、最大能量吸收参数。

#### 1.3.3 DNA 提取、16S rRNA 扩增及测序

采用 CTAB 方法对样本的基因组 DNA 进行提取, 之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样本 DNA 于离心管中, 使用无菌水稀

释样本至  $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。以稀释后的基因组 DNA 为模板,根据测序区域的选择,使用带 Barcode 的特异引物,Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer,和高效高保真酶进行 PCR,确保扩增效率和准确性。PCR 产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR 产物浓度进行等量混样,充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,对目的条带使用胶回收试剂盒回收产物。使用 TruSeq<sup>®</sup> DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 q-PCR 定量,文库合格后,使用 NovaSeq 6000 进行上机测序。

#### 1.4 统计学方法

利用 Graph Pad Prism (8.0.2) 进行统计分析。使用独立样本 *t* 检验统计两组间差异。统计结果用平均数 $\pm$ 标准误差( $\bar{x}\pm s\bar{x}$ )表示,以  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体重、空腹血糖和骨强度指标

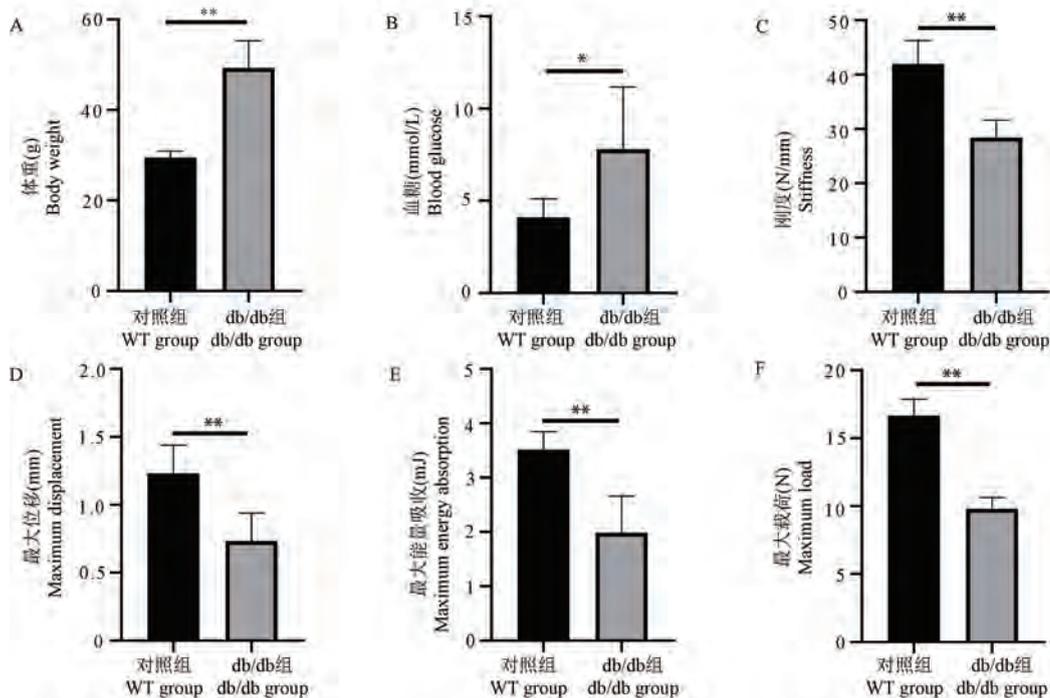
通过测量小鼠体重、空腹血糖发现,与 WT 组

比,db/db 组小鼠体重( $P<0.01$ ) (图 1A)、血糖( $P<0.05$ ) (图 1B) 均显著升高。进一步对两组小鼠胫骨进行骨生物力学实验,结果表明 db/db 小鼠胫骨刚度(图 1C)、最大位移(图 1D)、最大能量吸收(图 1E)、最大载荷(图 1F) 均显著低于 WT 小鼠( $P<0.01$ ),说明 db/db 小鼠 20 周时具有 2 型糖尿病的特征且有骨代谢相关并发症。

### 2.2 肠道菌群高通量测序结果

#### 2.2.1 样本序列分析

对 Illumina NovaSeq 测序得到的下机数据(raw PE)进行拼接和质控,得到 clean tags,再进行嵌合体过滤,得到可用于后续分析的有效数据(effective tags)(表 1)。为研究各样本的物种组成,对所有样本的 Effective Tags,以 97% 的一致性(identity)进行 OTUs (operational taxonomic units) 聚类,然后对 OTUs 的序列进行物种注释。样本稀释性曲线(图 2A、2B)显示,每个样本的曲线都趋于平缓,且物种累积箱形图(图 2C) 同样趋于平缓,说明本研究的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物,可以进行数据分析。



注:A:体重;B:血糖;C:刚度;D:最大位移;E:最大能量吸收;F:最大载荷。与 WT 组对比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 1 db/db 小鼠与 WT 小鼠体重、血糖、胫骨骨强度的差异

Note. A, Body weight. B, Blood glucose. C, Stiffness. D, Maximum displacement. E, Maximum energy absorption. F, Maximum load. Compared with WT group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

Figure 1 Differences in body weight, blood glucose and bone strength between db/db mice and WT mice

## 2.2.2 肠道菌群多样性分析

为了研究 db/db 小鼠和 WT 小鼠肠道微生物区系结构多样性的差异,我们使用 Chao1 指数、ACE 指数和 observed species 指数分别评估了微生物  $\alpha$  多样性,以此估计肠道微生物的丰富度和多样性。db/db 小鼠的  $\alpha$  多样性显著降低 (Chao1 丰富度指数  $P=0.029$ ,图 3A;observed species 指数  $P=0.049$ ,

图 3B;ACE 均匀度指数  $P=0.023$ ,图 3C)。相似性分析法 (ANOSIM) 分析比较 db/db 小鼠和 WT 小鼠肠道细菌群落组成,结果显示两者的群落存在显著差异 (ANOSIM; $P=0.02$ ) (图 3D)。

## 2.2.3 小鼠肠道菌群结构组成及差异物种分析

如图 4 所示,对小鼠肠道菌群结构进行分析,db/db 组及 WT 小鼠肠道菌群结构在门、纲、目、科

表 1 数据预处理统计及质控统计

Table 1 Data preprocessing statistics and quality control statistics

分组 Groups	样品号 Sample name	序列数 (#) Number of sequences	碱基数 (nt) Base	平均长度 (nt) Average length
对照组 WT group	WT1	62 588	26 098 768	417
	WT2	57 866	23 743 010	410
	WT3	60 206	25 009 314	415
	WT4	60 635	25 322 251	418
	WT5	59 649	24 588 905	412
	WT6	69 830	29 208 680	418
db/db 组 db/db group	db1	62 908	26 229 924	417
	db2	60 250	25 113 452	417
	db3	65 916	27 347 207	415
	db4	62 348	25 870 756	415
	db5	47 121	19 715 830	418
	db6	61 610	25 747 491	418

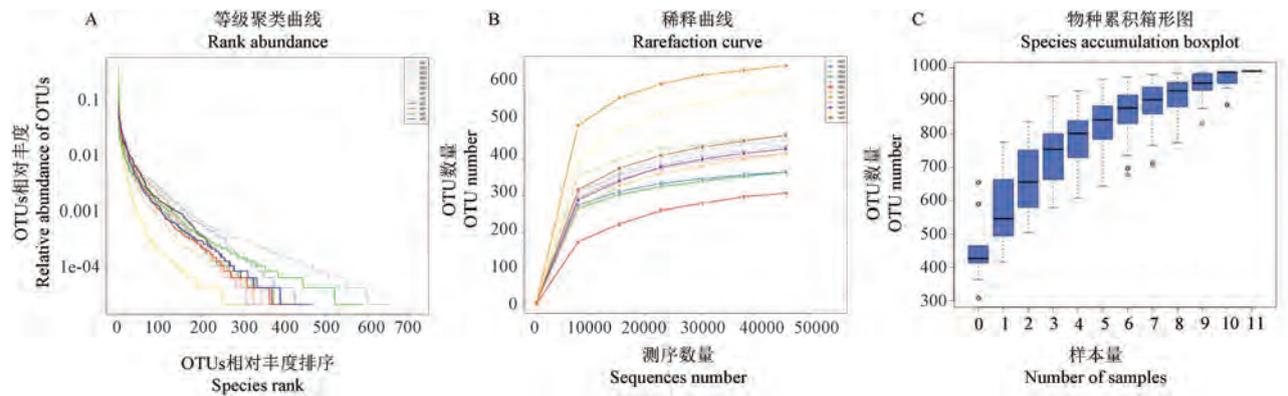
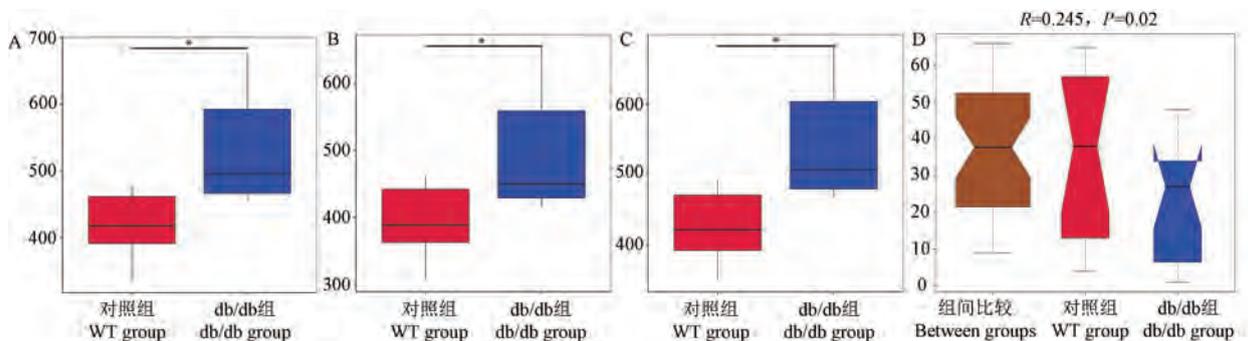


图 2 物种多样性曲线

Figure 2 Species diversity curve

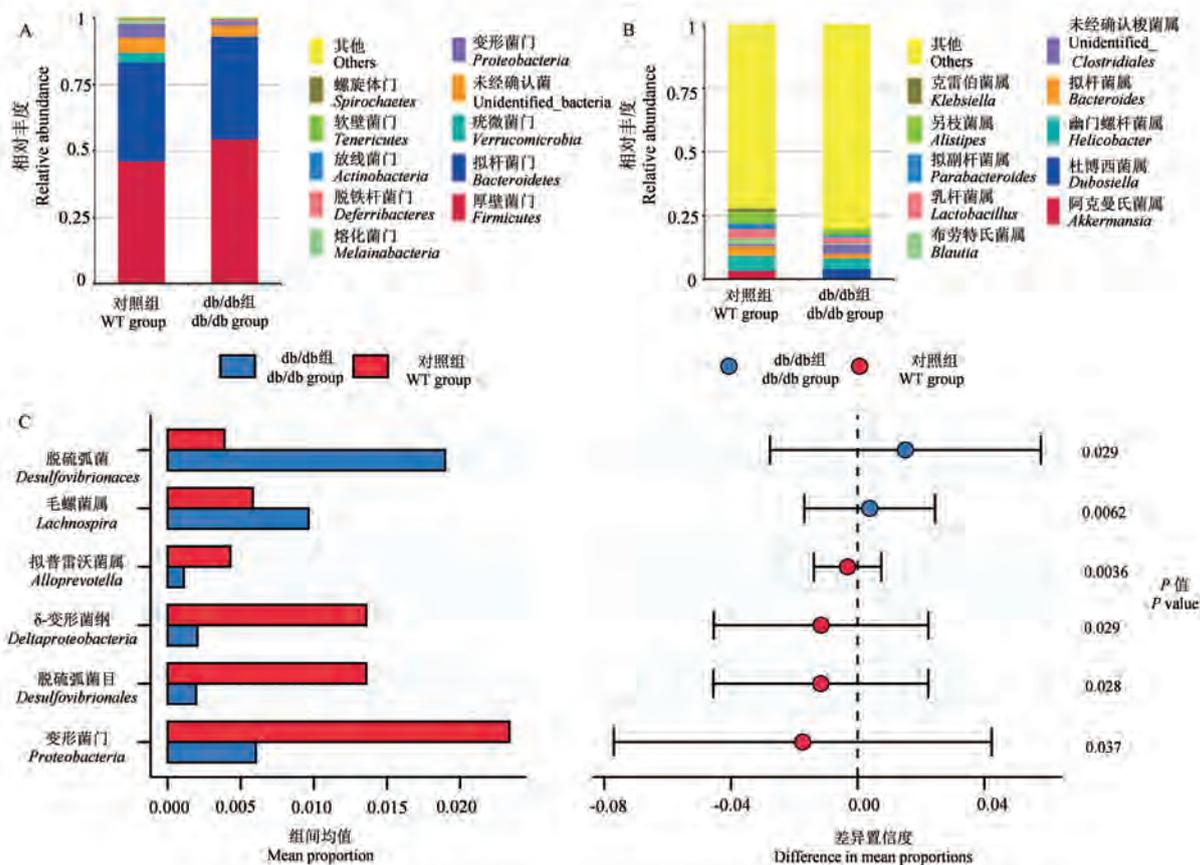


注:A;Chao1 指数;B;Observed species 指数;C;ACE 均匀度指数;D;ANOSIM 分析。与 WT 组对比,\* $P<0.05$ 。

图 3 db/db 小鼠与 WT 小鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性、 $\beta$  多样性分析比较

Note. A, Chao1 index. B, Observed species index. C, ACE evenness index. D, ANOSIM analyses. Compared with WT group,\* $P<0.05$ .

Figure 3 Analysis and comparison of intestinal microflora  $\alpha$  and  $\beta$  diversity between db/db mice and WT mice



注:A:门水平菌群相对丰度分布图;B:属水平菌群相对丰度分布图;C:各水平菌群差异物种分析图。

图 4 db/db 小鼠与 WT 小鼠肠道菌群相对丰度分布图和各水平差异菌群分析图

Note. A, Relative abundance distribution of phylum. B, relative abundance distribution of genus horizontal flora. C, Analysis diagram of different species of flora at each level.

Figure 4 Relative abundance distribution of bacteria at level and genus level of four phylum and analysis of different levels of bacteria

及属水平均存在差异。小鼠肠道菌群在门水平主要由厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、变形菌门 (Proteobacteria) 及疣微菌门 (Verrucomicrobia) 组成, WT 组菌丰度分别为 54.5%、38.5%、1.3% 及 0.04%, 而 db/db 组的是 46.1%、37.3%、5.2% 及 3.4% (图 4A)。在属水平, 优势属主要是阿克曼氏菌属 (Akkermansia)、幽门螺杆菌属 (Helicobacter)、拟杆菌属 (Bacteroides) 及另枝菌属 (Alistipes), 其中 WT 组菌丰度分别为 0.04%、4.1%、1.9%、2.4%, db/db 组分别为 3.4%、5.7%、3.9%、4.4% (图 4B)。值得注意的是两组小鼠肠道中均存在大量无法鉴定的细菌。

为了比较两组小鼠肠道菌群的差异物种, 本研究分别在门、纲、目、科及属水平分析肠道菌群的变化情况。db/db 组小鼠肠道菌群的毛螺菌属 (Lachnospira) ( $P = 0.0062$ ) 降低; 变形菌门 (Proteobacteria) ( $P =$

0.037)、 $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) ( $P = 0.029$ )、脱硫弧菌目 (Desulfovibrionales) ( $P = 0.028$ ) 和拟普雷沃菌属 (Alloprevotella) ( $P = 0.0036$ ) 升高 (图 4C)。

### 3 讨论

2 型糖尿病 (T2DM) 是最常见严重威胁人类健康的慢性代谢性疾病, 由遗传和环境因素共同作用引发, 约占糖尿病患者总数的 90% 以上<sup>[7]</sup>。随着病程进展, T2DM 患者出现相关并发症, 其中 2 型糖尿病合并骨质疏松症 (type 2 diabetes osteoporosis, T2DOP) 是胰岛素抵抗或分泌相对不足导致慢性长期高血糖引发全身性骨强度下降、骨脆性增加的疾病<sup>[7]</sup>。患者发生髌部骨折 (1.4~1.7 倍) 和椎骨骨折的风险增加<sup>[8]</sup>。2 型糖尿病患者中, 骨组织处于高糖环境, 而高糖环境对骨健康具有负性作用, 从而使胶原纤维质量受到损害、骨小梁网络受损, 成

骨细胞募集减少,矿物质沉积率增加,破骨细胞生成增加<sup>[9]</sup>。此外,在 T2DM 患者中,骨的形成与骨的吸收同时相应减少,这种骨转化减少也会影响对骨微损伤的修复,从而造成骨质量的下降,骨强度降低,也会使骨折发生率升高<sup>[10]</sup>。随着我国人口老龄化,其发病率呈增长趋势,严重影响着人们的身体健康和生活质量。T2DOP 作为糖尿病的常见复合性疾病,其发病率高、致残率高的临床特点使其成为当今医学界研究的热点<sup>[11-12]</sup>。因此,如何预防和延缓 T2DOP 尤为重要。db/db 小鼠 4 号染色体上 leptin 受体基因缺失,由于瘦素信号通路障碍,动物在 1~2 周出现高胰岛素血症,3~4 周明显肥胖,4~8 周出现高糖血症,是 2 型糖尿病研究常用的动物模型。相关文献报道,db/db 小鼠多用于 2 型糖尿病肾病、视网膜病变、心血管和糖尿病性皮肤病等的研究,对 2 型糖尿病性骨病及其肠道菌群研究较少<sup>[13]</sup>。研究发现 20 周的 db/db 小鼠体重、空腹血糖分别极显著和显著高于野生型小鼠,具有肥胖和高血糖特点。同时,db/db 小鼠胫骨刚度、最大位移、最大能量吸收值、最大载荷等显著下降,骨强度降低,骨质量受损,提示 20 周的 db/db 小鼠是 T2DOP 的适宜动物模型。

肠道菌群是人类和动物胃肠道中不同种类和数量的细菌的总称<sup>[14]</sup>。大量研究发现肠道菌群和 2 型糖尿病联系紧密<sup>[15]</sup>。与健康受试者相比,T2DM 患者的肠道菌群发生了变化<sup>[9]</sup>,同时 T2DM 不同疾病进程患者的肠道菌群特征也存在差异<sup>[11]</sup>。肠道菌群是参与 T2DM 及其并发症的重要环境因素。本文采用 16S rRNA 技术研究骨质量下降的 db/db 小鼠肠内容物菌群,发现物种数量、丰富度、均匀度均降低,与 WT 小鼠群落组成存在显著差异,肠道微生物生态紊乱。Maskarinec 等<sup>[16]</sup>对 1702 名参与者(59.9~77.4 岁)调查发现,从血糖正常到 T2DM, $\alpha$ 多样性指数下降。Allin 等<sup>[17]</sup>发现 $\alpha$ 多样性与糖代谢紊乱的严重程度呈负相关。本实验中 db/db 小鼠 $\alpha$ 多样性指标中的 Chao1 指数、ACE 指数和 observed species 均显著降低,提示 db/db 小鼠糖代谢紊乱。

糖尿病前期大鼠<sup>[18]</sup>肠道菌群从厚壁菌门转向拟杆菌门富集,糖尿病期<sup>[19]</sup>和糖尿病性心血管疾病患者<sup>[20]</sup>厚壁菌门丰度降低,推测随着糖尿病进程进展,厚壁菌门渐次丰度下降,本实验中 db/db 小鼠糖尿病性骨质疏松状态,属于并发症阶段,因此我们

观察到厚壁菌门丰度值也是降低的。毛螺菌属为革兰氏阴性厌氧菌,能酵解葡萄糖产生甲酸、乙酸等短链脂肪酸(SCFA)以及乳酸、乙醇、CO<sub>2</sub>和 H<sub>2</sub><sup>[14]</sup>。T2DM 患者中毛螺菌属较少<sup>[16]</sup>,我们也发现 db/db 小鼠的毛螺菌属显著低于 WT 组。推测毛螺菌属的减少抑制 db/db 小鼠对葡萄糖的降解,同时 SCFA 等有益的代谢物降低,进一步加剧 db/db 小鼠血糖升高和并发症的发生。

研究表明,变形菌门涉及持续的低度炎症与代谢紊乱,脱硫弧菌目丰度降低可以抑制炎症反应,拟普雷沃菌属丰度升高可能与糖尿病微血管并发症相关。糖尿病患者体内变形菌门、脱硫弧菌目和拟普雷沃菌属增加<sup>[21-22]</sup>,与本文研究结果相符,db/db 小鼠组变形菌门、脱硫弧菌目和拟普雷沃菌属均显著升高,提示其可能为糖尿病性骨质疏松的危险因素。

综上所述,20 周的 db/db 小鼠血糖升高、骨强度降低,是 T2DOP 的适宜动物模型。且与 WT 小鼠肠道菌群的多样性及特定菌群丰度存在差异,差异菌群集中在厚壁菌门(毛螺菌属)、变形菌门( $\delta$ -变形菌纲、脱硫弧菌目)、拟杆菌门(*Alloprevotella* 属)。本文通过系统阐述肠道菌群 db/db 小鼠中肠道菌群的变化,可以对 T2DOP 的研究提供新的视角。然而,由于肠道微生物群-宿主之间的相互作用以及疾病和模型的复杂性,而且目前大多数研究都是基础研究,因此肠道菌群对 T2DOP 的影响仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387(10027): 1513-1530.
- [2] 郭鑫,吴飞飞. 肠道菌群参与糖尿病肾病的发病机制研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2021, 18(14): 184-188.
- [3] Sircana A, Framarin L, Leone N, et al. Altered gut microbiota in type 2 diabetes: just a coincidence? [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(10): 98.
- [4] 邓永嘉,张煜莹,罗晓婷. 2 型糖尿病与肠道菌群相关性的研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(22): 4206-4213.
- [5] 邢玮,王政霖,吕甜甜,等. 2 型糖尿病 db/db 小鼠的生物学特性 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(8): 12-15.
- [6] 刘弘毅,陈岳祺,颜洁,等. 中药调节肠道菌群干预 2 型糖尿病合并骨质疏松患者的影响研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(11): 1572-1575, 1593.
- [7] Parizad N, Baghi V, Karimi EB, et al. The prevalence of

- osteoporosis among Iranian postmenopausal women with type 2 diabetes; a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(4): 2607-2612.
- [ 8 ] Yamaguchi T, Sugimoto T. Bone metabolism and fracture risk in type 2 diabetes mellitus [J]. *Endocr J*, 2011, 58(8): 613-624.
- [ 9 ] Pritchard JM, Giangregorio LM, Atkinson SA, et al. Association of larger holes in the trabecular bone at the distal radius in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus compared to controls [J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(1): 83-91.
- [ 10 ] Suzuki R, Fujiwara Y, Saito M, et al. Intracellular accumulation of advanced glycation end products induces osteoblast apoptosis via endoplasmic reticulum stress [J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(10): 1992-2003.
- [ 11 ] 杨一峰, 李艳波. 2 型糖尿病并发骨质疏松症的相关因素 [J]. *医学综述*, 2018, 24(8): 1586-1589, 1595.
- [ 12 ] 沈梦圆, 费扬, 孙丽琴, 等. 补肾活血法治疗糖尿病性骨质疏松症疗效及安全性 Meta 分析 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2022, 32(1): 75-81.
- [ 13 ] 贺梦霞, 崔颖, 谢洁, 等. 细胞骨架相关蛋白 2(CKAP2) 在 db/db 小鼠视网膜组织中的表达及其与 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的关系 [J]. *眼科新进展*, 2022, 42(2): 104-107.
- [ 14 ] 王丽群, 庞日朝, 胡晓敏, 等. 肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 129-136.
- [ 15 ] 唐明甜, 肖百全, 刘忠华, 等. 中药调节肠道菌群降低血糖的作用及机制研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 120-126.
- [ 16 ] Maskarinec G, Raquinio P, Kristal BS, et al. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort [J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0250855.
- [ 17 ] Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(4): 810-820.
- [ 18 ] Piccolo BD, Graham JL, Stanhope KL, et al. Diabetes-associated alterations in the cecal microbiome and metabolome are independent of diet or environment in the UC Davis Type 2 Diabetes Mellitus Rat model [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315(5): E961-E972.
- [ 19 ] Chávez-Carbajal A, Pizano-Zárate ML, Hernández-Quiroz F, et al. Characterization of the gut microbiota of individuals at different T2D stages reveals a complex relationship with the host [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(1): 94.
- [ 20 ] 陈茜, 薛勇, 宋晓峰, 等. 糖尿病及糖尿病心血管并发症患者肠道菌群的特征 [J]. *微生物学报*, 2019, 59(9): 1660-1673.
- [ 21 ] 高珊, 刘晓燕, 张爱敏, 等. 糖尿病微血管并发症患者肠道菌群的特征分析 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2022, 14(2): 166-172.
- [ 22 ] Salguero MV, Al-Obaide MAI, Singh R, et al. Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5): 3461-3469.

[ 收稿日期 ] 2022-02-24

饶思静,张森,邵亚兰,等.参附注射液经 NOS/NO 通路改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍的实验研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(6):8-15.

Rao SJ, Zhang S, Shao YL, et al. Shenfu injection improves cognitive dysfunction in vascular dementia model mice *via* the NOS/NO pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 8-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.002

# 参附注射液经 NOS/NO 通路改善血管性痴呆小鼠 认知功能障碍的实验研究

饶思静<sup>1</sup>,张森<sup>1</sup>,邵亚兰<sup>1</sup>,洪芬芳<sup>2\*</sup>,杨树龙<sup>1,3,4,5\*</sup>

(1.南昌大学基础医学院生理学教研室,南昌 330006;2.南昌大学基础医学院病原生物学实验中心,南昌 330006;  
3.南昌大学抚州医学院生理学教研室,江西 抚州 344099;4.南昌大学抚州医学院慢性病研究重点实验室,江西 抚州 344099;  
5.抚州市慢性病研究技术创新中心,江西 抚州 344000)

**【摘要】**目的 研究参附注射液改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍的作用机制。方法 雄性昆明系小鼠,分为假手术组、模型组(VD)、参附注射液组(SFI,10 mL/kg)、一氧化氮前体组(L-Arg,25 mg/kg)、一氧化氮合酶抑制剂组(L-NAME,10 mg/kg),每组各9只。双侧颈总动脉重复夹闭和再灌注以及腹腔注射硝普钠复制VD小鼠模型,造模成功后各组分别给药21 d,假手术组和VD组小鼠腹腔注射等量生理盐水。Morris水迷宫检测小鼠学习记忆能力;HE和Nissl染色观察海马组织病理学改变;Griess法测定NO浓度;ROS、MDA、GSH含量应用试剂盒检测;Western blot检测nNOS、iNOS、eNOS蛋白表达。结果 与假手术组相比,VD组小鼠Morris迷宫实验中潜伏时间延长,学习、记忆能力降低,海马CA1区域病理损伤明显,NO、ROS、MDA含量升高,GSH活性降低( $P<0.01$ , $P<0.05$ ),nNOS、iNOS蛋白表达均显著升高,eNOS蛋白表达降低( $P<0.01$ , $P<0.05$ )。与VD组相比,L-Arg用药组小鼠学习记忆能力,海马CA1区域病理损伤,NO、ROS、MDA、GSH表达等均无明显改善。而SFI及L-NAME用药组可观察到小鼠学习记忆能力较VD组有所改善,海马CA1区域病理损伤明显改善,NO、ROS、MDA含量降低,GSH活性升高,eNOS蛋白表达升高,iNOS、nNOS蛋白表达明显降低( $P<0.01$ , $P<0.05$ )。结论 SFI改善VD小鼠认知功能障碍可能与NOS/NO通路有关。

**【关键词】** 参附注射液;血管性痴呆;一氧化氮;一氧化氮合酶;认知功能

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0008-08

## Shenfu injection improves cognitive dysfunction in vascular dementia model mice *via* the NOS/NO pathway

RAO Sijing<sup>1</sup>, ZHANG Sen<sup>1</sup>, SHAO Yalan<sup>1</sup>, HONG Fengfang<sup>2\*</sup>, YANG Shulong<sup>1,3,4,5\*</sup>

(1. Department of Physiology, College of Basic Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China.

2. Pathogen Biology Experimental Center, Nanchang University, Nanchang 330006. 3. Department of Physiology,

Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344099. 4. Key Laboratory of Chronic Diseases, Fuzhou

Medical College, Nanchang University, Fuzhou 344099. 5. Technology Innovation Center of Chronic Disease

Research in Fuzhou City, Fuzhou Science and Technology Bureau, Fuzhou 344000)

**【基金项目】**国家自然科学基金(82060661,81660151,81660751);江西省自然科学基金项目(20212BAB206092);江西省教育厅科技研究重点项目(GJJ218104)。

**【作者简介】**饶思静(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化和脑血管疾病研究。E-mail:raosijing379@163.com

**【通信作者】**杨树龙(1966—),男,教授,博士生导师,研究方向:心脑血管生理学和炎症药理学。E-mail:yangshulong315@139.com

洪芬芳(1974—),女,高级实验师,研究方向:炎症药理学。E-mail:hongfenfang@126.com \*共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of Shenfu injection improving cognitive dysfunction in vascular dementia model mice. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into a Sham operation group, VD model group, SFI group (10 mL/kg), L-Arg group (25 mg/kg), and L-NAME group (10 mg/kg) with nine in each group. The VD mouse model was established by repeated clipping and reperfusion of bilateral common carotid arteries and intraperitoneal injection of sodium nitroprusside. After modeling, each group was administered drugs for 21 days, and Sham operation and VD model groups were administered the same amount of physiological saline. The Morris water maze test assessed learning and memory abilities of mice, HE and Nissl staining was used to observe pathological changes. The Griess method was used to assess the NO concentration. ROS, MDA, and GSH contents were assessed by kits. iNOS, nNOS, and eNOS protein expression was assessed by Western blot analysis. **Results** Compared with the Sham operation group, the latency time of the VD group was prolonged in the Morris maze test, pathological damage in the hippocampal CA1 region was obvious, NO, ROS, and MDA contents were increased, GSH activity was decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), nNOS and iNOS expression was significantly increased, and eNOS protein expression was decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with the VD group, L-Arg treatment group showed no significant improvements in learning or memory abilities, pathological damage in the hippocampal CA1 region, or expression of NO, ROS, MDA, and GSH. Compared with the VD group, learning and memory abilities in SFI and L-NAME groups were improved, pathological damage of the hippocampal CA1 region was significantly improved, NO, ROS, and MDA contents were decreased, GSH activity was increased, eNOS protein expression was increased, and iNOS and nNOS protein expression was significantly decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** SFI improves cognitive dysfunction in VD mice, which may be related to the NOS/NO pathway.

**【Keywords】** Shenfu injection; vascular dementia; nitric oxide; nitric oxide synthase; cognitive function

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

血管性痴呆 (VD) 是缺血性或出血性脑血管疾病及心血管和循环系统疾病引起的脑损伤导致的以记忆减退和进行性认知功能障碍为特征的综合征<sup>[1]</sup>。VD 是仅次于阿尔茨海默病 (AD) 的第二大临床常见老年痴呆类型, 占痴呆病例的 15%~20%, VD 的发病率随着人口老龄化和脑血管疾病的发病率增高而上升<sup>[2]</sup>。世界卫生组织统计预估, 到 2050 年痴呆人口将增加 2 倍, 人数达到 1 亿以上。VD 的发病机制极其复杂, 至今尚未明确, 并缺乏系统的治疗方案。中医药因其多成分、多靶点和多通路的特点, 成为探寻新的 VD 治疗方案的研究热点。参附注射液 (SFI) 主要成分为红参中的人参皂苷和附子中的乌头类生物碱, 临床多用于治疗冠心病、充血性心力衰竭和心缺血再灌注等各种心血管疾病<sup>[3]</sup>。随着研究深入, SFI 改善神经系统疾病的作用逐渐被证明<sup>[4]</sup>。SFI 可通过改善炎症反应、减少神经细胞凋亡、改善神经功能损伤, 治疗脑缺血再灌注损伤<sup>[5-6]</sup>。Ohno 等<sup>[7]</sup>研究发现, 全脑缺血大鼠注射一氧化氮抑制剂 (L-NAME) 24 h 后认知功能紊乱明显减轻, 提示 L-NAME 对海马 CA1 区的神经元损害有保护作用。一氧化氮 (NO) 在脑血管损伤和神经炎症中发挥至关重要的调节作用, 过量的 NO 可产生神经毒性损伤神经元导致认知功能受损<sup>[8]</sup>。

在脑缺血再灌注损伤中, NO 可影响神经元存活和血脑屏障的完整性, 提示 NO 与脑缺血再灌注损伤密切相关, 干预 NO 含量及相关作用机制可能是脑缺血再灌注的潜在治疗方法<sup>[9]</sup>。Wu 等<sup>[4]</sup>发现脑缺血再灌注后应用 SFI 可显著降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平, 调控 NOS 的表达, 减少神经毒性作用 NO 的产生。因此, 本研究通过观察 SFI 对 VD 小鼠的作用, 探究 SFI 是否通过 NOS/NO 通路改善 VD 小鼠的学习认知功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级体重 20~22 g 雄性 KM 小鼠, 共 50 只, 由江西中医药大学实验动物科技中心提供 [SCXK (赣) 2018-0003], 小鼠饲养在南昌大学屏障环境动物房 [SYXK (赣) 2021-0004], 该研究通过南昌大学实验动物伦理委员会的审查 ((2020) 医研伦第 (19) 号), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

参附注射液 (华润三九药业有限公司, 产品批号: 200807AK02); 硝普钠 (Solarbio, 货号: S9560); 一氧化氮合酶抑制剂 (货号: S0006); 一氧化氮前体

(货号:S0012)购自碧云天生物技术有限公司;ROS(货号:E004-1-1);MDA 测定试剂盒(货号:A003-1-2);GSH 测定试剂盒(货号:A006-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;尼氏染色液(Solarbio,货号:G1430);RIPA 裂解液(北京普利莱基因技术有限公司,货号:C1053);蛋白 Marker(上海羿圣生物科技有限公司,货号:20350ES76);GAPDH 鼠抗(RuiYing,货号:RLM3029);兔抗 nNOS(Cell signaling,货号:4234);兔抗 eNOS(RuiYing,货号:RLM3164);兔抗 iNOS(Boster,货号:BA0362);PVDF 膜(Millipore company,货号:IPVH00010)。

低温高速离心机(东旺仪器,型号:TG16KR);超高分灵敏度共聚焦显微镜(日本奥林巴斯,型号:FV3000);蛋白免疫转印系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 4600)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物模型复制、分组及给药

50 只小鼠适应性饲养 1 周后,随机选取 40 只 3%巴比妥钠按 40 mg/kg 麻醉后通过重复夹闭后再灌注双侧颈总动脉及腹腔注射硝普钠复制 VD 小鼠模型<sup>[10-11]</sup>。待造模小鼠手术结束麻醉苏醒后,根据 Longa 评分标准:0 分:无症状;1 分:提尾时对侧前肢内收屈曲;2 分:爬行时向对侧旋转;3 分:站立或爬行时向对侧倾倒;4 分:无自主活动伴意识障碍。评分 1 分及以上为造模成功,选取造模成功具有运动能力评分为 1~3 分小鼠。造模成功的小鼠随机分为 4 组单独给药:模型组(VD)、精氨酸组(L-Arg, 25 mg/kg)、一氧化氮抑制剂组(L-NAME, 10 mg/kg)、参附注射液组<sup>[12-14]</sup>(SFI, 10 mL/kg),每组 9 只。另随机选取 9 只为假手术组(Sham),共 5 组。造模成功后第 2 天各组分别按计量给药<sup>[15-17]</sup>,SFI 组尾静脉注射参附注射液,L-Arg 组、L-NAME 组腹腔注射精氨酸、一氧化氮抑制剂,假手术组和模型组等体积同样途径给予生理盐水,连续给药 21 d。

#### 1.3.2 行为学实验

给药 3 周后进行 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力,连续 6 d,每天在固定时间进行水迷宫实验。将小鼠于水迷宫的四个象限入水游泳学习 4 次,实验前 5 d 将目标象限平台置于水面下 1 cm,记录小鼠找到平台的时间,记为学习时间;第 6 天撤去平台,记录小鼠在目标象限的停留时间以及穿过目标象限平台的次数,记为记忆时间。

#### 1.3.3 组织样本的制备

行为学试验结束后,当天禁食不禁水,次日取材。小鼠 3%巴比妥钠按 40 mg/kg 麻醉后心尖取血,制备血清。每组随机选取 6 只小鼠处死后取脑组织,分离脑组织各部位,取海马、大脑皮层。脑组织转移至-80℃冰箱保存。其余小鼠麻醉后打开胸腔,暴露心脏,将针头由左心室心尖搏动处向主动脉方向刺入。剪开右心耳,给予 25 mL 生理盐水灌注,当右心耳流出清澈生理盐水后灌注 100 mL 含 4%多聚甲醛缓冲液,见肝颜色变白,小鼠四肢僵硬强直即停止灌注,开颅取全脑。放入多聚甲醛溶液,固定用于组织染色。

#### 1.3.4 组织病理学分析

(1) HE 染色:切片常规脱蜡后,苏木素染色 5 min,1%盐酸分化,伊红复染 2 min,梯度脱水,甘油明胶封片,尽快拍照,观察大脑海马 CA1 区神经元细胞形态变化等情况。(2) Nissl 染色:切片常规脱蜡后,焦紫油染料 56℃温箱浸染 1 h,ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 次,置于 Nissl 分化液分化 2 min。梯度脱水透明,中性树胶封片,尽快拍照,观察脑组织形态。

#### 1.3.5 Griess 法检测小鼠血清 NO 含量

NO 标准曲线稀释,向 96 孔板各孔中分别加入稀释好的标准应用液或待测样品各 50 μL;各孔中加入 50 μL Griess 试剂 A,37℃反应 10 min;各孔中加入 50 μL Griess 试剂 B,37℃反应 10 min;震荡 96 孔板数次,混匀各孔中反应液,酶标仪 540 nm 波长检测 OD 值。根据所得 OD 值,拟合 NO 反应标准曲线,通过标准曲线计算各待测样本的 NO 含量。

#### 1.3.6 Western blot 检测一氧化氮合酶(nNOS、iNOS、eNOS)蛋白表达

提取总蛋白,提前制备并预冷 1:100 蛋白酶抑制剂和 RIPA 裂解液混合溶液。称取 50~100 mg 组织样本放入 1.5 mL 离心管,加入 1 mL 裂解液,电动匀浆器充分匀浆,至不可见明显组织块。冰上裂解 30 min,每 10 min 于漩涡混合仪上震荡 15 s。12 000 r/min,4℃,离心 10 min,吸取上清液转移至新的 1.5 mL 离心管。测定并记录各组样品蛋白量,计算取等量总蛋白进行凝胶电泳,电转,封闭,PVDF 膜与兔抗大鼠 nNOS 抗体(1:1000)、iNOS 抗体(1:1000)、eNOS 抗体(1:2000)以及 GAPDH(1:5000)4℃孵育过夜,次日孵育对应二抗后曝光拍照,Image J 软件分析图像灰度值,计算蛋白表达

水平。

### 1.3.7 氧化应激指标检测

准确称取海马组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的匀浆介质,冰浴条件下机械匀浆,匀浆后离心10 min,取上清液待测。按试剂盒说明书(ROS、MDA、GSH)在96孔板操作,37℃孵育10 min。酶标仪测定各孔吸光度值,波长510 nm。

### 1.4 统计学方法

所有数据均采用SPSS 20.0软件进行数据组间显著性统计学分析,统计结果以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,通过单因素One-way ANOVA分析进行多组间数据比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。应用软件GraphPad Prism 6作统计图表。

## 2 结果

### 2.1 SFI对VD小鼠行为学的影响

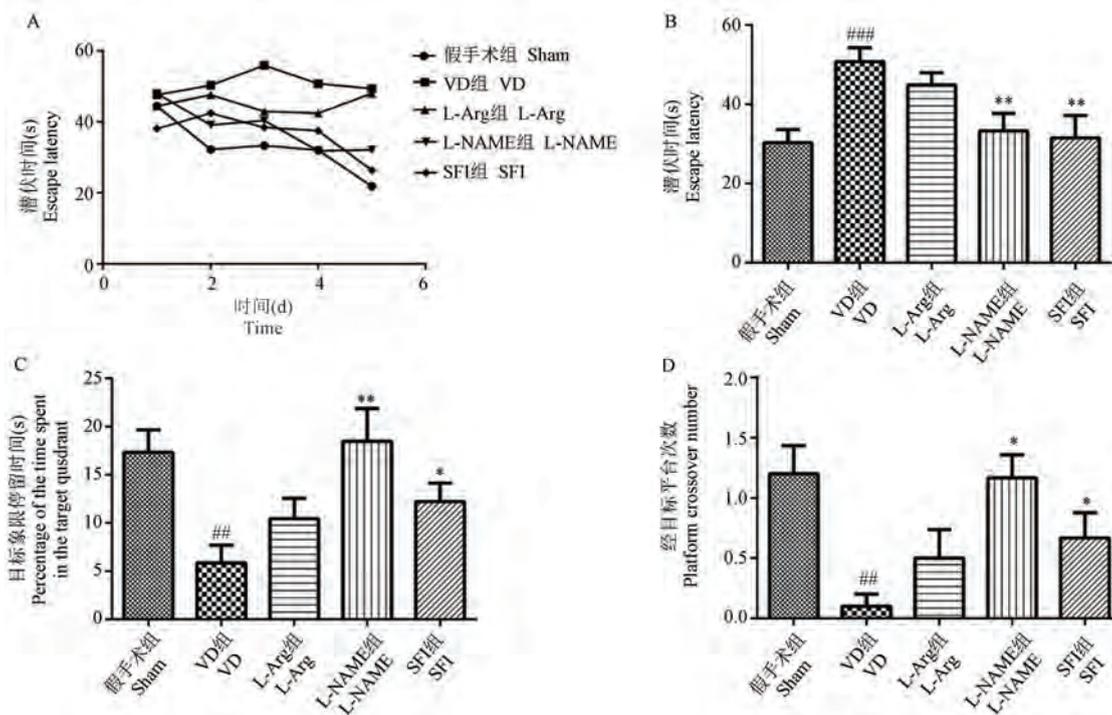
水迷宫实验定位航行实验结果显示,与假手术组小鼠相比,VD组小鼠定位航行的潜伏期明显延

长( $P < 0.01$ )。较VD组小鼠相比,L-Arg组小鼠定位航行的潜伏期无明显改变,而与VD小鼠相比,SFI组和L-NAME组小鼠定位航行的潜伏期均不同程度的缩短( $P < 0.05$ ) (图1A、1B)。Morris水迷宫空间探索实验显示,与假手术组小鼠相比,VD组小鼠目标象限(第四象限)停留时间以及目标象限平台经过次数均明显减少( $P < 0.05$ )。与VD组小鼠相比L-Arg组小鼠目标象限停留时间和平台经过次数均无显著增加,而SFI和L-NAME组小鼠目标象限停留时间和平台经过次数均明显增加( $P < 0.05$ ),表明SFI及L-NAME能够明显改善VD小鼠学习记忆功能(图1C、1D)。

### 2.2 SFI对VD小鼠海马CA1区病理组织学的影响

#### 2.2.1 HE染色

与假手术组相比,VD模型组小鼠海马结构疏散,细胞稀疏,细胞层变薄,甚至有细胞层缺失现象,神经元胞体变形,细胞核出现深染、固缩现象。与VD组相比,L-Arg组小鼠海马神经元排列较整齐,海马结构类似,细胞层改变程度较小。SFI组及



注:A:潜伏时间线型图;B:潜伏时间柱状图;C:目标象限停留时间;D:经过目标平台次数。与假手术组相比,## $P < 0.01$ ;与VD组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图1 Morris水迷宫实验( $n=9$ )

Note. A, Latent time line chart. B, Bar chart of latency time. C, Percentage of the time spent in the target quadrant. D, Number of crossover the target platform. Compared with sham group, ## $P < 0.01$ . Compared with VD group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 1 Morris water maze test

L-NAME 组海马结构较清晰,细胞层变厚,部分神经元细胞核深染、固缩,胞体呈多边形改变,但较 VD 组海马区的病理性损伤有明显的改善(图 2)。

### 2.2.2 Nissl 染色

如图 3 所示,与假手术组相比,VD 组小鼠海马 CA1 区神经元数量减少,细胞收缩,胞浆深染,尼氏小体减少、丢失明显,阳性细胞数目减少,不可见清晰的细胞形态。与 VD 组对比,SFI 组和 L-NAME 组

神经元细胞增多,细胞大部分形态清晰正常,可见胞浆深染减少,尼氏体恢复增多。而 L-Arg 组与 VD 组比较未见明显的细胞形态改变及尼氏体增多。

### 2.3 SFI 对 VD 小鼠血清 NO 含量的影响

与假手术组相比,VD 组小鼠的血清 NO 含量显著升高。与 VD 组相比,SFI 组、L-NAME 组的 NO 含量均显著下降,差异具有显著性( $P < 0.01$ ),L-Arg 组 NO 含量未见明显下降(图 4)。

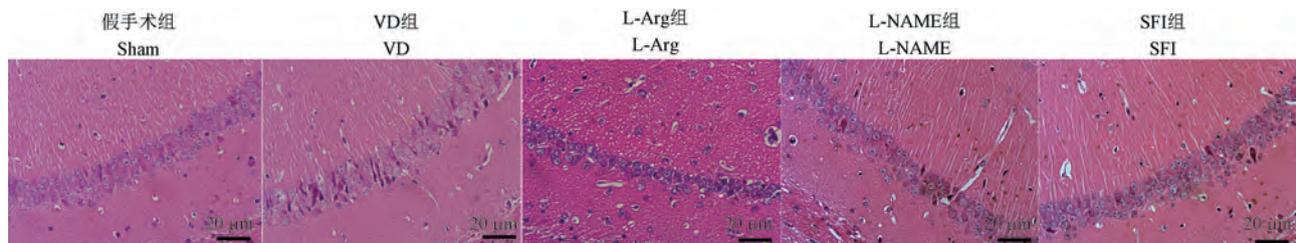


图 2 小鼠海马 CA1 区病理组织 HE 染色( $n=3$ )

Figure 2 HE staining of pathological tissues in CA1 region of mouse hippocampus

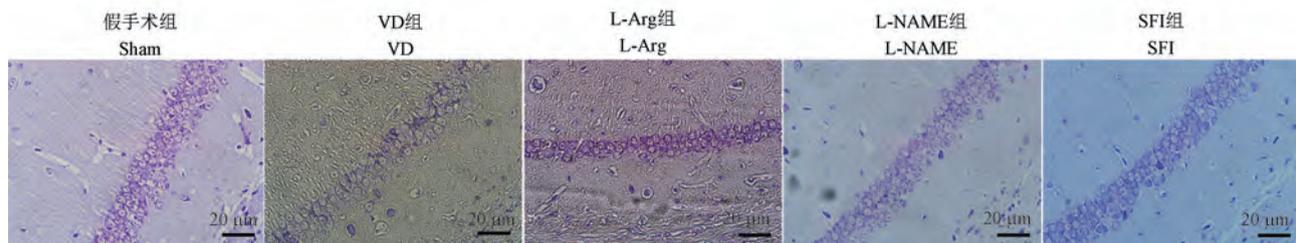
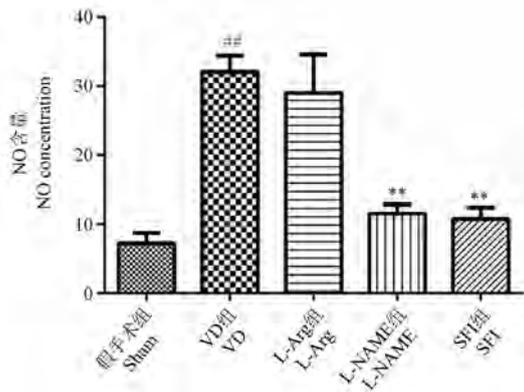


图 3 小鼠海马 CA1 区病理组织 Nissl 染色( $n=3$ )

Figure 3 Nissl staining of pathological tissues in CA1 region of mouse hippocampus



注:与假手术组相比,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;与 VD 组相比,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 4 小鼠血清 NO 含量( $n=6$ )

Note. Compared with sham group,<sup>#</sup> $P < 0.01$ . Compared with VD group,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

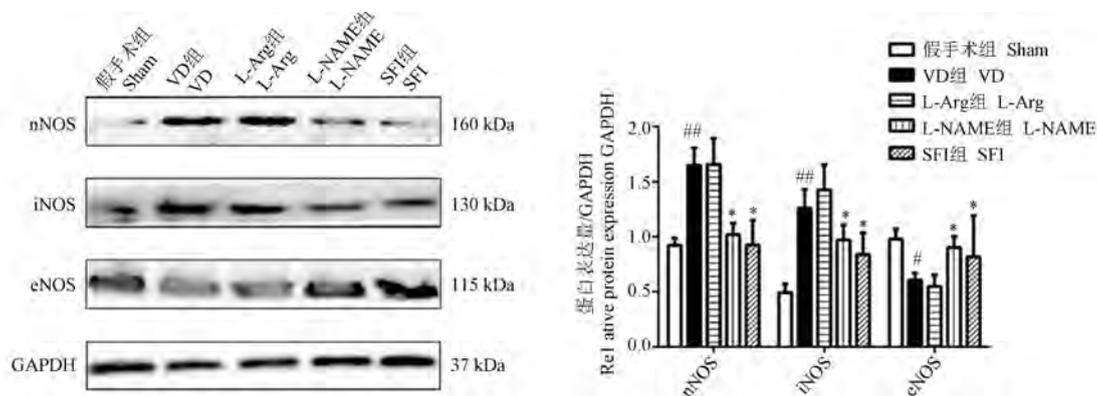
Figure 4 NO content in mice serum

### 2.4 SFI 对 VD 小鼠海马组织 NOS 的影响

与假手术组相比,VD 组小鼠海马组织 eNOS 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ),nNOS、iNOS 蛋白表达均明显上调( $P < 0.01$ )。与 VD 组相比,L-Arg 组海马组织 eNOS、nNOS、iNOS 蛋白表达均无明显改变。SFI、L-NAME 各组海马组织 eNOS 蛋白表达上调( $P < 0.05$ ),nNOS、iNOS 蛋白表达均明显下调( $P < 0.05$ ) (图 5)。

### 2.5 SFI 对 VD 小鼠海马组织 MDA 含量、ROS 以及 GSH 活性影响

如图 6 所示,VD 组与假手术组相比,小鼠海马组织 ROS、MDA 含量显著增加( $P < 0.01$ ),GSH 活性明显降低,差异均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 VD 组小鼠相比,SFI 以及 L-NAME 组小鼠海马组织 ROS、MDA 含量均明显降低( $P < 0.05$ ),GSH 活性明显升高( $P < 0.05$ )。

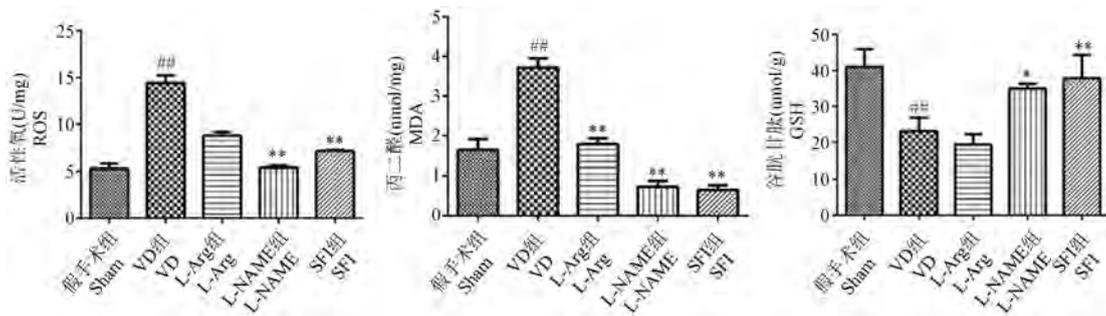


注:与假手术组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与 VD 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 5 小鼠海马组织 nNOS、iNOS、eNOS 蛋白表达 ( $n = 6$ )

Note. Compared with sham group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ . Compared with VD group, \* $P < 0.05$ .

Figure 5 Expression of nNOS, iNOS and eNOS proteins in mouse hippocampus



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

图 6 小鼠 ROS、MDA 含量及 GSH 活性 ( $n = 6$ )

Note. Compared with the sham group, ## $P < 0.01$ . Compared with the VD model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Figure 6 ROS, MDA content and GSH activity in mice

### 3 讨论

VD 是脑血管疾病因素引起的以认知功能障碍为主要表现的获得性智能损伤综合征,是目前唯一可防治的痴呆症,但其治疗一直是临床的重点及难点。VD 发病机制复杂,目前国内外研究主要集中于胆碱能损伤、细胞凋亡、氧化应激、炎症反应、兴奋毒性等<sup>[2]</sup>。

许丹芸等<sup>[18]</sup>研究表明 NO 参与急性脑缺血及 VD 全过程。随着脑缺血发展,胶质细胞活化产生炎症因子激活 iNOS 衍生出大量具有神经毒性的 NO 参与神经炎症导致神经细胞凋亡和死亡<sup>[19]</sup>。另一方面,过量的 NO 可引起脑血流量的调节失衡,破坏细胞膜结构、损伤 BBB,影响 DNA 转录和蛋白质的合成,直接损伤神经元导致 VD 认知功能障碍<sup>[20]</sup>。有报道显示 SFI 中主要组成成分人参,其有效成分 Rg1 可能通过 PI3K/Akt 途径诱导 eNOS 产

生 NO<sup>[21]</sup>,在脑缺血前期扩张血管,保护内皮细胞。人参皂苷 Rh2 又可抑制 NF- $\kappa$ B 活化,抑制 iNOS 活化减少 NO 产生减轻炎症反应<sup>[22]</sup>。研究表明 SFI 可直接清除自由基和过氧化物,保证脑部血流灌注,抑制细胞凋亡,减轻脑缺血再灌注损伤大鼠中枢神经系统病变程度<sup>[6]</sup>,改善神经元结构功能治疗 VD<sup>[23-24]</sup>。本研究也显示应用 SFI 和 L-NAME 的小鼠在水迷宫定位航行及空间探索结果均优于 VD 模型组。在脑组织病理学中观察到 SFI 和 L-NAME 减轻了 VD 模型小鼠神经元损伤,而 L-Arg 组小鼠的表现与 VD 模型小鼠相较无明显好转。且 VD 模型小鼠 NO 水平升高,而 SFI 组和 L-NAME 组均显著降低了 VD 小鼠 NO 含量,L-Arg 组小鼠 NO 含量与 VD 模型组没有差异。这些结果表明 SFI 可改善 VD 模型小鼠海马病理组织损伤及认知功能。L-NAME 和 L-Arg 分别是 NO 合酶抑制剂和前体,考虑 SFI 与 L-NAME 改善 VD 小鼠认知功能障碍与 NO 相关通

路及作用有关。

NO 是活跃的气体分子,在血管舒张、神经、免疫调节中均有参与。且 NO 具有双面性,在神经系统中既能保护血管又具有神经毒性<sup>[25]</sup>。一氧化氮合酶(NOS)共有三种类型:nNOS、iNOS 和 eNOS,均能催化 NO 合成前体物质产生 NO。三者中内皮细胞主要表达 eNOS,衍生 NO 调节内皮细胞功能和脑血流量<sup>[26]</sup>。nNOS 则主要在中枢和外周神经元中表达,iNOS 衍生的 NO 可通过影响突触可塑性促进学习和记忆<sup>[27]</sup>。而 iNOS 在正常生理状态下几乎不表达,但可在肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等多种细胞因子刺激下激活<sup>[28]</sup>,iNOS 的持续表达可催化合成大量具有神经毒性的 NO 介导炎症<sup>[29-30]</sup>,导致海马神经元凋亡损伤<sup>[31]</sup>。过量的 NO 可与  $O_2^-$  反应生成过氧亚硝酸盐 ( $ONNO^-$ ) 促使 eNOS 解偶联,降低 MnSOD 和谷胱甘肽还原酶的活性,导致 iNOS 表达增高,造成恶性循环<sup>[32]</sup>。Fleszar 等<sup>[33]</sup>发现,长期应用过多的 L-Arg 会导致 NO 过度产生,诱发神经毒性,损害神经细胞。而 L-NAME 可抑制神经递质的释放及 NOS 相应受体的激活,调节 NO 的产生对抗脑缺血时的兴奋毒性,保护神经元,改善大鼠学习空间记忆能力。林少滨<sup>[34]</sup>表明人参皂苷可能具有改善脑内神经递质含量、减少神经细胞凋亡、抗脑缺血等作用。同时可降低 LPS 刺激导致的 NF- $\kappa$ B 磷酸化反应,通过干预 mTOR 途径降低海马区 NF- $\kappa$ B 表达,抑制 iNOS 激活,减少 NO 释放,改善大鼠缺血再灌注后的学习记忆能力<sup>[35]</sup>。因此抑制 NOS 激活及降低 NO 的含量代表了治疗 VD 的有效策略。我们的研究发现 VD 模型小鼠 eNOS 的蛋白表达下降,iNOS、nNOS 蛋白表达显著升高。而 SFI 组和 L-NAME 组均显著降低了 VD 小鼠 iNOS、nNOS 蛋白表达,增加 eNOS 的蛋白表达。L-Arg 组的各蛋白表达与 VD 组无统计学差异。表明了 SFI 可能通过下调 iNOS、nNOS 而上调 eNOS 影响 NO 生物利用度是 NO 含量保持在合理水平,减轻 VD 小鼠的认知功能障碍。

脑缺血后 BBB 损伤引起红细胞外渗造成微出血,释放  $Fe^{2+}$  进一步产生活性氧(ROS)参与氧化应激加重脑组织损伤<sup>[36]</sup>。Zhang 等<sup>[37]</sup>发现 VD 小鼠血清中的超氧化物歧化酶(SOD)水平显著降低,丙二醛(MDA)水平升高。而 L-NAME 诱导的抑制作用可改善缺血后大鼠的脑氧化状态,降低氧化应激反应<sup>[38]</sup>。Gümüřlü 等<sup>[39]</sup>向全脑缺血的大鼠模型注

射 L-NAME 后发现 SOD 活性增加,脂质过氧化物的含量降低,大鼠脑缺血后的氧化状态好转。L-Arg 是以 NOS 为合成酶合成 NO 的底物,Arg 缺乏时 NOS 生成  $O_2^-$ ,适当生理浓度的 Arg 可减少  $O_2^-$  的生成。而脑缺血过程中增加过多的 L-Arg 会加剧 NO 的生物利用度失调<sup>[40]</sup>。本研究结果显示 SFI 和 L-NAME 增加了 VD 小鼠 GSH 活性,降低了 ROS、MDA 表达水平,表明 SFI 可能也通过调节 NO 生物利用度发挥抗氧化应激作用,改善 VD 小鼠神经元损伤及认知功能障碍。

综上所述,本实验结果表明 SFI 可改善 VD 小鼠的认知功能障碍,其机制可能与经 NOS/NO 通路,抑制氧化应激,调节 NO 生物利用度,影响 NO 生成,保护脑血管神经单元有关,为相关中医药治疗 VD 提供了新的方向及靶点。由于 NOS/NO 通路可参与多种 VD 发病机制,但本研究集中于炎症反应及氧化应激,未对其他机制深入研究。SFI 是中药复方,其治疗 VD 的具体有效成分尚未明确,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Dichgans M, Leys D. Vascular cognitive impairment [J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 573-591.
- [2] O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia [J]. *Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [3] 李艳,陈雨,杨柳,等. 参附注射液治疗心脑血管疾病相关物质基础及作用机制研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(4): 499-503.
- [4] 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.
- [5] 王敏,梁辉,王桂华,等. 参附注射液对血管性痴呆大鼠认知功能的作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2014, 16(12): 1324-1325.
- [6] 谢健. 参附注射液对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性和神经功能的影响 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2008.
- [7] Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat [J]. *Brain Res*, 1993, 632(1/2): 36-40.
- [8] Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(10): 766-775.
- [9] Wang Y, Hong F, Yang S. Roles of nitric oxide in brain ischemia and reperfusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4243.
- [10] 彭晓燕,万婷,张丽丹,等. 血管性痴呆大鼠模型的研究概

- 述 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 311-314.
- [11] 窦金金, 谢宁, 吴颂, 等. 血管性痴呆大鼠模型的改良 [J]. 中国临床保健杂志, 2012, 15(2): 167-168.
- [12] 刘文强, 徐艳, 韩爱民, 等. 参附注射液对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠皮质区钙网蛋白表达及神经元凋亡的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 281-286.
- [13] 邵亚兰. 参附注射液治疗血管性痴呆的作用及分子机制的实验研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [14] 李乃选, 刘红霞, 潘虹, 等. 参附注射液对血管性痴呆大鼠空间学习记忆功能和海马组织病理学改变的作用 [J]. 滨州医学院学报, 2019, 42(6): 401-406.
- [15] 宋红梅. 一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 对慢性脑缺血大鼠行为学及海马 iNOS 表达的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [16] Manukhina EB, Pshennikova MG, Goryacheva AV, et al. Role of nitric oxide in prevention of cognitive disorders in neurodegenerative brain injuries in rats [J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 146(4): 391-395.
- [17] 祁文秀, 刘丽霞, 郝卫成, 等. 长时间应用 L-精氨酸增强大鼠学习记忆功能和大脑皮质、海马 nNOS 或 c-fos 的表达及神经元数目的增加 (英文) [J]. 神经解剖学杂志, 2008, 24(4): 373-378.
- [18] 许丹芸, 游国雄, 苗建亭. 脑缺血及血管性痴呆形成过程中一氧化氮机制的实验研究 [J]. 中华老年医学杂志, 1999, 18(4): 240.
- [19] Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, et al. Mouse model of angiogenesis [J]. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1667-1679.
- [20] Zhu DY, Deng Q, Yao HH, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. Life Sci, 2002, 71(17): 1985-1996.
- [21] Wang Y, Liu Y, Zhang XY, et al. Ginsenoside Rg1 regulates innate immune responses in macrophages through differentially modulating the NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1): 77-84.
- [22] Li LC, Piao HM, Zheng MY, et al. Ginsenoside Rh2 attenuates allergic airway inflammation by modulating nuclear factor- $\kappa$ B activation in a murine model of asthma [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 6946-6954.
- [23] 张圆, 任长虹, 吴晓丹, 等. 参附注射液的临床应用及药理机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 1141-1146.
- [24] 孔祥怡, 郝利铭, 苏晓薇, 等. 人参皂苷 Re 对慢性缺血致血管性痴呆大鼠行为学及形态学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(21): 6033-6036.
- [25] Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(23): 5839-5848.
- [26] Shu X, Keller IV 4th, Begandt D, et al. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(23): 4561-4575.
- [27] Ally A, Powell I, Ally MM, et al. Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states [J]. Nitric Oxide, 2020, 102: 52-73.
- [28] Iadecola C. The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease [J]. Neuron, 2017, 96(1): 17-42.
- [29] Zhào H, Liu Y, Zeng J, et al. Troxerutin and cerebroprotein hydrolysate injection protects neurovascular units from oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury *in vitro* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 9859672.
- [30] Lee J, Bae EH, Ma SK, et al. Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases [J]. Chonnam Med J, 2016, 52(2): 81-90.
- [31] Hu X, Leak RK, Shi Y, et al. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair [J]. Nat Rev Neurol, 2015, 11(1): 56-64.
- [32] Zhu HY, Hong FF, Yang SL. The roles of nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the pathology of vascular dementia and related therapeutic approaches [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4540.
- [33] Fleszar MG, Wiśniewski J, Zboch M, et al. Targeted metabolomic analysis of nitric oxide/L-arginine pathway metabolites in dementia: association with pathology, severity, and structural brain changes [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13764.
- [34] 林少滨. 人参皂苷 Rb1 后处理对大鼠全脑缺血再灌注后认知功能的影响 [J]. 海峡药学, 2017, 29(7): 15-17.
- [35] Liu X, Liu R, Dai Z, et al. Effect of Shenfu injection on lipopolysaccharide (LPS)-induced septic shock in rabbits [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 234: 36-43.
- [36] Cohen RA, Tong X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(4): 308-316.
- [37] Zhang Y, Li Y, Wang Y, et al. Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4587-4593.
- [38] Seif-el-Nasr M, Fahim AT. Antioxidant effect of N omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on global cerebral ischemia in a rat model [J]. Arzneimittelforschung, 2001, 51(8): 628-632.
- [39] Gümüřlü S, Serteser M, Ozben T, et al. Inhibitory role of N omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats [J]. Clin Chim Acta, 1997, 267(2): 213-223.
- [40] Karlsson WK, Sørensen CG, Kruuse C. L-arginine and L-NMMA for assessing cerebral endothelial dysfunction in ischaemic cerebrovascular disease: a systematic review [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2017, 44(1): 13-20.

张游, 靳子言, 尹亚龙, 等. 电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 16-23.

Zhang Y, Jin ZY, Yin YL, et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 16-23.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.003

# 电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响

张游, 靳子言, 尹亚龙, 王嘉仪, 吴新贵\*

(广西医科大学第一附属医院中医科, 南宁 530021)

**【摘要】** 目的 探讨电针 (electroacupuncture, EA) 治疗足三里、内关穴对脑缺血大鼠神经可塑性因子 GAP-43、SYN 和 MAP-2 的影响。方法 将 80 只大鼠按随机数字表法分为假手术组 (Sham) 组、EA 3 d 组、大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 3 d 组、EA 14 d 组、MCAO 14 d 组, 每组 16 只。除 Sham 组外, 其余组采用 Longa 线栓法构建 MCAO 大鼠模型, EA 组术后每日治疗“足三里”和“内关”穴 20 min。平衡木试验评估大鼠运动功能, Western blot 法检测梗死对侧大脑皮层中神经可塑性因子 GAP-43、SYN 蛋白的表达, 实时荧光定量 PCR 法检测 GAP-43、SYN mRNA 的表达, 免疫荧光法检测 GAP-43/MAP-2、SYN/MAP-2 的共定位表达。结果 与 Sham 组相比, MCAO 组在各时间点平衡木试验评分显著升高 ( $P < 0.05$ ), MCAO 3 d 组 ( $P < 0.05$ ) 和 14 d 组 ( $P < 0.05$ ) 的 GAP-43、SYN mRNA 表达均显著降低, MCAO 14 d 组 ( $P < 0.05$ ) 的 SYN/MAP-2 共定位平均光密度表达显著减少, GAP-43 和 SYN 蛋白表达在 MCAO 3 d 组和 14 d 组均未见明显差异; 与 MCAO 组相比, EA 组在 1 d、3 d、7 d 时平衡木试验评分未见明显差异, 14 d 时平衡木试验评分显著降低 ( $P < 0.05$ ), 与 MCAO 3 d 组相比, EA 3 d 组 GAP-43、SYN mRNA 的表达均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 与 MCAO 14 d 组相比, EA 14 d 组的 GAP-43、SYN mRNA 表达均显著增加 ( $P < 0.05$ ), 以及 GAP-43 和 SYN 蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.05$ ), GAP-43/MAP-2、SYN/MAP-2 的共定位平均光密度均显著增加 ( $P < 0.05$ )。结论 EA 刺激“足三里”和“内关”穴可改善缺血性损伤后运动功能, 其机制可能与促进神经可塑性因子的表达来诱导轴突萌发, 进而激活损伤后的神经可塑性有关。

**【关键词】** 缺血性卒中; 电针; 神经可塑性; 运动功能

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0016-08

## Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats

ZHANG You, JIN Ziyan, YIN Yalong, WANG Jiayi, WU Xingui\*

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of electroacupuncture (EA) at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity factors GAP-43, SYN and MAP-2 in cerebral ischemic rats. **Methods** Eighty rats were divided into Sham, EA 3 d, middle cerebral artery occlusion (MCAO) 3 d, EA 14 d, and MCAO 14 d groups by a random number table with 16

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (81760885); 广西自然科学基金 (2017GXNSFDA198011)。

**【作者简介】** 张游 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 脑血管病的针灸治疗与研究。E-mail: 843757818@qq.com

**【通信作者】** 吴新贵 (1965—), 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 脑血管病的针灸治疗与研究。E-mail: wxingui200061@aliyun.com

rats per group. Except for the Sham group, a permanent MCAO rat model was established using the Longa thread embolization method. The EA group was treated at Neiguan and Zusanli points for 20 min daily after surgery. The motor function of rats was assessed by the balance beam test, and protein expression of neuroplasticity factors GAP-43 and SYN in the cerebral cortex contralateral to the infarct was assessed by Western blot. mRNA expression of GAP-43 and SYN was assessed by Real-time quantitative PCR, and colocalized expression of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 was determined by immunofluorescence. **Results** Compared with the Sham group, the MCAO group had significantly higher balance beam test scores at each time point ( $P < 0.05$ ), GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly lower in MCAO 3 d ( $P < 0.05$ ) and 14 d ( $P < 0.05$ ) groups, a significantly reduced SYN/MAP-2 colocalized mean optical density was found in the MCAO 14 d group ( $P < 0.05$ ), and GAP-43 and SYN protein expression was not significantly different in MCAO 3 d and 14 d groups. Compared with the MCAO group, no significant differences were seen in balance beam test scores at 1, 3, and 7 days in the EA group, and the balance beam test scores were significantly lower at 14 days ( $P < 0.05$ ). Compared with the MCAO 3 d group, GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly increased in the EA 3 d group ( $P < 0.05$ ). Compared with the MCAO 14 d group, GAP-43 and SYN mRNA expression was significantly increased ( $P < 0.05$ ) GAP-43 and SYN protein expression was significantly increased in the EA 14 d group ( $P < 0.05$ ), and the colocalized mean optical density of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** EA stimulation of Zusanli and Neiguan points improves motor functions after ischemic injury, and the mechanism may be related to promoting expression of neuroplasticity factors to induce axon sprouting and activating neuroplasticity after injury.

**【Keywords】** ischemic stroke; electroacupuncture; neuroplasticity; motion function

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

从全球范围来看,脑卒中是造成死亡和残疾的主要原因,每年都需要花费大量的医疗费用用于护理与治疗<sup>[1]</sup>。缺血性卒中是最常见的脑卒中类型,占脑卒中的 87%,出血性卒中仅占 13%<sup>[2]</sup>。在缺血性卒中时,可以观察到多种病理生理变化,包括脑水肿、神经元丢失和神经可塑性改变等<sup>[3]</sup>。神经可塑性在改善神经功能障碍中起着重要作用,已成为缺血性脑卒中治疗的重要靶点<sup>[4]</sup>。神经可塑性是指在未受损神经元和变性神经元之间,通过功能重组和重建新的神经连接来补偿损伤,包括关键生长因子的表达、突触和树突的生长、轴突重塑和血管新生<sup>[5]</sup>。生长相关蛋白 43 (GAP-43) 和突触素 (SYN) 是两类典型的神经可塑性蛋白<sup>[6]</sup>。GAP-43 是脊椎动物轴突生长与再生的经典分子标记,上调后可以促进神经元的生长、发育、神经再生和突触重建<sup>[7]</sup>。SYN 可作为突触发生的可靠指标,其表达水平可以反映突触的密度<sup>[8]</sup>。此外,微管相关蛋白 2 (MAP-2) 与缺血性脑损伤有密切关系,可作为损伤后剩余神经元中轴突和树突代偿性重建的指标<sup>[9]</sup>。电针 (electroacupuncture, EA) 是我国中医学的重要组成部分之一,其治疗缺血性卒中有一定的积极作用,可改善神经功能障碍<sup>[10]</sup>,但其作用机制尚不明确。本研究旨在探讨 EA 对脑缺血大鼠神经可塑性因子 GAP-43、SYN 和 MAP-2 的影响,以期对缺血性卒中的治疗提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

挑选 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 80 只,8~9 周龄,平均体重 (280±50)g,购自广西医科大学实验动物中心 [SCXK(桂)2020-0002],均饲养于广西医科大学动物实验中心动物房 [SYXK(桂)2020-0003],规律饮水、摄食,环境温度 (24±4)℃,平均相对湿度 55%,明暗交替 12 h/12 h。实验方案得到广西医科大学动物伦理委员会的许可 (202103020),并按 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

兔抗 GAP-43 抗体、小鼠抗 SYN 抗体 (Sigma 公司,批号:3510861、128097);抗 MAP-2 抗体 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号,39317041205);山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗 (Elabscience 公司,批号:N2IJ8QLTCV、FZSPC3WQFI);GAP-43、SYN 和  $\beta$ -actin 引物 (武汉塞维尔生物科技有限公司);Alexa Fluor 594 偶联驴抗兔抗体、Alexa Fluor 488 偶联山羊抗兔抗体、Alexa Fluor 488 偶联山羊抗小鼠抗体 (invitrogen 公司,批号:2313074、2284595、2379467);Alexa Fluor 594 偶联山羊抗小鼠抗体 (武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:157633)。针灸针 (苏州市华佗医疗用品有限公司,规格:0.25 mm×1.3 mm、0.25 mm×2.5 mm);电子针疗仪 (中国苏州医疗用

品厂有限公司,型号:SDZ-II);垂直电泳系统(bio-rad 公司,货号:1645052);荧光定量 PCR 仪(bio-rad 公司,型号:CFX);荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验分组

将 80 只大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、电针(EA)3 d 组、大脑中动脉阻塞(MCAO)3 d 组、EA 14 d 组、MCAO 14 d 组,每组 16 只。整个实验分组如图 1 所示。

#### 1.3.2 造模方法

根据之前的研究,通过改良 Longa 线栓法诱导<sup>[11]</sup>建立大鼠 MCAO 模型。每只大鼠在手术前禁食不禁水 12 h,随后麻醉方式选用腹腔注射氯胺酮(60 mg/kg)和甲苯噻嗪(8 mg/kg);使用线栓阻塞右侧大脑中动脉(MCA),固定线栓后逐层缝合切口。术后使用电烤灯照射大鼠,维持体温在 35~37℃之间。对于 Sham 组,仅切开颈前皮肤,随后缝合切口。在大鼠手术苏醒后 24 h 内,参考改进 Bederson 4 分 5 级法<sup>[12]</sup>:0 分,无神经功能缺损症状;1 分,左侧肢体疼痛刺激后收缩现象消失,轻度神经功能缺损;2 分,向左倾倒或转圈,中度神经功能缺损;3 分,向病灶对侧跌倒,提尾时左上肢屈曲抱胸,不能向前伸直,重度神经功能缺损;4 分,不能自行行走、意识水平下降。选择 Bederson 评分为 1~3 分的大鼠入组,剔除评分为 0 分、4 分的 SD 大鼠。

#### 1.3.3 干预方法

在 MCAO 术后 24 h 行 EA 治疗,使用异氟烷气

体麻醉大鼠,随后将大鼠固定于鼠架上,使用电子针疗仪刺激大鼠双侧肢体的足三里(ST36)和内关(PC6)穴,电流强度为 1~2 mA,疏密波频率为 2/10 Hz,每天 20 min。Sham 组、MCAO 组的大鼠仅被麻醉后固定,不进行 EA 治疗。

#### 1.3.4 样本采集

MCAO 组和 EA 组分别在 3 d 和 14 d 处死大鼠,Sham 组在 14 d 时处死取材。使用 1%戊巴比妥钠(0.35 mL/100 g)过量麻醉处死大鼠,随后按随机数字表法抽取大鼠:11 只大鼠用 0.01 mol/L PBS 从心尖处灌注,见右心房流出清亮液体后,立即开颅取梗死对侧大脑皮层,并置于-80℃冰箱保存,6 只用于 Western blot 检测,5 只用于实时荧光定量 PCR 检测;5 只大鼠用 0.01 mol/L PBS 行心脏灌注,见流出液体未见明显血液,随后用 4%多聚甲醛灌注 400 mL,迅速断头后取梗死对侧大脑皮层,浸泡于 4%多聚甲醛中 12 h 以上,蔗糖梯度脱水后常规 OCT 包埋,每片切片厚度为 10 μm,置于 4%冰箱中保存,用于免疫荧光法检测。

#### 1.3.5 观察指标及检测方法

##### (1)平衡木试验

平衡木测试,也称为行走测试,大鼠被训练在一根长 1750 mm、宽 19 mm 的木质横梁上行走,横梁高出地面 1 m,用于评估精细运动的协调。在 MCAO 诱导后,根据以下评分系统<sup>[13]</sup>评估木梁行走的表现:0 分,稳定平衡姿势并通过横梁;1 分,紧抓平衡木边缘后通过横梁;2 分,紧抱平衡木,一肢体从平衡木垂落,随后通过横梁;3 分,紧抱平衡木,二肢体从平衡木垂落或在平衡木上旋转(>60 s);

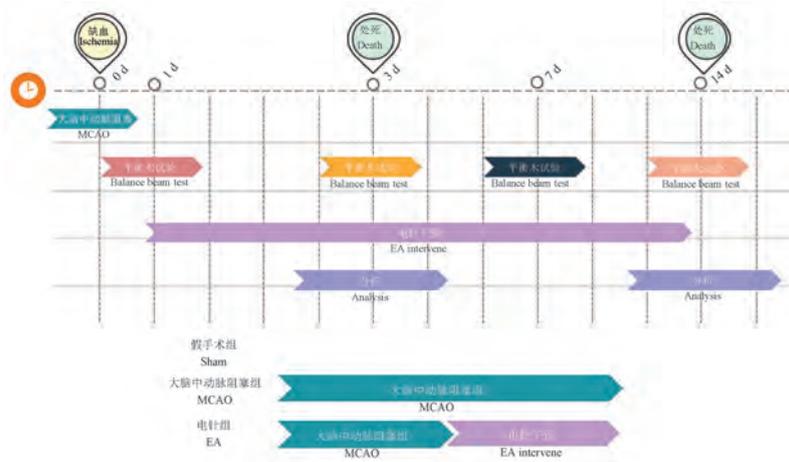


图 1 实验分组和干预方案

Figure 1 Experimental grouping and intervention protocol

4 分,试图在平衡木上平衡但跌落(>40 s);5 分,试图在平衡木上平衡但跌落(>20 s);6 分,跌落,未尝试在平衡木上平衡(<20 s)。每只老鼠的行为在每个时间点被评估,并记录得分。

## (2) Western blot 法

蛋白质印迹检测突触可塑性相关蛋白。从 -80℃ 冰箱取出脑组织样本,将脑组织切成合适大小后与蛋白裂解液混匀,并研磨成匀浆状,随后放置于 4℃ 低温离心机中 12 000 r/min, 30 min, 收集蛋白上清液;各组的蛋白浓度使用 BCA 法进行检测,然后将等量的蛋白质上样至 10% 凝胶中进行电泳、转膜,5% BSA 溶液中室温封闭 1 h, 4℃ 冰箱中孵育一抗过夜(12~14 h),一抗为 GAP-43(1:500), SYN(1:500), GADPH(1:1000),  $\beta$ -actin(1:1000), 隔日取出条带浸泡于 TBST 中漂洗 3 次,加入相对应的二抗:山羊抗兔(1:2000)、山羊抗小鼠(1:5000)二抗,在 37℃ 下孵育 1 h,使用化学发光法检测条带,通过 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值,GAP-43 蛋白以 GADPH 为内参,SYN 以  $\beta$ -actin 为内参,计算相对表达量。

## (3) 实时荧光定量 PCR

取出 1.3.4 中脑组织,按试剂盒说明书步骤提取总 RNA,随后使用分光光度计测定浓度,将各组 RNA 使用试剂盒反转录为 cDNA,随后设置 PCR 扩增程序。热循环条件为:95℃ 预变性 30 s;95℃ 15 s, 60℃ 30 s 循环 40 次。根据以上测得 Ct 值后,再以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算每组样品中 mRNA 相对表达量。引物序列详见表 1。

## (4) 免疫荧光法

从 4% 冰箱中取出切片,将切片在 85℃ 柠檬酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH=6.0)中预热 5 min,以进行抗原修复。然后用 5% 的牛血清白蛋白(BSA)在室温下封闭 1 h。将切片与一抗在 4℃ 下孵育过夜:兔抗 GAP-43 和小鼠抗 MAP-2 的混合物(1:400);以及小鼠抗 SYN 和兔抗 MAP-2 的混合物(1:400)。第二天取出切片,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。然

后与相对应的二抗在室温下孵育 1 h; Alexa Fluor 594 结合的驴抗兔 IgG(1:500)和 Alexa Fluor 488 结合的山羊抗兔 IgG(1:500)的混合物;以及 Alexa Fluor 594 结合的驴抗小鼠 IgG(1:500)和 Alexa Fluor 488 结合的山羊抗小鼠 IgG(1:500)的混合物。阴性对照用 0.01M PBS 孵化以替代一抗。然后用 40,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)在室温下孵育 15 min,封片后使用荧光显微镜检测共定位平均光密度,每张切片采集三个视野,并取平均值。

## 1.4 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 23.0 软件进行处理,计量数据用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。多组间的差异比较通过单因素方差分析(ANOVA)进行,然后组间多重比较采用 LSD-*t* 法检验,若不满足正态分布,采用 Tamhane 的多重比较检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠平衡木试验评分的比较

与 Sham 组相比,MCAO 术后各时间点平衡木试验评分均显著升高( $P<0.05$ ),MCAO 模型制备成功;MCAO 组和 EA 组在术后 1 d、3 d 和 7 d 时平衡木试验评分差异无统计学意义,但术后 14 d 时,EA 组平衡木试验评分较 MCAO 组显著降低( $P<0.05$ ),见图 2A、2B。

### 2.2 神经可塑性相关蛋白 GAP-43 和 SYN 的表达

如图 3A、3C 所示,与 MCAO 14 d 组相比,EA 14 d 组的 GAP-43 蛋白表达水平显著增加( $P<0.05$ ),其余各组未见明显差异。如图 3B、3D 所示,EA 14 d 组的 SYN 蛋白表达水平显著高于 MCAO 14 d 组( $P<0.05$ ),其余各组未见明显差异。

### 2.3 GAP-43 和 SYN mRNA 的表达

如图 4A 所示,与 Sham 组相比,MCAO 3 d 组( $P<0.05$ )和 MCAO 14 d 组( $P<0.05$ )的 GAP-43 蛋白表达均显著降低;EA 组的 GAP-43 蛋白表达在 3 d ( $P<0.05$ )和 14 d ( $P<0.001$ )时均显著高于 MCAO 组。如图 4B 所示,与 Sham 组相比,MCAO 3 d 组( $P<0.001$ )和 14 d 组( $P<0.001$ )的 SYN 蛋白表达均显著降低,与 MCAO 组相比,EA 3 d 组的 SYN 蛋白表达显著高于 MCAO 3 d 组( $P<0.01$ ),EA 14 d 组的 SYN 蛋白表达显著高于 MCAO 14 d 组( $P<0.001$ )。

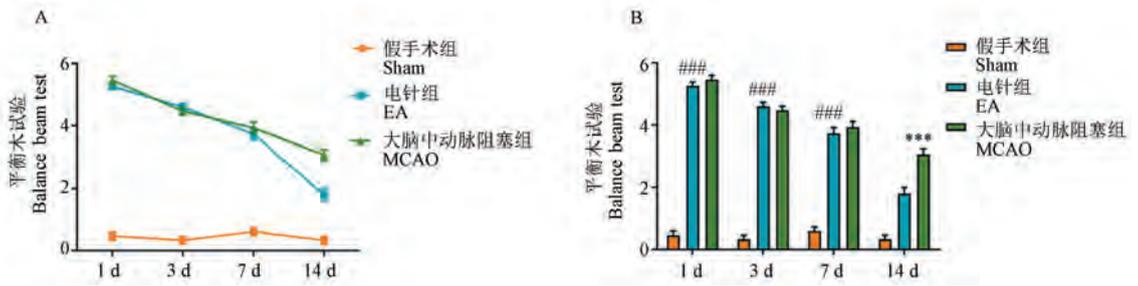
### 2.4 GAP-43 和 SYN 蛋白与轴突发芽的关系

如图 5 所示,EA 14 d 组的 GAP-43/MAP-2 共定

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
GAP-43	F:ATGCTGTGCTGTATGAGAAGAACC R:CATCAGCAACGGGAGCATC
SYN	F:GGATGGGCAAGGTCAAGGTA R:TCTGGACACGCACATCGTATTT
$\beta$ -actin	F:TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG R:GTTGGCATAGAGTCTTTACGG

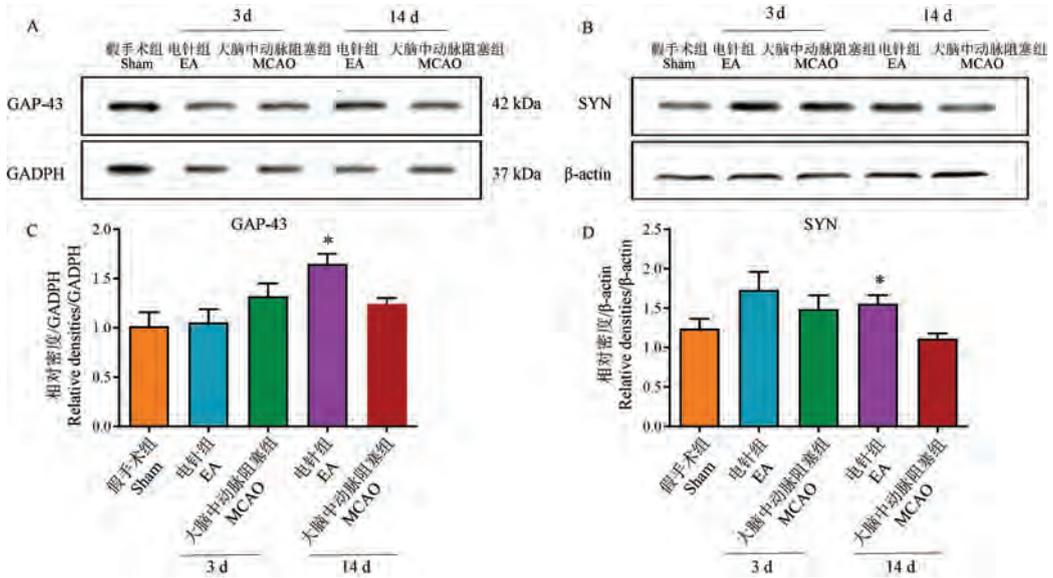


注:与 Sham 组比较,### $P < 0.001$ ;与 MCAO 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 2 脑缺血损伤后各组不同时间点平衡木试验评分比较( $\bar{x} \pm s, n = 16$ )

Note. Compared with Sham group,### $P < 0.001$ . Compared with MCAO group,\*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 2 Comparison of balance beam test scores between groups at different time points after cerebral ischemic injury

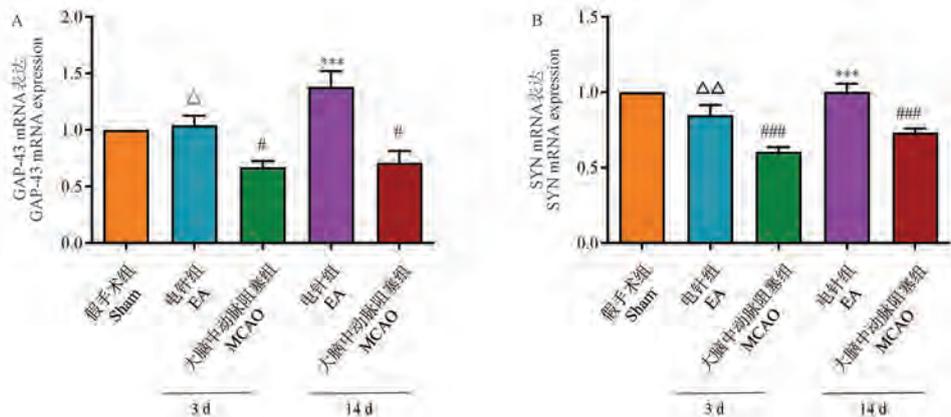


注:与 MCAO 14 d 组比较,\* $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠梗死对侧皮层神经可塑性蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. Compared with MCAO 14 d group,\* $P < 0.05$ .

Figure 3 Comparison of neuroplasticity-related protein expression in the contralateral cortical layers of infarcts in various groups of rats

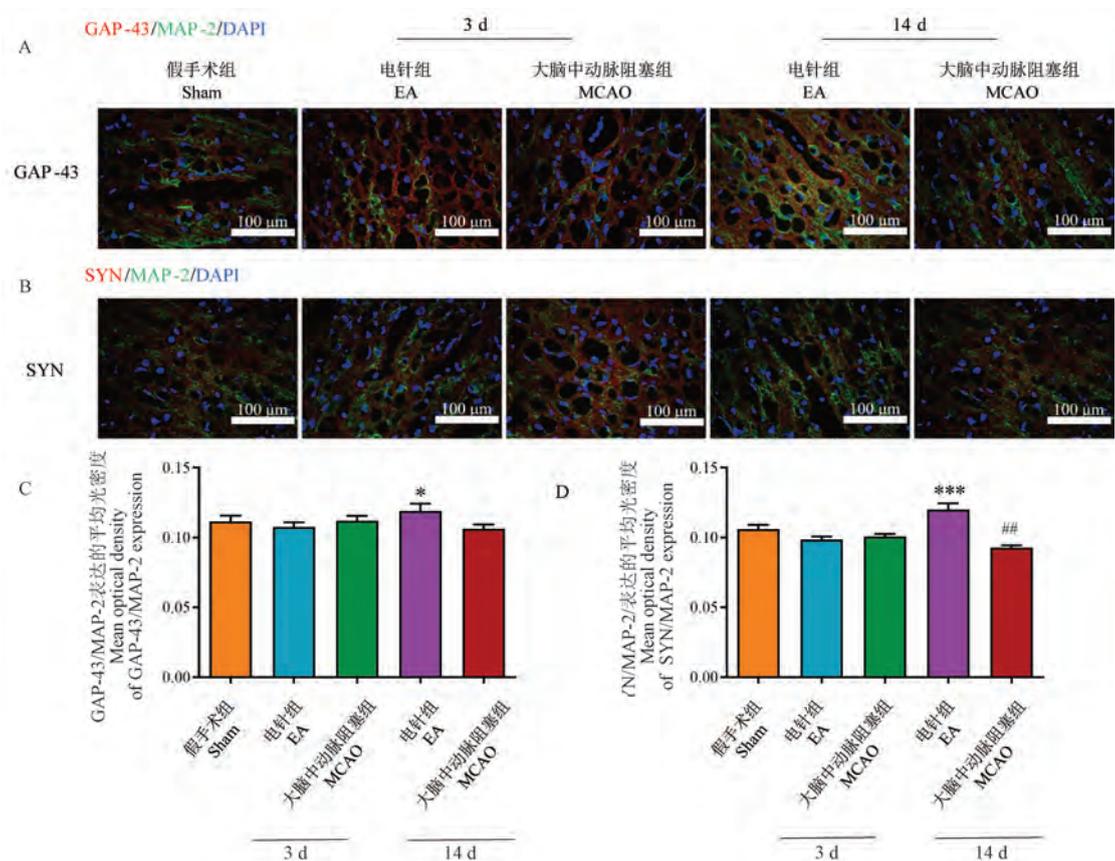


注:与 Sham 组比较,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.001$ ;与 MCAO 3 d 组比较, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与 MCAO 14 d 组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 各组大鼠 GAP-43 和 SYN mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Note. Compared with Sham group,# $P < 0.05$ ,### $P < 0.001$ . Compared with MCAO 3 d group, $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ . Compared with MCAO 14 d group,\*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 4 Comparison of GAP-43 and SYN mRNA expression in various groups of rats



注:与 Sham 组比较, ##  $P < 0.01$ ; 与 MCAO 14 d 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 5 各组大鼠 GAP-43/MAP-2 和 SYN/MAP-2 共定位平均光密度比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Note. Compared with Sham group, ##  $P < 0.01$ . Compared with MCAO 14 d group, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 5 Comparison of mean optical density of GAP-43/MAP-2 and SYN/MAP-2 co-localization in various groups of rats

位平均光密度显著高于 MCAO 14 d 组 ( $P < 0.05$ )。与 Sham 组相比, MCAO 14 d 组的 SYN/MAP 共定位平均光密度显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 EA 干预逆转了这种变化, EA 14 d 组的 SYN/MAP 共定位平均光密度显著高于 MCAO 14 d 组 ( $P < 0.001$ )。

### 3 讨论

缺血性卒中开始于大脑某一个区域的急性缺血, 进而影响所有细胞因子, 如血管(内皮细胞、周细胞)、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞, 并诱导发生不同程度的损伤反应<sup>[14]</sup>。在缺血性脑卒中治疗中, 快速恢复脑血流是治疗的首要目标和前提。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)是美国食品和药物管理局批准的唯一治疗急性缺血性脑卒中的药物, 但由于 t-PA 治疗窗口狭窄, 仅能在发病后 4.5 h 内使用, 且 t-PA 可能导致卒中后再灌注损伤<sup>[15]</sup>。因此, 寻求改善缺血性卒中的治疗方法已成为人们关注的焦点。

中医认为缺血性脑卒中属于“中风”“眩晕”的范畴, 现代中医认为, 由于“情志失调、饮食失节、劳逸失度”等原因, 导致风、火、痰、毒等致瘀因素侵犯脑室, 阻滞血络或气血虚损不能上荣脑窍而导致中风<sup>[16]</sup>。EA 是传统针灸和现代科技结合起来的一种治疗方法, 它具有操作简便、适用范围广、无明显副作用等优点。多项研究表明, EA 能明显减轻缺血性脑卒中患者的炎症水肿、继发性疼痛, 增加脑血流和改善日常生活能力, 并与其他康复治疗相配合可取得较好的疗效<sup>[17]</sup>。足三里穴归足阳明胃经, 为下合穴、胃经合穴, 脾胃为气血生化之源、气机升降之枢纽, 胃经为多气多血之经, 该穴具有调和气血及强健脾胃的作用, 临床上常用于治疗包含现代脑梗死概念下的中风、痿证、痹证、厥证等疾病<sup>[18]</sup>; 内关穴为八脉交会穴、手厥阴心包经之络穴, 络手少阳三焦经, 故刺之可疏通两经经气, 通调三焦之气, 调理气血, 疏布津液, 宁心安神, 理气止痛<sup>[19]</sup>。《针灸甲乙经》言:“人失智, 内关主之”。两个穴位一阴

一阳,一升一降,为调节气机、醒神开窍之要穴。本研究特选用“足三里”与“内关”穴结合,观察 EA 对缺血性脑卒中后的神经保护作用。

实验结果显示, MCAO 模型大鼠经电针刺激足三里穴后可显著改善神经功能障碍,如提高瘫痪肢体运动功能<sup>[20]</sup>,以及在大脑内的神经恢复上表现出了明显的效果,如促进神经再生、激活神经营养因子释放等<sup>[21]</sup>;在临床治疗上,电针治疗中风后肢体痉挛<sup>[22]</sup>和弛缓性瘫痪<sup>[23]</sup>,有明显的改善作用。本研究采用平衡木试验对缺血性卒中大鼠运动功能进行评估,发现 EA 组与 MCAO 组在 1 d、3 d、7 d 时间点均无显著性差异,直至 EA 治疗 14 d 时,平衡木试验评分显著低于 MCAO 组,说明 EA 治疗的疗效能随着缺血性卒中病程的延长而逐渐提高,其中恢复期疗效最显著。此外,有研究发现,中风后的肢体痉挛及运动恢复可能与神经可塑性有关<sup>[24]</sup>。

众所周知,大脑运动皮层包含直接投射至脊髓的神经元,可刺激躯体运动神经元并控制相关肢体肌肉运动。以前的研究显示脑缺血后神经功能恢复与神经可塑性有关,包括轴突的萌发和重塑、轴突生长、突触蛋白增加以及皮质脊髓束侧支形成<sup>[25]</sup>。对 MCAO 大鼠运动功能恢复的研究表明,运动功能的改善归因于神经突触的可塑性,突触的增加对运动功能的恢复起着至关重要的作用<sup>[26]</sup>。GAP-43、SYN 在缺血性卒中后梗死对侧皮质的表达与突触、突触传递及神经可塑性激活有关<sup>[27]</sup>。GAP-43 是神经营养素依赖性膜结合磷酸化蛋白,广泛分布于脑、小脑、海马、脊髓、背根神经节、自主神经系统以及中枢神经系统损伤后可塑性区域的轴突。研究表明,GAP-43 的浓度升高可能与神经轴突可塑性有关<sup>[7]</sup>。HDAC 抑制剂促进组蛋白乙酰化,诱导 GAP-43 表达增加,梗死区轴突再生增加<sup>[28]</sup>。SYN 是突触小泡内的蛋白质,它能诱导突触小泡激活,并在胞吐过程中形成融合孔。SYN 的分布及密度可间接反映突触数量及传递效率,以及缺血性脑损伤后神经可塑性的激活<sup>[8]</sup>。在本研究中,与 Sham 组相比, MCAO 组的 GAP-43 和 SYN mRNA 表达在 3 d 和 14 d 时均显著下降,但 EA 干预可逆转这种改变,与 MCAO 相比, EA 组的 GAP-43 和 SYN mRNA 表达在 3 d 和 14 d 时均显著增加,同时, EA 14 d 组的 GAP-43 和 SYN 蛋白的表达显著高于 MCAO 14 d 组。提示 EA 治疗可通过促进突触可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的表达改善缺血性卒中的神经功能

障碍,为后续的神经再生创造良好的环境。

神经可塑性是指神经系统因环境变化而发生结构和功能改变的能力,如脑缺血损伤后突触重组和轴突萌发等,这与神经功能恢复密切相关<sup>[5]</sup>。轴突再生在缺血性卒中后神经元再生过程中起着重要作用,如萌芽、生长、延伸、再联系等<sup>[29]</sup>。缺血性卒中后轴突萌发部位及其在神经功能恢复中的作用可能与梗死灶的大小有关,在中小型梗死中,在梗死周围皮质中,从运动区到躯体感觉区、运动前区、前额叶区和关联区可见新生神经细胞数量显著增加<sup>[30]</sup>;在较大的梗死中,梗死侧大脑皮质有大量神经细胞缺失,而梗死对侧的皮质出现轴突萌发<sup>[31]</sup>。研究还显示,大脑健侧皮质的神经元可以把轴突延伸至受损区域,从而有助于恢复运动功能<sup>[32]</sup>。在 MCAO 模型大鼠中,健侧前肢对患侧前肢有代偿性作用,并发现梗死对侧同部位的大脑皮质出现大量轴突萌芽、树突生长及突触增殖<sup>[33]</sup>。MAP-2 选择性地集中在神经元和树突中,在维持细胞分化、轴突运输以及神经结构和功能可塑性方面发挥着关键作用<sup>[9]</sup>。研究表明,缺血性脑损伤后,氨基胍可通过提高 MAP-2 的表达促进神经元树突和轴突发芽<sup>[34]</sup>。在本研究中,通过免疫荧光分析发现, EA 在干预 14 d 后, GAP-43/MAP-2 和 SYN/MAP-2 的共定位平均光密度均显著高于 MCAO 14 d 组,提示 GAP-43 和 SYN 蛋白可能参与了损伤后代偿性轴突发芽反应。

综上所述, EA 刺激“足三里”和“内关穴”对脑缺血性损伤大鼠神经功能障碍有明显的改善作用,这与我们先前的研究相稳合<sup>[35]</sup>,通过进一步研究发现其作用机制可能是通过上调神经可塑性因子 GAP-43 和 SYN 的表达促进轴突萌芽,激活损伤后代偿性神经重塑。

#### 参考文献:

- [1] Rajsic S, Gothe H, Borba HH, et al. Economic burden of stroke: a systematic review on post-stroke care [J]. *Eur J Health Econ*, 2019, 20(1): 107-134.
- [2] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 141(9): e139-e596.
- [3] Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1053: 137-147.
- [4] Xie Q, Cheng J, Pan G, et al. Treadmill exercise ameliorates focal cerebral ischemia/reperfusion-induced neurological deficit by promoting dendritic modification and synaptic plasticity via

- upregulating caveolin-1/VEGF signaling pathways [J]. *Exp Neurol*, 2019, 313: 60-78.
- [ 5 ] Cramer SC. Treatments to promote neural repair after stroke [J]. *J Stroke*, 2018, 20(1): 57-70.
- [ 6 ] Sadigh-Eteghad S, Geranmayeh MH, Majidi A, et al. Intranasal cerebrolysin improves cognitive function and structural synaptic plasticity in photothrombotic mouse model of medial prefrontal cortex ischemia [J]. *Neuropeptides*, 2018, 71: 61-69.
- [ 7 ] Williams KR, McAninch DS, Stefanovic S, et al. hnRNP-Q1 represses nascent axon growth in cortical neurons by inhibiting Gap-43 mRNA translation [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(3): 518-534.
- [ 8 ] Hami J, Vafaei-Nezhad S, Sadeghi A, et al. Synaptogenesis in the cerebellum of offspring born to diabetic mothers [J]. *J Pediatr Neurosci*, 2017, 12(3): 215-221.
- [ 9 ] Zhou Q, Zhang Q, Zhao X, et al. Cortical electrical stimulation alone enhances functional recovery and dendritic structures after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1311: 148-157.
- [ 10 ] Yang Y, Eisner I, Chen S, et al. Neuroplasticity changes on human motor cortex induced by acupuncture therapy: a preliminary study [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017: 4716792.
- [ 11 ] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area [J]. *Nosotchu*, 1986, 8: 1-7.
- [ 12 ] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [ 13 ] Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury [J]. *Science*, 1982, 217(4562): 855-857.
- [ 14 ] Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 144: 103-120.
- [ 15 ] Vidale S, Agostoni E. Thrombolysis in acute ischaemic stroke [J]. *Brain*, 2014, 137(Pt 6): e281.
- [ 16 ] 郭绮华, 崔苑真, 李梦真, 等. 从“虚-瘀-毒”探讨出血中风的核心病机 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(2): 242-246.
- [ 17 ] 张游, 尹亚龙, 吴新贵. 基于电针疗法对脑梗死后神经功能恢复的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2022, 49(1): 79-86.
- [ 18 ] 葛云鹏, 嵇波, 苏杭, 等. 艾灸足三里穴的现代研究进展 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(22): 95-99.
- [ 19 ] 向丽莉, 黄伟, 张小蕾, 等. 探意内关 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3890-3892.
- [ 20 ] Xing Y, Yang SD, Wang MM, et al. Electroacupuncture alleviated neuronal apoptosis following ischemic stroke in rats via midkine and ERK/JNK/p38 signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(1): 26-36.
- [ 21 ] Shariffar S, Shuster JJ, Bishop MD. Adding electrical stimulation during standard rehabilitation after stroke to improve motor function. A systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Phys Rehabil Med*, 2018, 61(5): 339-344.
- [ 22 ] Cai Y, Zhang CS, Liu S, et al. Electroacupuncture for poststroke spasticity: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2017, 98(12): 2578-2589.
- [ 23 ] Lin YF, Liu XH, Cui ZY, et al. Weakened effective connectivity related to electroacupuncture in stroke patients with prolonged flaccid paralysis: an EEG pilot study [J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 6641506.
- [ 24 ] Li S. Spasticity, motor recovery, and neural plasticity after stroke [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 120.
- [ 25 ] Liu Z, Chopp M, Ding X, et al. Axonal remodeling of the corticospinal tract in the spinal cord contributes to voluntary motor recovery after stroke in adult mice [J]. *Stroke*, 2013, 44(7): 1951-1956.
- [ 26 ] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12): 861-872.
- [ 27 ] Huang X, Wang X, Yang M, et al. Spontaneous neuronal plasticity in the contralateral motor cortex and corticospinal tract after focal cortical infarction in hypertensive rats [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(12): 105235.
- [ 28 ] Tedeschi A, Nguyen T, Puttagunta R, et al. A p53-CBP/p300 transcription module is required for GAP-43 expression, axon outgrowth, and regeneration [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(4): 543-554.
- [ 29 ] Wiersma AM, Fouad K, Winship IR. Enhancing spinal plasticity amplifies the benefits of rehabilitative training and improves recovery from stroke [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(45): 10983-10997.
- [ 30 ] Clarkson AN, López-Valdés HE, Overman JJ, et al. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(5): 716-723.
- [ 31 ] Wahl AS, Omlor W, Rubio JC, et al. Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke [J]. *Science*, 2014, 344(6189): 1250-1255.
- [ 32 ] Lee JK, Kim JE, Sivula M, et al. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(27): 6209-6217.
- [ 33 ] Jones TA. Multiple synapse formation in the motor cortex opposite unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 414(1): 57-66.
- [ 34 ] Sun M, Zhao Y, Gu Y, et al. Neuroprotective actions of aminoguanidine involve reduced the activation of calpain and caspase-3 in a rat model of stroke [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(4): 634-641.
- [ 35 ] 张游, 靳子言, 尹亚龙, 等. 电针足三里、内关穴抑制 mTOR 信号通路缓解大鼠脑缺血损伤作用的研究 [J]. *天津医药*, 2022, 50(11): 1146-1152.

王世界,杨晶,马贺,等. 基于线粒体质量控制系统观察六味地黄丸对老龄小鼠的神经保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 24-34.

Wang SJ, Yang J, Ma H, et al. Neuroprotective effect of liuwe dihuangwan on aged mice based on the mitochondrial quality control system [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 24-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.004

# 基于线粒体质量控制系统观察六味地黄丸对老龄小鼠的神经保护作用

王世界<sup>1</sup>, 杨晶<sup>1</sup>, 马贺<sup>1</sup>, 王璐瑶<sup>1</sup>, 张紫娟<sup>2</sup>, 苏运芳<sup>1</sup>, 张振强<sup>1\*</sup>

(1.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

**【摘要】** 目的 观察六味地黄丸对老龄小鼠海马区线粒体质量控制系统的影响及神经保护机制。方法 将50只20月龄C57BL/6J老龄小鼠按照每组10只进行随机分组,包括模型组,六味地黄丸低、中、高剂量组,多奈哌齐组,另选10只3月龄C57BL/6J野生小鼠为正常组。各组给药60d后,进行行为学实验,免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )的表达,透射电镜观察线粒体的健康程度及自噬小体的数量,Western blot检测线粒体质量控制系统相关蛋白。结果 高剂量组与模型组比较,行为学实验结果显示六味地黄丸可以提高小鼠的学习记忆能力,增强运动能力,减轻焦虑;免疫荧光实验显示GFAP、TNF- $\alpha$ 表达下降,电镜观察发现正常线粒体数量增多;Western blot实验结果显示PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、帕金蛋白(PARKIN)、自噬相关3号染色体基因(autophagy related 3, ATG3)、自噬相关7号染色体基因(autophagy related 7, ATG7)、微管相关蛋白1轻链3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\beta$ , LC3 $\beta$ )、线粒体融合蛋白2(mitochondrial fusion protein 2, MFN2)、线粒体内源发动蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)、线粒体转录因子A(recombinant transcription factor A, mitochondrial, TFAM)、 $\gamma$ 共激活因子-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )蛋白的表达上升,泛素结合蛋白1(sequestosome protein 1, P62)、线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, DRP1)、TNF- $\alpha$ 蛋白的表达下降。结论 六味地黄丸可以提高小鼠的认知学习能力,减轻小鼠海马区的神经炎症,改善线粒体质量控制系统。

**【关键词】** 六味地黄丸; 脑老化; 线粒体质量控制系统; 神经炎症

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0024-11

## Neuroprotective effect of liuwe dihuangwan on aged mice based on the mitochondrial quality control system

WANG Shijie<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>, MA He<sup>1</sup>, WANG Luyao<sup>1</sup>, ZHANG Zijuan<sup>2</sup>, SU Yunfang<sup>1</sup>, ZHANG Zhenqiang<sup>1\*</sup>

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. School of Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**【Abstract】** **Objective** To observe the effect of liuwe dihuangwan on the mitochondrial quality control system in the hippocampus of aged mice and its neuroprotective mechanism. **Methods** Fifty 20-month-old C57BL/6J mice were randomly divided into five groups with 10 mice in each group, including a model group liuwe dihuangwan low, medium,

**【基金项目】** 河南省高校科技创新团队支持计划资助(21HIRTSTHN026); 河南省科技攻关项目(212102310314, 222102310280)。

**【作者简介】** 王世界(1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: m19503851263@163.com

**【通信作者】** 张振强(1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: zzqkyc@hactcm.edu.cn

and high dose groups, donepezil group. Ten 3-month-old C57BL/6J mice were selected as the normal group. After 60 days of treatment, behavioral tests were carried out. Immunofluorescence was used to assess TNF- $\alpha$  and GFAP expression. Transmission electron microscopy was used to observe mitochondria and the number of autophagosomes. Proteins of the mitochondrial quality control system were assessed by Western blot. **Results** Compared with the model group, behavioral tests showed that liuwe dihuangwan improved learning and memory abilities, enhanced the exercise ability, and reduced anxiety. Immunofluorescence showed decreases in TNF- $\alpha$  and GFAP expression. Transmission electron microscopy showed that the number of normal mitochondria was increased. PINK1, PARKIN, ATG3, ATG7, LC3B, MFN2, OPA1, TFAM, and PGC-1 $\alpha$  protein expression was upregulated in the high-dose group, while P62, DRP1, and TNF- $\alpha$  protein expression was downregulated. **Conclusions** Liuwe dihuangwan improves the cognitive learning ability of mice, reduces neuroinflammation in the hippocampus, and improves the quality control system of mitochondria.

**[Keywords]** liuwe dihuangwan; brain aging; mitochondrial quality control system; neuroinflammation

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

在脑衰老的进程中,线粒体功能障碍是重要的特征之一<sup>[1]</sup>。线粒体质量控制系统是维持线粒体网络健康的重要机制,主要包括线粒体的融合分裂、线粒体自噬和线粒体生物发生等动态过程<sup>[2]</sup>。脑衰老过程中海马神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,线粒体质量控制系统难以维持平衡,导致能量生成减少,氧化应激水平上升<sup>[3]</sup>。线粒体损伤又会引起下游相关促炎因子的增加,引发机体内慢性炎症<sup>[4]</sup>。因此,改善线粒体质量控制系统、减轻神经炎症是抗脑老化的重要研究思路之一。

在脑衰老过程中,经常伴随着肾精的不足<sup>[5]</sup>。肾藏精,精生髓,髓能充脑以补益脑髓,故肾精的盛衰,直接影响着脑髓的盈亏<sup>[6]</sup>。因此,通过补益肾精,可以增强滋润、濡养人体各脏腑形体官窍,进而延缓脑衰老。六味地黄丸出自宋代钱乙的《小儿要证直诀》,由熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻和牡丹皮六味药组成,具有滋阴补肾、填精益髓的功效。本研究基于线粒体质量控制系统为靶点,模拟老龄化小鼠“肝脾肾亏虚”模型,探讨六味地黄丸改善学习记忆障碍和线粒体损伤作用机制,从而为六味地黄丸防治脑衰老提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

20 月龄雄性 C57BL/6J 自然衰老小鼠和 3 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2019-0004]。20 月龄,雄性, C57BL/6J 自然衰老小鼠, SPF 级, 50 只, 体重(25 $\pm$ 3)g; 3 月龄, 雄性, C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 10 只, 体重(25 $\pm$ 3)g。小鼠饲养在河南中医药大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0004], 基本条件: 室温 22~26 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60%, 白天光照 12 h, 晚上关灯

12 h。饲料购自河南环宇禾康生物科技有限公司(GB 14924.3-2010), 饮水小鼠自由获取。所有实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准(DWLL201907311), 并按照实验动物的 3R 原则给予关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

六味地黄丸(规格每 8 丸相当于饮片 3 g, 国药准字 Z41022128, 批号 200137, 仲景宛西制药股份有限公司); 多奈哌齐(规格每片 5 mg, 国药准字 H20050978, 批号 1911068, 苏州卫材药业有限公司); PINK(ER1706-27)、PARKIN(ET1702-60)均购于杭州华安生物技术有限公司; TNF- $\alpha$ (ab6671)、TNF- $\alpha$ (ab1793)、ATG3(ab108251)、ATG7(ab133528)、P62(ab91526)、LC3B(ab48394)、MFN2(ab124773)、OPA1(ab42364)、TFAM(ab138351)、PGC-1 $\alpha$ (ab191838)、驴抗兔荧光二抗(ab150073)、驴抗小鼠荧光二抗(ab150107)均购于 abcam 公司; DRP1(D6C7)购于 Cell Signaling;  $\beta$ -actin(BM0627)、GFAP(BA0056)、Western blot 兔二抗(BM3894)、Western blot 鼠二抗(BA1050)均购于 BOSTER; DAPI(G1012-100ML)购于 Servicebio。

全自动酶标仪(美国 Thermo 公司, 型号: 1510); 全自动冷冻切片机(德国 Leica 公司, 型号: CM1950); 垂直电泳仪(上海天能科技有限公司, 型号: VE-180); 冷冻离心机(美国 Thermo 公司, 型号: Fresco21); 正置荧光显微镜(Carl Zeiss AG, 型号: Axioscope 5); 透射电镜(日本电子株式会社, 型号: JEM-1400); Morris 水迷宫(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63031); Y 迷宫(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63041); 旷场(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63006); 冷冻超薄切片机(德国 Leica 公司, 型号: EM UC7)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验分组及给药

将 50 只 20 月龄 C57BL/6J 自然衰老小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 即模型组(model), 低、中、高剂量六味地黄丸治疗组(low dose、medium dose、high dose); 正常组(control) 为 10 只 3 月龄小鼠多奈哌齐组(donepezil)。六味地黄丸药液按照浓度 0.68、1.36、2.72 g/(kg·d) 分别灌胃给低、中、高剂量治疗组, 多奈哌齐药液按照浓度 0.75 mg/(kg·d) 灌胃给药, 正常组和模型组等量蒸馏水灌胃给药, 每天 1 次, 持续 60 d (给药剂量按照人与动物体表面积换算成等效剂量)。

#### 1.3.2 行为学实验

所有小鼠均参与行为学实验。小鼠灌胃结束后, 开始 Morris 水迷宫实验。每只小鼠在每天固定时间接受训练, 实验者将小鼠面向池壁从象限的中点处放入水中, 每象限训练 1 次。水迷宫实验共有 6 d 时间, 水迷宫的前 5 d 为定位航行实验, 在固定的时间里, 将小鼠置于每一个象限的中点位置, 作为小鼠的落水点, 记录小鼠找到平台的时间。在 60 s 的时间内, 小鼠找到平台, 则停止计时, 时间记录为逃避潜伏期。超过 60 s, 则记为 60 s。第 6 天为空间探索实验, 去掉台子, 将台子对面象限作为小鼠的落水点, 实验系统记录 60 s 内小鼠穿过原来台子位置的次数及台子所在象限停留的时间。采用 Smart 3.0 软件进行小鼠在水迷宫中的定位和追踪。

Y 迷宫实验共做 1 d, 需保证外周环境安静, 无干扰。Y 迷宫是由 3 个大小相同的臂组成, 三个臂可标记为①、②、③, 放入小鼠时, 将小鼠放在 3 个臂的交汇处 (每次实验结束后, 都需用 75% 的酒精擦拭, 防止异味残留, 干扰实验)。小鼠在 Y 迷宫里所用时间为 5 min, 实验系统记录小鼠进臂顺序及进臂次数。根据小鼠的进臂次数及准确的进臂顺序, 计算出小鼠的自发交替率 (自发交替率 (%) = [(自发交替次数)/(总进臂次数-2)] × 100%)。

旷场实验共做 3 d, 每天 1 次。在每天的固定时间里, 依次将小鼠放在立体方格的中心区域, 开始追踪 (每次实验结束后, 都需用 75% 的酒精进行擦拭, 防止异味残留, 影响实验)。在外周环境安静, 无干扰的实验条件下, 小鼠在旷场里所用时间为 5 min, 实验系统记录小鼠的理毛次数、运动总距离、中心区域停留的时间。

#### 1.3.3 Western blot 实验

行为学实验结束后每组随机挑选 3 只小鼠断头

处理, 取新鲜海马组织, 加入裂解液, 在低温高速离心机里离心, 得到组织上清液, 测定上清液的浓度; 加入 5×buffer, 高温 10 min, 使组织蛋白变性; 配置凝胶, 加入计算好的样; 电泳、转膜, 使蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶里封闭 2 h; 一抗封闭过夜, TBST 清洗一抗多次, 二抗孵育 2 h, TBST 清洗二抗多次, 加入显影液, 使用显影仪对条带进行显影。使用 Image J 对条带进行分析, 评估条带的统计学意义。

#### 1.3.4 免疫荧光实验

从各组小鼠里每组随机挑选 4 只小鼠, 对小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉, 取小鼠全脑, 放到体积分数为 4% 甲醛固定液试管里; 将脑组织换到蔗糖溶液里, 直至脑组织沉入底部; 将脑组织, 加入包埋剂, 冷凝后, 进行切片处理; 取脑片进行清洗, 封闭液进行封闭; 一抗孵育过夜, PBS 清洗多次, 二抗孵育 1.5 h, PBS 清洗多次; 加入 DAPI, PBS 清洗多次; 取出脑片, 进行贴片, 加入淬灭剂封片, 避光风干处理; 显微镜拍片、观察。图片荧光强度分析用 Image J 软件。

#### 1.3.5 透射电镜观察小鼠海马区线粒体的形态结构的变化

从各组小鼠里每组随机挑选 3 只小鼠, 处死后迅速取海马组织, 置于体积分数为 1% 锇酸里固定 2 h, 组织酒精梯度脱水处理, 组织丙酮脱水处理, 环氧树脂对组织进行包埋, 再烘箱聚合, 干燥过夜, 利用超薄切片机对组织进行切片。每组随机抽取海马组织样本, 透射电镜下观察线粒体的健康程度及自噬小体的数量。30 000 倍数视野下每组随机选取 5~8 个视野, 计算正常线粒体与损毁线粒体的数量及自噬小体的数量。

### 1.4 统计学方法

本实验所获数据均采用 GraphPad Prism 9.0 统计学软件进行统计分析, 并以平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 进行表示, Morris 水迷宫实验的各组小鼠逃避潜伏期的比较, 采用双因素方差进行分析, 其余各组之间的比较采用单因素方差进行分析, 并以  $P < 0.05$  表示各组之间差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 六味地黄丸可以提高老龄小鼠学习记忆能力、提高运动能力、降低焦虑

#### 2.1.1 水迷宫实验

与正常组相比, 模型组在实验第 4、5 天小鼠逃

避潜伏期缩短 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 穿越目标的次鼠减少 ( $P < 0.01$ ), 在目标象限停留的时间减少 ( $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 高剂量组与模型组比较, 水迷宫实验的第 4、5 天小鼠逃避潜伏期缩短 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 穿越目标的次数增多 ( $P < 0.01$ ), 目标象限停留的时间延长 ( $P < 0.001$ ), 具有统计学意义; 多奈哌齐组与模型组比较, 水迷宫实验的第 4、5 天小鼠逃避潜伏期缩短 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 穿越目标的次数增多 ( $P < 0.05$ ), 目标象限停留的时间延长 ( $P < 0.01$ ), 具有统计学意义。表明六味地黄丸可以改善小鼠的空间学习记忆能力 (图 1)。

2.1.2 Y 迷宫实验

与正常组相比, 模型组的自发交替率下降 ( $P < 0.01$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 中剂量组、多奈哌齐组自发交替率增加 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 各给药组进臂总次数无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。表明六味地黄丸能够改善小鼠的空间工作记忆能力 (图 2)。

2.1.3 旷场实验

与模型组比较, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组理毛次数增多 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的移动总距离增加 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P <$

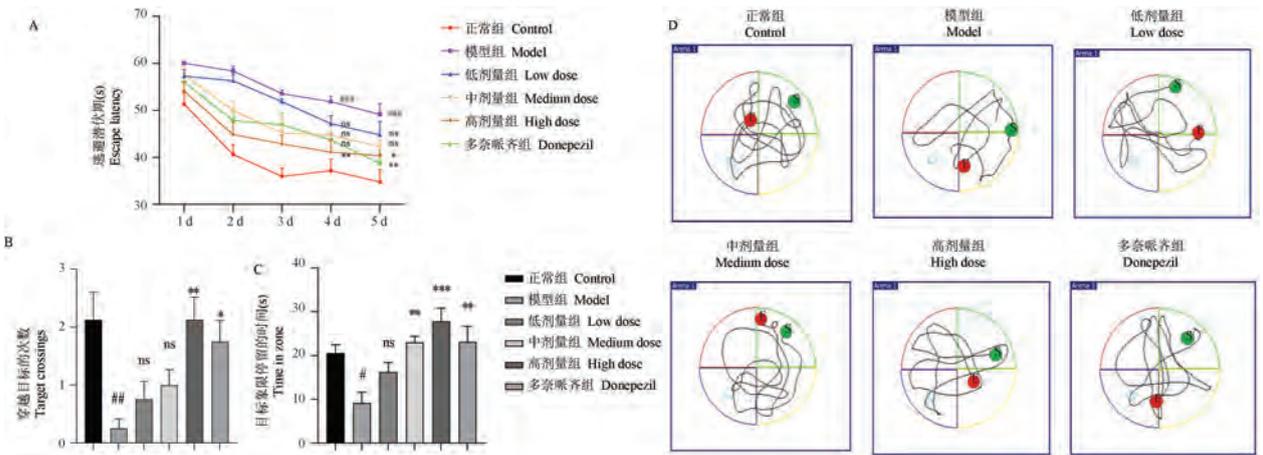
$0.001$ 、 $P < 0.001$ ), 具有统计学意义; 中、高剂量组、多奈哌齐组中心区域停留的时间延长 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ ), 具有统计学意义。表明六味地黄丸可以改善小鼠的运动能力和降低焦虑 (图 3)。

2.2 六味地黄丸降低老龄小鼠海马组织炎症因子的表达

免疫荧光结果显示, 与正常组相比, 模型组 GFAP、TNF- $\alpha$  平均荧光强度增加 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组与模型组比较 GFAP ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ) 的表达量均降低, 具有统计学意义; Western blot 结果显示, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组与模型组比较, TNF- $\alpha$  的表达量均降低 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ ), 具有统计学意义。结果表明六味地黄丸可以降低小鼠海马区炎症因子的表达 (图 4)。

2.3 六味地黄丸可以增加自噬小体的数量及提高线粒体自噬的能力

透射电子显微镜下观察各组自噬小体的数量, 结果发现, 与正常组相比, 模型组自噬小体数量较少 ( $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 高剂量组、多奈哌齐组的自噬小体的数量增加较多 ( $P <$

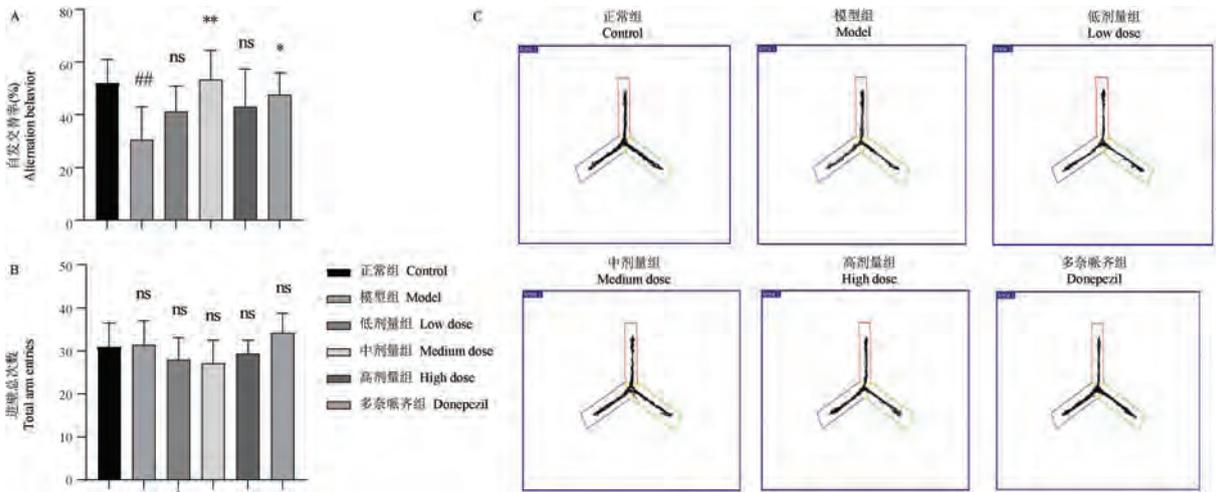


注: A: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠 MWM 的逃避潜伏期影响; B: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠穿越目标的次数影响; C: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠在目标象限停留的时间影响; D: 各组小鼠水迷宫轨迹图。与正常组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 六味地黄丸对小鼠学习记忆能力的影响 ( $n = 10$ )

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on the escape latency of MWM in mice of each group. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the times of crossing targets in mice of each group. C, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the time of mice staying in the target quadrant in each group. D, Water maze trajectories of mice in each group. Compared with control group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ . Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 1 Effect of liuwei dihuangwan on learning and memory ability of mice

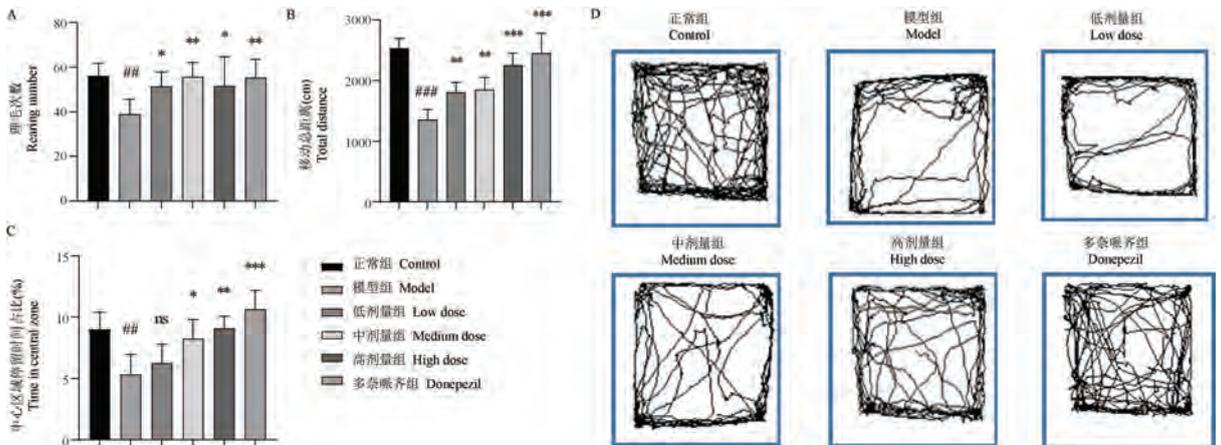


注:A:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠自发交替率的影响;B:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠进臂总次数的影响;C:各组小鼠的Y迷宫轨迹图。与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图2 六味地黄丸对小鼠空间工作记忆能力的影响 ( $n = 10$ )

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on spontaneous alternation rate in mice. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the total number of arm entries in mice. C, Y maze trajectory of each group of mice. Compared with control group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ . Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

Figure 2 Effects of liuwei dihuangwan on spatial working memory in mice



注:A:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠理毛次数的影响;B:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠运动总距离的影响;C:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠在中心区域停留时间的影响;D:各组小鼠的旷场轨迹图。与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

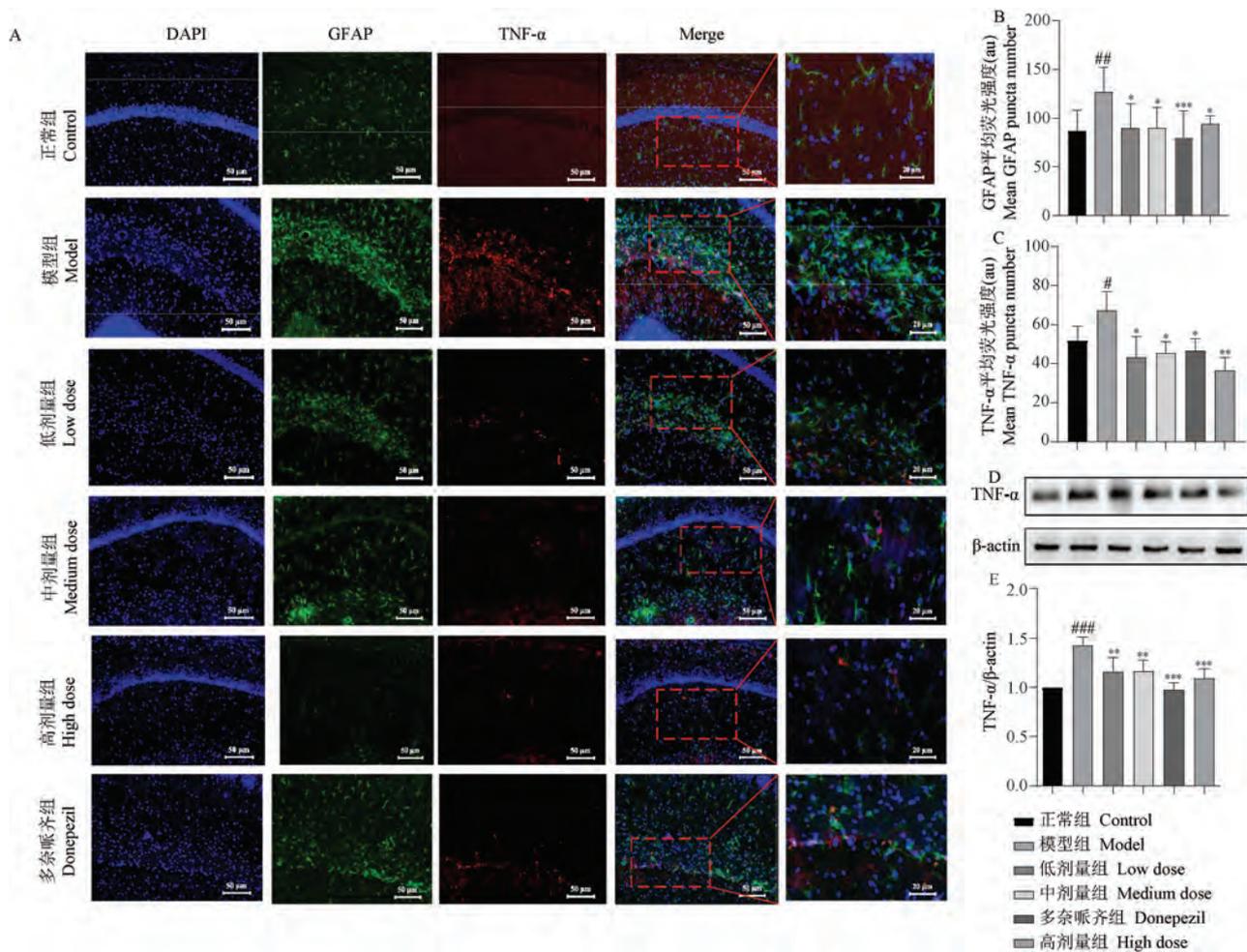
图3 六味地黄丸对小鼠运动能力及焦虑的影响 ( $n = 10$ )

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on the times of hair dressing in mice. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the total distance of exercise in mice. C, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the residence time in the central region of mice. D, Open field trajectory of mice in each group. Compared with control group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$ . Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

Figure 3 Effects of liuwei dihuangwan on exercise ability and anxiety in mice

0.05),具有统计学意义;Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组 PINK1、PARKIN、ATG3、ATG7、LC3B 表达下降 ( $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ ),P62 表达升高 ( $P < 0.05$ ),具有统

计学意义;与模型组相比,PINK1 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ),具有统计学意义;PARKIN 高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),具有统计学



注:A:GFAP 与 TNF-α 免疫荧光共定位表达,绿色荧光为 GFAP 阳性表达,红色荧光为 TNF-α 阳性表达,蓝色荧光为 DAPI 阳性表达;B:各组小鼠海马区 GFAP 的荧光强度;C:各组小鼠海马区 TNF-α 的荧光强度;D:各组小鼠海马区 TNF-α 蛋白表达情况;E:TNF-α/β-actin 相对蛋白表达量统计图。与正常组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 4** 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织炎症因子表达的影响 ( $n = 4$ )

Note. A, GFAP and TNF-α colocalization expression of immunofluorescence, green fluorescence is GFAP positive expression, red fluorescence is TNF-α positive expression, blue fluorescence was DAPI positive expression. B, Fluorescence intensity of GFAP in hippocampus of mice in each group. C, TNF-α in hippocampus of mice in each group fluorescence intensity. D, TNF-α in hippocampus of mice in each group protein expression. E, TNF-α/β-actin statistic diagram of relative protein expression. Compared with control group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ . Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 4** Effect of liuweidi Huangwan on the expression of inflammatory factors in hippocampus of aged mice

意义;ATG3 高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ), 具有统计学意义;ATG7 中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ), 具有统计学意义;P62 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ), 具有统计学意义;LC3B 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ), 具有统计学意义。结果表明六味地黄丸可以增加自噬小体的数量, 并且可以提高线粒体自噬 (图 5)。

## 2.4 六味地黄丸可以减轻老龄小鼠海马组织线粒体损伤、提高线粒体融合分裂能力

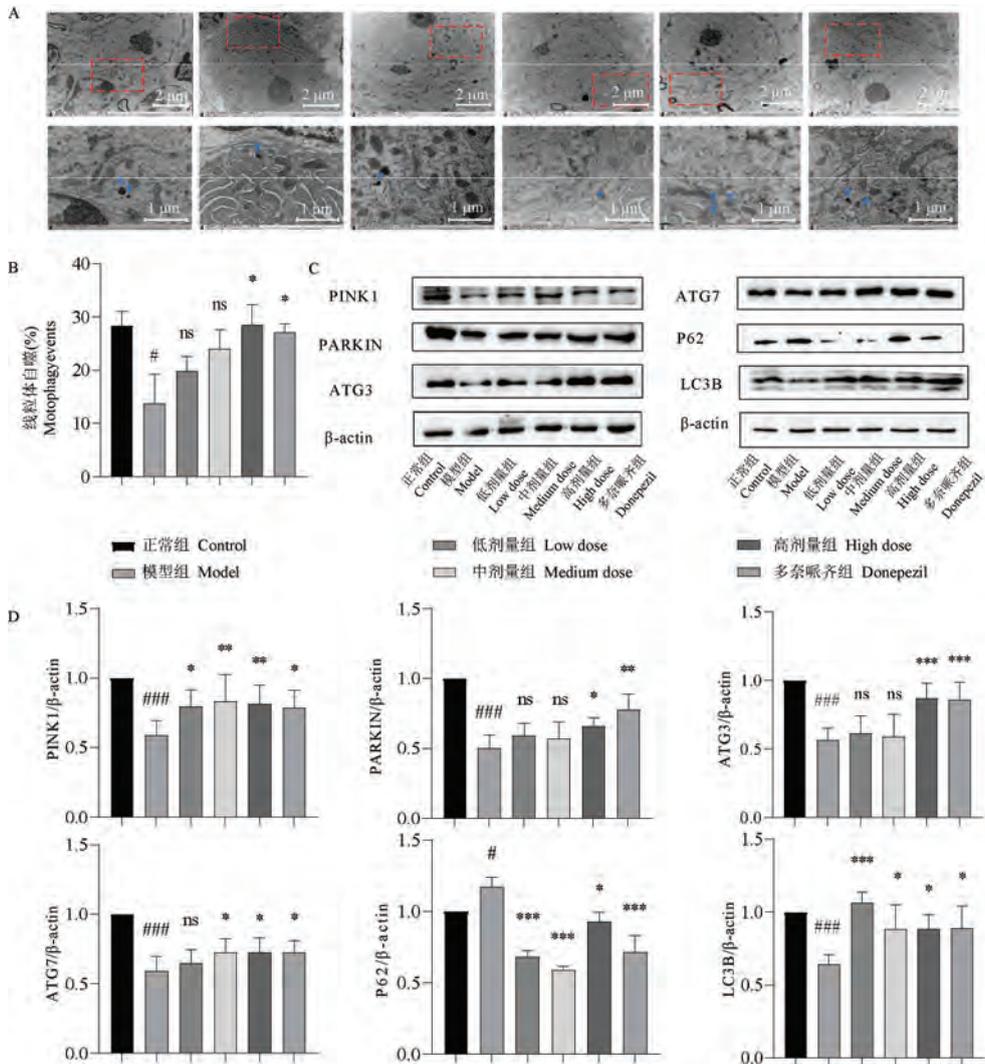
电镜下观察线粒体的损伤状况, 结果发现: 与正常组相比, 模型组受损伤的线粒体数量较多 ( $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组和多奈哌齐组的线粒体健康程度较好, 受损伤的线粒体少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 具有统计学意义; Western blot 检测线粒体融合分裂蛋白的表达, 实验结果显示, 与正常组相比, 模型组 MFN2、OPA1 表达下降 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ),

DRP1 表达升高 ( $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 MFN2 表达升高 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ ), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 OPA1 表达升高 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 DRP1 表达降低 ( $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ ), 具有统计学意义。结果表明六味

地黄丸可以减轻线粒体损伤, 显著提高线粒体的融合分裂能力(图 6)。

## 2.5 六味地黄丸可以提高老龄小鼠海马组织线粒体生物发生的能力

Western blot 检测结果如图 7 所示, 与正常组相比, 模型组 TFAM、PGC-1 $\alpha$  表达下降 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、高剂量组、多奈哌齐组的 TFAM 表达升高 ( $P < 0.01$ 、 $P <$



注: A:透射电子显微镜下各组小鼠海马组织中的自噬小体(蓝色箭头所指为自噬小体); B:自噬小体的量化统计; C:线粒体自噬相关蛋白的条带; D:线粒体自噬相关蛋白的统计分析。与正常组比较,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\#\# P < 0.001$ ; 与模型组比较,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ 。

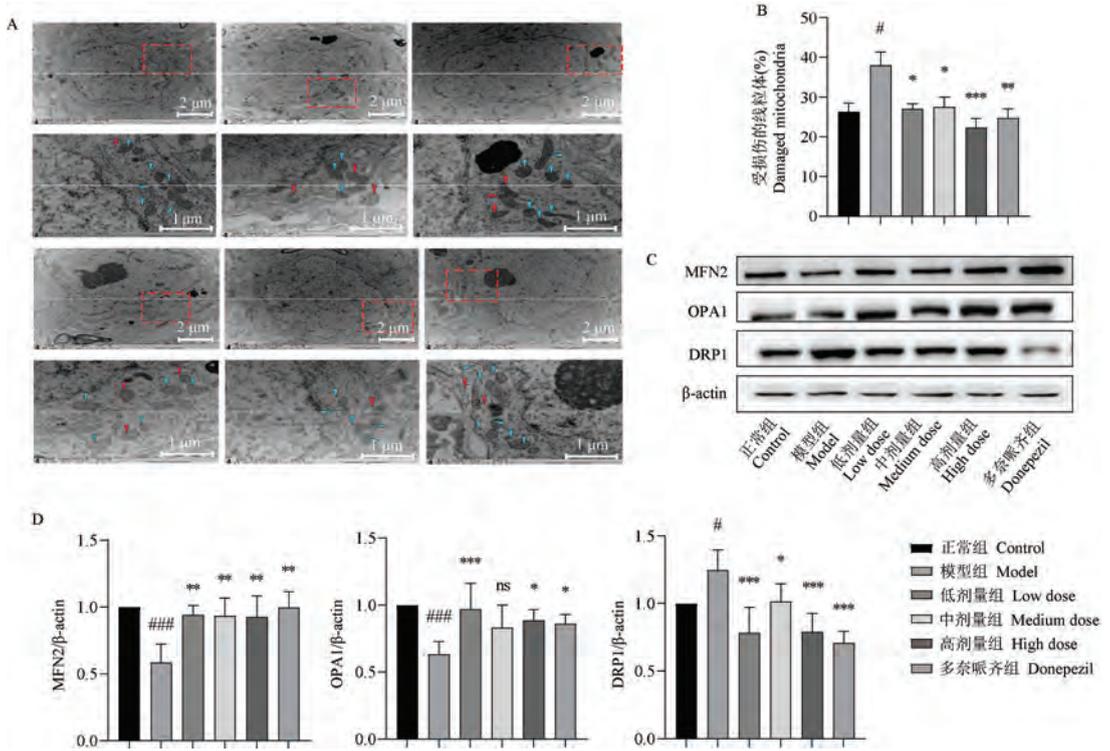
图 5 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织自噬小体的数量及线粒体自噬相关蛋白表达的影响( $n = 3$ )

Note. A, Autophagosome in hippocampal tissues of each group of mice under transmission electron microscopy (The blue arrows point to autophagosome). B, Quantitative statistics of autophagosome. C, Bands of mitochondrial autophagy-related proteins. D, Statistical analysis of mitochondrial autophagy-related proteins. Compared with control group,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\#\# P < 0.001$ . Compared with model group,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ .

Figure 5 Effects of liuweidi Huangwan on the number of autophagosome in hippocampal tissue and the expression of mitochondrial autophagy-related proteins in aged mice

0.05、 $P < 0.05$ ), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 PGC-1 $\alpha$  表达升高 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、

$P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ ), 具有统计学意义。结果表明, 六味地黄丸可以显著提高线粒体的生物发生能力。

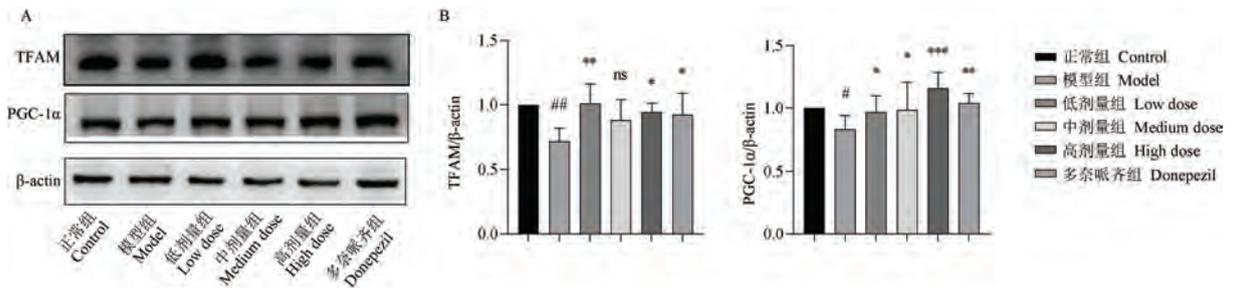


注: A:透射电子显微镜下各组的线粒体的形态(红色箭头所指为受损线粒体,蓝色箭头所指为健康线粒体);B:各组小鼠受损伤线粒体的量化统计;C:线粒体融合分裂相关蛋白的条带;D:线粒体融合分裂相关蛋白的量化统计。与正常组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 6** 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织线粒体形态及融合分裂相关蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )

Note. A, Morphology of mitochondria in each group under transmission electron microscopy (The red arrow point to damaged mitochondria, and the blue arrow point to healthy mitochondria). B, Quantitative statistics of damaged mitochondria in mice in each group. C, Bands of mitochondrial fusion division-associated proteins. D, Quantitative statistics of mitochondrial fusion and division-related proteins. Compared with control group, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$ . Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 6** Effects of liuweidi huangwan on mitochondrial morphology and fusion division-related protein expression in hippocampal tissues of aged mice



注:A:线粒体生物发生相关蛋白的条带;B:线粒体生物发生相关蛋白的量化统计。与正常组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

**图 7** 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织线粒体生物发生相关蛋白表达的影响 ( $n = 3$ )

Note. A, Bands of mitochondrial biogenesis-related proteins. B, Quantitative statistics of mitochondrial biogenesis-related proteins. Compared with control group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ . Compared with model group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 7** Effects of liuweidi huangwan on the expression of mitochondrial biogenesis-related proteins in hippocampal tissues of aged mice

### 3 讨论

脑衰老是机体大环境和脑局部微环境的改变,导致脑组织、生理功能发生不可逆的退行性改变,表现为学习记忆和运动功能减退、脑萎缩等<sup>[7]</sup>。随着人体的脑衰老,病理改变以海马神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,导致能量生成减少,氧化应激水平为主要表现<sup>[8]</sup>。此外,损伤的线粒体会导致促凋亡因子及炎症因子的表达升高,影响衰老脑的认知功能<sup>[9]</sup>。在目前对脑衰老的研究中,发现减轻线粒体的损伤,改善线粒体质量控制系统,可以在一定程度上缓解脑衰老的进程<sup>[10]</sup>。

脑衰老在传统中医医学文化里,是由多种因素造成的,诸如:肾精不足致衰、脾胃虚弱致衰、阴阳失调致衰、津液不足致衰、痰浊血瘀致衰等理论,其中“肾衰”是导致人体脑衰老的最为认可的因素<sup>[11]</sup>。《医学正传》曰:肾气盛则延寿,肾气衰则寿夭。可知,在古时候,中医就意识到肾在人体衰老过程中扮演着重要角色。人体步入老年,脏腑亏虚,气血不足,先天之精耗损严重,肾精不得则上冲于脑,则脑失所养,故肝脾肾虚则脑髓无以化生,从而引发脑衰老。六味地黄丸是传统中医药里面的一味经典名方,具有补肝肾、益精血,强筋骨的作用,可以有效地“补肾”<sup>[12]</sup>。现代药理学研究表明,六味地黄丸具有免疫调节、抗衰老、抗氧化、改善肾功能、保护神经等现代药理作用<sup>[13-14]</sup>。本实验通过选择六味地黄丸干预老龄小鼠,观察六味地黄丸对老龄小鼠认知功能的影响、小鼠海马区神经炎症和线粒体质量控制系统的影 响,探究其中多靶点、多途径的治疗逻辑与可能存在的分子生物学联系。

本实验首先通过行为学实验证实六味地黄丸能够改善自然衰老小鼠的空间学习记忆能力。实验结果表明六味地黄丸各治疗组小鼠的空间学习记忆能力明显优于模型组小鼠的空间学习记忆能力。此外,通过旷场实验发现六味地黄丸也能够明显改善老龄小鼠的运动能力和焦虑情绪。有研究表明传统中医补肾填精药方可以改善衰老引起的认知功能障碍和提高学习记忆能力<sup>[15]</sup>。随后,我们进一步探讨六味地黄丸对认知能力改善的生物学机制。

在脑衰老的过程中,会有大量的炎症因子产生,伴随着炎症因子的积聚和星形胶质细胞的大量激活、积聚,又会加速脑衰老<sup>[16-17]</sup>。研究表明星形

胶质细胞在生理状态下可以分泌一些神经营养因子和细胞因子,调节神经元功能<sup>[18]</sup>。但同时激活的星形胶质细胞不仅有神经保护作用,它们也破坏神经细胞并促进多种神经退行性疾病的发生<sup>[19]</sup>。这表明星形胶质细胞在调控脑部的神经炎症方面,发挥着重要作用。伴随着脑部星形胶质细胞的大量激活,大量的炎症因子也会被释放出来,脑部促炎因子的释放,会进一步对神经元细胞造成损害。本实验通过检测炎症因子 TNF- $\alpha$  在老龄小鼠海马区的表达以及星形胶质细胞的激活状态发现,经过六味地黄丸干预后,炎症因子 TNF- $\alpha$  的表达量降低,星形胶质细胞激活减少,从而表明六味地黄丸可以缓解脑内神经炎症的失衡和脑内神经炎症对神经系统的损坏。

线粒体质量控制系统是生物维持机体线粒体稳态的重要机制,其主要包括线粒体融合分裂、线粒体自噬和线粒体生物发生三个方面<sup>[20]</sup>。线粒体生物发生与线粒体自噬可以促进线粒体的生成与分解,线粒体融合分裂可以修复受损的线粒体,三者共同维持线粒体数量和质量的稳定<sup>[21]</sup>。线粒体质量控制系统受到破坏,一方面表现为线粒体的形态、结构、数量、功能发生改变<sup>[22]</sup>;另一方面表现为抗氧化能力、炎症反应、自噬障碍、磷酸化修饰等病理发生过程<sup>[23]</sup>。有研究表明,年龄与线粒体质量控制系统破坏密切相关,老年脑海马组织神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,导致能量生成减少,氧化应激水平上升<sup>[24]</sup>。此外,损伤的线粒体也会导致促凋亡因子及炎症因子的表达升高,损伤脑的认知功能<sup>[25]</sup>。

线粒体的融合分裂是在多种蛋白质的精确配合下协同进行的,过程高度保守,融合与分裂之间保持动态平衡,这种动态平衡对于线粒体维持自身的形态、功能和分布很重要<sup>[26]</sup>。线粒体的融合主要包含两个步骤,即由 MFN 介导的外膜融合和由 OPA1 介导的内膜融合。相邻的两个线粒体实现外膜和内膜的融合,从而变成一个呈纤维状延伸和网络状结构的线粒体<sup>[27]</sup>。DRP1 是目前发现的唯一的线粒体分裂蛋白,多数的线粒体分裂都需要 DRP1 蛋白的参与,DRP1 可以通过不同的方式被激活来驱动线粒体分裂。实验结果显示六味地黄丸提高了线粒体融合蛋白 MFN2、OPA1 的表达,降低了 DRP1 的表达<sup>[28]</sup>。提示六味地黄丸可能通过改善线粒体融合分裂的能力,保护神经元,抗脑衰老。

自噬即“自己吃自己”是细胞吞噬自身的错误折叠蛋白和破损细胞器,并将其包裹进囊泡,与溶酶体结合,形成自噬溶酶体,降解其吞噬的内容物,以此满足能量代谢的需求和细胞器的更新<sup>[29]</sup>。线粒体自噬是自噬的一种,是线粒体质量控制系统的重要组成部分,是由 PINK1-PARKIN 介导的清除细胞内损伤细胞器或者多余细胞的过程<sup>[30]</sup>。PINK1 是受损线粒体的分子传感器,是线粒体自噬的“启动子”,可以触发线粒体自噬的起始信号,并将 PARKIN 募集至线粒体。PARKIN 是线粒体自噬信号的“增强子”,可以将线粒体外膜上的线粒体蛋白 MFN1、MFN2、VDAC1 泛素化,并进一步扩大自噬信号。线粒体外膜上的蛋白泛素化后,线粒体外膜会积聚大量包括 P62 在内的受体蛋白,LC3B 蛋白与泛素化的受损线粒体结合,自噬小体与溶酶体结合,受损线粒体被降解<sup>[31]</sup>。我们的实验结果显示六味地黄丸可以提高 PINK1、PARKIN、ATG3、ATG7、LC3B 线粒体自噬蛋白的表达,降低 P62 的表达。自噬小体可以直观地表达一个细胞的自噬水平,是衡量细胞自噬能力的有效标准。在透射电子显微镜的观察下发现,与模型组相比,低、中、高剂量组自噬小体的数量均多于模型组,这说明六味地黄丸可以提高细胞内的自噬小体的数量。以上实验结果表明六味地黄丸可能通过 PINK1-PARKIN 信号通路,影响相关线粒体自噬蛋白的表达,提高神经元细胞的线粒体自噬水平,保护神经元,抗脑衰老。

线粒体生物发生是指线粒体前体的生长和分化,是为满足能量供应而刺激新的线粒体产生,增加细胞线粒体质量和数量的过程<sup>[32]</sup>。新生的线粒体在细胞内运转一段时间后,其功能会有不同程度的下降,两个甚至多个线粒体发生融合的时候,会共享线粒体内部的资源,维持线粒体正常运转的同时极大地节省了资源<sup>[33]</sup>。融合的线粒体如果线粒体功能出现故障,线粒体会开始分裂,不能用的线粒体会被分裂出去,还能继续用的线粒体继续融合,不能用的线粒体会被自噬等途径分解成氨基酸重新利用<sup>[34]</sup>。线粒体融合分裂与线粒体自噬都是为了让线粒体更好地执行其的任务;线粒体生物发生。PGC-1 $\alpha$  是目前被认为最重要的线粒体生物合成调节因子,是维持神经元存活和突触传递的关键因素<sup>[35]</sup>。TFAM 是一种核编码因子,可转运到线粒体,与线粒体 DNA 的 D 环结合,激活其复制和转录<sup>[36]</sup>。TFAM 是由 PGC-1 $\alpha$  通过与 NRFs 共活化而

调控的<sup>[37]</sup>。以上研究表明 PGC-1 $\alpha$  和 TFAM 在线粒体生物发生过程中发挥了重要作用。Western blot 实验结果显示:六味地黄丸各剂量组可以提高 PGC-1 $\alpha$  和 TFAM 的表达,提示六味地黄丸可能通过改善线粒体生物发生抗脑衰老。

综合以上实验结果,本实验通过六味地黄丸干预老龄小鼠,探究六味地黄丸对老龄小鼠脑老化诱发的神经退行性病变的保护作用。证明了六味地黄丸可以减轻老龄小鼠海马区的神经炎症,调节线粒体的质量控制系统,进而改善老龄小鼠的学习记忆能力,从而为六味地黄丸应用于衰老引起的神经退行性疾病的治疗提供理论和实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Schmid ET, Pyo JH, Walker DW. Neuronal induction of BNIP<sub>3</sub>-mediated mitophagy slows systemic aging in *Drosophila* [J]. Nat Aging, 2022, 2(6): 494-507.
- [2] Eldeeb MA, Thomas RA, Ragheb MA, et al. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease [J]. Physiol Rev, 2022, 102(4): 1721-1755.
- [3] Blinkouskaya Y, Caçoilo A, Gollamudi T, et al. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations [J]. Mech Ageing Dev, 2021, 200: 111575.
- [4] Chung KW, Dhillon P, Huang S, et al. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis [J]. Cell Metab, 2019, 30(4): 784-799.
- [5] 张博, 李炎, 黄树明. “肾通于脑”理论的科学实质探析 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(1): 62-64.
- [6] 高巴东, 邓洋洋, 王重一, 等. “肾-骨-髓-脑”相关性及其临床意义 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6): 44-47.
- [7] Montine TJ, Cholerton BA, Corrada MM, et al. Concepts for brain aging: resistance, resilience, reserve, and compensation [J]. Alzheimers Res Ther, 2019, 11(1): 22.
- [8] Mertens J, Reid D, Lau S, et al. Aging in a dish: iPSC-derived and directly induced neurons for studying brain aging and age-related neurodegenerative diseases [J]. Annu Rev Genet, 2018, 52: 271-293.
- [9] van Horsen J, van Schaik P, Witte M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: a vicious circle in neurodegenerative disorders? [J]. Neurosci Lett, 2019, 710: 132931.
- [10] Nabi SU, Khan A, Siddiqui EM, et al. Mechanisms of mitochondrial malfunction in Alzheimer's disease: new therapeutic hope [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4759963.
- [11] 邱朝阳, 刘萍, 霍青. 基于“肾藏精, 精舍志”论帕金森认知障碍病机 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 593-595.
- [12] 李彬. 六味地黄丸的药理分析及临床应用研究 [J]. 智慧健康, 2022, 8(33): 186-190.

- [13] 刘妍, 王蕾. 六味地黄及金匱肾气方的现代药理研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(11): 996-998.
- [14] 吴梅艳, 李平. 六味地黄丸的药理作用及临床运用综述 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(9): 1023-1025.
- [15] 毛蕾, 张玉莲. 补肾填精中药治疗老年性痴呆 [J]. 吉林中医药, 2010, 30(5): 394-396.
- [16] Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation [J]. *Neuron*, 2020, 108(4): 608-622.
- [17] Walker KA, Basisty N, Wilson DM 3rd, et al. Connecting aging biology and inflammation in the omics era [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(14): e158448.
- [18] Zhang YP, Li YY, Zhang C, et al. Interleukin-10 attenuates behavioral, immune and neurotrophin changes induced by chronic central administration of interleukin-1 $\beta$  in rats [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2022, 29(4): 380-390.
- [19] Endo F, Kasai A, Soto JS, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease [J]. *Science*, 2022, 378(6619): eadc9020.
- [20] Ng MYW, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 881-905.
- [21] Liu L, Li Y, Wang J, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 is regulated by PGC-1 $\alpha$ /NRF1 to fine tune mitochondrial homeostasis [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(3): e50629.
- [22] Rosina M, Ceci V, Turchi R, et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(4): 533-548.
- [23] Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation: intertwined roads to neurodegeneration [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(8): 647.
- [24] Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 44879-44905.
- [25] Marchi S, Guilbaud E, Tait SWG, et al. Mitochondrial control of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(3): 159-173.
- [26] Toda C, Kim JD, Impellizzeri D, et al. UCP<sub>2</sub> regulates mitochondrial fission and ventromedial nucleus control of glucose responsiveness [J]. *Cell*, 2016, 164(5): 872-883.
- [27] Gao S, Hu J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(1): 62-74.
- [28] Quiles JM, Gustafsson ÅB. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(11): 723-736.
- [29] Kim KH, Lee MS. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-337.
- [30] Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/parkin mitophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(10): 733-744.
- [31] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119-131.
- [32] Li PA, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [33] Adebayo M, Singh S, Singh AP, et al. Mitochondrial fusion and fission: the fine-tune balance for cellular homeostasis [J]. *FASEB J*, 2021, 35(6): e21620.
- [34] Ding Q, Qi Y, Tsang SY. Mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and mitophagy in the maturation of cardiomyocytes [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2463.
- [35] Han B, Jiang W, Liu H, et al. Upregulation of neuronal PGC-1 $\alpha$  ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2832-2848.
- [36] Li Y, Yang Q, Chen H, et al. TFAM downregulation promotes autophagy and ESCC survival through mtDNA stress-mediated STING pathway [J]. *Oncogene*, 2022, 41(30): 3735-3746.
- [37] Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(8): 1178-1186.

[收稿日期]2022-10-31

高丽娟,李博,于磊,等. *Marcks1* 基因敲除对小鼠成年造血的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 35-45, 61.  
Gao LJ, Li B, Yu L, et al. Effect of *Marcks1* gene knockout on adult hematopoiesis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 35-45, 61.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.005

## *Marcks1* 基因敲除对小鼠成年造血的影响

高丽娟<sup>1</sup>, 李博<sup>1</sup>, 于磊<sup>1</sup>, 齐晓龙<sup>1</sup>, 张旭<sup>1</sup>, 高珊<sup>2</sup>, 刘宁<sup>2</sup>, 马元武<sup>1,2\*</sup>

(1.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021;2.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

**【摘要】** 目的 建立造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠,探究该基因敲除对小鼠成年造血的影响。方法 对 E15.5 *Marcks1* 敲除小鼠进行胎肝竞争性移植实验,分析胎肝移植后不同月龄小鼠外周血中成熟功能谱系血细胞的占比。流式分选胎肝 KSL 细胞,利用 RNA-Seq 分析该基因敲除后差异基因表达。利用 CRISPR/Cas9 技术,构建 *Marcks1* 条件敲除小鼠,并与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠。利用 PCR 和 Sanger 测序鉴定基因型。利用 Real-time PCR 检测小鼠骨髓和造血干细胞中 *Marcks1* mRNA 的表达。利用流式细胞技术分析小鼠骨髓、外周血、脾和胸腺中不同类型造血细胞的占比。通过竞争性骨髓移植实验分析 *Marcks1* 敲除对造血重建的影响。结果 *Marcks1* 敲除造成胎肝移植后 B 细胞占比下降、髓系细胞占比升高,骨髓中 CLP 和 CMP 占比下降、GMP 占比升高。RNA-seq 结果显示该基因敲除后导致胎肝 KSL 细胞中 252 个基因上调,400 个基因下调。GO 结果显示差异基因主要富集在免疫应答、质膜以及低压门钙离子通道活性等相关基因。KEGG 结果显示差异基因主要富集在造血谱系分化和细胞因子受体互作相关信号通路。我们利用 CRISPR/Cas9 技术成功建立造血特异性 *Marcks1* 敲除小鼠。流式结果表明 *Marcks1* 缺失不影响小鼠成年造血,但影响骨髓移植后的造血重建能力。结论 成功建立造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠。造血系统敲除 *Marcks1* 基因,不影响成年稳态造血,但影响成年造血重建能力。我们建立的 *Marcks1* 条件敲除小鼠,为该基因的成年造血功能研究以及该基因的其他组织特异性功能研究提供了动物模型。

**【关键词】** 豆蔻酰化的富含丙氨酸 C 激酶底物蛋白 1; *Marcks1*; 条件敲除小鼠; 造血干细胞; 骨髓移植

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0035-11

## Effect of *Marcks1* gene knockout on adult hematopoiesis in mice

GAO Lijuan<sup>1</sup>, LI Bo<sup>1</sup>, YU Lei<sup>1</sup>, QI Xiaolong<sup>1</sup>, ZHANG Xu<sup>1</sup>, GAO Shan<sup>2</sup>, LIU Ning<sup>2</sup>, MA Yuanwu<sup>1,2\*</sup>

(1. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, National Health Commission of China, Beijing 100021, China. 2. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021)

**【Abstract】 Objective** To establish hematopoietic system-specific *Marcks1* knockout mice and explore the effect of *Marcks1* gene deletion on hematopoiesis. **Methods** Using fetal liver competitive transplantation of E15.5 *Marcks1*

**【基金项目】** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-024)。

**【作者简介】** 高丽娟(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:疾病动物模型建立与造血干细胞功能研究。E-mail:1260407943@qq.com

**【通信作者】** 马元武(1983—),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:基因编辑与疾病动物模型创制。E-mail:mayuanwu@cnilas.org

gene knockout mice, we analyzed the proportions of various hematopoietic cell types in peripheral blood at 1, 2, 3, and 4 months after fetal liver transplantation. KSL cells were sorted by flow cytometry and analyzed by RNA-seq. We used CRISPR/Cas9 technology to generate *Marcks11* conditional knockout mice and obtained hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice by crossing with *Vav1-Cre* mice. The genotype of the produced mice was confirmed by PCR and Sanger sequencing. Real-time PCR was used to assess *Marcks11* mRNA expression in bone marrow and hematopoietic stem cells. Flow cytometry was used to analyze the proportions of various hematopoietic cell types in bone marrow, peripheral blood, spleen, and thymus. The effect of *Marcks11* gene knockout on hematopoietic reconstitution was analyzed by competitive bone marrow transplantation. **Results** *Marcks11* gene knockout decreased the proportion of B cells, increased the proportion of myeloid cells, decreased CLP and CMP, and increased GMP after fetal liver transplantation. RNA-seq showed that 252 genes were upregulated and 400 genes were downregulated. GO analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in the immune response, plasma membrane, and low-pressure gate calcium channel activity. KEGG analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in hematopoietic lineage differentiation and cytokine-cytokine receptor interaction-related signaling pathways. We generated hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice successfully. Flow cytometry showed that *Marcks11* deletion did not affect the steady-state hematopoietic functions of adult mice, but it did affect the hematopoietic reconstitution ability after competitive bone marrow transplantation. **Conclusions** We successfully established hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice and found that *Marcks11* gene knockout does not affect stable hematopoiesis, but affects hematopoietic reconstitution. The underlying mechanism requires further investigation. This study provides an animal model to examine the gene function of *Marcks11* in adult hematopoiesis and other aspects.

**【Keywords】** myristoylated alanine-rich C-kinase substrate like 1; *Marcks11*; conditional knockout mice; hematopoietic stem cell; bone marrow transplantation

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

造血干细胞通过自我更新维持自我,并通过分化发育为成熟功能血细胞,维持机体整个生命周期的造血稳态<sup>[1-2]</sup>。造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)在特定微环境和细胞内外调控因子的协同作用下,增殖分化产生各类造血祖细胞,造血祖细胞进而定向分化为具有不同形态的原红细胞、原粒细胞、原单核细胞、原巨核细胞和原淋巴细胞,随后进一步分化发育成成熟血细胞,维持机体的造血稳态<sup>[1-4]</sup>。当机体受到损伤、辐射等外界刺激时, HSCs 的自我更新和发育分化能力遭到破坏,造血稳态失衡,发生贫血、白血病等系列血液系统疾病<sup>[5-7]</sup>。虽然 HSCs 的增殖、发育、分化是目前研究最为系统的一类多潜能干细胞,但对这一精细而复杂的调控过程仍存在很多不清楚的地方。因此,进一步深入了解 HSCs 的分化发育过程,不仅有助于了解血液系统疾病的发生、发展过程,同时也有助于发展基于 HSCs 的治疗策略。

豆蔻酰化富含丙氨酸 C 激酶底物蛋白(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS)家族包含 MARCKS 和 MARCKS 相关蛋白 1(MARCKSL1)两个成员。该家族成员功能结构域具有以下特点:(1)N 末端的肉豆蔻酰化位点结构

域,可以进行可逆的豆蔻酰化修饰,通过疏水性肉豆蔻酰基共价结合,可逆地插入质膜内侧,成为蛋白质的脂质锚定位点;(2)MH2 结构域(MARCKS Homology 2, MH2),目前功能尚不明确;(3)效应结构域(effector domain, ED),位于蛋白质的中心,由 24/25 个氨基酸残基组成的高碱性片段<sup>[8-9]</sup>。ED 被蛋白激酶磷酸化后,降低与质膜的亲和力,转移到细胞质中,这种由质膜到胞质的易位也称为“静电开关”<sup>[10]</sup>。MARCKSL1 是一种肌动蛋白结合蛋白,分子量大小为 20 kDa<sup>[11]</sup>,在脊椎动物中广泛表达,参与大脑发育<sup>[12-13]</sup>、血管生成<sup>[14-15]</sup>和炎症反应<sup>[16]</sup>等一系列生理、病理过程,但目前关于 MARCKSL1 在造血系统中是否发挥功能以及发挥什么样的功能仍不清楚。

前期工作中,我们建立了 *Marcks11* 系统敲除小鼠,通过初步分析发现 *Marcks11* 敲除会影响胎肝中造血干细胞的数量<sup>[17]</sup>。但是由于该基因缺失会导致小鼠胚胎死亡,这严重限制了该基因在成年造血中的功能研究。在本研究中,我们首先通过胎肝移植实验,分析了 *Marcks11* 基因缺失对胎肝造血重建的影响,并通过 RNA-seq 分析了差异基因表达情况和可能的信号通路。在确定 *Marcks11* 在造血中发挥

重要功能后,为进一步研究该基因在成年造血中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 技术,建立 *Marcks11* 条件敲除小鼠,再与造血系统特异的 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠,分析了该基因缺失对成年造血和造血重建的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

本实验使用 2 月龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠雌雄各 25 只,体重为 22~32 g;6~8 周龄 SPF 级 *Vav1-Cre* 小鼠雌雄各 5 只,体重为 15~20 g;2 月龄 SPF 级 CD45.1 小鼠雌雄各 3 只,体重为 22~26 g;2 月龄 SPF 级 CD45.1/CD45.2 小鼠雌雄各 20 只,体重为 22~35 g。野生型 C57BL/6 小鼠购于北京华阜康生物科技有限公司[SCXK(京)2020-0004],*Vav1-Cre* 小鼠由中国医学科学院血液学研究所的袁卫平教授惠赠,CD45.1 小鼠和 CD45.1/CD45.2 小鼠由清华大学董忠军教授惠赠,实验所需的动物饲养于本单位 SPF 级屏障动物设施内[SYXK(京)2019-0011],饲养环境符合相应的国家标准。饲养期间小鼠自由饮水和摄食。本研究所涉及的所有动物实验,通过本单位实验动物伦理委员会(IACUC)的审批(MYW20005),并在动物实验过程中严格遵循实验动物的 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

MEGA shortscript T7 转录试剂盒(Ambion 公司,Am1354);全基因组 DNA 提取试剂盒(TransGen 公司,EE101-22);Sca1 流式抗体(Invitrogen 公司,25598182);c-kit 流式抗体(Invitrogen 公司,17117282);CD34 流式抗体(Invitrogen 公司,11034182);Flt3(Invitrogen 公司,12135182);CD45.1 流式抗体(Invitrogen 公司,12045381);CD45.2 流式抗体(Invitrogen 公司,45045482);CD4 流式抗体(Invitrogen 公司,11004286);CD8a 流式抗

体(Invitrogen 公司,17008182);B220 流式抗体(Invitrogen 公司,13045285);CD11b 流式抗体(Invitrogen 公司,47011282);Ly6G 流式抗体(Invitrogen 公司,13593182);10×EDTA 抗凝剂(麦瑞博生物公司,M10128);10×红细胞裂解液(BD 公司,555899)。PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国);实时荧光定量 PCR 仪(Thermo 公司,美国);流式细胞仪(BD 公司,美国);数码凝胶成像处理系统(Tanon 公司,中国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 基于 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcks11* 条件敲除小鼠

我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcks11* 基因条件敲除小鼠。首先,针对 *Marcks11* 基因,设计两个 sgRNA 靶点,靶点信息见表 1,由公司合成互补的寡聚核苷酸链,退火后连接到 *Dra* I 线性化后的 pUC57-sgRNA 载体中。构建好的载体,经线性化和酚氯仿抽提后,作为模板利用 MEGAshortscriptT7 转录试剂盒体外转录获得目标 sgRNA。通过基因工程手段,扩增 *Marcks11* 基因片段并在第二外显子上下游插入 *loxP* 序列,并构建到 pUC19-DNA 载体中作为同源重组模板。

对 C57BL/6 雌鼠注射激素 PMSG 和 HCG 进行超排卵,随后将雌鼠与 C57BL/6 雄鼠合笼,次日,从雌鼠输卵管中获得可用于注射的受精卵。

将 sgRNA、Cas9 蛋白和纯化后供体模板混合,通过显微注射方式将其注入受精卵核质中,随后将注射后的受精卵移植到假孕雌鼠输卵管,等待小鼠出生,并进行基因型鉴定。获得的条件敲除小鼠与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交获得造血系统特异性敲除小鼠。

#### 1.3.2 小鼠基因型鉴定

剪取新生小鼠(7~10 d)的脚趾,按照全基因组 DNA 提取试剂盒的步骤提取基因组 DNA,溶于 0.1×TE 中,进行 PCR 扩增。敲除小鼠检测引

表 1 sgRNA 靶点和寡聚核苷酸链合成信息

Table 1 sgRNA target sequence and oligos

靶点 Target	序列 Sequence
sgRNA1(PAM)	GGTGATGTTGGATGGGAGTG(AGG)
M-Marcks11-E2A-sgRNA-up	5'-TAGGTGATGTTGGATGGGACTG-3'
M-Marcks11-E2A-sgRNA-down	5'-AAACCACTCCCATCCAAGATC-3'
sgRNA2(PAM)	GGGAAGAACTTAAACCAACC(AGG)
M-Marcks11-E2B-sgRNA-up	5'-TAGGGAAGAACTTAAACCAACC-3'
M-Marcks11-E2B-sgRNA-down	5'-AAACGGTTGGTTTAAAGTTCCTC-3'

物为: M-Marcksl1-F/M-Marcksl1-WT-R 和 M-Marcksl1-F/M-Marcksl1-KO-R, PCR 条件为: 94℃ 持续 5 min; 94℃ 持续 30 s, 62℃ 持续 30 s, 72℃ 持续 30 s, 此步骤 30 个循环; 72℃ 持续 10 min; 保温于 4℃。野生条带和敲除条带分别是 1923 bp 和 316 bp。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳后成像。引物序列见表 2。条件敲除小鼠的鉴定: 引物 M-Marcksl1-loxP-F/M-Marcksl1-loxP-R, PCR 条件: 95℃ 持续 5 min; 95℃ 持续 20 s, 60℃ 持续 30 s, 72℃ 持续 2 min, 此步骤 30 个循环; 72℃ 持续 10 min; 保温于 4℃。引物 Cre-F/Cre-R, PCR 条件为: 95℃ 持续 5 min; 95℃ 持续 20 s, 60℃ 持续 30 s, 72℃ 持续 30 s, 此步骤 30 个循环; 72℃ 持续 10 min; 保温于 4℃。条件敲入条带和敲除条带分别是 1842 bp 和 235 bp。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后成像观察。引物序列见表 2。

表 2 小鼠基因型鉴定引物序列

Table 2 Primer sequences for genotype identification

引物 Primer	序列 Sequence	PCR 产物 Amplicon
M-Marcksl1-F	5'-TCCAGGCCCGTGAG-3'	1923 bp
M-Marcksl1-WT-R	5'-GCCTCATCTGTTCCTTCAC-3'	
M-Marcksl1-F	5'-TCCAGGCCCGTGAG-3'	316 bp
M-Marcksl1-KO-R	5'-TCTGTAGGTGGAGGTTGATAGC-3'	
M-Marcksl1-loxP-F	5'-CTGTGAGGGGTGAGGGTGATGTT-3'	1842 bp
M-Marcksl1-loxP-R	5'-AACTTATATTGCCTGTCTTCCC-3'	
Cre-F	5'-TACTGACGGTGGGAGAATG-3'	437 bp
Cre-R	5'-CTGTTTCACTATCCAGGTTACG-3'	

### 1.3.4 流式分析

外周血单细胞悬液准备: 小鼠眼眶静脉丛采血 100  $\mu$ L, 提前在管中加入 10  $\mu$ L 10 $\times$ EDTA 抗凝剂, 混匀, 随后加入 1 mL 1 $\times$ 红细胞裂解液, 混匀后于 37℃ 恒温箱中静置 10 min, 离心, 弃去上清, 加入 PBS 重悬细胞备用。

脾细胞和胸腺细胞单细胞悬液准备: 脱颈椎法牺牲小鼠后, 取绿豆大小 (3~4 mm<sup>3</sup>) 的胸腺、脾组织置于病理载玻片毛面一侧, 用另一载玻片毛面一侧沾取 PBS 后研磨组织, 制成单细胞悬液备用。

骨髓单细胞悬液准备: 取小鼠双侧胫骨和股骨, 用 1 mL 注射器吸取 PBS 从骨头两端反复冲洗骨髓腔直至骨头发白, 获取的骨髓细胞备用。

流式抗体染色和流式上机分析: 抗体染色组合见表 3。按照对应抗体组合进行染色后, 4℃ 避光静置 30 min, 加入 PBS 清洗, 离心弃去上清, 加入 PBS 重悬细胞后用 70  $\mu$ m 的滤膜滤入流式管中, 上机和流式分析。

### 1.3.3 竞争性移植实验

胎肝竞争性移植实验: 取 E15.5 小鼠胎肝, 制成单细胞悬液, 将 0.01 ee 胎肝细胞和 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个竞争性骨髓细胞 (CD45.1 小鼠) 混合, 尾静脉注射进入经致死辐照的受体小鼠 (9 Gy, X 射线) (CD45.1/CD45.2 小鼠) 体内。移植后每个月采集受体小鼠的外周血进行流式分析血细胞占比, 4 个月后再对受体小鼠的骨髓细胞进行流式分析。Ctrl 为对照小鼠, KO 为敲除小鼠。

成年鼠的竞争性骨髓移植实验: 将 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 个骨髓细胞 (*Marcksl1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠为敲除组, *Marcksl1<sup>fl/fl</sup>* 小鼠为对照组) 与 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 个竞争性骨髓细胞 (CD45.1 小鼠) 混合, 尾静脉注射进入经过致死照射的受体小鼠 (CD45.1/CD45.2 小鼠) 中。移植后每个月采集受体小鼠外周血进行流式分析细胞占比。Ctrl 为对照小鼠, cKO 为条件敲除小鼠。

表 3 流式抗体组合

Table 3 Flow cytometry antibody combination

细胞 Cell	抗体 Antibody
造血干细胞 KSL	e-kit <sup>+</sup> Scal <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>
长期造血干细胞 LT-HSC	e-kit <sup>+</sup> Scal <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> Flt3 <sup>-</sup>
短期造血干细胞 ST-HSC	e-kit <sup>+</sup> Scal <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> Flt3 <sup>-</sup>
多潜能祖细胞 MPP	e-kit <sup>+</sup> Scal <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> Flt3 <sup>+</sup>
造血祖细胞 HPC	Lin <sup>-</sup> Scal <sup>-</sup> e-kit <sup>+</sup>
髓系祖细胞 CMP	Lin <sup>-</sup> Scal <sup>-</sup> e-kit <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
粒系祖细胞 GMP	Lin <sup>-</sup> Scal <sup>-</sup> e-kit <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>
巨核系祖细胞 MEP	Lin <sup>-</sup> Scal <sup>-</sup> e-kit <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16 <sup>-</sup>
淋巴系祖细胞 CLP	Lin <sup>-</sup> Scal <sup>Mid</sup> e-kit <sup>Mid</sup> CD127 <sup>+</sup> Flt3 <sup>+</sup>
T 淋巴细胞 T lymphocytes	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
B 淋巴细胞 B lymphocytes	B220 <sup>+</sup>
髓系细胞 Myeloid cells	CD11b <sup>+</sup>
粒细胞 Granulocytes	Ly6G <sup>+</sup>

### 1.4 统计学方法

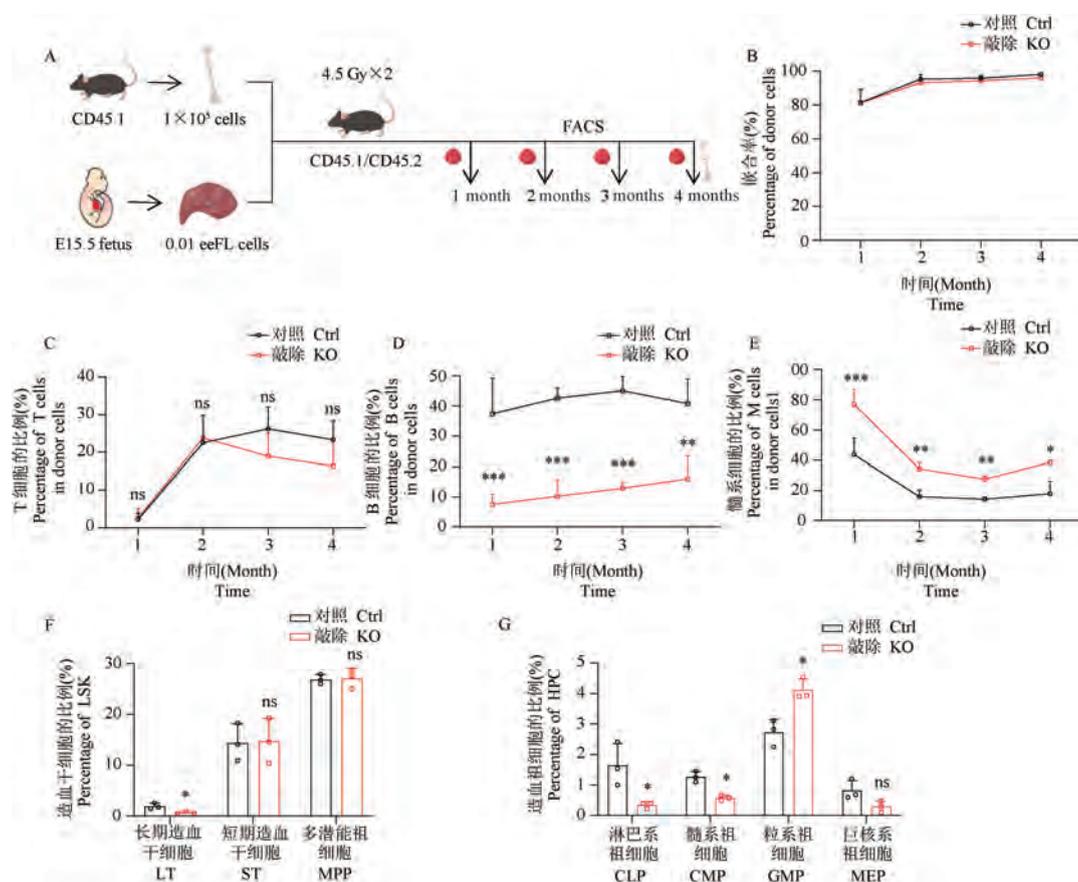
流式细胞仪结果使用 FlowJo 10 软件进行数据分析,数据结果绘图和统计使用 GraphPad Prism 8.0 软件。用平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示实验中所有数据。采用独立样本 *t* 检验进行组间比较,认为  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Marcks11* 基因敲除影响小鼠的胎肝造血重建能力

在前期工作中,我们发现 *Marcks11* 基因敲除影响胎肝中 KSL 细胞的比例<sup>[17]</sup>。为进一步研究该基因缺失对造血功能的影响,我们对敲除小鼠和对照

小鼠 E15.5 胎肝进行竞争性移植实验,具体操作流程如图 1A 所示,分析胎肝造血的重建能力。结果显示,受体小鼠中供体小鼠细胞的嵌合率在移植 2 个月后就达 90% 以上,表明移植成功(图 1B)。对移植后不同时间点外周血中淋系和髓系细胞占比进行流式细胞分析,结果显示敲除组 T 淋巴细胞的占比与对照组相比无明显差异(图 1C),B 淋巴细胞的占比显著降低(图 1D),髓系细胞占比显著升高(图 1E)。对移植 4 个月后受体小鼠的骨髓造血干/祖细胞进行流式分析,结果显示长期造血干细胞(LT)的比例下降,短期造血干细胞(ST)和多潜能祖细胞(MPP)的占比无显著差异(图 1F)。与对照组相比,敲除组淋系祖细胞(CLP)和髓系祖细胞(CMP)



注:A:E15.5 胎肝竞争性移植示意图;B:受体小鼠的嵌合率分析;C:受体小鼠外周血中供体来源 T 细胞的比例;D:受体小鼠外周血中供体来源 B 细胞的比例;E:受体小鼠外周血中供体来源髓系细胞的比例;F:受体小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的比例;G:受体小鼠骨髓中淋巴系祖细胞、髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的比例。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 1 *Marcks11* 基因敲除对胎肝造血重建能力的影响 ( $n \geq 3$ )

Note. A, E15.5 fetal liver competitive transplantation diagram. B, Percentage of donor cells in peripheral blood of recipient mice. C, Percentage of donor-derived T cells in peripheral blood of recipient mice. D, Percentage of donor-derived B cells in peripheral blood of recipient mice. E, Percentage of donor-derived M cells in peripheral blood of recipient mice. F, Percentage of LT, ST, MPP in bone marrow of recipient mice. G, Percentage of CLP, CMP, GMP, MEP in bone marrow of recipient mice. Compared with Ctrl group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 1 The effect of *Marcks11* gene knockout on hematopoietic reconstructive ability

的占比显著下降,粒系祖细胞(GMP)的比例显著升高(图 1G)。以上结果表明,*Marcks1* 基因敲除影响胎肝造血重建能力。

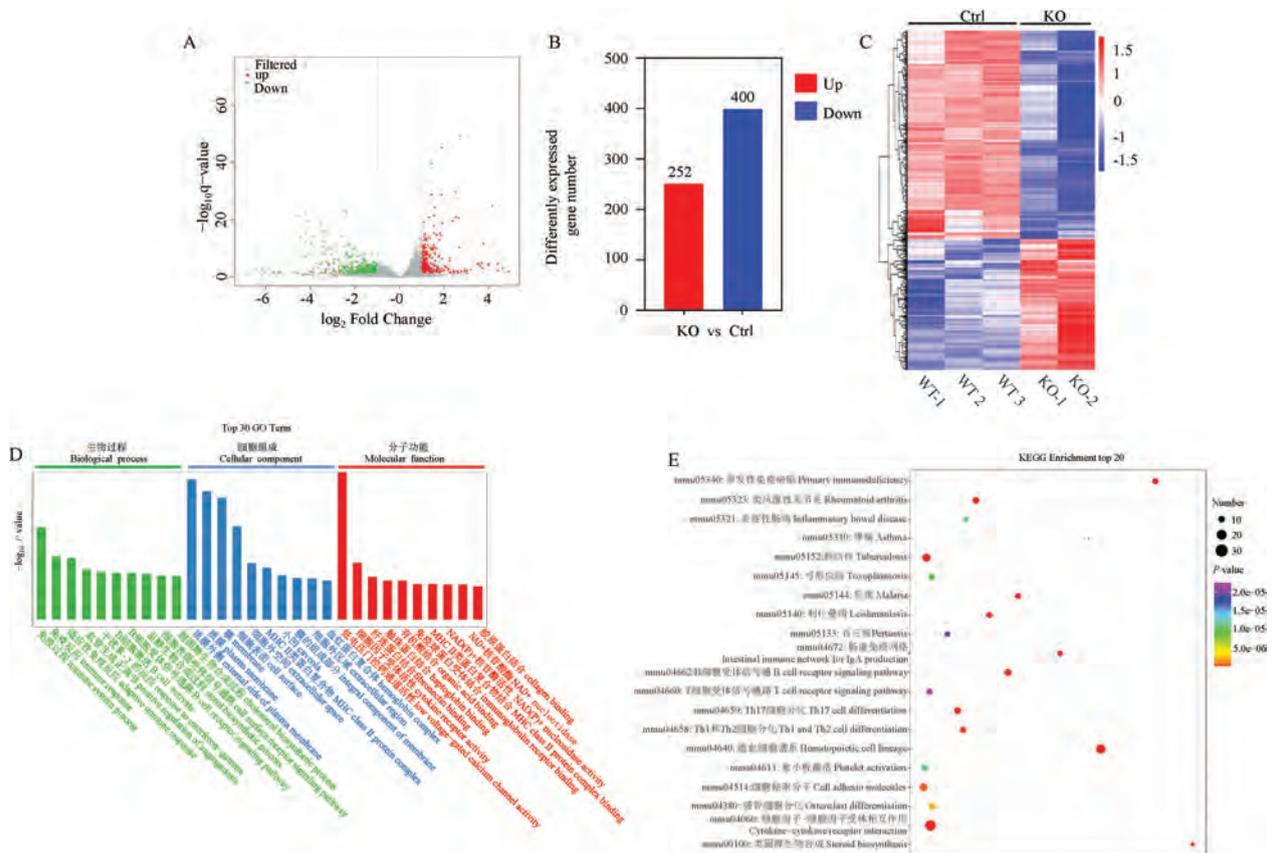
## 2.2 *Marcks1* 基因敲除 KSL 细胞的表达差异分析

为进一步确定 *Marcks1* 缺失导致的基因表达图谱的改变以及可能涉及的信号通路,我们对 *Marcks1* 基因敲除和对照小鼠的 KSL 细胞收集并进行转录组测序分析,结果分析显示存在 652 个差异表达基因( $P < 0.05$ , Fold change  $\geq 2$ ) (图 2A),其中 252 个上调基因,400 个下调基因(图 2B、2C)。随后,我们进行了差异基因的 GO (Gene Ontology) 富集分析(list hits  $\geq 2$ ),结果显示差异表达基因主要集中在免疫应答、质膜、低压门钙离子通道活性等相关基因(图 2D)。KEGG 富集分析结果显示,基因表达差异主要富集在造血谱系分化和细胞因子受体

互作等相关信号通路(图 2E)。

## 2.3 建立造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠

由于 *Marcks1* 敲除会导致胚胎死亡,难以研究该基因的成年生物学功能。如图 3,为研究成年 *Marcks1* 基因功能或特定组织器官中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcks1* 条件敲除小鼠,构建策略如图 3A 所示。对新出生小鼠进行基因型鉴定(图 3B)和 Sanger 测序(图 3C),结果表明我们成功建立了 *Marcks1* 条件敲除小鼠。将构建的 *Marcks1* 条件敲除小鼠与 *Vav1-Cre* 工具小鼠杂交(图 3D),建立造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠(*Marcks1*<sup>fl/fl</sup>/*Vav1*, *Marcks1* cKO 小鼠),基因型鉴定结果(图 3E)和 Cre 介导的 *loxP* 序列之间的重组测序图(图 3F),表明在目标组织中可以实现 *Marcks1* 基因的敲除。利用 Real-time PCR 分析小鼠骨髓细

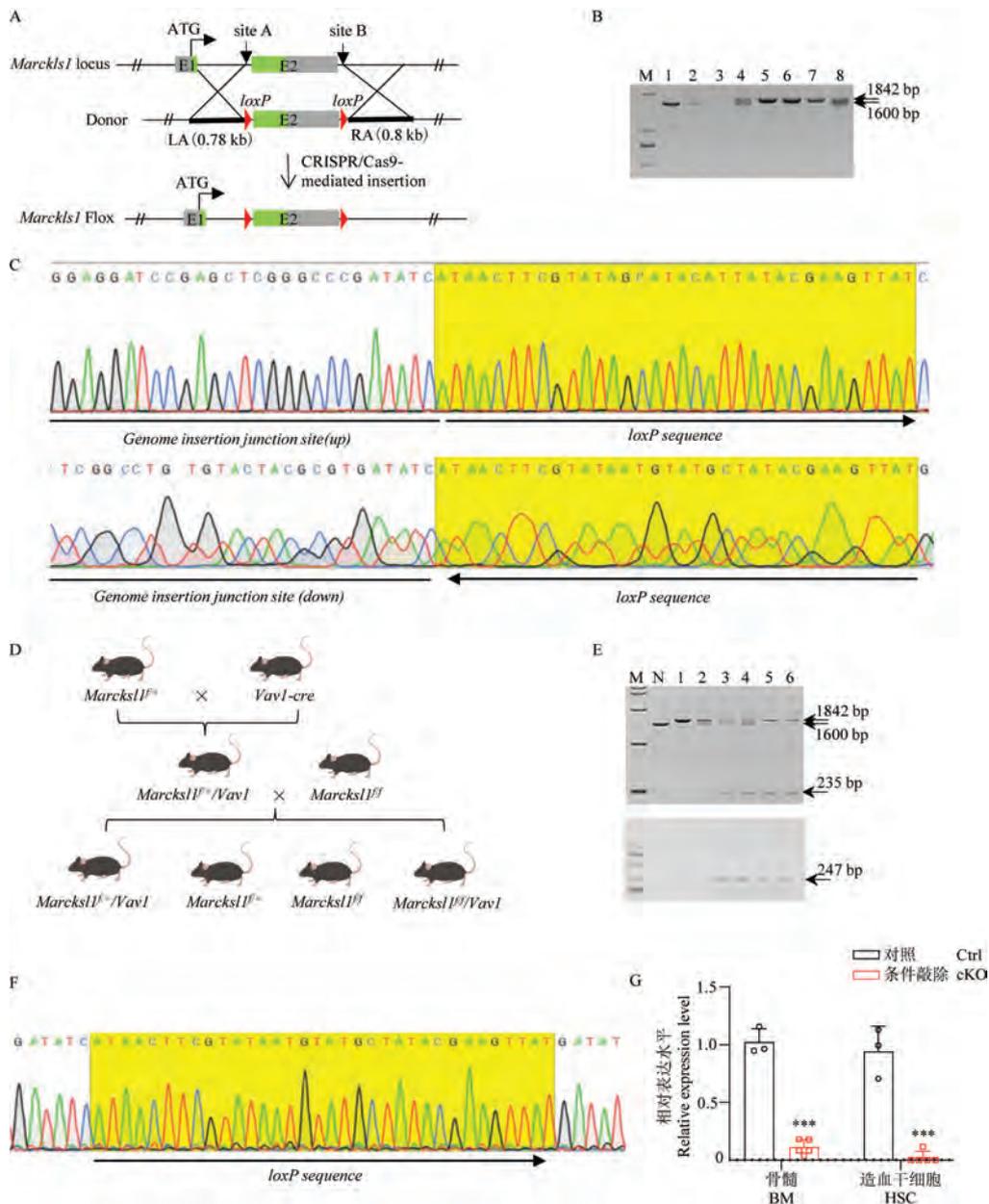


注: A: 差异表达基因火山图; B: 差异表达基因的数量; C: 热图显示差异表达基因; D: GO 富集分析差异表达基因; E: 针对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析。

图 2 *Marcks1* 敲除小鼠 KSL 细胞的差异表达基因富集分析

Note. A, Volcano map of differentially expressed genes. B, Number of differentially expressed genes. C, Heat map of differentially expressed genes. D, GO (Gene Ontology) enrichment analysis of differentially expressed genes. E, Enrichment analysis of differentially expressed genes using KEGG signaling pathway.

Figure 2 Enrichment analysis of differentially expressed genes in KSL cells of *Marcks1* knockout mice



注:A:利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Marcks1* 条件敲除小鼠策略图;B:*Marcks1* 条件敲除小鼠基因型鉴定的 PCR 产物电泳图;M 为 Marker DL2000,1,2 为 WT,3,5,6,7 为 *Marcks1*<sup>f/f</sup>,4,8 为 *Marcks1*<sup>f/+</sup>;C:*Marcks1* 插入 loxP 片段的测序结果图;D:造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠的获得过程;E:造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠的基因型鉴定 PCR 产物电泳图;M 为 Marker DL15000;N 为阴性对照,1 为 *Marcks1*<sup>f/f</sup>;2 为 *Marcks1*<sup>f/+</sup>;3,4 为 *Marcks1*<sup>f/+</sup>/*Vav1*;5,6 为 *Marcks1*<sup>f/f</sup>/*Vav1*;F:*Marcks1* 敲除片段的测序结果图;G:*Marcks1*<sup>f/f</sup>/*Vav1* 小鼠骨髓细胞和造血干细胞中 *Marcks1* mRNA 的相对表达水平( $n \geq 3$ )。与对照组相比,\*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 3 建立造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠

Note. A, Strategy map of *Marcks1* conditional knockout mice was constructed using CRISPR/Cas9 technique. B, Electrophoresis of PCR products identified by *Marcks1* conditional knockout mice genotype. M, Marker DL2000. 1, 2, WT. 3, 5, 6, 7, *Marcks1*<sup>f/f</sup>. 4, 8, *Marcks1*<sup>f/+</sup>. C, Sequencing result diagram of *Marcks1* inserted loxP fragment. D, Acquisition process of hematopoietic system-specific *Marcks1* knockout mice. E, Electrophoresis of PCR products identified by hematopoietic system-specific *Marcks1* knockout mice genotype. M, Marker DL15000. N, Negative control. 1, *Marcks1*<sup>f/f</sup>. 2, *Marcks1*<sup>f/+</sup>. 3, 4, *Marcks1*<sup>f/+</sup>/*Vav1*. 5, 6, *Marcks1*<sup>f/f</sup>/*Vav1*. F, Sequencing result of *Marcks1* knockout fragment. G, Relative expression level of *Marcks1* mRNA in mice bone marrow cells and hematopoietic stem cells. Compared with Ctrl group, \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 3 Establish hematopoietic system specific *Marcks1* knockout mice

胞和造血干细胞中的表达情况,结果进一步显示我们成功敲除了 *Marcks11* 基因(图 3G)。综上,我们成功建立造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠。

## 2.4 *Marcks11* 造血系统特异性敲除不影响生殖

对 *Marcks11* 条件敲除小鼠的出生情况进行统计分析,76 只子代小鼠的基因型统计结果显示子代小鼠的出生率符合孟德尔遗传规律(表 4),表明 *Marcks11* 造血系统特异性敲除不会影响生殖。

## 2.5 *Marcks11* 敲除不影响成年造血

为了解 *Marcks11* 缺失对成年小鼠造血的影响,我们通过流氏分析了 2 月龄对照组 *Marcks11<sup>f/f</sup>* 小鼠和敲除组 *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* 小鼠外周血细胞、骨髓细胞、脾细胞和胸腺细胞的占比。结果显示,与对照组相比,敲除小鼠在造血干细胞、造血干/祖细胞以及成熟功能细胞方面均无明显变化(图 4、图 5)。上述结果表明 *Marcks11* 造血特异性敲除不影响成年造血。

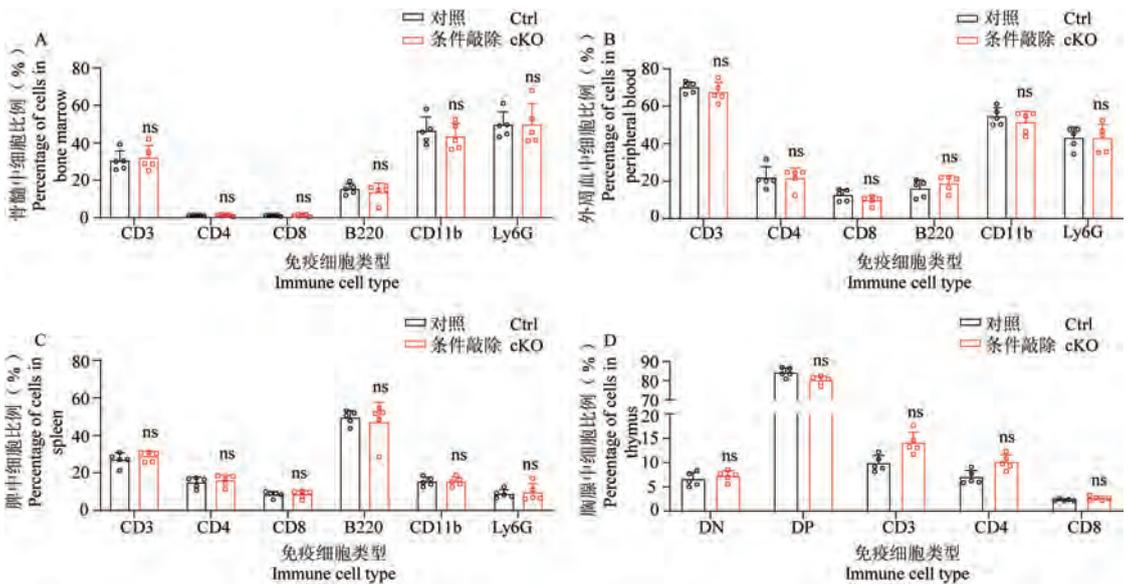
## 2.6 *Marcks11* 敲除影响成年小鼠的造血重建能力

随后,我们分析了 *Marcks11* 敲除对成年造血重建能力的影响,通过对 2 月龄小鼠进行竞争性骨髓移植实验,流程如图 6A 所示。结果显示移植后 1 个月受体小鼠的嵌合率达到 90% 以上,表明移植成功(图 6B)。对移植后外周血中的 T 细胞、B 细胞和髓系细胞进行占比分析,结果显示 cKO 组相较于对照组,T 细胞(图 6C)、B 细胞(图 6D)和髓系细胞(图 6E)的比例显著提高。上述结果表明,*Marcks11* 敲除影响成年造血重建能力。

表 4 *Marcks11* 基因条件性敲除小鼠的出生率

Table 4 Birth rate of *Marcks11* gene conditional knockout mice

基因型	出生率
Genotype	Birth rate
<i>Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1</i>	21/76(28%)
<i>Marcks11<sup>f/f</sup></i>	17/76(22%)
<i>Marcks11<sup>f/f</sup></i>	18/76(24%)
<i>Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1</i>	20/76(26%)

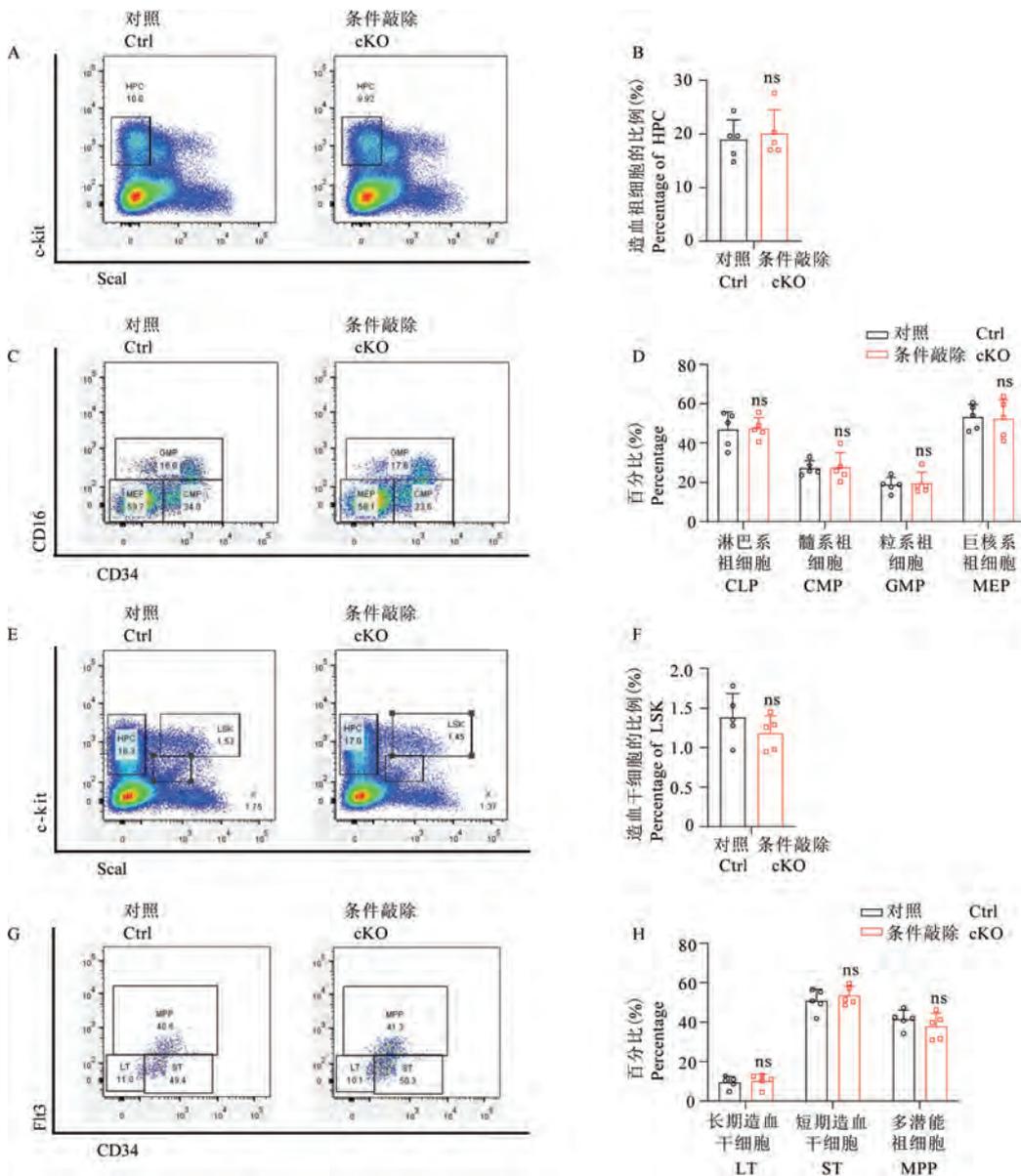


注:A:2月龄 *Marcks11<sup>f/f</sup>* 和 *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* 小鼠骨髓中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;B:2月龄 *Marcks11<sup>f/f</sup>* 和 *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* 小鼠外周血中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;C:2月龄 *Marcks11<sup>f/f</sup>* 和 *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* 小鼠脾中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;D:2月龄 *Marcks11<sup>f/f</sup>* 和 *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* 小鼠胸腺中 T 细胞的比例。CD3:CD3<sup>+</sup>T 细胞;CD4:CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞;CD8:CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞;B220:B 细胞;CD11b 为髓系细胞;Ly6G:粒细胞;DN:CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>双阴性细胞;DP:CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>双阳性细胞。

图 4 *Marcks11* 缺失不影响稳态条件下免疫细胞的比例( $n=5$ )

Note. A, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in bone marrow of 2-month-old *Marcks11<sup>f/f</sup>* and *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* mice. B, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in peripheral blood of 2-month-old *Marcks11<sup>f/f</sup>* and *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* mice. C, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in spleen of 2-month-old *Marcks11<sup>f/f</sup>* and *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* mice. D, Percentage of T cells in thymus of 2-month-old *Marcks11<sup>f/f</sup>* and *Marcks11<sup>f/f</sup>/Vav1* mice. CD3, CD3<sup>+</sup>T cells. CD4, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells. CD8, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells. B220, B cells. CD11b, myeloid cells. Ly6G, granulocytes. DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative cells. DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive cells.

Figure 4 *Marcks11* deletion has no effect on the percentage of immune cells under steady-state conditions

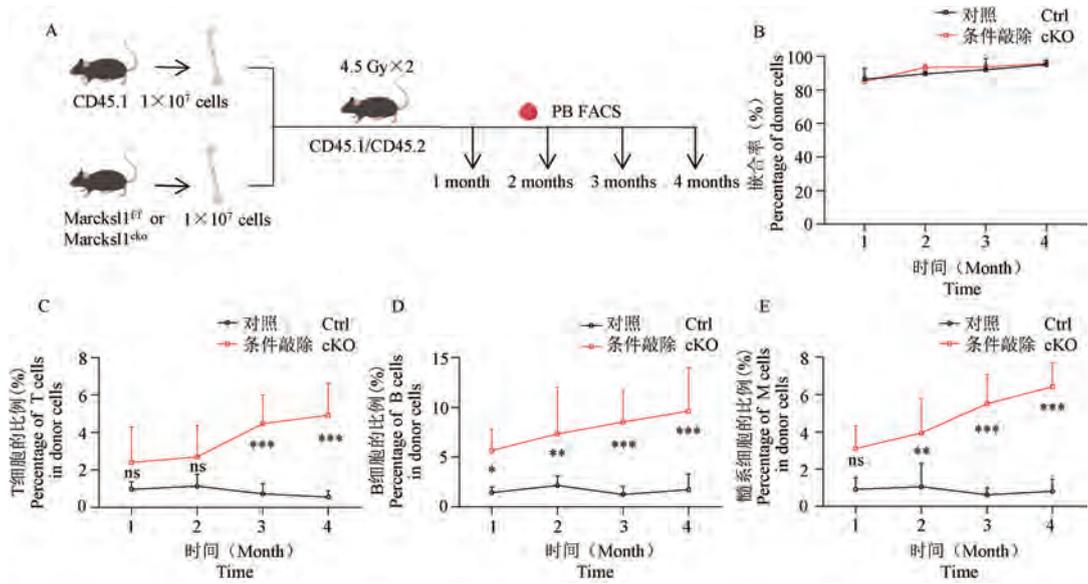


注:A:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓造血祖细胞的代表性流式散点图;B:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓造血祖细胞的比例;C:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓中髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的代表性流式散点图;D:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓中淋巴系祖细胞、髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的比例;E:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓造血干细胞的代表性流式散点图;F:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓造血干细胞的比例;G:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的代表性流式散点图;H:2月龄 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* 和 *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* 小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的比例。

图5 *Marcks1* 缺失不影响稳态条件下造血干/祖细胞的比例 (n=5)

Note. A, Representative flow scatter diagram of hematopoietic progenitor cells in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. B, Percentage of hematopoietic progenitor cells in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. C, Representative flow scatter diagram of CMP, GMP, MEP in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. D, Percentage of CLP, CMP, GMP, MEP in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. E, Representative flow scatter diagram of hematopoietic stem cells in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. F, Percentage of hematopoietic stem cells in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. G, Representative flow scatter diagram of LT, ST, MPP in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice. H, Percentage of LT, ST, MPP in bone marrow of 2-month-old *Marcks1<sup>fl/fl</sup>* and *Marcks1<sup>fl/fl</sup>/Vav1* mice.

Figure 5 *Marcks1* deletion has no effect on the percentage of hematopoietic stem/progenitor cells under steady-state conditions



注:A:小鼠竞争性骨髓移植流程图;B:受体小鼠移植细胞嵌合率分析;C:来自于供体小鼠的T淋巴细胞在受体小鼠中的占比分析;D:受体小鼠外周血中供体来源B淋巴细胞的比例;E:受体小鼠外周血中供体来源髓系细胞的比例。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图6 *Marcks1* 敲除对成年造血干细胞造血重建能力的影响( $n \geq 3$ )

Note. A, Competitive bone marrow transplantation diagram. B, Percentage of donor cells in peripheral blood of recipient mice. C, Percentage of donor-derived T cells in peripheral blood of recipient mice. D, Percentage of donor-derived B cells in peripheral blood of recipient mice. E, Percentage of donor-derived M cells in peripheral blood of recipient mice. Compared with Ctrl group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 6 Effect of *Marcks1* knockout on hematopoietic reconstructive ability of hematopoietic stem cells

### 3 讨论

MARCKSL1 在多种组织器官中高表达,并参与神经系统发育<sup>[12-13,18-19]</sup>、血管形成<sup>[14-15]</sup>以及肿瘤生长迁移<sup>[20-21]</sup>等多种生理、病理过程。MARCKSL1 参与神经发育过程,MARCKSL1 缺失会导致小鼠神经管闭合不全影响大脑发育,最终导致胚胎发育终止<sup>[13]</sup>。此外,MARCKSL1 还在内皮细胞中富集表达,当 MARCKSL1 的 ED 结构域被 Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化时,MARCKSL1 通过与 F-肌动蛋白结合,来调节内皮细胞的大小和形状影响血管直径进而影响血管生成<sup>[14]</sup>。也有报道 MARCKSL1 在多种实体肿瘤中异常表达,调节肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭过程<sup>[22]</sup>,如 MARCKSL1 在食管鳞癌中高表达,通过与 F-肌动蛋白相互作用促进侵袭性伪足形成和细胞外基质降解,调节肿瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[23]</sup>。MARCKSL1 在肺腺癌中表达上调,通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进上皮间充质转化调节癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[24-25]</sup>。尽管已有的研究发现了一些 MARCKSL1 重要生理和病理功能,但是 MARCKSL1 在不同组织、器官中的功能研究仍处于初步阶段,非常重要的一个原因是由于该基因敲除

会导致胚胎发育后期死亡,难以研究该基因在成年以及不同组织器官中的功能。

MARCKSL1 在介导炎症反应、调节免疫应答中发挥重要作用,与造血系统调控密切相关。在前期工作中,我们通过分析 MARCKSL1 的表达图谱,发现该基因在造血干细胞中高表达,且表达与年龄呈正相关。初步的结果显示 *Marcks1* 基因缺失影响胎肝中造血干细胞的比例<sup>[17]</sup>,这提示 MARCKSL1 可能与造血过程密切相关。本研究中,我们基于前期建立的 *Marcks1* 敲除小鼠,进一步分析该基因缺失对胎肝造血重建的影响,结果表明,*Marcks1* 缺失影响造血重建过程,导致 B 细胞占比下降、髓系细胞占比升高,发生分化偏移。为深入探究其内在机制,我们对获得的 KSL 细胞进行表达差异分析,发现 *Marcks1* 基因缺失主要影响造血谱系分化和细胞因子互作相关的信号通路,这也可能是导致造血重建过程中发生分化偏移的重要原因。由于该基因敲除会导致小鼠胚胎发育后期死亡<sup>[17]</sup>,限制了该基因的成年以及组织细胞特异性功能研究。为此,我们通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Marcks1* 条件敲除小鼠,通过与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血特异性 *Marcks1* 敲除小鼠,通过出生小鼠的基因型分析,

发现 *Marcks1* 造血特异性敲除不影响生殖。随后我们分析了成年阶段造血干细胞分化发育不同阶段细胞的占比,发现 *Marcks1* 缺失不影响成年造血。但成年竞争性骨髓移植实验,发现 *Marcks1* 缺失影响造血重建过程,并导致 T 细胞、B 细胞和髓系细胞的比例升高,是否也是通过影响造血谱系分化和细胞因子互作相关的信号通路,来影响造血重建过程,仍需要进一步研究证实。我们以 *Marcks1* 系统敲除和造血系统特异性敲除小鼠为基础,探讨了 *Marcks1* 在稳态造血和造血重建中发挥的作用,有助于我们深入了解造血发育过程和造血调控网络,也有助于造血系统疾病的诊断、治疗和病因分析等。

综上,通过本研究,我们建立了 *Marcks1* 造血系统特异性敲除小鼠,结合全身敲除小鼠模型,初步确定了该基因缺失,不影响成年稳态造血,但会影响造血重建过程, MARCKSL1 可能通过影响造血谱系分化和细胞因子受体互作等信号通路,影响造血重建过程,但具体机制仍需进一步研究证实,以上结果表明了 *Marcks1* 在造血过程中发挥一定作用,提示我们 MARCKSL1 可能成为潜在的造血调控分子或造血系统疾病的治疗靶点。我们的工作为 *Marcks1* 基因的成体造血功能研究,以及该基因的组织器官特异性功能研究提供了重要的动物模型。在之后的研究中我们可以以 *Marcks1* 造血系统特异性敲除小鼠为基础,构建血液系统疾病模型,比如 MLL-AF9 急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 模型,以此来探究 MARCKSL1 影响 AML 发展的分子机制,为通过 MARCKSL1 治疗 AML 提供理论依据和可行性。

#### 参考文献:

[ 1 ] Orkin SH. Hematopoiesis: how does it happen? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7(6): 870-877.

[ 2 ] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology [J]. *Cell*, 2008, 132(4): 631-644.

[ 3 ] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages [J]. *Nature*, 2000, 404(6774): 193-197.

[ 4 ] Wang Z, Ema H. Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells [J]. *Int J Hematol*, 2016, 103(5): 498-509.

[ 5 ] Goyama S, Kitamura T. Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: an overview and update 2017 [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(4): 553-562.

[ 6 ] Asada S, Kitamura T. Clonal hematopoiesis and associated diseases: a review of recent findings [J]. *Cancer Sci*, 2021,

112(10): 3962-3971.

[ 7 ] Jiang P, Wang H, Zheng J, et al. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell homeostasis [J]. *Blood Sci*, 2019, 1(1): 19-28.

[ 8 ] El Amri M, Fitzgerald U, Schlosser G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 43.

[ 9 ] Chen Z, Zhang W, Selmi C, et al. The myristoylated alanine-rich C-kinase substrates (MARCKS): a membrane-anchored mediator of the cell function [J]. *Autoimmun Rev*, 2021, 20(11): 102942.

[ 10 ] McLaughlin S, Aderem A. The myristoyl-electrostatic switch; a modulator of reversible protein-membrane interactions [J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(7): 272-276.

[ 11 ] Li J, Aderem A. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates [J]. *Cell*, 1992, 70(5): 791-801.

[ 12 ] Wu M, Chen DF, Sasaoka T, et al. Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5): 2110-2115.

[ 13 ] Chen J, Chang S, Duncan SA, et al. Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(13): 6275-6279.

[ 14 ] Kondrychyn I, Kelly DJ, Carretero NT, et al. *Marcks1* modulates endothelial cell mechanoreponse to haemodynamic forces to control blood vessel shape and size [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5476.

[ 15 ] Kim BR, Lee SH, Park MS, et al. MARCKSL1 exhibits anti-angiogenic effects through suppression of VEGFR-2-dependent Akt/PDK-1/mTOR phosphorylation [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 1041-1048.

[ 16 ] Green TD, Crews AL, Park J, et al. Regulation of mucin secretion and inflammation in asthma: a role for MARCKS protein? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810(11): 1110-1113.

[ 17 ] 李博, 高丽娟, 于磊, 等. *Marcks1* 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(5): 108-114.

[ 18 ] Tanaka T, Shimizu S, Ueno M, et al. MARCKSL1 regulates spine formation in the amygdala and controls the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anxiety-like behaviors [J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 62-73.

[ 19 ] Prieto D, Zolessi FR. Functional diversification of the four MARCKS family members in zebrafish neural development [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2017, 328(1/2): 119-138.

[ 20 ] Björklom B, Padzik A, Mohammad H, et al. C-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(17): 3513-3526.

严威, 靳情, 孙锐, 等. LINC00662 通过 miR-144/COX-2 调控胶质瘤细胞替莫唑胺耐药性的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 46-53.

Yan W, Jin Q, Sun R, et al. Mechanism of LINC00662 regulating temozolomide resistance of glioma cells via miR-144/COX-2 signaling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 46-53.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.006

# LINC00662 通过 miR-144/COX-2 调控胶质瘤细胞替莫唑胺耐药性的作用研究

严威<sup>1</sup>, 靳情<sup>2</sup>, 孙锐<sup>3</sup>, 水波<sup>4</sup>, 余涵<sup>1\*</sup>, 段鹏<sup>1\*</sup>

(1.湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院,湖北 襄阳 441000;2.襄阳市中医医院,湖北 襄阳 441000;  
3.武汉市第四医院,武汉 430033;4.襄阳市中心血站,湖北 襄阳 441000)

**【摘要】** 目的 探究 LINC00662 通过 miR-144/COX-2 轴调节胶质瘤细胞耐药性的机制。方法 qRT-PCR 检测胶质瘤组织和癌旁正常组织、U251 细胞和 U251/替莫唑胺(TMZ)细胞中 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 表达水平;双荧光素酶报告系统评估 LINC00662、miR-144 和 COX-2 的调控关系。设置空白对照组、敲低 LINC00662 阴性对照(si-NC)组、敲低 LINC00662 组、同时敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。CCK-8 和 Edu 法分析细胞增殖情况;流式细胞术定量检测细胞凋亡;Western blot 分析靶蛋白表达水平。**结果** 与癌旁正常组织相比,胶质瘤组织中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达显著上调,miR-144 表达下调( $P<0.05$ );与 U251 细胞相比,U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达显著上调,miR-144 表达下调( $P<0.05$ )。双荧光素酶报告实验证实 LINC00662 靶向结合 miR-144,miR-144 靶向结合 COX-2。与 si-NC 组相比,敲低 LINC00662 组 U251/TMZ 细胞增殖能力显著降低,凋亡率升高( $P<0.05$ );COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白显著下调,Bax 蛋白上调( $P<0.05$ );抑制 miR-144 表达可在一定程度上逆转 LINC00662 敲低对 U251/TMZ 细胞增殖、凋亡的影响( $P<0.05$ )。**结论** LINC00662 通过 miR-144/COX-2 信号可调节胶质瘤细胞增殖、凋亡,改变胶质瘤细胞 TMZ 耐药性。

**【关键词】** 胶质瘤细胞;LINC00662;miR-144;COX-2;替莫唑胺耐药性

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0046-08

## Mechanism of LINC00662 regulating temozolomide resistance of glioma cells via miR-144/COX-2 signaling

YAN Wei<sup>1</sup>, JIN Qing<sup>2</sup>, SUN Rui<sup>3</sup>, SHUI Bo<sup>4</sup>, YU Han<sup>1\*</sup>, DUAN Peng<sup>1\*</sup>

(1. Xiangyang First People's Hospital affiliated to Hubei Medical College, Xiangyang 441000, China.

2. Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang 441000. 3. Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430033.

4. Xiangyang Blood center, Xiangyang 441000)

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of LINC00662 in regulation of temozolomide resistance of glioma cells through miR-144/COX-2 signaling. **Methods** qRT-PCR were used to measure the mRNA expression levels of

**【基金项目】**湖北省教育厅项目(Q20212105);襄阳市科学技术局项目(2021YL29,2021ZD12);襄阳市第一人民医院科技创新项目(XYY2021M02,XYY2021Q05)。

**【作者简介】**严威(1982—),男,硕士,主管检验师,研究方向:临床检验和输血。E-mail:a249788411@163.com

**【通信作者】**余涵(1989—),男,博士,主治医师,研究方向:肿瘤发生机制及治疗。E-mail:yuhanqh@163.com

段鹏(1985—),男,博士,副教授,研究方向:细胞生物学。E-mail:meduanpeng@163.com

\* 共同通信作者

LINC00662, miR-144, and COX-2 in glioma tissues, normal tissue adjacent to cancer, U251 cells, and U251/temozolomide (TMZ) cells. The dual-luciferase reporter system were used to assess the regulatory relationship of LINC00662, miR-144, and COX-2. The five groups were a blank control, knockdown LINC00662 negative control (si-NC), knockdown LINC00662, and simultaneous knockdown of LINC00662 and inhibition of miR-144 expression. Cell proliferation were analyzed by CCK-8 and Edu assays. Apoptosis was evaluated by flow cytometry. Expression levels of target proteins were analyzed by Western blot. **Results** Compared with adjacent normal tissue, the mRNA expression levels of LINC00662 and COX-2 were significantly upregulated and the expression level of miR-144 was downregulated in glioma tissues ( $P < 0.05$ ). Compared with U251 cells, the mRNA expression levels of LINC00662 and COX-2 were significantly upregulated and the expression level of miR-144 was downregulated in U251/TMZ cells. Dual-luciferase reporter assays showed that LINC00662 targeted miR-144, and miR-144 targeted COX-2. Compared with the si-NC group, cell proliferation of the knockdown LINC00662 group was significantly decreased, the apoptosis rate of the knockdown LINC00662 group was increased ( $P < 0.05$ ), COX-2, PCNA, MRP1 and Bcl-2 protein expression levels in the knockdown LINC00662 group were significantly downregulated, and the Bax protein expression level in the knockdown LINC00662 group was upregulated ( $P < 0.05$ ). Inhibiting miR-144 expression reversed the effects of LINC00662 knockdown on U251/TMZ cell proliferation and apoptosis ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LINC00662 regulates the proliferation and apoptosis of glioma cells through miR-144/COX-2 signaling and is closely related to temozolomide resistance of glioblastoma cells.

**【Keywords】** glioma cells; LINC00662; miR-144; COX-2; temozolomide resistance

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

胶质瘤是成人中最具侵袭性的原发性脑肿瘤之一,具有广泛的侵袭性和对传统治疗的抵抗力<sup>[1]</sup>。目前,手术切除后基于替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 的化疗是胶质瘤患者最常用的治疗策略之一,而对 TMZ 产生耐药性是目前胶质瘤治疗的主要障碍<sup>[2]</sup>。因此,阐明 TMZ 抗性的分子机制可为胶质瘤治疗提供潜在新分子靶点。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子,无编码功能性蛋白质能力<sup>[3]</sup>。最近,一些证据表明, lncRNA 在胶质瘤发生发展中发挥重要作用,如 lncRNA HOXA-AS3 在胶质瘤细胞中显著高表达,且与不良预后相关<sup>[4]</sup>; lnc-TALC 可改善胶质瘤细胞对 TMZ 的耐药性<sup>[5]</sup>。基于 lncRNA 的基因组特征可为胶质瘤 TMZ 抗性提供治疗策略。相关研究发现 LINC00662 在胶质瘤中充当致癌基因,与预后相关,可加速肿瘤细胞的生长<sup>[6-7]</sup>。然而,关于 LINC00662 是否介导胶质瘤中的 TMZ 抗性机制仍未可知。

近期研究表明, lncRNA 通过调控微小 RNA (microRNA, miRNA) 和靶基因来调控肿瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。且已有研究证实, miR-144 可通过靶向调控靶基因抑制胶质瘤进展,并提高对 TMZ 的敏感性<sup>[9]</sup>。此外,环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2, 又称 PTGS2) 是一种炎症相关酶,与胶质瘤的发生发展相关<sup>[10]</sup>。Yao 等<sup>[11]</sup>报道 COX-2 是 miR-144 下

游靶基因,在胃癌中发挥促癌作用。因此,本研究通过探讨 LINC00662 是否通过调控 miR-144/COX-2 轴调节胶质瘤细胞 TMZ 耐药性,以期为胶质瘤的治疗提供新的见解。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 临床组织

本研究一共收集 30 份人胶质瘤组织样本及癌旁正常组织样本 (均采集同一患者),其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 35~55 岁。患者于 2018 年 3 月~2020 年 12 月期间接受手术并签署知情同意书。手术切除后立即将样品冷冻在液氮中。本研究经湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院伦理委员会批准 (XYYYE20220012)。

#### 1.1.2 细胞

U251 细胞、U251/TMZ 细胞购自厦门 IMMOCELL,货号:IM-H421、IMD-007。

### 1.2 主要试剂与仪器

Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 购自赛默飞世尔科技有限公司,货号:30030; TRIzol 提取试剂、Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen,货号:15596018、11668027; One Step PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa,货号:RR064B; CCK-8 细胞增殖检测试剂盒和双荧光素酶报告基因检测试

剂盒购自南京 Vazyme, 货号: A311-01 和 DD1205-01; Annexin V-Alexa Fluor 488/碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自上海 YEASEN, 货号: 40305ES20; Click-iK Edu 试剂盒 (红色荧光) 购自北京 Biorigin, 货号: BN16017; 高效 RIPA 裂解液购自北京 BIOSIC, 货号: EX6010; 一抗 COX-2、多药耐药相关蛋白 1 (multidrug resistance-related protein 1, MRP1)、PCNA、Bax、Bcl-2 和 GAPDH 均购自英国 Abcam, 货号: ab179800、ab233383、ab18197、ab182734、ab182858 和 ab9485。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养

U251 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM, 于 37°C、含 5% CO<sub>2</sub> 的增湿培养箱中培养。U251/TMZ 细胞根据说明书在以上培养条件基础上, 添加 TMZ 16 μg/mL 培养。

#### 1.3.2 细胞分组

以 U251/TMZ 细胞为研究对象, 设置空白对照 (Control) 组、敲低 LINC00662 阴性对照 (si-NC) 组、敲低 LINC00662 (si-LINC00662) 组、敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照 (si-LINC00662 + miR-NC inhibitor) 组、敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达 (si-LINC00662 + miR-144 inhibitor) 组。Control 组正常培养; si-NC 组转染 si-NC; si-LINC00662 组转染 si-LINC00662; si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组转染 si-LINC00662 和 miR-NC inhibitor; si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组转染 si-LINC00662 和 miR-144 inhibitor。均按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂方法操作, 转染后培养 48 h。

#### 1.3.3 qRT-PCR 检测组织和细胞中靶分子表达水平

用 TRIzol 提取来自以上各组织和细胞的总 RNA, 并将总 RNA 逆转录为 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 添加相应的引物和荧光定量试剂盒的试剂进行 qRT-PCR 检测, 使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因相对表达水平。U6 和 GAPDH 用于标准化 miR-144、LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达。

引物序列如下: LINC00662 (正向: 5'-TGGACATCTGTCTGGAGG-3', 反向: 5'-GGCTGAGGCATAAGAATCG-3'); miR-144 (正向: 5'-GCCCTACAGTATAGATGATGTA-3', 反向: 5'-GTGCAGGTCGAGGT-3'); COX-2 mRNA (正向: 5'-TCGCTGTGCCTGATGATTG-3', 反向: 5'-

TCGCTTATGATCTGTCTTG-3'); GAPDH (正向: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反向: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCACT-3'); U6 (正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向: 5'-AACGCTTTCACGAATTTGCCGT-3')。

#### 1.3.4 双荧光素酶报告基因检测

StarBase v3.0 用于预测 LINC00662 与 miR-144 的结合位点, Target Scan7.2 用于预测 miR-144 与 COX-2 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3' UTR) 之间的互补序列。将 miR-144 和 LINC00662 或 COX-2 之间的共同片段克隆并插入到 pmirGLO 报告载体中, 形成 WT-LINC00662 和 WT-COX-2。以相同的方式构建相对突变体 MUT-LINC00662 和 MUT-COX-2。报告基因分别与 miR-144 mimic 或 miR-NC mimic 共转染 U251/TMZ 细胞, 利用双荧光素酶报告基因检测试剂盒评估荧光素酶活性。

#### 1.3.5 CCK-8 检测各组 U251/TMZ 细胞增殖活力

将稳定转染的各组细胞接种到 96 孔板中, 培养 24 h 后, 与含 10% CCK-8 新鲜培养基溶液共同孵育 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值 (A 值)。

#### 1.3.6 Edu 检测各组 U251/TMZ 细胞增殖情况

将上述转染后的各组细胞接种到 24 孔板中, 培养 24 h 后, 每孔中添加 10 μmol Edu 溶液, 再次培养 2 h 后 4% 甲醛固定 30 min, 随后将细胞用 Hoechst 33342 染色 30 min, 具体操作方法参照 Click-iT Edu 试剂盒说明书。使用荧光显微镜进行观察, Image-Pro Plus 软件对 Edu 阳性细胞 (红色细胞) 进行计数。Edu 阳性细胞率 = Edu 阳性细胞与总 Hoechst 33342 阳性细胞 (蓝色细胞) 的比率。

#### 1.3.7 流式细胞仪检测各组 U251/TMZ 细胞凋亡

收集按照上述方法转染的各组细胞, 根据 Annexin V-Alexa Fluor 488/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行 Annexin V-Alexa Fluor 488 和 PI 染色, 通过 FACS 细胞术分析细胞凋亡率。

#### 1.3.8 Western blot 检测各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平

使用含有蛋白酶体抑制剂的 RIPA 裂解液在冰上提取按照上述方法培养的各组细胞总蛋白。将蛋白通过 10% SDS-PAGE 电泳分离并转移到 PVDF 膜上。在室温下使用含有 0.1% Tween-20 的 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 然后使用 COX-2、MRP1、PCNA、Bax 和 Bcl-2 特异性一抗 4°C 过夜孵育。洗膜后使用 HRP 标记的 IgG 二抗孵育 2 h, 随后通过化学发光

观察。通过 Image J 软件分析蛋白表达并标准化为 GAPDH。

### 1.4 统计学方法

数值变量资料统计描述为平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。使用单因素方差分析或 *t* 检验进行统计学分析。以双侧  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。所有统计分析均使用 SPSS 25.0 软件。

## 2 结果

### 2.1 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在胶质瘤组织中的表达水平

与癌旁正常组织比较,胶质瘤组织中 LINC00662 水平和 COX-2 mRNA 表达均明显升高,miR-144 表达均降低( $P < 0.05$ ) (见表 1)。

### 2.2 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在靶细胞中表达的水平

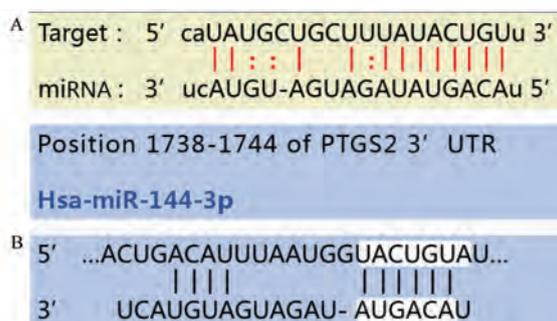
与 U251 细胞比较,U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达均显著升高,miR-144 表达水平降低( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

### 2.3 细胞中 LINC00662、miR-144 和 COX-2 之间的调控关系

通过网站预测发现,LINC00662 与 miR-144 之间、miR-144 和 COX-2 的 3' UTR 之间存在结合位点(见图 1)。双荧光素酶实验结果显示,与 miR-NC mimic 和 WT-LINC00662 共转染的细胞比较,miR-144 mimic 和 WT-LINC00662 共转染到细胞中可显

著降低相对荧光素酶活性( $P < 0.05$ );此外,与 miR-NC mimic 和 WT-COX-2 共转染的细胞比较,miR-144 mimic 和 WT-COX-2 共转染到细胞中可显著降低相对荧光素酶活性( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

与 si-NC 组比较,si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞中 LINC00662 和 COX-2 mRNA 表达明显降低,miR-144 表达增高( $P < 0.05$ )。与 si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组比较,si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 LINC00662 表达水平无显著变化( $P > 0.05$ ),miR-144 表达降低( $P < 0.05$ ),COX-2 mRNA 表达增高( $P < 0.05$ ) (见表 4)。



注:A:LINC00662 与 miR-144 的结合位点预测;B:miR-144 与 COX-2 的结合位点预测。

图 1 结合位点的预测

Note. A, Putative binding sites of VLINC00662 and miR-144. B, Putative binding sites of miR-144 and COX-2.

Figure 1 Predicted binding sites

表 1 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在组织中的表达水平( $n = 30$ )

Table 1 Expression level of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in tissues

组织 Tissues	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
癌旁正常组织 Normal tissues adjacent to cancer	1.00±0.08	1.03±0.09	1.04±0.11
胶质瘤组织 Glioma tissues	3.15±0.30*	0.36±0.04*	2.94±0.25*

注:与癌旁正常组织相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal tissues adjacent to cancer, \* $P < 0.05$ .

表 2 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在细胞中的表达水平( $n = 3$ )

Table 2 Expression level of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in cells

细胞 Cells	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
U251	1.04±0.12	1.08±0.15	1.06±0.13
U251/TMZ	3.09±0.33*	0.42±0.05*	2.88±0.27*

注:与 U251 相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with U251, \* $P < 0.05$ .

表 3 双荧光素酶活性测定分析 LINC00662 与 miR-144、miR-144 与 COX-2 之间的关系( $n = 3$ )

Table 3 Analysis of the relationship between LINC00662 and miR-144, miR-144 and COX-2 by double luciferase activity assay

组别 Groups	WT-LINC00662	MUT-LINC00662	WT-COX-2	MUT-COX-2
miR-NC mimic	1.08±0.10	1.07±0.11	1.09±0.13	1.08±0.07
miR-144 mimic	0.36±0.05*	0.96±0.09	0.43±0.06*	0.97±0.08

注:与 miR-NC mimic 组相比,\* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with miR-NC mimic group, \* $P < 0.05$ .

## 2.4 各组 U251/TMZ 细胞增殖情况分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞增殖活力和 Edu 阳性细胞率均降低 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662 + miR-NC inhibitor 组比较, si-LINC00662+miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞增殖活力和 Edu 阳性细胞率均增高 ( $P < 0.05$ )。(见图 2)

## 2.5 各组 U251/TMZ 细胞凋亡情况分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞凋亡率增高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662+miR-NC

inhibitor 组比较, si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。(见图 3)

## 2.6 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平分析

与 si-NC 组比较, si-LINC00662 组 U251/TMZ 细胞中 COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白水平均降低, Bax 蛋白水平增高 ( $P < 0.05$ ); 与 si-LINC00662+miR-NC inhibitor 组比较, si-LINC00662 + miR-144 inhibitor 组 U251/TMZ 细胞中 COX-2、PCNA、MRP1 和 Bcl-2 蛋白水平明显增高, Bax 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ ) (见图 4, 表 5)。

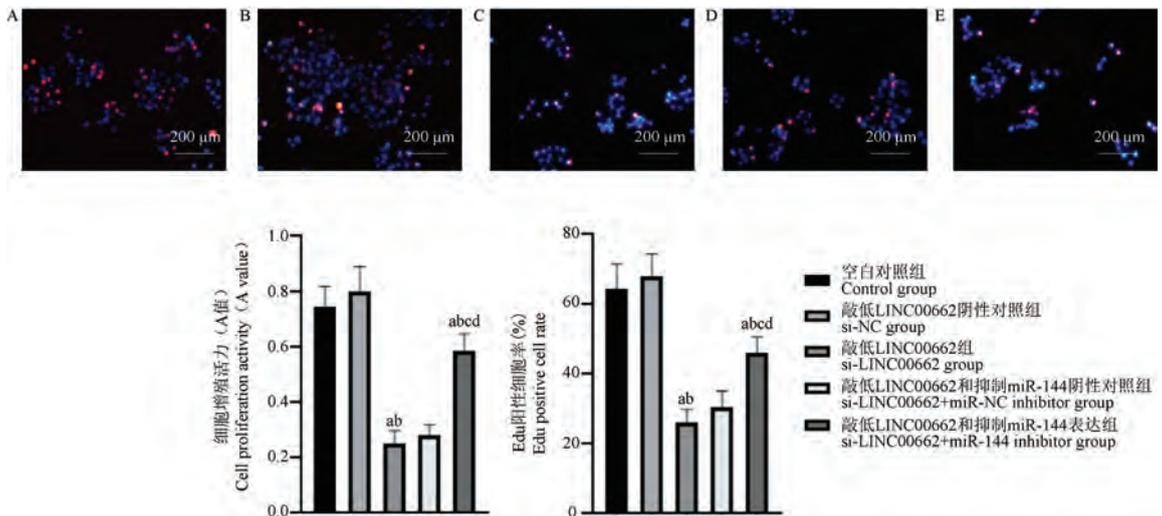
表 4 LINC00662、miR-144 和 COX-2 mRNA 在 U251/TMZ 细胞中的表达水平 ( $n=3$ )

Table 4 Expression of LINC00662, miR-144 and COX-2 mRNA in U251/TMZ cells

组别 Groups	LINC00662	miR-144	COX-2 mRNA
空白对照组 Control group	1.04±0.09	1.07±0.05	1.03±0.07
敲低 LINC00662 阴性对照组 si-NC group	1.07±0.10	1.05±0.09	1.06±0.09
敲低 LINC00662 组 si-LINC00662 group	0.22±0.05 <sup>ab</sup>	2.37±0.20 <sup>ab</sup>	0.48±0.06 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组 si-LINC00662+miR-NC inhibitor group	0.25±0.04 <sup>ab</sup>	2.45±0.24 <sup>ab</sup>	0.53±0.07 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组 si-LINC00662+miR-144 inhibitor group	0.27±0.03 <sup>abcd</sup>	1.58±0.18 <sup>abcd</sup>	0.80±0.09 <sup>abcd</sup>

注:与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 阴性对照组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

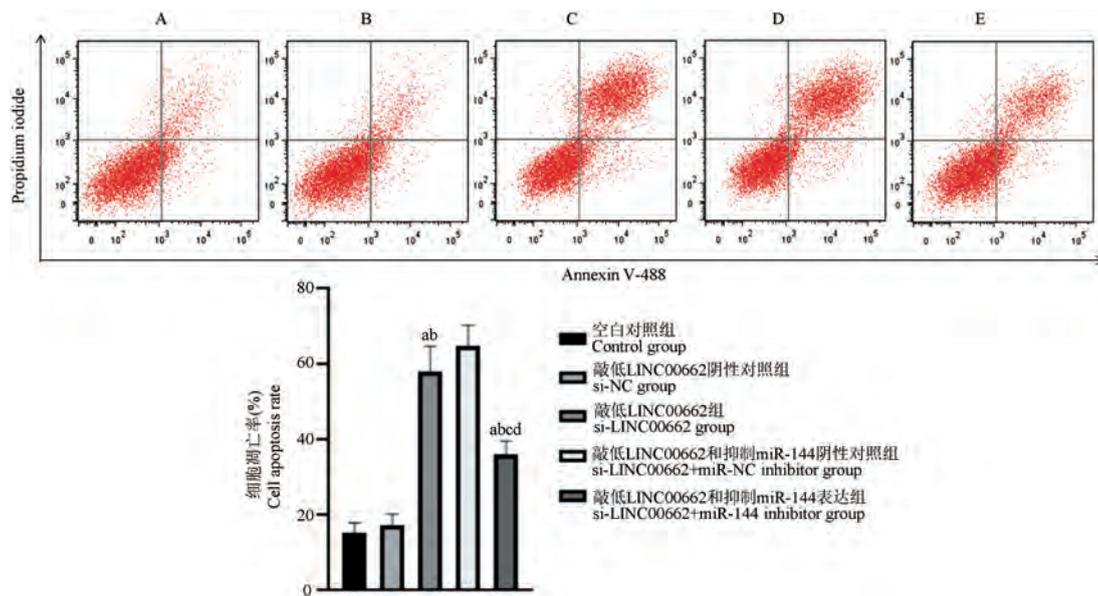


注: A; 空白对照组; B; 敲低 LINC00662 阴性对照组; C; 敲低 LINC00662 组; D; 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E; 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。与空白对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 阴性对照组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 各组 U251/TMZ 细胞增殖情况

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 2 Proliferation of U251/TMZ cells in each group



注: A: 空白对照组; B: 敲低 LINC00662 阴性对照组; C: 敲低 LINC00662 组; D: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 各组 U251/TMZ 细胞凋亡情况

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .

Figure 3 Apoptosis of U251/TMZ cells in each group

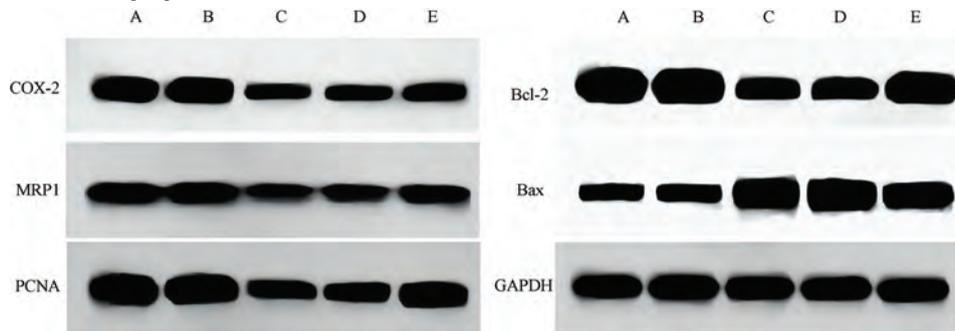
表 5 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白水平分析 (n=3)

Table 5 Analysis of target protein level in U251/TMZ cells of each group

组别 Groups	COX-2	MRP1	PCNA	Bcl-2	Bax
空白对照组 Control group	0.69±0.08	0.89±0.09	0.99±0.12	1.01±0.14	0.41±0.05
敲低 LINC00662 阴性对照组 si-NC group	0.75±0.09	0.84±0.10	1.08±0.13	0.97±0.12	0.43±0.06
敲低 LINC00662 组 si-LINC00662 group	0.26±0.03 <sup>ab</sup>	0.36±0.05 <sup>ab</sup>	0.44±0.05 <sup>ab</sup>	0.37±0.04 <sup>ab</sup>	1.12±0.15 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组 si-LINC00662+miR-NC inhibitor group	0.28±0.05 <sup>ab</sup>	0.33±0.04 <sup>ab</sup>	0.48±0.06 <sup>ab</sup>	0.40±0.06 <sup>ab</sup>	1.20±0.13 <sup>ab</sup>
敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组 si-LINC00662+miR-144 inhibitor group	0.47±0.06 <sup>abcd</sup>	0.55±0.06 <sup>abcd</sup>	0.69±0.08 <sup>abcd</sup>	0.72±0.08 <sup>abcd</sup>	0.81±0.09 <sup>abcd</sup>

注: 与空白对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 阴性对照组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ . Compared with si-LINC00662+miR-NC inhibitor group, <sup>d</sup> $P < 0.05$ .



注: A: 空白对照组; B: 敲低 LINC00662 阴性对照组; C: 敲低 LINC00662 组; D: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 阴性对照组; E: 敲低 LINC00662 和抑制 miR-144 表达组。

图 4 各组 U251/TMZ 细胞中靶蛋白表达水平

Note. A, Control group. B, si-NC group. C, si-LINC00662 group. D, si-LINC00662+miR-NC inhibitor group. E, si-LINC00662+miR-144 inhibitor group.

Figure 4 Expression level of target protein in U251/TMZ cells of each group

### 3 讨论

胶质瘤的治疗主要是以手术加放、化疗为主,然而,其治疗效果并不理想,复发率和死亡率相对较高<sup>[12]</sup>。TMZ 具有良好的抗癌作用,能很好地改善脑胶质瘤患者的临床症状,并显著缩小肿瘤体积,基于 TMZ 的化疗是当前胶质瘤最广泛使用的治疗方法之一<sup>[13]</sup>。然而,亦有研究发现,胶质瘤细胞对 TMZ 的抵抗力正在增强<sup>[14-15]</sup>。因此,有必要对胶质瘤的 TMZ 耐药机制进行探究。

已有大量研究表明,肿瘤组织中异常表达的 LncRNA 可作为预测肿瘤预后的分子标志物<sup>[8,16-17]</sup>。Wei 等<sup>[18]</sup>研究表明,LINC00662 在宫颈癌组织和细胞中显著高表达,可促进宫颈癌细胞的进展和放射抗性。同样,本研究发现 LINC00662 在胶质瘤组织中高表达,与前人研究结果相一致<sup>[6-7]</sup>。LncRNA 与胶质瘤等肿瘤的耐药性有关,如 LncRNA DILA1 可通过抑制细胞周期蛋白 D1 降解抑制乳腺癌细胞生长,并恢复对他莫昔芬的敏感性<sup>[19]</sup>; LncRNA SNHG12 可作为 miR-129-5p 的海绵调控 MAPK/ERK 通路激活进而使胶质母细胞瘤具有 TMZ 抗性<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,LINC00662 在耐药细胞株 U251/TMZ 中表达显著高于 U251 细胞,在 U251/TMZ 细胞中敲低其表达,可显著降低细胞增殖活力、提高细胞凋亡能力,提示敲低 LINC00662 可增强胶质瘤对 TMZ 的敏感性。

LncRNA 可作为竞争性内源性 RNA 靶向 miRNA 来调节 miRNA 靶基因的表达<sup>[16]</sup>。据报道,LINC00662 可作为竞争性内源性 RNA 靶向 miR-34a-5p/凝集素甘露糖结合 2 样 (LMAN2L) 或 miR-107/高迁移率族框 1 蛋白 (HMGB1) 轴来调节胶质瘤的进展<sup>[6-7]</sup>。因此,笔者通过 StarBase v3.0 网站预测了 LINC00662 的靶基因,发现并验证了 LINC00662 和 miR-144 之间的靶向关系。因此,笔者继续通过 Target Scan7.2 网站预测并证实了 miR-144 和 COX-2 之间的靶向关系,与以往报道结果相一致<sup>[11]</sup>。另有研究证实,COX-2 在胶质瘤组织中表达上调,其过表达可促进胶质瘤的发生和发展<sup>[21]</sup>。本研究发现敲低 LINC00662 可显著下调 miR-144 表达,上调 COX-2 表达,提示 LINC00662 可作为 miR-144 竞争性内源性 RNA 来调节 COX-2 的表达。此外,本研究显示敲低 LINC00662 可引起细胞活力降低和凋亡率升高,同时,该现象在抑制 miR-144 表达

的 U251/TMZ 细胞中被逆转,提示 LINC00662 促进胶质瘤细胞对 TMZ 耐药,且 miR-144/COX-2 信号参与该过程。

耐药性是目前肿瘤化疗的主要障碍,其主要原因是一些外排的转运蛋白如 MRP1 的过度表达<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,敲低 LINC00662 可显著降低 U251/TMZ 细胞 MRP1 表达,再次证明了敲低 LINC00662 增强了胶质瘤对化疗药物的敏感性,即降低了胶质瘤的 TMZ 耐药性。此外,PCNA 是一种直接参与 DNA 合成的核蛋白,其表达水平增加表明细胞增殖能力提高<sup>[23]</sup>。Bcl-2 和 Bax 是凋亡相关蛋白质,Bcl-2 通过与线粒体外膜上的受体结合,有助于维持线粒体膜的完整性,充当细胞凋亡的抑制剂;而 Bax 起促进细胞凋亡的作用,若细胞暴露于凋亡诱导剂,Bax 就会从细胞质移动到线粒体膜上并改变外膜的通透性,从而诱导释放细胞色素 c 和其他凋亡分子,最终导致 DNA 断裂<sup>[24]</sup>。本研究结果发现敲低 LINC00662 可影响 MRP1、PCNA、Bcl-2 和 Bax 表达,下调 miR-144 表达可在一定程度上逆转敲低 LINC00662 对 MRP1、PCNA、Bcl-2 和 Bax 的影响,进一步提示 LINC00662 靶向调控 miR-144,参与调节胶质瘤细胞的 TMZ 耐药性。

综上所述,LINC00662 可通过 miR-144/COX-2 信号,调节 U251/TMZ 细胞增殖和凋亡,进而影响胶质瘤细胞的 TMZ 耐药性。这些结果为 LINC00662/miR-144/COX-2 调控网络在胶质瘤发展中的作用提供了新的理论支持。但由于本研究对象的单一性,有必要进一步在多个细胞系和动物模型中对 LINC00662 在胶质瘤中的耐药机制进行探究,这将为胶质瘤的治疗提供进一步的证据。

#### 参考文献:

- [1] 郑杰灵,袁亚维. 脑胶质瘤中链非编码 RNA TCONS\_00008552 促进放疗抵抗、侵袭转移的机制 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(11): 1748-1752.
- [2] Sorribes IC, Handelman SK, Jain HV. Mitigating temozolomide resistance in glioblastoma via DNA damage-repair inhibition [J]. J R Soc Interface, 2020, 17(162): 20190722.
- [3] Lee H, Zhang Z, Krause HM. Long noncoding RNAs and repetitive elements: junk or intimate evolutionary partners? [J]. Trends Genet, 2019, 35(12): 892-902.
- [4] Chen W, Li Q, Zhang G, et al. LncRNA HOXA-AS3 promotes the malignancy of glioblastoma through regulating miR-455-5p/USP3 axis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(20): 11755-11767.
- [5] Wu P, Cai J, Chen Q, et al. Lnc-TALC promotes O<sup>6</sup>-

- methylguanine-DNA methyltransferase expression via regulating the c-Met pathway by competitively binding with miR-20b-3p [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2045.
- [ 6 ] Wu J, Guo X, Xu D, et al. LINC00662 sponges miR-107 accelerating the invasiveness and proliferation of glioma cells [J]. J Cancer, 2020, 11(19): 5700-5712.
- [ 7 ] Geng Y, Wu Y, Xu C, et al. Long non-coding RNA LINC00662 regulated proliferation and migration by targeting miR-34a-5p/LMAN2L axis in glioma [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 10161-10172.
- [ 8 ] 刘艳, 许路, 邵阿末, 等. miR-186 通过负调控 Smad6 对胶质瘤细胞迁移和上皮间质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 25-31.
- [ 9 ] Liu ZQ, Ren JJ, Zhao JL, et al. microRNA-144 represses gliomas progression and elevates susceptibility to Temozolomide by targeting CAV2 and FGF7 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4155.
- [ 10 ] Palumbo P, Lombardi F, Augello FR, et al. Biological effects of selective COX-2 inhibitor NS398 on human glioblastoma cell lines [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 167.
- [ 11 ] Yao Q, Gu A, Wang Z, et al. microRNA-144 functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting cyclooxygenase-2 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(3): 3088-3095.
- [ 12 ] 何超, 周玉玲, 王荣, 等. 多靶点抑制剂西奥罗尼增强人胶质瘤细胞放射敏感性的机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(9): 1537-1544.
- [ 13 ] 张静, 周永刚, 舒俊斌, 等. miR-130b 在胶质瘤对替莫唑胺耐药中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(4): 597-605.
- [ 14 ] 李秀英, 张勇, 冯旭东, 等. 调强放疗联合替莫唑胺对高级别脑胶质瘤术后患者免疫功能和生活质量的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(16): 3187-3191.
- [ 15 ] Franco-Molina MA, Santana-Krřinskaya SE, Madrigal-de-León LM, et al. Evaluation of the cytotoxic and immunogenic potential of temozolamide, panobinostat, and *Lophophora williamsii* extract against C6 glioma cells [J]. EXCLI J, 2021, 20: 614-624.
- [ 16 ] 陈婉斐, 泮慧俐, 李珍珍, 等. 抑制 lncRNA LUCAT1 表达通过靶向调控 miR-204-3p 减轻高糖诱导的心肌 H9c2 细胞损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(10): 1761-1768.
- [ 17 ] Deng H, Zhu B, Dong Z, et al. miR-214-5p targeted by LncRNA DANCR mediates TGF- $\beta$  signaling pathway to accelerate proliferation, migration and inhibit apoptosis of prostate cancer cells [J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 2224-2240.
- [ 18 ] Wei J, Wang L, Sun Y, et al. LINC00662 contributes to the progression and the radioresistance of cervical cancer by regulating miR-497-5p and CDC25A [J]. Cell Biochem Funct, 2020, 38(8): 1139-1151.
- [ 19 ] Shi Q, Li Y, Li S, et al. LncRNA DILA1 inhibits Cyclin D1 degradation and contributes to tamoxifen resistance in breast cancer [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5513.
- [ 20 ] Lu C, Wei Y, Wang X, et al. DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 28.
- [ 21 ] Cui X, Cui N, Pan J, et al. Expression of RhoA and COX-2 and their roles in the occurrence and progression of brain glioma [J]. Pak J Pharm Sci, 2021, 34(1(Special)): 397-401.
- [ 22 ] Nasr R, Lorendeau D, Khonkam R, et al. Molecular analysis of the massive GSH transport mechanism mediated by the human Multidrug Resistant Protein 1/ABCC1 [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 7616.
- [ 23 ] 罗瑞, 秦启忠, 刘敏, 等. rhPGRN 通过 MAPK/PI3K 通路调控自噬和内质网应激并促进细胞增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(6): 1071-1081.
- [ 24 ] 吴艺璇, 彭维艳, 刘露, 等. 淫羊藿苷通过 AMPK 减轻脂肪酸诱导的肾小管上皮细胞线粒体损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 113-121.

[ 收稿日期 ] 2022-09-22

熊亚妮,孟永,钱仪敏,等. Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的特征及其造模前后谷氨酸的含量 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 54-61.

Xiong YN, Meng Y, Qian YM, et al. Characteristics of the Long Evans model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the content of glutamate before and after modeling [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 54-61.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.007

# Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的特征及其造模前后谷氨酸的含量

熊亚妮<sup>1,2,3</sup>, 孟永<sup>3</sup>, 钱仪敏<sup>2</sup>, 张鹏<sup>2</sup>, 张慧<sup>4</sup>, 李华<sup>2,3\*</sup>

(1.上海工程技术大学,上海 201620;2.中国医药工业研究总院上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203;  
3.益诺思生物技术南通有限公司,江苏 海门 226133;4.上海鼎岳生物技术有限公司,上海 201315)

**【摘要】** 目的 观察 Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia reperfusion, RIR) 损伤后视网膜的功能、结构及谷氨酸含量的变化,为视网膜的损伤及可能保护机制研究提供参考。方法 随机选取 30 只成年 SPF 级 Long Evans 大鼠,对其左眼前房持续 60 min 灌注高压生理盐水 (132 mmHg),构建 RIR 损伤模型,右侧眼不处理作为自身对照。在造模后 1、3、7 和 14 d,利用闪光全视网膜电图 (flash electroretinogram, f-ERG) 检测视网膜电生理功能的变化情况;在造模前及造模后 3、7、14 d,利用光学相干断层技术 (optical coherence tomography, OCT) 测量视网膜厚度,眼底成像观察眼底血管的变化情况;于造模后 14 d 处死大鼠,进行石蜡包埋、苏木精伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色和缺口末端标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 荧光染色观察视网膜形态结构、细胞凋亡及分布情况,ELISA 检测视网膜谷氨酸的含量。结果 与对照眼相比,造模眼从第 1 天开始视网膜电图 b 波振幅极显著下降 ( $P < 0.01$ ),潜伏期极显著延迟 ( $P < 0.01$ );OCT 显示从第 3 天开始视网膜神经节细胞复合体 (retinal ganglion cell complex, GCC) 厚度极显著变薄 ( $P < 0.01$ ),从第 7 天开始全层视网膜厚度极显著变薄 ( $P < 0.01$ ),且都随着时间延长越来越薄 ( $P < 0.05$ );眼底照片显示视网膜从第 3 天开始出现明显的缺血,一直到第 14 天都没有恢复到正常水平;第 14 天 HE 染色切片结果显示视网膜萎缩,内层明显变薄,视网膜神经节细胞 (ganglion cells, RGCs) 减少;TUNEL 荧光染色结果显示视网膜各层出现明显的细胞凋亡;ELISA 结果显示造模后视网膜谷氨酸含量增加 ( $P < 0.05$ )。结论 Long Evans 大鼠 RIR 损伤引起视觉电生理功能严重损伤,视网膜萎缩,尤其 GCC 厚度减少最明显,且随着时间延长损伤加剧,不可逆转,RGCs 凋亡,眼底血管缺血,视网膜谷氨酸含量增加,为视网膜损伤类疾病的研究提供良好的动物模型。

**【关键词】** Long Evans 大鼠;RIR 损伤;视网膜;谷氨酸;动物模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0054-08

## Characteristics of the Long Evans model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the content of glutamate before and after modeling

XIONG Yan<sup>1,2,3</sup>, MENG Yong<sup>3</sup>, QIAN Yimin<sup>2</sup>, ZHANG Peng<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>4</sup>, LI Hua<sup>2,3\*</sup>

(1. Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China.

2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai InnoStar Biotech Co., Ltd, Shanghai 201203.

3. InnoStar Biotech Haimen Co., Ltd, Haimen 226133. 4. Shanghai Dingyue Biotechnology Co., Ltd, Shanghai 201315)

**【基金项目】** 江苏省创新能力建设计划科技公共服务平台项目 (BM2021002)。

**【作者简介】** 熊亚妮 (1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药物眼科毒理研究。E-mail: xyn152472@163.com

**【通信作者】** 李华 (1978—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向: 药物毒理研究。E-mail: hli@innostar.cn

**【Abstract】 Objective** To observe changes in retinal functions, structure, and glutamate content after retinal ischemia-reperfusion(RIR) injury in Long Evans rats to provide a reference for the study of retinal injury and possible protective mechanisms. **Methods** Thirty adult SPF level Long Evans rats were randomly selected, and the left anterior chamber of their left eye was perfused with high-pressure normal saline for 60 minutes to establish an RIR injury model, while the right eye was untreated as a control. At 1, 3, 7, and 14 days after modeling, changes in retinal electrophysiological functions were assessed by flash electroretinogram. The retinal thickness was measured by optical coherence tomography(OCT) before and at 3, 7 and 14 days after modeling. Changes in fundus vessels were observed by fundus angiography. Rats were sacrificed at 14 days after modeling, and the retinal morphology, apoptosis, and distribution were observed by hematoxylin-eosin (HE) and TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) staining. The content of glutamate in the retina was detected by ELISA. **Results** Compared with control eyes, the B wave amplitude of the electroretinogram in the model eyes were decreased significantly( $P<0.01$ ) and latency was delayed significantly( $P<0.01$ ) from the first day. OCT showed that the thickness of the retinal ganglion cell complex(GCC) was significantly thinner from day 3( $P<0.01$ ), the thickness of the whole retina was significantly thinner from day 7( $P<0.01$ ), and both of them became thinner over time( $P<0.05$ ). Fundus images showed that the retina had obvious ischemia from day 3 and did not recover to the normal level until day 14. On day 14, the HE staining showed retinal atrophy, obvious thinning of the inner layer and a reduction of retinal ganglion cells. TUNEL staining showed obvious apoptosis in all retinal layers. ELISAs showed that the glutamic acid content in the retina was increased after modeling( $P<0.05$ ). **Conclusions** RIR injury in Long Evans rat causes serious damage to visual electrophysiological functions, retinal atrophy, an obvious reduction in the GCC thickness over time that becomes irreversible, RGC apoptosis, fundus vascular ischemia, and an increased retinal glutamate content, thereby providing a good animal model to study retinal injury diseases.

**【Keywords】** Long Evans rats; RIR injury; retina; glutamate; animal model

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

RIR 损伤与多种视网膜疾病相关,如糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜动脉阻塞和青光眼等,是一种常见的视网膜疾病发生机制。RIR 损伤会造成进行性的视网膜及其相关神经细胞(如 RGCs)的损伤,从而导致不可逆的视力丧失<sup>[1-3]</sup>。RIR 造成的损伤是多因素综合作用的结果,兴奋性氨基酸学说是其机制之一。在脊椎动物的视网膜中,谷氨酸是必不可少的兴奋性神经递质,在视觉信号的传递中起着重要作用。正常浓度的谷氨酸可维持 RGCs 的分化状态和代谢活动的正常进行,而在 RIR 过程中细胞间质谷氨酸含量明显升高,过度激活谷氨酸受体,引起兴奋性毒性<sup>[4-5]</sup>。

常用的离体或在体 RIR 损伤模型的建立方法有很多种,如钳夹视神经法、前房灌注法及结扎血管法等。其中前房灌注法操作简单,周期短,可重复性高,使用最为广泛<sup>[1,6]</sup>。Long Evans 大鼠的视网膜结构与人类相似,含有色素,有较为完整的视觉功能,近年来广泛应用于眼科学的研究<sup>[7-9]</sup>,但 Long Evans 大鼠 RIR 损伤模型的特征及损伤发展研究较少。因此本研究拟采用前房灌注法构建 Long Evans 大鼠 RIR 损伤模型,通过功能和形态两个方面研究 RIR 损伤后两周内的 Long Evans 大鼠视网膜损伤的

变化过程,包括活体状态下 f-ERG 检测视网膜的视觉功能,OCT 测量 GCC 及视网膜全层厚度,眼底成像观察眼底血管变化情况;HE 和 TUNEL 染色切片观察视网膜形态结构、视网膜细胞凋亡及分布情况,ELISA 检测造模后视网膜谷氨酸表达,以期 Long Evans 大鼠视网膜损伤及保护机制研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选择 30 只 SPF 级雄性健康 Long Evans 大鼠,体重 180~260 g,周龄 6~8 周,购自浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]。实验动物的饲养及实验操作均在益诺思生物技术南通有限公司动物实验研究中心 SPF 级设施中进行[SYXK(苏)2018-0034]。饲养环境:温度为 20~26℃,湿度为 40%~70%,每小时换气次数 $\geq 15$ 次,使用 100%的全新风,自动光照,每 12 h 明暗交替。饲料和垫料均由北京科澳协力饲料有限公司提供,所有动物均能自由采食,自由饮水。本实验的动物管理和使用申请已获得益诺思生物技术南通有限公司动物管理和使用委员会(IACUC)的批准(IACUC-2022-r-226),并遵循 3R 原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

0.9% NaCl 注射液 (D21010906A, 山东科伦药业有限公司); 复方托吡卡胺滴眼液 (J20180051, 参天制药(中国)有限公司); 左氧氟沙星滴眼液 CH202005052, 参天制药(中国)有限公司); 舒泰® 50 (8ADTA, 法国维克公司); 盐酸赛拉嗪注射液 (8ECXA, 吉林省华牧动物保健品有限公司); 谷氨酸试剂盒(微量法) (ml895122, 上海酶联生物技术有限公司); 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (C1090, 碧云天生物技术有限公司)。

32G 注射用针头(无锡市宇寿医疗器械有限公司); 光学显微镜 (Leica 公司); Diagnosys Celeris 动物电生理仪(美国 Ellex 公司); 光学相干断层扫描(德国海德堡公司); 超广角共焦激光造影机 (CRO, 苏州微清医疗器械有限公司); 组织脱水机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 包埋机(德国 LEICA 公司); 蜡块修整仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 轮转式切片机(德国 LEICA 公司); 漂片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 烘片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 多功能染色封片一体机(德国 LEICA 公司); 酶标仪(molecular devices 公司); 共聚焦荧光显微镜(德国 LEICA 公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 造模方法

Long Evans 大鼠肌肉注射舒泰和赛拉嗪混合麻醉。复方托吡卡胺用于扩大瞳孔, 0.5% 的盐酸丙美卡因用于角膜表面麻醉。所有操作均遵守无菌的原则。将 32G 注射用针头由颞侧角膜缘水平刺入大鼠左眼前房中, 固定针头并连接 0.9% 生理盐水输液系统。调整生理盐水高度置于角膜顶点 180 cm, 此高度可在眼内形成 132 mmHg 眼压, 导致眼部缺血, 可见眼前节变白, 高眼压诱导缺血损伤 60 min 后, 关闭静脉输液装置, 移除针头, 视网膜完成再灌注。造模后局部给予左氧氟沙星滴眼液及氧氟沙星眼膏抗感染处理, 右眼作为自身对照眼不作处理。

### 1.3.2 f-ERG 检查

于造模后 1、3、7、14 d (D1、D3、D7、D14), 用 f-ERG 检查大鼠视网膜的电生理功能, 在进行检查之前, 暗适应至少 6 h, 然后于暗室弱红光照明下, 使用角膜电极作为记录电极轻触角膜, 局部用 1.7% 羟丙甲纤维素溶液保持整个检测过程角膜湿润, 保证

整个测试过程中角膜电极电阻低于 5 kΩ。视网膜电图由 Celeris system(diagnosys) 记录。由于不同只大鼠的 b 波振幅和潜伏期存在差异, 无法进行单纯比较。所以选择每只大鼠的造模眼的 b 波振幅与其对侧正常对照眼的 b 波振幅和潜伏期差值进行同体对照, 来评估损伤变化。

### 1.3.3 视网膜厚度测量

于造模后 3、7、14 d, 用 OCT 测量视网膜厚度, 其中以距大鼠视神经 1500 μm 位置测量的 GCC, 包括神经纤维层(nerve fiber layer, NFL)、神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL) 和内丛状层(inner plexiform layer, IPL) 的总厚度及视网膜全层厚度。

### 1.3.4 眼底成像

于造模后 3、7、14 d, 大鼠麻醉状态下, 利用超广角共焦激光造影机观察了大鼠造模眼底血管的变化。

### 1.3.5 HE 染色

于造模后 14 d 麻醉处死大鼠, 摘除眼球置于 4℃ 的改良 Davidson's 溶液中固定至少 72 h, 然后转移到 4% 多聚甲醛溶液中固定至少 24 h 后, 石蜡包埋切片, 切片方向与眼轴平行, 切片取近视神经处, 厚度为 4 μm, 进行 HE 染色。在光学显微镜下观察视网膜形态结构。

### 1.3.6 TUNEL 荧光染色

石蜡切片用二甲苯脱蜡两次, 无水乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水梯度冲洗。加入蛋白酶 K, 37℃ 孵育 30 min。然后 PBS 冲洗 5 次, 加入 TUNEL 检测液 37℃ 避光孵育 60 min。PBS 冲洗, 吸干液体, 加入一滴荧光淬灭封片液, 封片, 避光下共聚焦荧光显微镜观察。

### 1.3.7 谷氨酸含量测定

于造模后 1、7、14 d, 将动物安乐死后, 腹主动脉放血, 摘取眼球。在眼科手术显微镜下分离视网膜。用滤纸吸干水分, 称取视网膜重量, 按体重比 1:10 加入提取液, 充分混匀后, 进行冰浴匀浆, 离心, 取上清液待检测。具体检测步骤根据试剂盒说明书。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析的统计分析, 采用 GraPhPad Prism 8 软件制图。计量资料均采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。f-ERG 结果分析时造模眼与对照眼之间的比较采用配对样本 *t* 检验, 两组比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单

因素方差分析,组间比较采用 LSD 或 Dunnett T3 检验。本研究以  $P < 0.05$  表示有显著性差异;以  $P < 0.01$  表示有极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 f-ERG 电生理信号

为了检测视网膜功能在急性高眼压引起的 RIR

损伤中的变化,对 Long Evans 大鼠进行了暗适应条件下的 f-ERG 检测,并记录了光强为  $1.0 \text{ cds} \cdot \text{m}^2$  条件下大鼠 b 波的振幅及潜伏期。检测结果发现,与自身正常对照眼相比,造模眼各检测时间点 b 波的振幅极显著降低 ( $P < 0.01$ ),平均缩减  $185.8 \mu\text{V}$ ; b 波的潜伏期相比于对照眼也发生极显著的延迟 ( $P < 0.01$ ),平均延迟  $11.2 \text{ ms}$ (表 1,图 1A、1B)。且造

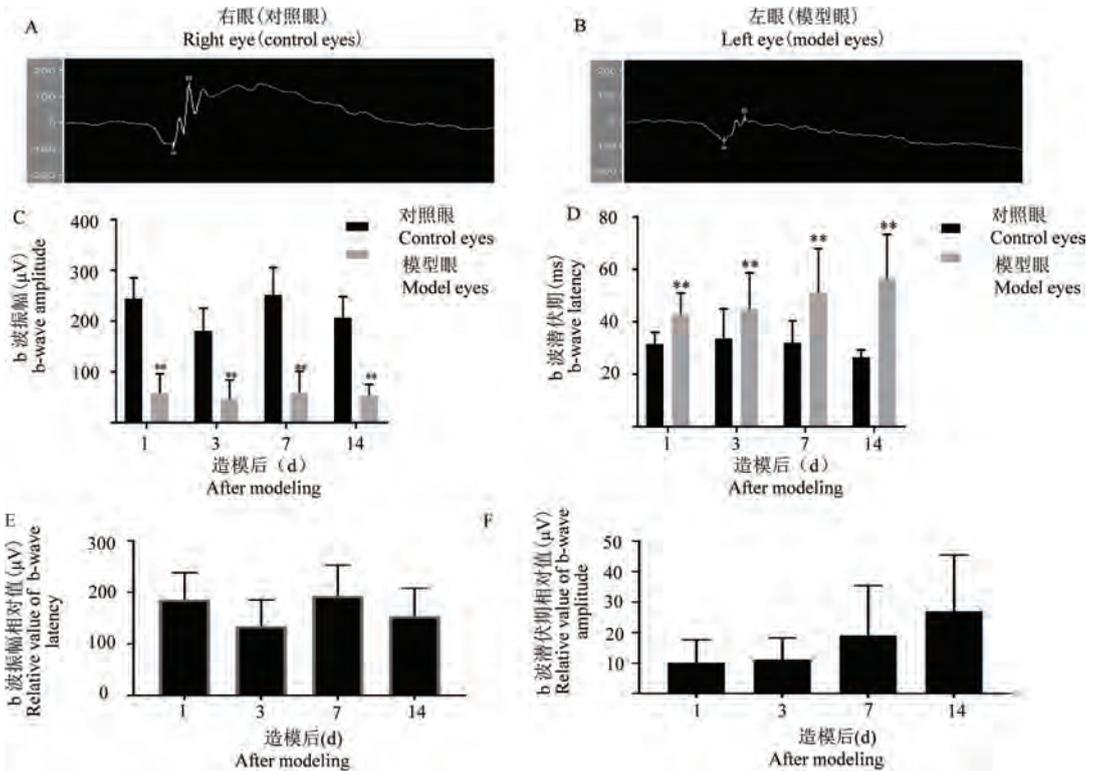
表 1 RIR 损伤后不同时间点造模眼与对照眼 ERG 检测结果分析( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Analysis of erg test results in model eyes and control eyes at different time points after rir injury

时间 Time	b 波振幅 b-wave amplitude		b 波潜伏期 b-wave latency	
	振幅缩减 ( $\mu\text{V}$ ) Amplitude reduction	$P$	延迟时间 (ms) Delay time	$P$
	D1R-D1L	$185.8 \pm 52.4$	** $P < 0.01$	$11.2 \pm 7.1$
D3R-D3L	$134.5 \pm 50.9$	** $P < 0.01$	$11.2 \pm 7.1$	** $P < 0.01$
D7R-D7L	$193.0 \pm 59.9$	** $P < 0.01$	$19.1 \pm 16.4$	** $P < 0.01$
D14R-D14L	$154.0 \pm 54.0$	** $P < 0.01$	$30.0 \pm 16.8$	** $P < 0.01$
$P$	0.078		0.01	

注: D1、D3、D7、D14 分别表示大鼠 RIR 损伤后 1、3、7、14 d; L 表示左眼(造模眼), R 表示右眼(对照眼)。与对照眼比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. D1, D3, D7 and D14 respectively represent 1, 3, 7 and 14 days after RIR injury in rats. L represents the left eye (model eyes), R represents the right eye (control eyes). Compared with the control eyes, \*\*  $P < 0.01$ .



注: A、B; RIR 损伤后造模眼和对照眼 b 波检测结果图; C、D; RIR 损伤后不同时间点造模眼与对照眼 b 波振幅和潜伏期结果比较。E、F: RIR 损伤后不同时间点造模眼相较于对照眼 b 波振幅缩减和 b 波潜伏期延迟情况。与对照眼比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 RIR 模型大鼠 b 波检测结果及其比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Note. A/B, b-wave detection results of the model eye and control eye after RIR injury. C/D, Comparison of b-wave amplitude and latency results between the model eye and the control eye at different time points after RIR injury. E/F, The reduction of b-wave amplitude and delay of b-wave latency in the model eye at different time points after RIR injury compared to the control eye. Compared with control eyes, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 1 Comparison of b-wave detection results in RIR model rats

模眼在各个检测时间范围内均无法恢复至对照眼的视觉水平。此外, Long Evans 大鼠双眼 b 波潜伏期相对值在各检测时间点上总体均存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) (表 1), 且随着时间逐渐增大 (图 1F)。以上结果表明大鼠前房灌注急性高眼压引起的 RIR 损伤模型的视网膜功能受到严重损伤。

## 2.2 OCT 测量视网膜厚度

利用 OCT 观察视网膜结构在急性高眼压引起

的 RIR 损伤中的变化。结果发现, 造模前造模眼显示正常的视网膜结构, 造模后 3、7、14 d 造模眼 GCC 和视网膜全层厚度较造模前变薄 ( $P < 0.01$ ) (表 2, 图 2)。GCC 厚度在第 3 天较造模前开始有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 视网膜全层厚度在第 7 天开始有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。视网膜厚度变薄呈时间依赖性, 提示视网膜结构逐渐受到严重损伤 (图 2、图 3), 且无法恢复到造模前正常的视网膜厚度。

表 2 OCT 测量 GCC 及视网膜全层厚度情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Three and full retinal thickness measured by OCT

时间 (d) Time	GCC 厚度 ( $\mu\text{m}$ ) GCC thickness	视网膜全层厚度 ( $\mu\text{m}$ ) Full thickness of retina
造模前 Before molding	96.0 $\pm$ 10.1	268.4 $\pm$ 10.3
D3	74.1 $\pm$ 12.6 **	249.0 $\pm$ 22.0
D7	65.0 $\pm$ 14.1 **	216.9 $\pm$ 25.2 **
D14	60.0 $\pm$ 19.5 **	214.1 $\pm$ 33.8 **

注: 与造模前比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with that before modeling, \*\*  $P < 0.01$ .

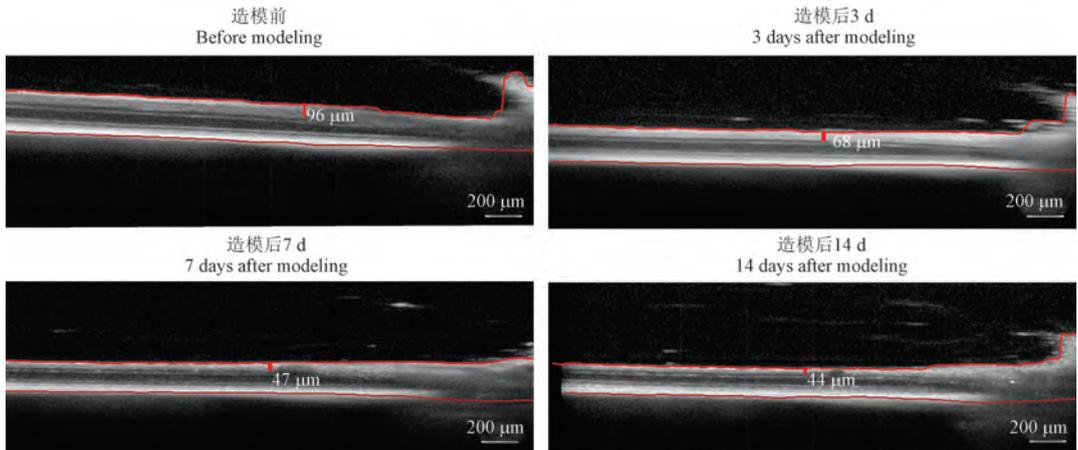
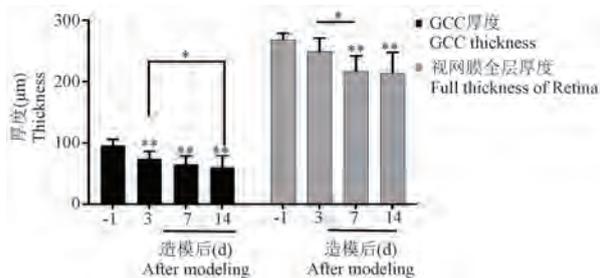


图 2 Long Evans 大鼠造模眼不同时间 OCT 检测视网膜情况

Figure 2 Retina of Long Evans rats was detected by OCT at different times



注: 与造模前比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 RIR 损伤前后不同时间点造模眼视网膜厚度结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Note. Compared with that before modeling, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Comparison of retinal thickness between model eyes and control eyes at different time points before after RIR injury

## 2.3 眼底血管变化

大鼠造模后视网膜眼底照相检查结果见图 4, 正常对照眼底血管形态均正常, 造模眼在造模后第 1 天表现出一定程度的血管走行较僵直, 分支减少, 一直到第 14 天眼底血管血流流量有所恢复, 但都没有达到正常状态, 提示视网膜血管受到严重破坏。

## 2.4 HE 染色

如图 5 所示, 对照眼视网膜结构层次清晰, 各层细胞排列紧密, 大小均一。造模眼视网膜变薄, RGCs 细胞核稀疏, 空泡化明显, 内核层 (inner nuclear layers, INL) 和外核层 (outer nuclear layers, ONL) 厚度及细胞数目减少。

### 2.5 TUNEL 荧光染色

对照眼视网膜结构层次清晰,各层细胞排列紧密,大小均一。造模眼视网膜变薄,神经节细胞胞核稀疏,空泡化明显,内核和外核层厚度及细胞数目减少,视网膜各层明显有大量细胞凋亡(图 6)。

### 2.6 谷氨酸含量比较

大鼠造模后 1、7、14 d 视网膜谷氨酸含量变化

见表 3,与对照眼相比,造模后第 1 天造模眼的视网膜谷氨酸浓度迅速升高,第 7 天到最高峰,之后下降,到第 14 天与对照眼表达的浓度相近。

### 2.7 其他眼部情况

30 只 Long Evans 大鼠中 3 只造模后出现角膜溃疡,其中 1 只角膜穿孔;2 只晶状体刮伤,形成白内障。

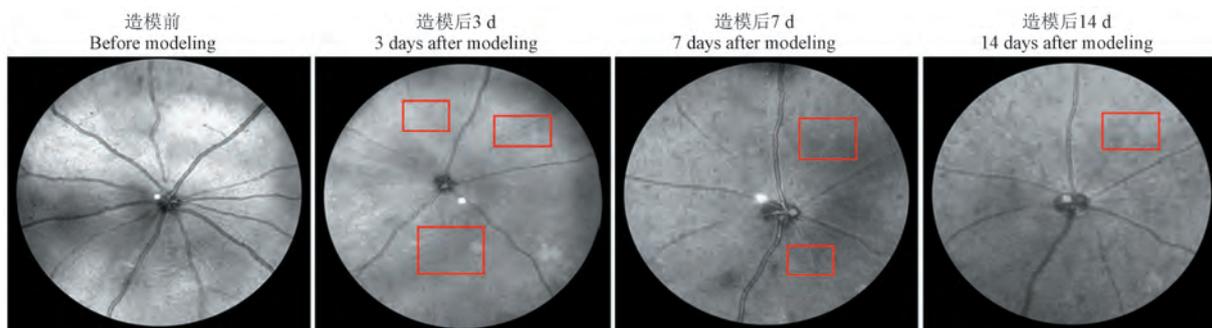
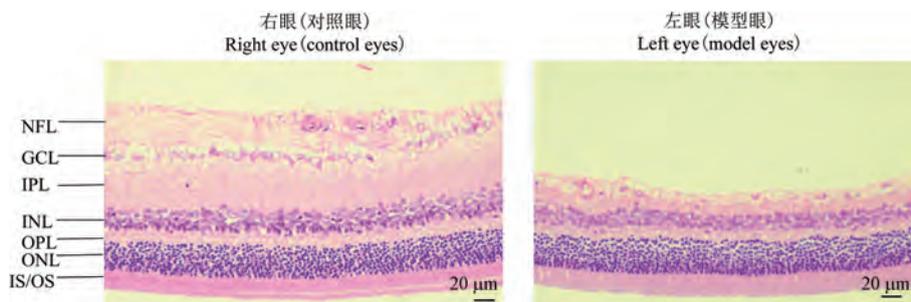


图 4 视网膜眼底照相检查结果

Figure 4 Retinal fundus photography results

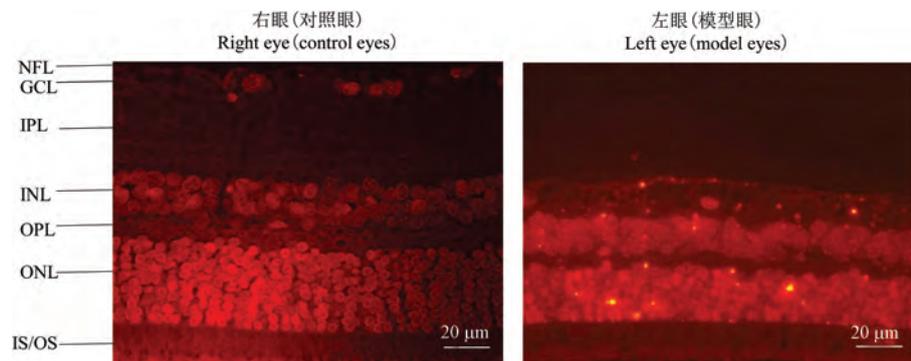


注:INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;IS/OS:视锥、视杆细胞层。

图 5 HE 染色切片观察视网膜结构

Note. INL, Inner nuclear layers. OPL, Outer slave layer. ONL, Outer nuclear layers. IS/OS, Cone, rod cell layer.

Figure 5 HE staining section observation of retinal structure



注:INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;IS/OS:视锥、视杆细胞层。

图 6 TUNEL 荧光染色观察视网膜细胞凋亡

Note. INL, Inner nuclear layers. OPL, Outer slave layer. ONL, Outer nuclear layers. IS/OS, Cone, rod cell layer.

Figure 6 Retinal cell apoptosis was visualized by TUNEL fluorescence staining

表 3 造模后不同时间视网膜谷氨酸含量变化( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 changes of retinal glutamate content at different times after modeling

时间 Time	谷氨酸浓度( $\mu\text{mol/g}$ ) Glutamic acid concentration	
	对照眼 Control eyes	模型眼 Model eyes
	D1	41.6 $\pm$ 7.4
D7	40.0 $\pm$ 13.6	77.6 $\pm$ 22.6**
D14	55.3 $\pm$ 9.2	60.1 $\pm$ 11.8

注:与对照眼比较,\*\* $P<0.01$ 。Note. Compared with the control eye, \*\* $P<0.01$ .

### 3 讨论

本研究采用前房灌注生理盐水致 Long Evans 大鼠 RIR 损伤,研究不同时期视网膜功能和组织结构变化。为了观察大鼠视网膜功能情况,视觉电生理是较成熟的手段。因啮齿类动物视网膜大多缺乏黄斑<sup>[10]</sup>,本实验使用暗适应下 f-ERG 来检测视网膜功能。在 f-ERG 中,a 波的起源是视网膜光感受器和色素上皮细胞,b 波起源于视网膜内层的双极细胞和 Müller 细胞,是连接 RGCs 细胞的重要部分<sup>[11-12]</sup>。有研究发现,b 波振幅可作为反映视网膜缺血的敏感指标<sup>[13]</sup>。RGCs 作为双极细胞下游神经元,当 RGCs 损伤时 b 波最先受到影响。f-ERG 检测结果表明 RIR 损伤后第 1 天大鼠 f-ERG 波形发生明显紊乱,双极细胞、Müller 细胞和无长突细胞发生损伤,视觉功能发生严重障碍,且随着检测时间的持续,该状态没有发生逆转,说明 RIR 损伤对大鼠视觉功能的影响不能短期自愈,与文献报道相符<sup>[2,14]</sup>。f-ERG 检测结果中,RIR 损伤后第 3 天时,模型大鼠的视觉功能发生了小幅度且短暂的改善现象,分析可能是视网膜代偿反应。值得注意的是,上述改善未能获得很好的统计学支持,说明改善程度轻微或分组内个体不足导致了检验效能不足,今后进行视觉电生理检测大鼠 RIR 视觉电生理功能需要增大分组内个体数目。尽管如此,这种短暂改善并没有阻止视觉电生理功能损伤的发生,表明在缺乏外界干预的情况下,RIR 损伤的大鼠视网膜的自我修复有限,可能存在完整功能的视网膜发生了进一步损伤的现象。Nakatani 等和 Matlach 等<sup>[15-16]</sup>研究结果表明,OCT 测量视盘周围的 GCC 厚度可重复性高,而且视盘周围的 GCC 厚度是 RGCs 损伤的最敏感参数。本研究选用 OCT 测量 GCC 厚度及视网膜全层厚度,结果显示造模后 GCC 厚度在 RIR 损伤的第 3 天较造模前变薄,而视网膜

全层厚度在第 3 天无显著改变,第 7 天才开始有显著改变。GCC 对应着 RGCs 的轴突、细胞体,借此验证了 RGCs 对高眼压更敏感,也验证了 Nakatani 等和 Matlach 等的 GCC 对高眼压更敏感这一结论。RIR 损伤后第 14 天 HE 及 TUNEL 染色结果也显示视网膜变薄,尤其是 GCC 变薄最明显,RGCs 胞核稀疏,空泡化明显,内核层和外核层变薄,视网膜各层细胞出现明显凋亡。以上结果说明缺血再灌注导致视网膜微循环及内环境紊乱,使得神经元及神经胶质细胞结构功能改变,最后导致细胞死亡。同时眼底成像技术也发现眼底视网膜血管从第 3 天开始就出现明显的缺血现象,且到第 14 天的都没有恢复,说明前房在 132 mmHg 压力作用下会造成视网膜严重的缺血现象,造成视网膜的急性损伤,这也印证了许多文献报道的缺血可能是视网膜及视神经损伤的原因之一<sup>[17]</sup>。

视网膜中正常的谷氨酸浓度可维持 RGCs 的分化和新陈代谢活动的正常进行,而高病理性谷氨酸浓度则会产生对中枢神经的毒害损伤作用<sup>[18]</sup>。在研究中发现,与对照眼相比,造模眼在急性高眼压损伤后视网膜谷氨酸浓度即迅速升高,说明 Long Evans 大鼠在急性高眼压损伤后,视网膜中谷氨酸迅速增加,产生神经兴奋毒性,这可能是视网膜电生理功能快速损伤、结构萎缩及造成 RGCs 死亡的因素之一。

综上所述,本实验研究发现,给予 Long Evans 大鼠前房持续 60 min,132 mmHg 灌注压所造成的 RIR 损伤会引起视觉功能严重损伤,视网膜萎缩,厚度减少,RGCs 损伤,视网膜谷氨酸含量增加,神经兴奋毒性增强,可以为视网膜损伤疾病的发病机制及保护药物的研究提供良好的模型基础。

### 参考文献:

- [1] Jiang MN, Zhou YY, Hua DH, et al. Vagal nerve stimulation attenuates ischemia-reperfusion induced retina dysfunction in acute ocular hypertension [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 87.
- [2] Li X, Ye Z, Pei S, et al. Neuroprotective effect of minocycline on rat retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Vis*, 2021, 27: 438-456.
- [3] Liu W, Xia F, Ha Y, et al. Neuroprotective effects of HSF1 in retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(4): 965-977.
- [4] Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup> channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina [J]. *Exp Eye Res*,

- 2000, 70(4): 475-484.
- [ 5 ] Pang IH, Clark AF. Inducible rodent models of glaucoma [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2020, 75: 100799.
- [ 6 ] 斯庆布日古德, 都日娜. 建立视网膜缺血再灌注损伤模型方法的选择 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(26): 167-168.
- [ 7 ] Li S, Li H, Takahata T. Pigmented Long-Evans rats demonstrate better visual ability than albino Wistar rats in slow angles-descent forepaw grasping test [J]. *Neuroreport*, 2022, 33(12): 543-547.
- [ 8 ] Baek SM, Kim K, Kim S, et al. SP prevents T2DM complications by immunomodulation [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16753.
- [ 9 ] Linsenmeier RA, Beckmann L, Dmitriev AV. Intravenous ketamine for long term anesthesia in rats [J]. *Heliyon*, 2020, 6(12): e05686.
- [ 10 ] Moshiri A, Chen R, Kim S, et al. A nonhuman primate model of inherited retinal disease [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 863-874.
- [ 11 ] Bui BV, He Z, Vingrys AJ, et al. Using the electroretinogram to understand how intraocular pressure elevation affects the rat retina [J]. *J Ophthalmol*, 2013, 2013: 262467.
- [ 12 ] Jnawali A, Lin X, Patel NB, et al. Retinal ganglion cell ablation in Guinea pigs [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 202: 108339.
- [ 13 ] Muir ER, Chandra SB, Narayanan D, et al. Effects of chronic mild hyperoxia on retinal and choroidal blood flow and retinal function in the DBA/2J mouse model of glaucoma [J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0266192.
- [ 14 ] Wiemann S, Yousf A, Joachim SC, et al. Knock-out of tenascin-C ameliorates ischemia-induced rod-photoreceptor degeneration and retinal dysfunction [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 642176.
- [ 15 ] Matlach J, Wagner M, Malzahn U, et al. Repeatability of peripapillary retinal nerve fiber layer and inner retinal thickness among two spectral domain optical coherence tomography devices [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(10): 6536-6546.
- [ 16 ] Nakatani Y, Higashide T, Ohkubo S, et al. Influences of the inner retinal sublayers and analytical areas in macular scans by spectral-domain OCT on the diagnostic ability of early glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(11): 7479-7485.
- [ 17 ] Eriчев VP, Khachatryan GK, Khomchik OV. Current trends in studying pathogenesis of glaucoma [J]. *Vestn Oftalmol*, 2021, 137: 268-274.
- [ 18 ] González Fleitas MF, Devouassoux JD, Aranda ML, et al. Enriched environment provides neuroprotection against experimental glaucoma [J]. *J Neurochem*, 2020, 152(1): 103-121.

[收稿日期]2022-09-14

## (上接第 45 页)

- [ 21 ] Egeland NG, Austdal M, van Diermen-Hidle B, et al. Validation study of MARCKSL1 as a prognostic factor in lymph node-negative breast cancer patients [J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0212527.
- [ 22 ] Kim BR, Dong SM, Seo SH, et al. Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1 [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(9): 1765-1773.
- [ 23 ] Zhao Y, Xie X, Tian L, et al. MARCKSL1 interacted with F-actin to promote esophageal squamous cell carcinoma mobility by modulating the formation of invadopodia [J]. *Cancer Med*, 2023, 12(3): 3299-3312.
- [ 24 ] Liang W, Gao R, Yang M, et al. MARCKSL1 promotes the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(3): 2272-2280.
- [ 25 ] Sheats MK, Yin Q, Fang S, et al. MARCKS and lung disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60(1): 16-27.

[收稿日期]2023-03-15

王衍,陈玲,庞胤,等. 外源性八肽胆囊收缩素对谷氨酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 62-67, 74.

Wang Y, Chen L, Pang Y, et al. Protective effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on glutamate-induced neuronal apoptosis in the rat cerebral cortex [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 62-67, 74.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.008

# 外源性八肽胆囊收缩素对谷氨酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡的保护作用研究

王 衍<sup>1</sup>, 陈 玲<sup>2\*</sup>, 庞 胤<sup>3</sup>, 张海峰<sup>3</sup>, 李贺扬<sup>4</sup>

(1. 沧州医学高等专科学校医学系, 河北 沧州 061001; 2. 沧州医学高等专科学校附属人民医院妇科, 河北 沧州 061001; 3. 沧州医学高等专科学校基础医学部, 河北 沧州 061001; 4. 河北沧州市中心医院神经外五科, 河北 沧州 061001)

**【摘要】** 目的 探讨外源性八肽胆囊收缩素(CCK-8)对谷氨酸诱导体外大鼠大脑皮层神经元损伤模型中神经细胞凋亡的保护作用及其可能作用机制。方法 不同浓度 CCK-8 处理体外培养的大鼠大脑皮层神经元, MTT 法检测细胞存活情况并筛选合适浓度。培养大鼠大脑皮层神经细胞并用谷氨酸(Glu)处理建立神经元损伤模型, 分为模型组、CCK-8 组, 另设对照组。采用流式细胞术检测细胞周期与凋亡率; Flou-4 实验检测各组细胞  $Ca^{2+}$  水平; 实时定量 PCR 法检测 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关蛋白(Bax) mRNA 表达情况; Western blot 检测 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达情况。结果 与对照组比较, 模型组神经元细胞存活率、 $G_1$  期细胞分布比例、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平降低, S 期、 $G_2/M$  期细胞分布比例、细胞凋亡率、 $Ca^{2+}$  水平、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组神经元细胞存活率、 $G_1$  期细胞分布比例、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平升高, S 期、 $G_2/M$  期细胞分布比例、细胞凋亡率、 $Ca^{2+}$  水平、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ )。结论 CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡有一定的抑制作用, 可能是通过抑制钙离子内流, 调节细胞内 Bax/Bcl-2 表达水平发挥作用。

**【关键词】** 外源性八肽胆囊收缩素; 大脑皮层神经元; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤因子 2; Bcl-2 相关蛋白

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0062-06

## Protective effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on glutamate-induced neuronal apoptosis in the rat cerebral cortex

WANG Yan<sup>1</sup>, CHEN Ling<sup>2\*</sup>, PANG Yin<sup>3</sup>, ZHANG Haifeng<sup>3</sup>, LI Heyang<sup>4</sup>

(1. Department of Medicine, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001, China. 2. Department of Gynaecology, People's Hospital Affiliated to Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001. 3. Department of Basic Medicine, Cangzhou Medical College, Cangzhou 061001. 4. Department of Neurology V, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and mechanism of exogenous cholecystokinin octapeptide(CCK-8) on neuronal apoptosis induced by glutamate in the rat cerebral cortex in vitro. **Methods** Rat cortical neurons cultured in vitro were treated with various concentrations of CCK-8. An MTT assay was used to assess cell survival and screen the appropriate concentration. Rat cortical neurons were treated with glutamic acid(Glu) to establish a neuron injury model and

**【基金项目】** 2021 年医学科学研究课题(20210971)。

**【作者简介】** 王衍(1976—), 男, 硕士, 研究方向: 颅脑外科学、临床应用解剖学。E-mail: zhuxitai407739xi@163.com

**【通信作者】** 陈玲(1977—), 女, 硕士, 研究方向: 妇产科学、临床应用解剖学。E-mail: feng80730li@163.com

were divided into model, CCK-8, and control groups. The cell cycle and apoptosis rate were assessed by flow cytometry. The  $Ca^{2+}$  level was assessed by Flou-4 staining. Bcl-2 and Bax mRNA expression was assessed by Real-time quantitative PCR. Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 protein expression was assessed by Western blot. **Results** Compared with the control group, the survival rate of neuronal cells, the distribution of  $G_1$  phase cells, Bcl-2 mRNA and protein expression levels were decreased, and the distributions of S and  $G_2/M$  phase cells, the apoptosis rate, calcium ion level, Bax and cleaved caspase-3 protein expression levels were increased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the neuronal cell survival rate,  $G_1$  phase cell distribution, snf Bcl-2 mRNA and protein expression levels were increased, whereas S and  $G_2/M$  phase cell distributions, apoptosis rate, calcium ion level, Bax and cleaved caspase-3 protein expression levels were decreased in the CCK-8 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** CCK-8 has an inhibitory effect on neuronal apoptosis induced by glutamate by inhibiting calcium influx and regulating Bax/Bcl-2 expression in cells.

**[Keywords]** exogenous cholecystokinin octapeptide; cortical neurons; apoptosis; B-cell lymphoma factor 2; Bcl-2-related protein

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

谷氨酸是中枢神经系统最主要的兴奋神经递质之一,参与着许多神经系统的正常生理活动<sup>[1]</sup>。在许多中枢神经系统疾病中发现,谷氨酸呈异常释放的状态,且累积量较高时会产生兴奋性神经毒性,高浓度和低浓度谷氨酸均可损伤神经元,关于其具体浓度并未见有具体标准<sup>[2]</sup>。据报道,谷氨酸神经毒性是影响大量慢性或急性神经疾病神经元损伤的主要途径,严重时可直接引发神经细胞元坏死,造成不可逆的神经损伤<sup>[3]</sup>。外源性八肽胆囊收缩素(exogenous cholecystokinin octapeptide, CCK-8)是分布于中枢神经系统的经典脑肠肽,是脑组织含量最丰富的神经肽之一,以神经递质的形式参与消化、摄食、疼痛的感知及焦虑情绪的产生等多种生理过程<sup>[4-5]</sup>。研究发现,CCK-8具有抑制  $Ca^{2+}$  内流、减少 NO 的生成和促进神经生长因子的生成等作用,能够减少神经元损伤,但其作用机制尚不明确<sup>[6]</sup>。近期有关报道,CCK-8减少神经毒性的功能可能与影响细胞凋亡的过程有关<sup>[7]</sup>。本研究旨在探讨 CCK-8 对大脑皮层神经元损伤大鼠模型神经元凋亡的影响,分析其能否发挥神经保护作用,为 CCK-8 的药物研发及谷氨酸神经毒性的临床治疗提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠(出生 24 h 内),雌雄不限,体重 5~6 g,80 只,来源于杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2019-0004]。实验在沧州医学高等专科学校动物实验中心[SYXK(冀)2019-0006]进行,实验经沧州医学高等专科学校审核通过(CYLL20230509),实验过程按照 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

CCK-8(武汉科斯坦生物科技有限公司,货号:601336);L-谷氨酸(美国 Sigma 公司,批号:G1251);兔抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体、兔抗大鼠凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤因子 2(b-cell lymphoma factor 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关蛋白(bcl-2 related x protein, Bax)和 cleaved caspase-3 多克隆抗体、山羊抗兔二抗 IgG(美国 Cell Signaling 公司,批号:#4970、#15071、#41162、#9662、#2985);DMEM 细胞培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号:90023、S9030、T1300)。BD FACSAria II 型流式细胞仪(上海实维实验仪器技术有限公司);Flou-4 AM 钙离子检测试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RM2135 型 Leica 石蜡切片机(德国 Leica 公司);Olympus 型多功能显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 大脑皮层神经元原代培养

将大鼠处死,无菌条件下分离大脑皮质(剔除血管与软组织),取适量皮质组织剪碎放入培养基内,0.25%胰蛋白酶 37℃ 下消化 15 min,加入 10%胎牛血清终止消化。200 目筛网过滤,收集滤液高速离心后收集细胞,使用 DMEM 培养基(15%胎牛血清)重悬,制成密度为  $3 \times 10^5$ /mL 的细胞悬液,将细胞接种于预先包被多聚赖氨酸的 24 孔板上,常规培养于 37℃、5%  $CO_2$  培养箱,48 h 后加入 10  $\mu$ mol/L 阿糖胞苷。每天观察细胞生长状态,3 d 换液 1 次,培养 8 d 进行神经元鉴定后细胞可用于实验。

#### 1.3.2 细胞活力检测

原代培养神经元细胞 8 d 后,采用 MTT 实验检测不同浓度 CCK-8 对神经元细胞活力的影响,将神

神经元细胞接种于 96 孔板中,细胞浓度为  $1 \times 10^4$ /mL。使用终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  的谷氨酸处理大脑皮层神经元细胞建立神经元损伤模型,再分别给予含有 0、0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$  的 CCK-8 的培养液处理细胞,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积数为 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱培养 24 h。取出 96 孔板,向各孔细胞加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,各孔加入 DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$ ,震荡器上充分震荡 10 min。酶标仪波长 490 nm 处检测各孔吸光值,实验重复 3 次。细胞存活率(%)=实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

### 1.3.3 模型建立与细胞分组

将大脑皮层神经元细胞常规培养于 DMEM 细胞培养基(10%胎牛血清+1%青链霉素),置于 5%、 $\text{CO}_2$  恒温箱中,37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养,取对数生长期细胞用于实验。使用终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  的谷氨酸处理大脑皮层神经元细胞建立神经元损伤模型,分为模型组和 CCK-8 组,另设对照组。CCK-8 组使用含有 1  $\mu\text{mol/L}$  的 CCK-8 培养液处理细胞,对照组为等量完全培养基。

### 1.3.4 流式细胞术检测细胞周期

取处于对数生长期神经元细胞重新制备细胞悬液,浓度调整为  $1 \times 10^6$ /mL,给予相应药物培养 24 h。使用 PBS 溶液反复洗涤细胞 3 次,接种于 6 孔板内,使用 80%乙醇溶液固定细胞 5 min,PBS 溶液清洗 2 次,去除残留乙醇溶液,加入 80  $\mu\text{L}$  PBS 溶液、10  $\mu\text{L}$  PI、50  $\mu\text{L}$  FITC,避光孵育 60 min。重悬细胞上机收集细胞,于 FACS Aria 流式细胞仪波长 488 nm 处检测荧光强度,观察并分析细胞各周期分布情况。

### 1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡

收集对数生长期的细胞,PBS 重悬细胞制备细胞悬液,浓度调整为  $1 \times 10^6$ /mL,给予对应浓度药物培养 24 h。弃去培养液,预冷的 PBS 洗涤 2 次,胰蛋白酶消化,用 500  $\mu\text{L}$  结合缓冲液重悬细胞为  $1 \times 10^6$ /mL。高速离心 5 min,分别加入 195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC、5  $\mu\text{L}$  PI 混匀,室温下避光孵育 20 min。流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡率分析各组细胞凋亡情况。

### 1.3.6 Flou-4 染色检测细胞钙离子水平

取对数生长期神经元细胞进行实验,胰蛋白酶消化为细胞悬液,以  $5 \times 10^5$ /mL 接种于 6 板孔中,按照各组对应药物操作后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含有 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱。加入 1 mL 培养基和 Flou-4 AM

染液,于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱静置 20 min。弃去上清液,使用染色缓冲液洗涤 2 次,荧光显微镜下观察并拍照,IPP 6.0 软件分析。

### 1.3.7 RT-PCR 检测 mRNA 表达

取各组处于对数生长期的细胞,弃去培养液,PBS 清洗,加入细胞裂解试剂置于冰上裂解,TRIzol 沉淀法提取各组细胞总 RNA。反转录试剂盒合成 cDNA,用于配制 PCR 反应体系:2 $\times$ SYBR qPCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,cDNA 样品 2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,ddH $_2\text{O}$  6  $\mu\text{L}$ 。引物设计为 Bcl-2: F-5'-GAGAGCGTCAACAGGGAGATG-3'、R-5'-CCAGCC TCCGTTATCCTGGA-3'; Bax: F-5'-CCGGCGAATT GGAGATGAACT-3'、R-5'-CCAGCCCATGATGGTT CTGAT-3';  $\beta$ -actin: F-5'-GGCTGTATTCCCTC CATCG-3'、R-5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。设置 PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$  30 s,59 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,共循环 40 次。得 Ct 值,根据  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算目的基因与内参基因的相对表达量,比较各样本之间基因表达差异。

### 1.3.8 Western blot 检测蛋白表达

提前按照比例(1:99)将 RIPA 细胞裂解液与蛋白酶抑制剂 PMSF 配制蛋白裂解液,取出各组神经元细胞后,弃去培养液,离心收集细胞,PBS 清洗后加入蛋白裂解液冰上裂解,4 $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min,提取总蛋白,并对蛋白上清液进行浓度测定。确定蛋白上样量,制备分离胶与浓缩胶进行凝胶电泳。250 mA 恒流 2 h 转至 PVDF 膜上,加入脱脂牛奶封闭 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$  孵育一抗(1:1000)过夜,TBST 清洗 5 次,加入 1:3000 稀释二抗,摇床封闭 2 h,TBST 清洗 5 次。加入化学发光试剂 ECL A 液与 B 液进行显色,曝光、显影,Image J 软件分析。

## 1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 统计学软件分析数据,数据均采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。结果以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 对细胞活力的影响

使用谷氨酸处理细胞后,细胞活性明显降低( $P < 0.05$ )。不同浓度 CCK-8(0、0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$ )作用于大脑皮层神经元细胞后,各组细胞

存活率均明显升高,且呈现浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。根据对细胞活力的影响结果,后续实验 CCK-8 选择  $1 \mu\text{mol/L}$  作为统一给药浓度,见表 1。

### 2.2 各组细胞周期分布比较

细胞周期分布检测可以显示各时期细胞情况,直观反映细胞是否出现凋亡,流式细胞仪检测细胞周期分布结果显示,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞  $G_1$  期细胞分布减少, S 期、 $G_2/M$  期细胞分布比例增加 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组大脑皮层神经元细胞  $G_1$  期细胞分布增加, S 期、 $G_2/M$  期细胞分布比例减少 ( $P < 0.05$ ), 见表 2, 图 1。

### 2.3 各组细胞凋亡率比较

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测结果显示,与对照组 ( $6.43 \pm 0.77$ )% 比较,模型组大脑皮层神经元细胞凋亡率 ( $34.26 \pm 1.60$ )% 升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组大脑皮层神经元细胞凋亡率 ( $9.45 \pm 0.83$ )% 降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.4 各组细胞钙离子水平比较

Flou-4 AM 染色结果显示,与对照组 ( $0.23 \pm 0.02$ ) 比较,模型组大脑皮层神经元细胞钙离子水平 ( $0.76 \pm 0.04$ ) 明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组大脑皮层神经元细胞钙离子水平 ( $0.27 \pm 0.04$ ) 降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

表 1 各组细胞存活情况比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Comparison of cell survival in each group

药物 Drug	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concentration	细胞存活率 (%) Cell viability
谷氨酸 Glutamate	50	$62.36 \pm 0.53^{**}$
	0	$100.00 \pm 0.00$
CCK-8	0.01	$65.78 \pm 0.64^{**}$
	0.1	$68.67 \pm 0.63^{**\Delta}$
	1	$74.95 \pm 0.59^{**\Delta\Delta}$

注:与  $0 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 组相比,  $^{**}P < 0.05$ ; 与  $0.01 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 组比,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与  $0.1 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 组比,  $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ 。  
Note. Compared with  $0 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 group,  $^{**}P < 0.05$ . Compared with  $0.01 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 group,  $^{\Delta}P < 0.05$ . Compared with  $0.1 \mu\text{mol/L}$  CCK-8 group,  $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ .

表 2 各组细胞周期分布比较 ( $\bar{x} \pm s, \%, n = 3$ )  
Table 2 Comparison of cell cycle distribution in each group

组别 Groups	$G_1$ 期 Phase $G_1$	S 期 Phase S	$G_2/M$ 期 Phase $G_2/M$
对照组 Control group	$44.34 \pm 1.72$	$22.17 \pm 1.75$	$12.21 \pm 2.01$
模型组 Model group	$35.49 \pm 1.63^{**}$	$29.75 \pm 2.08^{**}$	$26.68 \pm 1.69^{**}$
CCK-8 组 CCK-8 group	$48.82 \pm 1.72^{\Delta}$	$23.33 \pm 2.26^{\Delta}$	$11.64 \pm 1.94^{\Delta}$

注:与对照组相比,  $^{**}P < 0.05$ ; 与模型组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。  
Note. Compared with control group,  $^{**}P < 0.05$ . Compared with model group,  $^{\Delta}P < 0.05$ .

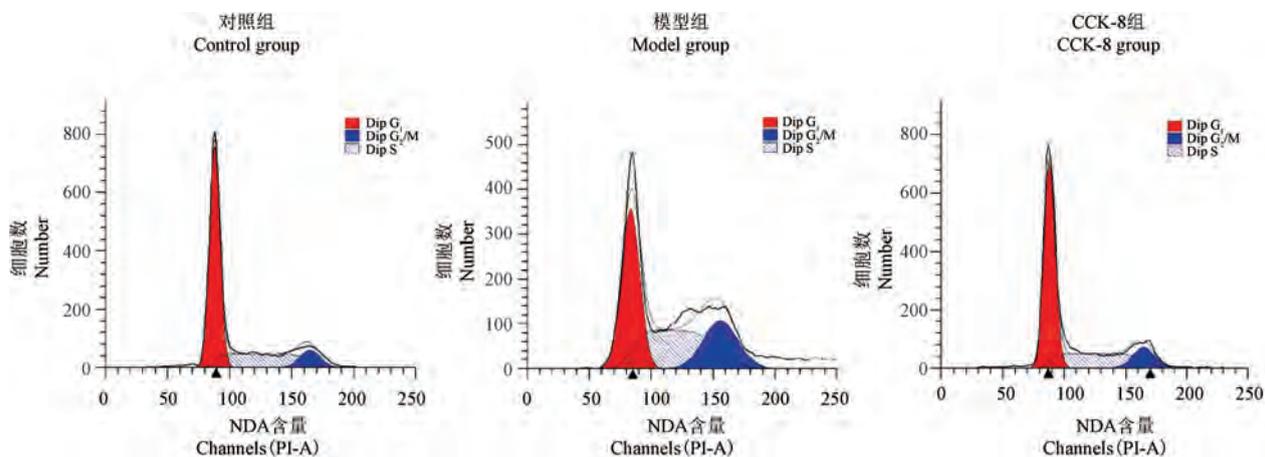


图 1 各组细胞周期分布检测

Figure 1 Cell cycle distribution in each group

## 2.5 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平比较

Bcl-2 和 Bax mRNA 水平可以反映出 Bcl-2/Bax 经典细胞凋亡通路在基因水平的表达情况,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 mRNA 表达水平明显降低, Bax mRNA 表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 mRNA 表达水平明显升高, Bax mRNA 表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

## 2.6 凋亡蛋白水平比较

Western blot 实验结果显示,与对照组比较,模型组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低, Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, CCK-8 组大脑皮层神经元细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高, Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 4, 图 4。

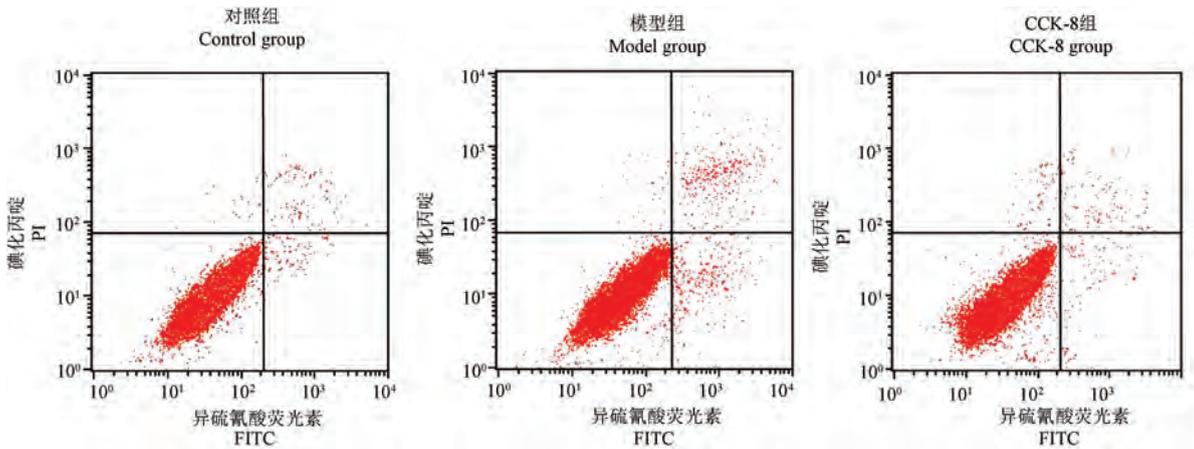


图 2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况

Figure 2 Apoptosis was detected by flow cytometry

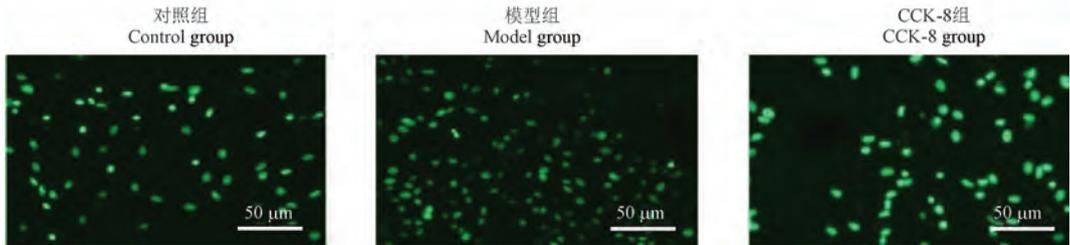


图 3 Flou-4 检测细胞钙离子水平 (Flou-4 AM)

Figure 3 Flou-4 was used to detect the level of calcium in cells

表 3 各组细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Comparison of Bcl-2 and Bax mRNA levels of cells in each group

组别 Groups	Bcl-2	Bax
对照组 Control group	0.55 ± 0.04	0.35 ± 0.03
模型组 Model group	0.22 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.91 ± 0.07 <sup>**</sup>
CCK-8 组 CCK-8 group	0.52 ± 0.06 <sup>△</sup>	0.39 ± 0.04 <sup>△</sup>

注:与对照组相比, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 4 各组细胞凋亡蛋白水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Comparison of apoptotic protein levels in each group

组别 Groups	Bcl-2	Bax	cleaved caspase-3
对照组 Control group	0.67 ± 0.06	0.35 ± 0.02	0.26 ± 0.03
模型组 Model group	0.28 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>**</sup>	0.69 ± 0.04 <sup>**</sup>
CCK-8 组 CCK-8 group	0.56 ± 0.06 <sup>△</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>△</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>△</sup>

注:与对照组相比, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.05$ . Compared with model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

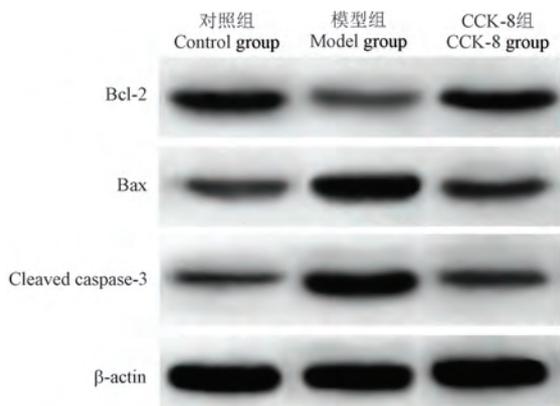


图 4 各组细胞凋亡蛋白表达水平检测

Figure 4 Expression level of apoptosis protein was detected in each group

### 3 讨论

谷氨酸是脑内兴奋性神经递质,与细胞膜上的特异性受体结合参与多种神经系统生理活动,如记忆、感知、神经细胞的发育调节等<sup>[7]</sup>。在既往研究中发现,高浓度的谷氨酸对神经元可造成一定程度的神经毒性,抑制神经细胞的发育<sup>[8]</sup>。病理状态下,细胞外高浓度的谷氨酸会过度激活受体,引发急性神经元水肿和迟发性神经元变性,对神经元造成损伤,长时间会导致神经元细胞死亡<sup>[9]</sup>。神经元细胞是构成神经系统的基本结构和功能单位,各动物的神经系统虽大不相同,繁复程度也不可相提并论,但其基本组织—神经元细胞的基本特征却大致相同<sup>[10]</sup>。因此,体外培养大鼠大脑皮层神经元细胞,可以模拟神经元细胞在高浓度的谷氨酸下发生凋亡的过程。

CCK-8 是一种由多个氨基酸组成的多肽,参与调节饮食、学习记忆和神经递质的释放等生理过程,据报道,CCK-8 能够抑制神经细胞凋亡,具有神经保护的药理作用<sup>[11-12]</sup>。另有研究发现,CCK-8 可通过调节凋亡蛋白水平保护体外培养的神经元细胞<sup>[13]</sup>。本研究通过采用不同浓度 CCK-8 处理体外培养的大鼠大脑皮层神经元细胞,从分子机制上探讨 CCK-8 对谷氨酸诱导的大脑皮层神经元细胞增殖和凋亡的影响。结果显示,在 MTT 实验中,使用高浓度的谷氨酸处理大脑皮层神经元细胞后,细胞活力明显降低,且采用不同浓度的 CCK-8(0、0.01、0.1 和 1  $\mu\text{mol/L}$ )作用大脑皮层神经元细胞后,各组细胞存活率均明显升高,且呈现浓度依赖性。提示在高浓度的谷氨酸损伤条件下,CCK-8 可以大幅度

的提高大脑皮层神经元细胞的存活率。此外,相较于对照组,模型组神经元细胞凋亡率也明显下降,说明谷氨酸诱导下,神经元细胞坏死和凋亡的情况较为严重,但 CCK-8 组神经元的细胞凋亡率却明显高于模型组。提示 CCK-8 能够抑制谷氨酸诱导的大脑皮层神经元细胞凋亡,对大脑皮层神经元细胞具有保护作用。研究发现,CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞周期也具有明显作用<sup>[13]</sup>,在流式细胞术检测细胞周期实验中,发现模型组细胞多分布于  $G_2$  期,添加 CCK-8 作用后,能够显著减少神经元细胞由  $G_2$  向 M 期进行转变,从而抑制细胞的凋亡,进一步证实 CCK-8 对神经元细胞的保护作用。

在本研究中,与对照组比较,模型组神经元细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白水平明显升高,而 Bcl-2 表达水平明显降低。谷氨酸介导着 N-甲基-D-天(门)冬氨酸受体,这是一种调节  $\text{Ca}^{2+}$  通道的主要受体,高浓度的谷氨酸可以与其结合,引起  $\text{Ca}^{2+}$  的内流,引发钙超载,导致蛋白酶的激活和基因表达的改变,造成神经元细胞坏死和凋亡<sup>[14-15]</sup>。Bcl-2 家族蛋白作为细胞凋亡的调控因子,可以通过改变线粒体外膜的通透性,诱发膜间隙的凋亡蛋白释放,引起细胞凋亡<sup>[16]</sup>。研究结果提示谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡与下调 Bax/Bcl-2 比值相关,与既往研究报道一致。在本研究中,使用 CCK-8 处理细胞后,与模型组对比,CCK-8 组神经元细胞  $\text{Ca}^{2+}$  水平明显降低,且抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平升高,促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平均呈下降趋势。表明 CCK-8 对谷氨酸的神经毒性的抑制作用可能与抑制  $\text{Ca}^{2+}$  内流,上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平,抑制神经元细胞凋亡有关。

综上所述,CCK-8 对谷氨酸诱导的神经元细胞凋亡有一定的抑制作用,可能是通过抑制  $\text{Ca}^{2+}$  内流,调节细胞内 Bax/Bcl-2 表达水平发挥作用,为临床治疗谷氨酸神经毒性提供实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, et al. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 184.
- [2] Manucha W. Mitochondrial dysfunction associated with nitric oxide pathways in glutamate neurotoxicity [J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2017, 29(2): 92-97.

魏杏茹,王翠,庞旭娇,等. 虫草素通过调控 miR-135b-5p 表达抑制宫颈癌 Hela 细胞侵袭、转移的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 68-74.

Wei XR, Wang C, Pang XJ, et al. Cordycepin inhibits invasion and metastasis of Hela cervical cancer cells by regulating miR-135b-5p expression [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 68-74.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.009

# 虫草素通过调控 miR-135b-5p 表达抑制宫颈癌 Hela 细胞侵袭、转移的实验研究

魏杏茹<sup>1\*</sup>, 王翠<sup>2</sup>, 庞旭娇<sup>3</sup>, 杜婷婷<sup>1</sup>

(1.保定市妇幼保健院妇科,河北保定 071000;2.定州市人民医院妇科,河北定州 073000;  
3.河北省第七人民医院妇科,河北定州 073000)

**【摘要】** 目的 研究虫草素通过调控 miR-135b-5p 表达对宫颈癌 Hela 细胞侵袭、转移的影响及其调控机制。方法 用浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  (虫草素 I 组) 和 100  $\mu\text{mol/L}$  (虫草素 II 组) 的虫草素处理宫颈癌 Hela 细胞,另设空白对照组,用 MTT 法测定 Hela 细胞的生长情况。采用 Transwell 法测定 Hela 细胞侵袭情况,采用划痕实验检测宫颈癌 Hela 细胞的转移能力,采用 Real-time PCR 法测定人永生表皮细胞 Hacat 和宫颈癌 Hela 细胞中 miR-135-5p 的表达水平及不同浓度虫草素处理后对 miR-135-5p 的表达水平的影响。转染 miR-135b-5p mimic 至宫颈癌 Hela 细胞,并采用 Transwell 技术和划痕实验检测宫颈癌 Hela 细胞的侵袭能力和转移能力。**结果** 加入虫草素后宫颈癌 Hela 细胞生长受到显著的抑制,且高浓度的虫草素抑制作用更明显 ( $P < 0.05$ )。宫颈癌 Hela 细胞中 miR-135b-5p 的表达水平为  $(1.97 \pm 0.07)$ ,显著高于人永生表皮细胞 Hacat 细胞中 miR-135b-5p 的表达水平  $(1.01 \pm 0.03)$ ,组间比较差异具有统计学意义 ( $t = 28.187, P = 0.000$ )。加入虫草素后,宫颈癌 Hela 细胞侵袭率和转移率及 miR-135b-5p 表达明显降低;且高浓度虫草素处理后,宫颈癌 Hela 细胞侵袭率和转移率更低,组间比较差异均具有统计学意义 ( $t = 138.614 \sim 317.100, P < 0.05$ )。过表达 miR-135b-5p 显著增加宫颈癌 Hela 细胞的侵袭率和转移率 ( $t = 7.145, t = 7.465, P < 0.05$ ),且 Vimentin 表达增加、E-cad 表达降低 ( $t = 8.223, t = 7.473, P < 0.05$ )。**结论** 虫草素可通过抑制 miR-135b-5p 表达进而抑制 Hela 细胞的侵袭和转移。

**【关键词】** 虫草素;宫颈癌;Hela 细胞;侵袭;转移;miR-135b-5p

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0068-07

## Cordycepin inhibits invasion and metastasis of Hela cervical cancer cells by regulating miR-135b-5p expression

WEI Xingru<sup>1\*</sup>, WANG Cui<sup>2</sup>, PANG Xujiao<sup>3</sup>, DU Tingting<sup>1</sup>

(1. Department of Gynecology, Baoding Maternal and Child Health Hospital, Baoding 071000, China.

2. Department of Gynecology, Dingzhou People's Hospital, Dingzhou 073000. 3. Department of Gynecology, Hebei Seventh People's Hospital, Dingzhou 073000)

**【Abstract】 Objective** To study the effect of cordycepin on invasion and metastasis of Hela cervical cancer cells by regulating miR-135b-5p expression and its regulatory mechanism. **Methods** Hela cells were treated with 50 and 100

**【基金项目】** 河北省保定市科技计划项目 (2041ZF276)。

**【作者简介】** 魏杏茹 (1978—), 女, 副主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤。E-mail: weixr\_1978@163.com

$\mu\text{mol/L}$  cordycepin, and HeLa cell growth was measured by MTT assays. Transwell assays were used to assess HeLa cell invasion, a scratch assay was used to assess the metastasis ability of HeLa cells, and Real-time PCR was used to measure the miR-135-5p expression level in human immortalized epidermal cell line Hacat and HeLa cells, and the effect of various cordycepin concentrations on miR-135-5p expression level. miR-135b-5p mimic was transfected into HeLa cells, and the invasion and metastasis of HeLa cells were assessed by Transwell and scratch assays. **Results** After cordycepin treatment, HeLa cell growth was significantly inhibited, and the inhibitory effect of the high concentration cordycepin was more obvious ( $P < 0.05$ ). The miR-135b-5p expression level in HeLa cells was ( $1.97 \pm 0.07$ ), which was significantly higher than that in Hacat cells ( $1.01 \pm 0.03$ ), and the difference between groups was statistically significant ( $t = 28.187, P = 0.000$ ). After cordycepin treatment, the invasion and metastasis rates of HeLa cells and miR-135b-5p expression were decreased significantly. After treatment with a high cordycepin concentration, the invasion and metastasis rates of HeLa cells were lower, and the differences between groups were statistically significant ( $t = 138.614 \sim 317.100, P < 0.05$ ). Overexpression of miR-135b-5p significantly increased the invasion and metastasis rates of HeLa cells ( $t = 7.145, 7.465, P < 0.05$ ), and vimentin expression was increased and E-cad expression was decreased ( $t = 8.223, 7.473, P < 0.05$ ). **Conclusions** Cordycepin inhibits the invasion and metastasis of HeLa cells by inhibiting miR-135b-5p expression.

**【Keywords】** cordycepin; Cervical cancer; HeLa cells; invasion; transfer; miR-135b-5p

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

宫颈癌是常见的生殖系统恶性肿瘤,是女性癌症死亡的重要原因<sup>[1-2]</sup>。早期宫颈癌可以进行手术切除,但是晚期宫颈癌的标准治疗主要是放化疗,但是长期使用容易产生耐药性<sup>[3-4]</sup>。因此寻找高效的抗宫颈癌药物非常重要。冬虫夏草是冬虫夏草菌子实体与其寄主蝠蛾幼虫的僵虫菌核构成的复合体,生长于高寒地带,其主要活性成分是虫草素,具有调节免疫系统、抗菌、抗炎、清除自由基等多种功效;虫草素可以通过激活 caspase 介导的细胞凋亡途径、调节 ROS 的表达水平等机制来诱导癌细胞凋亡,同时诱导细胞周期阻滞、抑制癌细胞的转移、调控抑癌基因 p53 的表达水平来抑制癌细胞的增殖<sup>[5-6]</sup>。但是虫草素对人宫颈癌侵袭和转移作用以及生物学机制尚需认证及探索。miR-135b 位于 1 号染色体上,有 miR-135b-5p 和 miR-135b-3p 两种剪切成熟体,研究显示 miR-135b-5p 在食管鳞癌中能够通过抑制 smad2/3 的磷酸化参与 TGF- $\beta$  信号通路的调节,抑制食管鳞癌的迁移与侵袭;且 miR-135b-5p 在宫颈癌细胞系中表达水平上调,miR-135b-5p 表达与宫颈癌细胞的增殖存在相关性<sup>[7-9]</sup>,因此本研究将进一步研究虫草素在宫颈癌 HeLa 细胞侵袭、转移中的作用,其对 miR-135b-5p 表达影响,以期寻找更有效的抗宫颈癌药物奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

宫颈癌 HeLa 细胞和人永生表皮细胞 Hacat 均由中国科学院细胞库提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清、RPMI 1640 培养基(美国 Gibco);虫草素(Sigma,纯度  $\geq 99\%$ )。CO<sub>2</sub> 培养箱(ThermoFisher Scientific);酶标仪(RT-6100, Rayto);荧光显微镜(BX43, Olympus);蛋白成像系统(ChemiDoc XRS, BIO-RAD)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养和分组

常规复苏细胞并进行传代。

实验分组:虫草素 I 组(虫草素浓度  $50 \mu\text{mol/L}$ )、虫草素 II 组(虫草素浓度  $100 \mu\text{mol/L}$ )和空白对照组(虫草素浓度  $0 \mu\text{mol/L}$ ),设 5 个复孔。

#### 1.3.2 MTT 测定细胞的生长情况

MTT 测定细胞的生长的具体操作参照文献<sup>[10]</sup>进行,首先测定 IC<sub>50</sub> 值:设定虫草素浓度为 0、20、30、40、50、60、70、80  $\mu\text{mol/L}$ ,其他操作参照文献<sup>[10]</sup>进行。

根据 IC<sub>50</sub> 结果,采用浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素处理细胞,并设空白对照组,测定虫草素对细胞生长的影响。各组中加入的样品:空白孔中加入 10  $\mu\text{L}$  培养液,其余孔中分别加入 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素。

#### 1.3.3 PCR 法测量 miR-135-5p 表达

培养 48 h 时,从细胞培养箱中取出细胞,PBS 清洗两遍,每孔中加入 1 mL 细胞裂解液 TRIzol,提取总的 RNA,并采用微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,然后进行扩增。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计并合成。

反应体系:SYBR® Premix Ex Taq TM II 5  $\mu\text{L}$ ,上游、下游引物各 0.25  $\mu\text{L}$ , ROX 0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA 2.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 10  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 40 个循环。GAPDH 作为内参, GAPDH 引物序列为上游:5'-GACAGTCAGCCGCATCTTCT-3' 和下游:5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC-3', miR-135-5p 引物序列为上游:5'-TGCGATATGGCTTTTCATTCCTA-3' 和下游:5'-CGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'。按  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  的方法计算目的基因相对表达量。

宫颈癌 Hela 细胞培养后, 分别加入含 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素的培养液, 并设一组空白对照组, 培养过夜, 然后采用 Real-time PCR 法测定宫颈癌 Hela 细胞中 miR-135-5p 的表达水平。

### 1.3.4 Transwell 测定细胞的侵袭能力

Transwell 测定细胞的侵袭能力的研究参照文献进行操作<sup>[10]</sup>, 小室下层加入含有血清的含 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素的培养液, 并设一组空白对照组, 上层小室中加入不含血清的培养液。转染细胞的侵袭情况采用 miR-135b-5p mimic 和 miR mimic NC 转染后的细胞, 具体操作方法与空白对照组相同。

### 1.3.5 划痕实验检测 Hela 细胞的转移能力

将含 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素及空白对照组的宫颈癌细胞 Hela 细胞消化铺满单层后<sup>[10]</sup>, 使用小号枪头垂直划痕, 然后加入不含血清的培养基, 于细胞培养箱中培养 48 h, 然后用显微镜拍照, 用 Image J 软件进行分析, 细胞迁移率 = (0 h 细胞划痕宽度 - 48 h 细胞划痕宽度) / 0 h 细胞划痕宽度  $\times$  100%。转染细胞的转移情况采用 miR-135b-5p mimic 和 miR mimic NC 转染后的细胞, 操作与空白对照组相同。

### 1.3.6 miR-135b-5p mimic 和 miR mimic NC 的转染

用 PBS 将宫颈癌 Hela 细胞清洗两遍, 加入 2 mL 完全培养基, 在超净台内, 取数个 1.5 mL EP 管, 分别加入 200  $\mu\text{L}$  基础培养基, 然后分别加入 5  $\mu\text{L}$  miR-135b-5p mimic 和 miR mimic NC, 静置 5 min, 然后分别加入 5  $\mu\text{L}$  Tubofect Transfection Reagent 转染制剂, 混匀后静置 25 min。然后加入至 6 孔板中, 于细胞培养箱中继续培养。48 h 后观察细胞的状态, 并采用 Transwell 技术和划痕实验检测宫颈癌 Hela 细胞的侵袭能力和转移能力。

### 1.3.7 过表达 miR-135b-5p 对虫草素处理 Hela 细胞的侵袭、转移影响

参照方法部分 1.3.3 和 1.3.4, 首先用浓度为 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的虫草素处理宫颈癌细胞 Hela 细胞, 然后参照方法部分 1.3.6 转染 miR-135b-5p mimic 使 miR-135b-5p 过表达, 48 h 后观察细胞的状态, 并采用 Transwell 技术和划痕实验检测宫颈癌 Hela 细胞的侵袭能力和转移能力。

### 1.3.8 Western blot 检测 Vimentin 和 E-cad 蛋白表达

细胞培养 48 h 后, 取出并用 PBS 清洗后, 提取总蛋白, 然后加入适量 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 变性 5 min。然后进行电泳、切胶、转膜, 封闭 2 h 后, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PVDF 膜用 TBST 漂洗 5 次, 然后加入二抗, 室温孵育 1 h, 用 TBST 洗膜。ECL 显色, 凝胶成像系统拍照并分析灰度值, 计算 EMT 标志物波形蛋白 (Vimentin) 和 E-钙黏蛋白 (E-cad) 蛋白相对表达量。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析处理。所有数据采用平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 计量资料多组间比较采用  $F$  检验, 组间两两对比差异分析采用 LSD- $t$  检验。结果以  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 虫草素对宫颈癌 Hela 细胞生长的影响

通过加入不同浓度的虫草素对细胞处理 48 h 之后, 计算得到宫颈癌 Hela 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 结果见图 1A。因此选择 50  $\mu\text{mol/L}$  和高浓度 100  $\mu\text{mol/L}$  进行后续实验研究。

虫草素 I 组和虫草素 II 组宫颈癌 Hela 细胞 OD 值均小于空白对照组, 且高浓度的虫草素抑制作用更明显 ( $P<0.05$ ), 结果见图 1B。

### 2.2 人永生表皮细胞 HacaT 和宫颈癌 Hela 细胞中 miR-135b-5p 的表达差异

宫颈癌 Hela 细胞中 miR-135b-5p 的表达水平为  $1.97\pm 0.07$ , 显著高于人永生表皮细胞 HacaT 细胞中 miR-135b-5p 的表达水平  $1.01\pm 0.03$ , 组间比较差异具有统计学意义 ( $t=28.187, P=0.000$ )。

### 2.3 虫草素对宫颈癌 Hela 细胞侵袭和转移及 miR-135b-5p 表达的影响

加入虫草素后, 宫颈癌 Hela 细胞侵袭率和转移

率及 miR-135b-5p 表达明显降低;且高浓度虫草素处理后,宫颈癌 HeLa 细胞侵袭率和转移率更低,组间比较差异均具有统计学意义 ( $t = 138.614 \sim 317.100, P < 0.05$ ),见表 1、图 2。

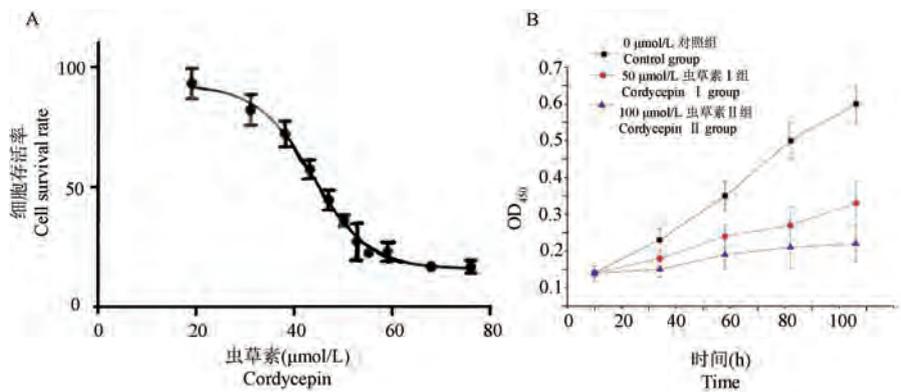
### 2.4 过表达 miR-135b-5p 对 HeLa 细胞的侵袭、转移及蛋白表达的影响

miR-135b-5p 过表达对宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭率和转移率有所增加 ( $t = 7.145, t = 7.465, P < 0.05$ ),且造成 Vimentin 表达增加、E-cad 表达降低

( $t = 8.223, t = 7.473, P < 0.05$ )。Western blot 结果显示,miR-135b-5p 过表达组与 NC 组相比, Vimentin 蛋白表达显著增加( $t = 5.284, P < 0.05$ );E-cad 表达显著降低( $t = 10.284, P < 0.05$ ),见表 2、图 3。

### 2.5 过表达 miR-135b-5p 对虫草素处理 HeLa 细胞的侵袭、转移影响

miR-135b-5p 处理后经虫草素处理 HeLa 细胞的侵袭、转移显著高于 miR-135b-5p 处理前 ( $P < 0.05$ )。(表 3)



注:A:不同浓度虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞生存率的影响;B:各组别宫颈癌 HeLa 细胞干预后 OD<sub>450</sub> 值。

图 1 虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞生存率以及干预后 OD<sub>450</sub> 值的影响

Note. A, Effect of different concentrations of cordycepin on the survival rate of cervical cancer HeLa cells. B, OD<sub>450</sub> value of HeLa cells of cervical cancer in each group after intervention.

Figure 1 Effects of cordycepin on survival rate of cervical cancer HeLa cells and OD<sub>450</sub> after intervention

表 1 虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭、转移及 miR-135b-5p 表达的影响

Table 1 Effects of cordycepin on invasion, metastasis and expression of mir-135b-5p in HeLa cells of cervical carcinoma

项目 Objective	空白对照 Control group	虫草素 I 组 Cordycepin I group	虫草素 II 组 Cordycepin II group	F	P
宫颈癌 HeLa 细胞侵袭率 (%) HeLa cell invasion rate of cervical cancer	85.63±4.22	68.23±3.58*	49.02±2.38#	138.614	<0.001
宫颈癌 HeLa 细胞转移率 (%) HeLa cell metastasis rate of cervical cancer	60.00±5.42	45.28±4.07*	19.87±2.39#	222.511	<0.001
miR-135b-5p 相对表达量 Relative expression of miR-135b-5p	1.99±0.05	1.68±0.04*	1.34±0.03#	10.328	<0.001

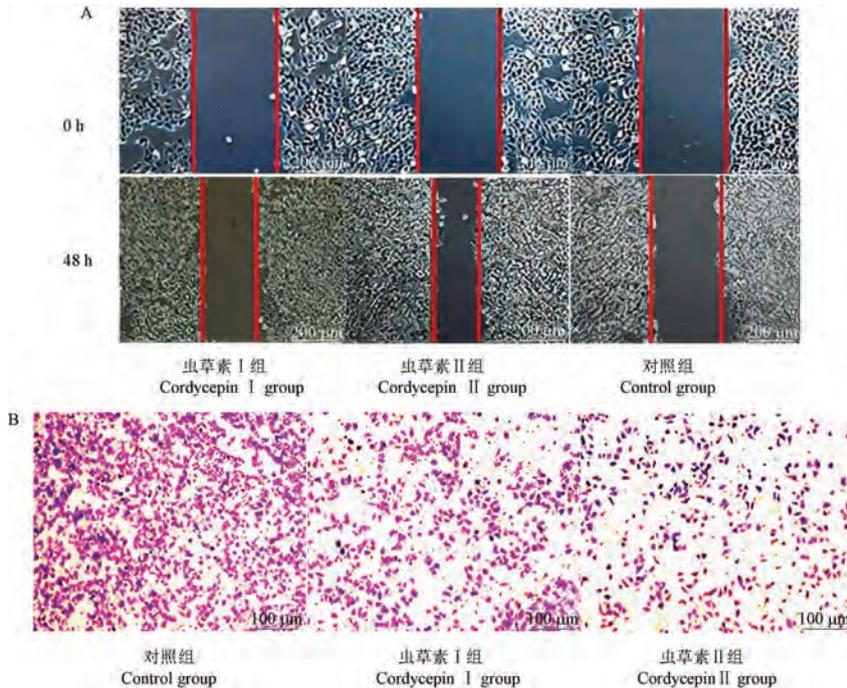
注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与虫草素 I 组比较, #  $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, \*  $P < 0.05$ . Compared with cordycepin I group, #  $P < 0.05$ .

表 2 过表达 miR-135b-5p 对 HeLa 细胞侵袭、转移和蛋白表达影响

Table 2 Effects of overexpression of miR-135b-5p on invasion, metastasis and protein expression of HeLa cells

组别 Groups	空白对照 Control group	miR-135b-5p	t	P
HeLa 细胞转移率 (%) HeLa cell metastasis rate	26.23±8.39	64.45±5.34	7.145	<0.001
HeLa 细胞侵袭率 (%) HeLa cell invasion rate	33.58±7.59	113.49±4.86	7.465	<0.001
E-cad	0.97±0.04	0.57±0.02	7.473	<0.001
Vimentin	0.87±0.04	1.11±0.05	8.223	<0.001



注:A:虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭的影响(划痕实验);B:虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞转移的影响。

图2 虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭以及细胞转移的影响

Note. A, Effect of cordycepin on the invasion of cervical cancer HeLa cells (scratch test). B, Effect of cordycepin on metastasis of cervical cancer HeLa cells.

Figure 2 Effect of cordycepin on the invasion and cordycepin on metastasis of cervical cancer HeLa cells

表3 过表达 miR-135b-5p 对虫草素处理 HeLa 细胞的侵袭、转移影响

Table 3 Effects of overexpression of miR-135b-5p on invasion and metastasis of HeLa cells treated with cordycepin

项目 Objective	miR-135b-5p 处理前 Before miR-135b-5p treatment		miR-135b-5p 处理后 After miR-135b-5p treatment	
	虫草素 I 组 Cordycepin I group	虫草素 II 组 Cordycepin II group	虫草素 I 组 Cordycepin I group	虫草素 II 组 Cordycepin II group
	宫颈癌 HeLa 细胞侵袭率(%) HeLa cell invasion rate	66.65±3.34	49.04±2.33	76.56±5.01*
宫颈癌 HeLa 细胞转移率(%) HeLa cell metastasis rate	44.87±4.54	19.90±2.41	53.47±4.89*	48.48±3.89*

注:与同组处理前比较,\* $P<0.05$ 。

Note. Compared with the same group before treatment, \* $P<0.05$ .

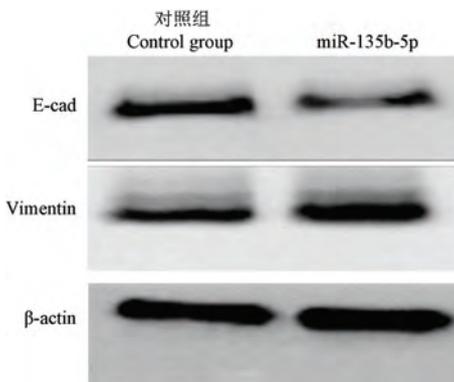


图3 过表达 miR-135b-5p 对宫颈癌 HeLa 细胞中 Vimentin 和 E-cad 的影响

Figure 3 Effects of overexpression of miR-135b-5p on Vimentin and E-cad in HeLa cells

### 3 讨论

本研究使用不同浓度的虫草素处理宫颈癌 HeLa 细胞,对不同组细胞的增殖率进行检测,结果显示,加入虫草素后宫颈癌 HeLa 细胞生长受到显著的抑制,且高浓度的虫草素抑制作用更明显。细胞过度增殖会促进肿瘤的增长、远处转移和局部侵袭是宫颈癌临床治疗中的主要限制因素,降低肿瘤细胞的侵袭和转移率可以提高临床治疗效果<sup>[11]</sup>。本研究结果显示虫草素可以显著降低宫颈癌 HeLa 细胞的侵袭率和转移率,且高浓度的虫草素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭和转移的抑制效果更佳。虫草素是冬虫夏草的主要活性成分,具有多种功效,如抗肿

瘤、抗菌、抗自由基、消炎及调节机体免疫系统的作用<sup>[12]</sup>。虫草素对多种肿瘤细胞如肝癌细胞等细胞的侵袭和转移具有一定的抑制作用<sup>[13]</sup>。有研究已经证实载虫草素的脂质体可以增加肝癌细胞核的破裂,促进细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。另有研究证实虫草素还可以加速宫颈癌 Hela 细胞的凋亡,降低肿瘤细胞增殖率<sup>[16]</sup>。结合已有研究结果及本研究结果证实,虫草素可以抑制肿瘤细胞的增殖,进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移,起到抗肿瘤的效果。

前期文献报道,相对于癌旁组织,宫颈癌组织中多种 miRNAs 表达水平异常,miR-135b-5p 是其中的 miRNAs 之一,对肿瘤细胞的干细胞化具有促进作用,因此其表达水平可以作为早期诊断的指标之一<sup>[17]</sup>。miR-135b-5p 在多种组织中都有一定水平的表达,且在多种癌症如胃癌等实体肿瘤发生发展过程中表达水平增加<sup>[18]</sup>。miR-135b-5p 是一种促癌基因,对肿瘤细胞的生长有一定促进作用,抑制 miR-135b-5p 表达可以抑制鼻咽癌及结直肠癌等癌细胞的增殖、分化和侵袭能力<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,miR-135b-5p 在宫颈癌 Hela 细胞中的表达水平显著高于人永生表皮细胞 Hacat 细胞中的表达水平。虫草素处理后可以显著降低 miR-135b-5p mRNA 的相对表达水平,且呈现浓度依赖性。提示虫草素可以显著抑制 miR-135b-5p 的表达,且浓度越高抑制作用越强。本研究进一步转染 miR-135b-5p mimic 和 miR mimic NC,结果显示过表达 miR-135b-5p 可以显著增加宫颈癌 Hela 细胞的侵袭率和转移率;miR-135b-5p 高表达的 Hela 细胞经虫草素处理后,其侵袭率、转移率显著高于 miR-135b-5p 低表达的 Hela 细胞。提示宫颈癌 Hela 细胞的侵袭和转移可能与 miR-135b-5p 过表达有关。以上研究结果证实 miR-135b-5p 过表达会促进肿瘤的发展。

本文进一步研究了过表达 miR-135b-5p 对宫颈癌 Hela 细胞中 EMT 标志物表达水平的影响,结果显示过表达 miR-135b-5p 宫颈癌细胞中 Vimentin 蛋白表达水平增加,E-cad 蛋白表达水平降低,提示过表达 miR-135b-5p 对 EMT 进程具有促进作用。本研究结果提示虫草素对 miR-135b-5p 表达水平具有抑制作用。因此证实虫草素可以通过抑制 miR-135b-5p 的表达进而抑制宫颈癌 Hela 细胞侵袭和转移。虫草素抑制肿瘤发展具有多种作用机制,文献报道显示虫草素可以通过靶向调控 *Bcl-2*、*p53* 等基因表达从而诱导肝癌细胞凋亡,抑制其转移和侵

袭<sup>[20]</sup>。本研究结果进一步证实虫草素还可以通过抑制 miR-135b-5p 的表达对宫颈癌 Hela 细胞侵袭和转移起到抑制作用,抑制 EMT 进程,但是虫草素抑制 miR-135b-5p 表达的机制尚不清楚,尚需要进一步的研究。

综上,虫草素通过抑制 miR-135b-5p 的表达,进而抑制 Hela 细胞的侵袭和转移,为进一步揭示虫草素抑制宫颈癌 Hela 细胞的侵袭和转移的分子机制奠定了实验基础,也为进一步寻找抗宫颈癌的药物提供了新的方向。但是本研究中未直接证实虫草素通过抑制 miR-135b-5p 的表达进而抑制宫颈癌 Hela 细胞的侵袭和转移,需要进一步的实验进行证实。

#### 参考文献:

- [1] 徐晓峰,王纯,卢国丰,等. 宫颈癌患者 Kruppel 样因子 6、p21 蛋白表达水平与病理特征及化疗敏感性的相关性分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(6): 12-15.
- [2] Yang W, Kim Y, Liu Y, et al. SU-E-T-547: rotating shield brachytherapy (RSBT) for cervical cancer [J]. Med Phys, 2012, 39(6Part18): 3831.
- [3] Shi TY, Zhu ML, He J, et al. Polymorphisms of the Interleukin 6 gene contribute to cervical cancer susceptibility in Eastern Chinese women [J]. Hum Genet, 2013, 132(3): 301-312.
- [4] Nair N, Zhang L, Kuan-Celariet A, et al. Revised FIGO staging shows dramatic survival differences in cervical cancer patients with positive lymph nodes in Louisiana [J]. Journal of Clinical Oncology, 2019, 37(15): e17010.
- [5] Wongsab B, Raethong N, Chumnanpuen P, et al. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of *Cordyceps militaris* identified by comparative transcriptome analysis [J]. Genomics, 2020, 112(1): 629-636.
- [6] Xu JC, Zhang YQ, Chen T, et al. Tu152-cordycepin induces G2/M phase arrest and apoptosis through the Mapk/Erk pathways in esophageal cancer cells [J]. Gastroenterology, 2019, 156(6): S-964-S-965.
- [7] Wang Z, Chen Z, Jiang Z, et al. Cordycepin prevents radiation ulcer by inhibiting cell senescence via NRF<sub>2</sub> and AMPK in rodents [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2538.
- [8] Li R, Hu J, Cao S. The clinical significance of miR-135b-5p and its role in the proliferation and apoptosis of *Hippocampus* neurons in children with temporal lobe epilepsy [J]. Dev Neurosci, 2020, 42(5/6): 187-194.
- [9] Li L, Wang A, Cai M, et al. Identification of stool miR-135b-5p as a non-invasive diagnostic biomarker in later tumor stage of colorectal cancer [J]. Life Sci, 2020, 260: 118417.
- [10] 方健,王辰男,孟庆刚. 猫眼草提取物通过调控 miR-501-3p/KPNA4 轴影响肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的实验研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2020, 29(11): 1291-1296, 1300.

- [11] 曼热帕·吐尔逊, 马蓉, 祖菲娅·艾力. 干细胞转录因子 Oct4 及 Sox2 对宫颈癌细胞成瘤、迁移和浸润能力的影响 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 145-148.
- [12] 张婕, 汪露, 韩世愈. 沉默 FOXC1 对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭和转移能力的影响 [J]. 中国生育健康杂志, 2021, 32(6): 540-545, 602.
- [13] 杨刚, 张永红, 郑茂华. 虫草素对胶质瘤细胞的增殖及侵袭作用的影响及机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(10): 1208-1212.
- [14] 陈汝君, 盛婵, 孙克, 等. 过表达 PLAC1 基因对子宫颈癌 HeLa 细胞侵袭和转移能力影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(11): 811-818.
- [15] Marcelo A, Brito F, Carmo-Silva S, et al. Cordycepin activates autophagy through AMPK phosphorylation to reduce abnormalities in Machado-Joseph disease models [J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(1): 51-63.
- [16] Hulpia F, Mabilille D, Campagnaro GD, et al. Combining tubercidin and cordycepin scaffolds results in highly active candidates to treat late-stage sleeping sickness [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5564.
- [17] 李永红, 刘文明, 李伟, 等. miR-135b-5p 靶向 CMTM3 调节胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(19): 3305-3310.
- [18] 刘青, 邓慧敏, 周林涛, 等. 卵巢癌患者组织中 miR-135b 的表达及临床意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 32-34.
- [19] 王亚楠, 丁建华, 许艳平, 等. 微小 RNA-34 对小儿恶性胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(9): 1659-1662.
- [20] 崔琳琳, 韩丹, 王莹, 等. 虫草素药理作用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 335-338, 345.

[收稿日期]2022-07-15

## (上接第 67 页)

- [3] Joyce MR, Holton KF. Neurotoxicity in Gulf War Illness and the potential role of glutamate [J]. Neurotoxicology, 2020, 80: 60-70.
- [4] Leigh RS, Ruskoaho HJ, Kaynak BL. Cholecystokinin peptide signaling is regulated by a TBX5-MEF<sub>2</sub> axis in the heart [J]. Peptides, 2021, 136: 170459.
- [5] Pirmík Z, Kořínková L, Osacká J, et al. Cholecystokinin system is involved in the anorexigenic effect of peripherally applied palmitoylated prolactin-releasing peptide in fasted mice [J]. Physiol Res, 2021, 70(4): 579-590.
- [6] Funakoshi A, Tatsuno K, Shimauchi T, et al. Cholecystokinin downregulates psoriatic inflammation by its possible self-regulatory effect on epidermal keratinocytes [J]. J Immunol, 2019, 202(9): 2609-2615.
- [7] Kumar M, Kumar A, Sindhu RK, et al. Arbutin attenuates monosodium L-glutamate induced neurotoxicity and cognitive dysfunction in rats [J]. Neurochem Int, 2021, 151: 105217.
- [8] Song J, Yang X, Zhang M, et al. Glutamate metabolism in mitochondria is closely related to Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2021, 84(2): 557-578.
- [9] Taguchi K, Izumi Y, Takada-Takatori Y, et al. Protective effect of 2', 3'-dihydroxy-4', 6'-dimethoxychalcone on glutamate-induced neurotoxicity in primary cortical cultures [J]. Biol Pharm Bull, 2020, 43(1): 184-187.
- [10] Ge L, Liu S, Rubin L, et al. Research progress on neuroprotection of insulin-like growth factor-1 towards glutamate-induced neurotoxicity [J]. Cells, 2022, 11(4): 666.
- [11] Wang C, Zhang C, Wu D, et al. Cholecystokinin octapeptide reduces myocardial fibrosis and improves cardiac remodeling in post myocardial infarction rats [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2020, 125: 105793.
- [12] Sachuriga, Iinuma N, Shibata H, et al. Intracerebroventricular administration of sulphated cholecystokinin octapeptide induces anxiety-like behaviour in goldfish [J]. J Neuroendocrinol, 2019, 31(1): e12667.
- [13] 王雅楠. 八肽胆囊收缩素在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中的神经保护作用 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [14] Miao Y, Zheng Y, Geng Y, et al. The role of GLS1-mediated glutaminolysis/2-HG/H3K4me3 and GSH/ROS signals in Th17 responses counteracted by PPAR $\gamma$  agonists [J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4531-4548.
- [15] Zhang C, Xie S, Yuan S, et al. Metabotropic glutamate receptor 8 is regulated by miR-33a-5p and functions as an oncogene in breast cancer [J]. J Oncol, 2021, 2021: 8002087.
- [16] Li H, Zhu Z, Liu J, et al. microRNA-137 regulates hypoxia-induced retinal ganglion cell apoptosis through Notch1 [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(3): 1774-1782.

[收稿日期]2022-07-29

周斌,万少兵,王瑛,等. JAK2/STAT3 信号通路调控急性肺损伤过程中 Th17/Treg 失衡机制的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 75-80.

Zhou B, Wan SB, Wang Y, et al. JAK2/STAT3 signaling pathway regulates the Th17/Treg imbalance in acute lung injury [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 75-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.010

# JAK2/STAT3 信号通路调控急性肺损伤过程中 Th17/Treg 失衡机制的研究

周斌\*, 万少兵, 王瑛, 余平, 典万康, 周莹, 周琴

(武汉市第三医院急诊科, 武汉 430060)

**【摘要】目的** 探讨 JAK2/STAT3 信号通路在急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 过程中对 Th17/Treg 失衡的影响及其机制。**方法** 将 24 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、JAK2 抑制剂组和 STAT3 抑制剂组, 每组 6 只。对照组气道内滴注生理盐水, 8 h 后腹腔注射等量生理盐水, 模型组、JAK2 抑制剂组和 STAT3 抑制剂组气道滴注脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 构建 ALI 模型, 8 h 后分别腹腔注射等量生理盐水、Fedratinib 和 NSC74859。LPS 滴注 24 h 后测定小鼠肺湿重/干重 (W/D), HE 染色观察肺组织病理变化, 流式检测肺组织中 Treg 细胞和 Th17 细胞的比例, ELISA 检测肺组织匀浆中 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平, Western blot 检测肺组织中 JAK2、STAT3、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比, 模型组 W/D 升高 ( $P < 0.01$ ), 肺组织损伤严重, 有大量炎性细胞浸润, 肺组织中 Th17/Treg 比值、炎症因子 IL-6、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 水平、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, JAK2 抑制剂组和 STAT3 抑制剂组 W/D 降低 ( $P < 0.05$ ), 肺组织损伤有所减轻, 炎性细胞浸润减少, 肺组织中 Th17/Treg 比值、炎症因子 IL-6、IL-17A、TGF- $\beta$ 1 水平、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。**结论** 抑制 JAK2/STAT3 信号通路的激活能够调节 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中 Th17/Treg 细胞的失衡, 抑制炎症反应, 减轻肺损伤。

**【关键词】** 急性肺损伤; JAK2/STAT3 信号通路; 辅助性 T 细胞 17; 调节性 T 细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0075-06

## JAK2/STAT3 signaling pathway regulates the Th17/Treg imbalance in acute lung injury

ZHOU Bin\*, WAN Shaobing, WANG Ying, YU Ping, DIAN Wankang, ZHOU Ying, ZHOU Qin

(Department of Emergency, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of the JAK2/STAT3 signaling pathway on the Th17/Treg imbalance in acute lung injury (ALI) and its mechanism. **Methods** Twenty-four C57BL/6 mice were randomly divided into control, model, JAK2 inhibitor, and STAT3 inhibitor groups with six mice in each group. The control group was instilled with normal saline in their airway, and the same amount of normal saline was injected intraperitoneally 8 h later. The model, JAK2 inhibitor, and STAT3 inhibitor groups were instilled with lipopolysaccharide (LPS) in their airway to establish the ALI model, and the same amount of normal saline, Fedratinib, and NSC74859 were injected intraperitoneally 8 hours later, respectively. The wet/dry (W/D) lung weight of mice was measured at 24 h after LPS infusion, the pathological changes of lung tissue were observed by HE staining, the proportion of Treg and Th17 cells in lung tissue was measured by flow cytometry, and IL-6, IL-10, IL-17A, and TGF- $\beta$ 1 levels in lung tissue homogenates were measured by ELISA. Protein expression of JAK2, STAT3, p-JAK2, and p-STAT3 in lung tissues was detected by Western blot. **Results**

[基金项目] 武汉市卫健委基金项目 (WX21B32)。

[作者简介] 周斌 (1975—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 呼吸疾病相关的危重症。E-mail: zb750725@sohu.com

Compared with the control group, the W/D ratio was increased ( $P < 0.01$ ), lung tissue injury was severe, there was a degree number of inflammatory cell infiltration, the Th17/Treg ratio, the levels of inflammatory factors IL-6, IL-17A, TGF- $\beta$ 1, p-JAK2, and p-STAT3 were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the IL-10 level was significantly decreased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the W/D lung weight of JAK2 inhibitor and STAT3 inhibitor groups was decreased ( $P < 0.05$ ), lung tissue injury was alleviated, inflammatory cell infiltration was reduced, the Th17/Treg ratio, IL-6, IL-17A, and TGF- $\beta$ 1 levels, p-JAK2 and p-STAT3 protein expression levels were significantly decreased in lung tissue ( $P < 0.01$ ), and the IL-10 level was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Inhibiting activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway regulates the imbalance of Th17/Treg cells in lung tissue of ALI mice induced by LPS, inhibits the inflammatory response, and reduces lung injury.

**[Keywords]** acute lung injury; JAK2/STAT3 signaling pathway; T helper cells 17; regulatory T cells

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

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种常见的由肺内和肺外因素共同作用引起的临床综合征,其死亡率高达 30%~60%,可导致肺不张,严重时发展为急性呼吸窘迫综合征<sup>[1-2]</sup>。ALI 的主要病理特征为严重低氧血症、肺水肿和肺中过量中性粒细胞的积累<sup>[3]</sup>。研究认为,ALI 的发病机制包括炎症和抗炎反应的失衡以及氧化还原和凋亡的失衡<sup>[4]</sup>,但 ALI 的发病机制尚未完全阐明,其发病机制和治疗策略一直是研究的焦点。

近年来的研究表明,CD4<sup>+</sup>T 细胞在 ALI 的发病机制中发挥重要作用。CD4<sup>+</sup>T 细胞作为重要的免疫调节细胞,可促进或抑制其他免疫细胞的激活<sup>[5]</sup>。辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)是 CD4<sup>+</sup>T 细胞的亚群,两者之间的平衡在许多炎症和自身免疫疾病的发病机制中发挥作用<sup>[6]</sup>。Th17 细胞通过分泌 IL-17 在多种免疫炎症性疾病中发挥关键的促炎作用,Treg 细胞可间接拮抗 Th17 细胞,从而抑制炎症和免疫反应<sup>[7]</sup>。因此,Th17 细胞和 Treg 细胞间存在着复杂的相互作用关系,但其确切调控机制亟待阐明。目前的研究表明,JAK2/STAT3 信号通路在机体 Th17/Treg 分化平衡中起重要的调控作用<sup>[8]</sup>,但尚未见其在 ALI 中对 Th17/Treg 平衡的研究。因此本研究构建脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 ALI 小鼠模型,观察肺组织中 Treg 和 Th17 的变化及其与 JAK2/STAT3 信号通路的关系,探讨 Th17/Treg 平衡在 ALI 发病中的重要作用及可能的调控机制,为揭示 ALI 的发病机制奠定初步基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 5 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,18~20 g,

共 24 只,来源于三峡大学实验动物中心[SCXK(鄂)2018-0012]。在武汉华联科生物技术有限公司动物中心进行[SYXK(鄂)2018-0104],温度 22~26℃、湿度 50%~60%、明暗人工光照各 12 h。实验符合动物实验 3R 原则,经武汉华联科生物技术有限公司伦理审查委员会批准(HLK-20210810-001)。

### 1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(P3761,美国 SIGMA MERCK 公司); LPS(L2880,美国 sigma 公司); NSC74859(S1155,美国 Selleck 公司); Fedratinib(T126330,上海阿拉丁公司);伊红、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(E8090、PC0020,北京 Solarbio 公司);苏木素(G1004,武汉 Servicebio 公司);固定破核剂(562574,美国 BD bioscience 公司);CD4、IL-17A、CD25 和 FOXP3 流式抗体(11-0041-81、25-7177-80、53-0251-80、35-5773-80 美国 eBioscience 公司);小鼠 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 ELISA 试剂盒;抗体 JAK2、STAT3、GAPDH 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(MU30044、MU30055、MU30386、MU30071、PAB47912、PAB46077、PAB36269、SAB43714,武汉 Bioswamp 公司);抗体 p-JAK2 和 p-STAT3(ab32101、ab32143,美国 abcam 公司)。小动物呼吸机(DW-3000B,北京北瑞未来科技有限公司);酶标仪(MK3,芬兰雷勃公司);石蜡切片机(RM2235,德国 Leica 公司);流式细胞仪(NovoCyte,美国艾森公司);电泳仪(mini protean 3 cell,美国 Bio Rad 公司);全自动化学发光分析仪(Tanon-5200,上海天能科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小鼠急性肺损伤模型构建

小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.12 mL/10 g),

剪掉颈部毛发,消毒后切开皮肤,分离气管旁的肌肉和组织,使气管暴露,将小鼠竖直倾斜约 80°,用微量进样器在气道内缓慢滴入 LPS(24 mg/kg),摇晃使药液分布均匀,观察小鼠呼吸状况,待小鼠呼吸平稳后,缝合颈部皮肤,放回鼠笼,自由进食、进水<sup>[9]</sup>。

### 1.3.2 实验分组及处理

24 只小鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、JAK2 抑制剂组和 STAT3 抑制剂组,每组 6 只。对照组进行假手术操作,气道内缓慢滴入等量生理盐水,8 h 后腹腔注射等量生理盐水;模型组、JAK2 抑制剂组和 STAT3 抑制剂组均先构建 ALI 模型,8 h 后分别腹腔注射等量生理盐水、Fedratinib(100 mg/kg)和 NSC74859(5 mg/kg),模型构建 24 h 后全部处死并取材<sup>[10]</sup>。

### 1.3.3 肺湿重和干重比值测定

取右上肺叶,滤纸吸去表面血污,记录湿重(W),然后放入 80°C 的恒温烤箱中烘干 3 d 至恒重,称重,记为干重(D),计算湿重和干重比值(W/D)。

### 1.3.4 肺组织 HE 染色

小鼠肺组织用 4% 多聚甲醛进行固定,常规步骤脱水浸蜡包埋,切片(厚度 3 μm),展片、烤片后进行 HE 染色,显微镜拍照。

### 1.3.5 流式检测肺组织中 Treg、Th17 细胞比例变化

Th17 细胞(CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>)流式双标法检测,Treg 细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3)流式三标法检测。制备肺组织单细胞悬液,PBS 洗涤后,加入 CD4 和 CD25 抗体,避光孵育 30 min,先后加入固定剂和破膜剂,加入流式抗体 IL-17 和 FOXP3 孵育 45 min,PBS 重悬后避光保存,上机检测。

### 1.3.6 ELISA 检测肺组织匀浆中 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF-β1 水平

制作小鼠肺组织匀浆,严格按照试剂盒说明书检测 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF-β1 的水平。

### 1.3.7 Western blot 检测肺组织中 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白的表达

将肺组织剪碎后加入裂解液,完全裂解后 4°C 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,BCA 法进行蛋白质定量,加入上样缓冲液,沸水浴使蛋白质变性,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,湿转至 PVDF 膜,封闭,一抗、二抗孵育,ECL 显影,全自动化学发光分析仪中检测,TANON GIS 软件读取条带灰度值。

## 1.4 统计学方法

利用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,结果用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐,则采用 Dunnett' *t* 法。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠肺 W/D 的比较

与对照组( $3.30 \pm 0.25$ )相比,模型组( $4.53 \pm 0.34$ )W/D 明显升高( $P < 0.01$ );与模型组相比,JAK2 抑制剂组( $3.67 \pm 0.28$ )和 STAT 抑制剂组( $3.65 \pm 0.34$ )W/D 均明显降低( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组小鼠肺组织 HE 染色结果比较

如图 1 所示,对照组小鼠肺组织结构正常,未见明显损伤;模型组小鼠肺组织损伤严重,肺泡萎缩并伴随大量炎症细胞浸润,肺间质充血增厚;JAK2 抑制剂组和 STAT 抑制剂组肺组织病理损伤均有所减轻,炎症细胞浸润也有所减少。

### 2.3 各组小鼠肺组织中 Th17、Treg 细胞比例的比较

与对照组相比,模型组小鼠肺组织中 Th17 细胞比例和 Th17/Treg 比值显著升高( $P < 0.01$ ),Treg 细胞比例显著降低( $P < 0.01$ );与模型组相比,JAK2 抑制剂组和 STAT 抑制剂组小鼠肺组织中 Th17 细胞比例和 Th17/Treg 比值均显著降低( $P < 0.01$ ),Treg 细胞比例显著升高( $P < 0.01$ )(图 2,表 1)。

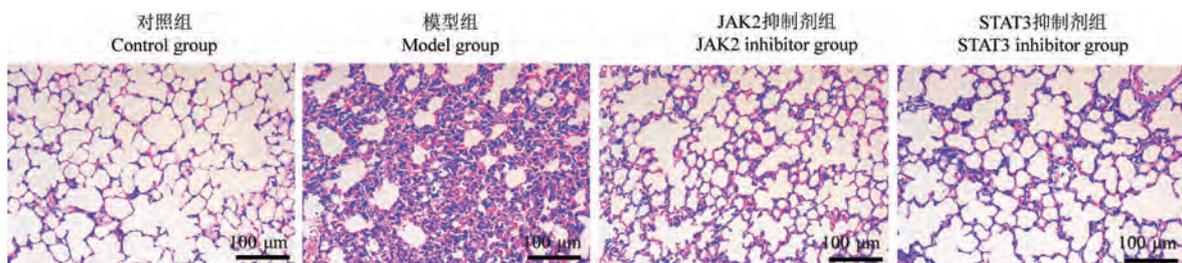


图 1 小鼠肺组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining results of mouse lung tissue

## 2.4 各组小鼠肺组织中 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平的比较

与对照组比,模型组小鼠肺组织 IL-6、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平显著升高( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比, JAK2 抑制剂组和 STAT 抑制剂组 IL-6、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平均显著降低( $P < 0.01$ ), IL-10 水平显著升高( $P < 0.01$ )(表 2)。

## 2.5 各组小鼠肺组织中 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达水平的比较

与对照组相比,模型组小鼠肺组织中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平均得到了显著升高( $P < 0.01$ );与模型组相比, JAK2 抑制剂组和 STAT 抑制剂组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平均得到了显著降低( $P < 0.01$ )(图 3)。

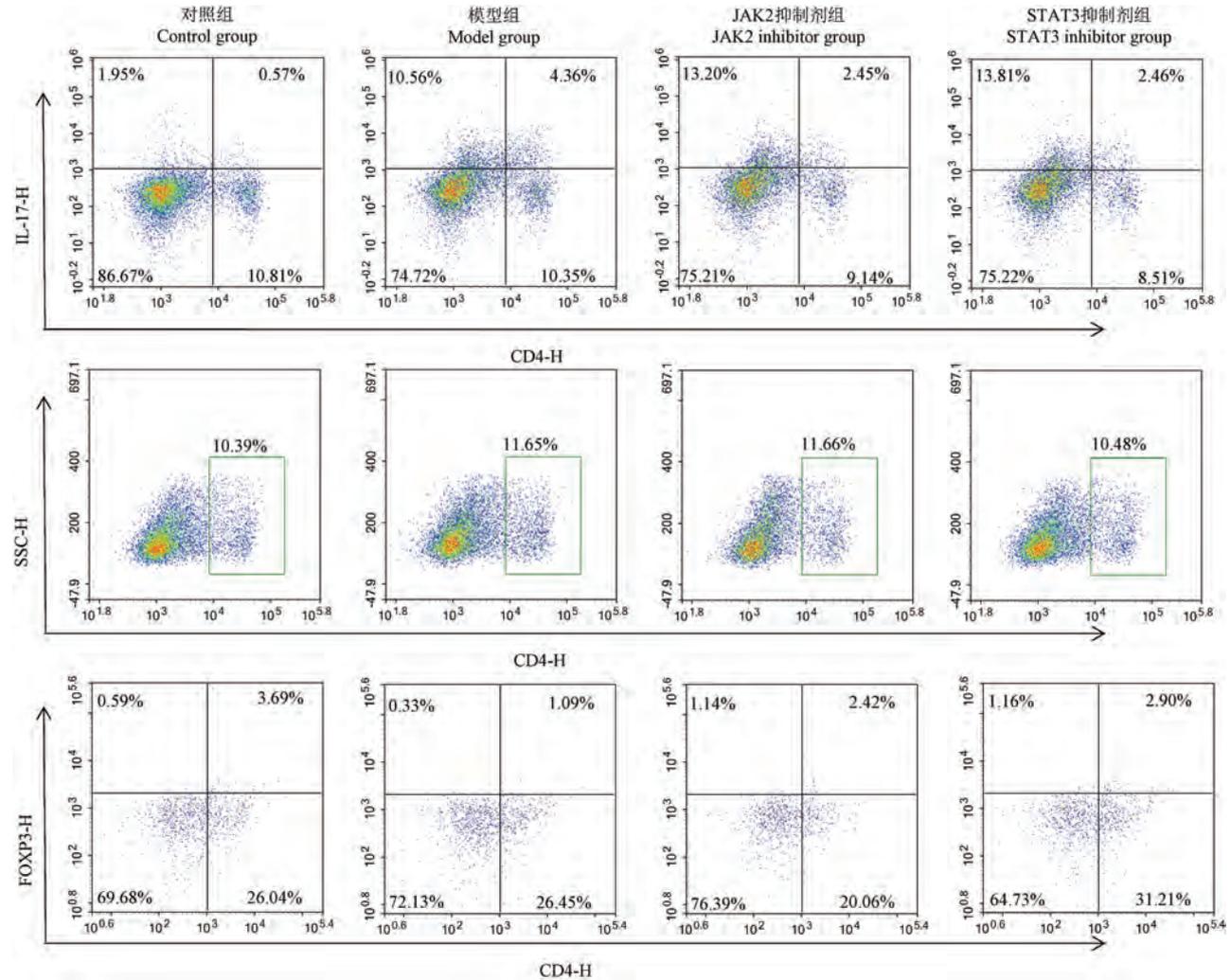


图 2 流式检测小鼠肺组织中 Th17、Treg 细胞比例

Figure 2 Results of flow detection of the proportion of Th17 and Treg cells in mouse lung tissue

表 1 各组小鼠肺组织中 Th17、Treg 细胞比例的比较

Table 1 Comparison of the proportions of Th17 and Treg cells in the lung groups of mice in each group

组别 Groups	Th17 (%)	Treg (%)	Th17/Treg
对照组 Control group	0.68±0.14	3.65±0.13	0.19±0.03
模型组 Model group	4.50±0.17**	1.03±0.19**	4.49±1.07**
JAK2 抑制剂组 JAK2 inhibitor group	2.51±0.18##	2.51±0.12##	1.00±0.10##
STAT3 抑制剂组 STAT3 inhibitor group	2.35±0.12##	2.89±0.06##	0.81±0.05##

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

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

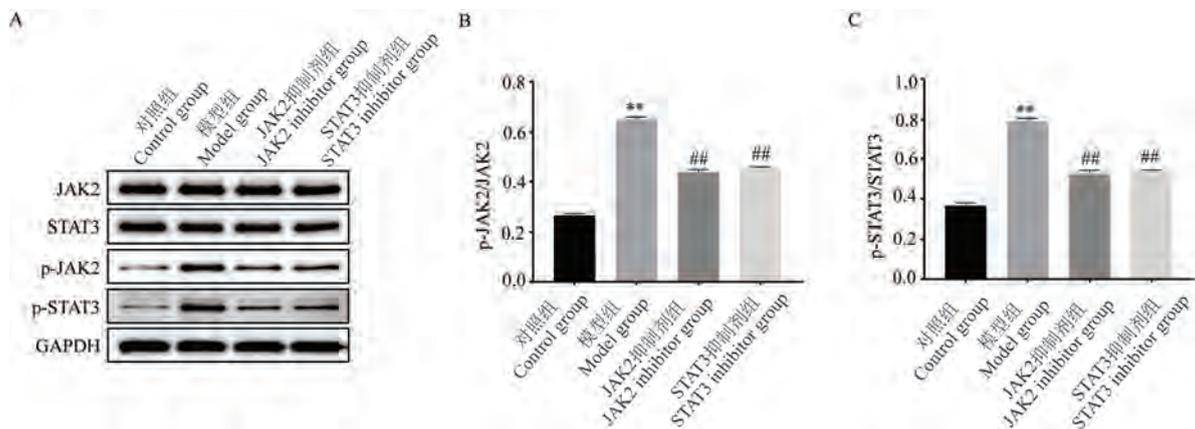
表 2 小鼠肺组织匀浆中 IL-6、IL-10、IL-17A 和 TGF-β1 水平的比较

Table 2 Comparison of IL-6, IL-10, IL-17A and TGF-β1 levels in mouse lung tissue homogenates

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	TGF-β1 (pg/mL)
对照组 Control group	59.88±8.31	519.58±57.73	106.13±8.63	116.96±8.50
模型组 Model group	256.30±16.44**	137.51±15.40**	415.47±29.92**	542.84±24.70**
JAK2 抑制剂组 JAK2 inhibitor group	137.85±16.68##	301.20±9.98##	223.05±15.89##	309.63±34.54##
STAT3 抑制剂组 STAT3 inhibitor group	124.50±15.70##	279.95±21.63##	217.00±12.59##	270.79±41.23##

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

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



注:A:小鼠肺组织中 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达条带图;B:各组小鼠肺组织中 JAK2 蛋白磷酸化水平直方图;C:各组小鼠肺组织中 STAT3 蛋白磷酸化水平直方图。与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图 3 小鼠肺组织中 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白表达水平

Note. A, Expression band map of JAK2, STAT3 and their phosphorylated proteins in mouse lung tissue. B, Histogram of JAK2 protein phosphorylation level in lung tissue of mice in each group. C, Histogram of STAT3 protein phosphorylation levels in lung tissues of mice in each group. Compared with control group, \*\* $P<0.01$ . Compared with model group, ## $P<0.01$ .

Figure 3 Expression levels of JAK2, STAT3 and their phosphorylated proteins in mouse lung tissue

### 3 讨论

JAK2/STAT3 通路在多种细胞类型的免疫应答调节中发挥关键作用,能够调节许多基因的转录,包括细胞因子、粘附分子和炎症介质等<sup>[11]</sup>。许多临床研究表明,JAK2/STAT3 通路在 ALI 中发挥关键作用,Han 等<sup>[12]</sup>证明 JAK2/STAT3 水平在严重急性胰腺炎 ALI 大鼠模型中上调,而许多研究发现抑制 JAK2/STAT3 通路的激活可改善肺损伤<sup>[13-14]</sup>。大量研究表明,革兰氏阴性菌感染是导致 ALI 最常见的病因之一,而革兰氏阴性菌外膜的主要成分 LPS 可引起肺损伤和炎症反应,LPS 诱导的小鼠 ALI 是一种被广泛接受的模型<sup>[15]</sup>。因此本研究利用 LPS 构建小鼠 ALI 模型,结合 JAK2 和 STAT3 抑制剂来探究 JAK2/STAT3 通路在 ALI 中对 Th17/Treg 平衡的

影响。结果显示,LPS 处理后,小鼠肺 W/D 升高,肺组织损伤严重,有大量炎性细胞浸润,这与闵思敏等<sup>[16]</sup>的研究结果一致,而 JAK2 和 STAT3 抑制剂干预后,小鼠肺 W/D 降低,肺组织损伤得到缓解,炎性细胞浸润减少,提示抑制 JAK2/STAT3 能够减轻 LPS 诱导的 ALI。

研究表明,抑制 JAK2/STAT3 通路能够调节 Th17/Treg 稳态,抑制炎症反应缓解肝纤维化<sup>[17]</sup>。而 JAK2/STAT3 通路在 ALI 中对 Th17/Treg 平衡的影响还未有研究,因此我们检测了 JAK2/STAT3 通路抑制剂对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中 Th17 细胞和 Treg 细胞的比例,流式结果显示,LPS 诱导 ALI 后,Th17/Treg 比例升高,而 JAK2 和 STAT3 抑制剂干预后,Th17/Treg 比例降低,表明抑制 JAK2/STAT3 可降低 Th17/Treg 比例,抑制 Th17/Treg 失

衡,抑制 ALI 小鼠肺部炎症反应,即 JAK2/STAT3 通路能够调节 ALI 中 Th17/Treg 的平衡。

促炎细胞因子和抗炎细胞因子之间的平衡对于维持内部环境的稳态至关重要<sup>[18]</sup>。研究表明,在 ALI 过程中,机体促炎细胞因子和抗炎细胞因子释放增多且两者出现失衡,引起炎症反应的加剧,最终加速 ALI 进程。Th17 细胞可通过分泌促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等加剧炎症反应。Treg 细胞可通过细胞与细胞直接接触、阻碍靶细胞代谢、分泌抗炎细胞因子如 IL-35、IL-10、TGF- $\beta$  等抑制炎症发挥免疫抑制作用<sup>[19-20]</sup>。因此,我们对肺组织中相关的炎症因子进行了检测,结果显示 ALI 小鼠模型肺组织中促炎因子 IL-6、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平升高,抗炎因子 IL-10 水平降低,而 JAK2 和 STAT3 抑制剂干预后,促炎因子 IL-6、IL-17A 和 TGF- $\beta$ 1 水平降低,抗炎因子 IL-10 水平升高,表明抑制 JAK2/STAT3 可抑制过度炎症反应,促进炎症消退,减轻肺损伤。

最后我们检测了 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平,结果显示,LPS 诱导后小鼠肺组织中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平升高,JAK2 和 STAT3 抑制剂干预后,p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白水平均降低。综上,抑制 JAK2/STAT3 通路的激活能够调节 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中 Th17/Treg 细胞的稳态,抑制炎症反应,减轻肺损伤。

#### 参考文献:

[ 1 ] Mokrá D. Acute lung injury-from pathophysiology to treatment [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S353-S366.

[ 2 ] Mowery NT, Hillman Terzian WTH, Nelson AC. Acute lung injury [J]. *Curr Probl Surg*, 2020, 57(5): 100777.

[ 3 ] Long ME, Mallampalli RK, Horowitz JC. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2022, 136(10): 747-769.

[ 4 ] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(4): 345-350.

[ 5 ] Li Y, Dong T, Jiang X, et al. Chronic and low-level particulate matter exposure can sustainably mediate lung damage and alter CD4 T cells during acute lung injury [J]. *Mol Immunol*, 2019, 112: 51-58.

[ 6 ] Lee GR. The balance of Th17 versus treg cells in autoimmunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 730.

[ 7 ] Liu H, Bai C, Xian F, et al. A high-calorie diet aggravates LPS-

induced pneumonia by disturbing the gut microbiota and Th17/Treg balance [J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112(1): 127-141.

[ 8 ] Zhao Y, Luan H, Jiang H, et al. Gegen Qinlian Decoction relieved DSS-induced ulcerative colitis in mice by modulating Th17/Treg cell homeostasis *via* suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153519.

[ 9 ] Zhang S, Chen X, Devshilt I, et al. Fennel main constituent, trans-anethole treatment against LPS-induced acute lung injury by regulation of Th17/Treg function [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 1369-1376.

[ 10 ] Cao F, Tian X, Li Z, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome by erythropoietin *via* the EPOR/JAK2/STAT3 pathway contributes to attenuation of acute lung injury in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 306.

[ 11 ] Zhao X, Zhao B, Zhao Y, et al. Protective effect of anisodamine on bleomycin-induced acute lung injury in immature rats *via* modulating oxidative stress, inflammation, and cell apoptosis by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(10): 859.

[ 12 ] Han X, Wang Y, Chen H, et al. Enhancement of ICAM-1 *via* the JAK2/STAT3 signaling pathway in a rat model of severe acute pancreatitis-associated lung injury [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(3): 788-796.

[ 13 ] Longevity OMAC. Retracted: hydrostatin-SN10 ameliorates pancreatitis-induced lung injury by affecting IL-6-induced JAK2/STAT3-associated inflammation and oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8541783.

[ 14 ] Yang S, Song Y, Wang Q, et al. Daphnetin ameliorates acute lung injury in mice with severe acute pancreatitis by inhibiting the JAK2-STAT3 pathway [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11491.

[ 15 ] D'Alessio FR. Mouse models of acute lung injury and ARDS [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1809: 341-350.

[ 16 ] 闵思敏, 刘小碣, 丁渡山, 等. 川芎嗪通过 Rac1/LIMK1 通路减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(8): 1407-1415.

[ 17 ] 冯锦, 吴建红, 熊响莲, 等. 紫杉醇通过调控 JAK2/STAT3 通路对肝纤维化模型大鼠 Th17/Treg 影响的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(13): 1564-1569.

[ 18 ] Kumar V. Pulmonary innate immune response determines the outcome of inflammation during pneumonia and Sepsis-associated acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1722.

[ 19 ] Wang L, Wang X, Tong L, et al. Recovery from acute lung injury can be regulated *via* modulation of regulatory T cells and Th17 cells [J]. *Scand J Immunol*, 2018, 88(5): e12715.

[ 20 ] Wang L, Jiang W, Wang X, et al. Regulatory T cells in inflammation and resolution of acute lung injury [J]. *Clin Respir J*, 2022, 16(9): 587-595.

陈琪敏,周红霞,谢佩芳,等. 基于转录组学探讨阿比朵尔对 HCoV-OC43 感染诱导神经营养因子信号通路活化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 81-89.

Chen QM, Zhou HX, Xie PF, et al. Transcriptome-based exploration of the effect of Arbidol on HCoV-OC43 infection-induced activation of the neurotrophin signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 81-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.011

# 基于转录组学探讨阿比朵尔对 HCoV-OC43 感染诱导神经营养因子信号通路活化的影响

陈琪敏<sup>1</sup>,周红霞<sup>2</sup>,谢佩芳<sup>3</sup>,李润峰<sup>4</sup>,杨子峰<sup>4,5,6,7</sup>,邱敏珊<sup>2</sup>,沈利汉<sup>1,2\*</sup>

(1.广东医科大学,广东 湛江 524023;2.南方医科大学第十附属医院(东莞市人民院),东莞市呼吸和重症医学研究所,重症医学科,广东 东莞 523059;3.昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 650500;4.广州医科大学附属第一医院广州呼吸健康研究院呼吸疾病国家重点实验室/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心,广州 510000;5.广州实验室,广州 510000;6.广州市传染性疾病预防快速诊断与预警重点实验室,广州 510000;7.澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室,澳门 519020)

**【摘要】** 目的 采用转录组学技术分析阿比多尔(arbidol, ARB)对 HCoV-OC43 感染引起宿主信号通路活化的影响,并探讨 ARB 抗炎活性与其作用于神经营养因子信号通路的关系。方法 用 OC43 感染 HRT-18 细胞,并以 ARB 进行干预。感染 96 h 后提取总 RNA,进行转录组学分析,获得差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),开展基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,筛选出 ARB 可能作用的生物学过程及相关信号通路。进一步利用 RT-qPCR 方法验证 ARB 干预对神经营养因子信号通路关键分子表达的抑制作用。结果 与病毒感染组相比,高、中和低剂量(6、2 和 0.67 μg/mL) ARB 干预分别显示出 9459、4186 和 1744 个 DEGs。GO 分析显示,ARB 主要干预的生物学过程是共翻译蛋白膜靶向,作用的细胞组成为粘着斑和细胞-底物间连接,影响的分子功能为钙粘蛋白结合。KEGG 分析发现,与冠状病毒感染相关的细胞凋亡信号通路和神经营养因子信号通路有明显富集,其中 ARB 对神经营养因子信号通路中的 MAPK、PI3K 和 NF-κB 通路分子有显著抑制作用。RT-qPCR 检测显示,ARB 对 *PIK3CA*、*AKT*、*TRAF-6*、*Bax*、*p38* 和 *c-JUN* 等分子的 mRNA 表达具有明显抑制作用。结论 本研究提示了 ARB 应用于治疗冠状病毒感染引起神经炎症的可能性。

**【关键词】** 转录组学;阿比多尔;HCoV-OC43;神经营养因子信号通路

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0081-09

## Transcriptome-based exploration of the effect of Arbidol on HCoV-OC43 infection-induced activation of the neurotrophin signaling pathway

CHEN Qimin<sup>1</sup>, ZHOU Hongxia<sup>2</sup>, XIE Peifang<sup>3</sup>, LI Runfeng<sup>4</sup>, YANG Zifeng<sup>4,5,6,7</sup>, QIU Minshan<sup>2</sup>, SHEN Lihan<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China. 2. Department of Critical Care Medicine, Dongguan Institute of Respiratory and Critical Care Medicine, the 10th Affiliated Hospital of Southern Medical University

**【基金项目】** 广东省防控新型冠状病毒感染科技攻关应急专项(2020A111129028);东莞市新型冠状病毒肺炎防疫防治技术研究及推广应急攻关专项项目(202071715001114);广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120045);广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515110151);东莞市人民医院院内项目-科研培育项目(K202002);东莞市人民医院院内项目-科研培育项目(K202019)。

**【作者简介】** 陈琪敏(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:重症医学、宿主与病毒相互作用。E-mail:qiminC0704@outlook.com

**【通信作者】** 沈利汉(1977—),男,博士,主任医师,研究方向:重症医学、宿主与病毒相互作用。E-mail:shenlihan@hotmail.com

(Dongguan People's Hospital), Dongguan 523059. 3. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500. 4. State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000. 5. Guangzhou Laboratory, Guangzhou 510000. 6. Guangzhou key laboratory for clinical rapid diagnosis and early warning of infectious diseases, Guangzhou 510000. 7. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau 519020)

**[Abstract] Objective** To analyze the influence of arbidol (ARB) on HCoV-OC43-induced activation of host signaling pathways and to explore the correlation between the anti-inflammatory activity of ARB and its effect on the neurotrophin signaling pathway. **Methods** HRT-18 cells were infected with OC43 and treated with ARB. After 96 hours, total RNA was extracted, transcriptomic analysis was performed to identify differentially expressed genes (DEGs), and Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed to identify potential biological processes and signaling pathways related to ARB treatment. RT-qPCR was used to verify the inhibitory effect of ARB on the expression of important molecules in the neurotrophin pathway. **Results** ARB treatment at high, medium, and low doses (6, 2 and 0.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) resulted in 9459, 4186, and 1744 DEGs, respectively, compared with the virus-infected control group. GO analysis showed that ARB mainly affected biological processes of cotranslational protein targeting to membrane, cellular components such as focal adhesion and cell-substrate junction, and molecular functions such as cadherin binding. KEGG analysis showed that apoptosis and neurotrophin signaling pathways related to coronavirus infection were significantly enriched, and ARB had a significant inhibitory effect on MAPK, PI3K, and NF- $\kappa\text{B}$  in the neurotrophin signaling pathway. RT-qPCR analysis revealed that ARB significantly inhibited mRNA expression of *PIK3CA*, *AKT*, *TRAF-6*, *Bax*, *p38*, and *c-Jun*. **Conclusions** This study suggests that ARB can be used for treatment of neuroinflammation caused by coronavirus infection.

**[Keywords]** transcriptomes; arbidol; HCoV-OC43; neurotrophin signaling pathway

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

冠状病毒 (coronaviruses, CoVs) 为有包膜的单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈球形, 基因组全长 27~33kb, 是目前已知基因组最大的 RNA 病毒。根据血清及遗传特性可进一步将冠状病毒分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  四个属,  $\alpha$  和  $\beta$  属主要感染人类及哺乳动物<sup>[1-2]</sup>。目前发现能够感染人的冠状病毒共有 7 种, HCoV-229E 和 NL6 属于  $\alpha$  冠状病毒, 而严重急性呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)、新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)、HCoV-HKU1 和 HCoV-OC43 属于  $\beta$  冠状病毒。自 2003 年至今, SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 前后引发全球范围内的严重疫情, 死亡率达 10%~38%<sup>[3-4]</sup>, 而 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 为常见的人冠状病毒, 主要引起轻至中度上呼吸道疾病。迄今为止, 与冠状病毒相关的神经并发症越来越频繁<sup>[1]</sup>。许多研究报告了感染患者表现出头痛、呕吐、肌痛、嗅觉丧失甚至更严

重的脑炎和中风的神经症状和并发症<sup>[1-2]</sup>。目前国际上批准可紧急用于治疗 SARS-CoV-2 感染药物仅有奈玛特韦片/利托那韦片<sup>[5]</sup>, 急需储备更多抗病毒药物。

阿比多尔 (arbidol, ARB) 是具有免疫调节作用的核苷类广谱抗病毒药物, 由前苏联药物化学研究中心研制<sup>[6]</sup>。该药物在俄罗斯已上市 20 余年, 于 2006 年在中国获准上市, 普遍用于治疗甲乙型流感病毒引起的上呼吸道感染。临床研究结果表明, ARB 治疗可显著提高 COVID-19 患者的病毒核酸转阴率, 并且能够显著缩短病程<sup>[7-8]</sup>。研究表明 ARB 可显著抑制 SARS-CoV 在 Vero E6 细胞中的增殖<sup>[9]</sup>。本研究组在前期发现, ARB 可显著抑制 HCoV-OC43 在 HRT-18 细胞中的增殖, 以及通过阻断 p38、Erk1/2 和 JNK 等信号通路的激活从而抑制 IL-6、CXCL-8/IL-8、IFN- $\alpha$  和 CCL-2/MCP-1 等炎症因子的表达<sup>[10]</sup>。为进一步明确 ARB 抗 HCoV-OC43 感染的机制, 本研究通过 RNA-Seq 测序和 RT-qPCR 方法进一步揭示 ARB 对神经营养因子通路的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

人直肠癌细胞 HRT-18 细胞(ATCC, CCL-224)由本实验室保存。

#### 1.1.2 病毒株

HCoV-OC43 毒株由广州医科大学赵金存教授提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

盐酸阿比朵尔片(arbidol hydrochloride tablets, ARB)购自中海石油欧益制药有限公司; ARB 用 DMSO 配制成浓度为 100 mg/mL 的母液, 于 4℃ 保存待用; TRIzol (Ambion/Invitrogen, 美国); RPMI 1640 培养基(Gibco, 美国); 胎牛血清(FBS)(Gibco, 美国); RR036A PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, 日本); AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 中国)。Illumina NovaSeq 6000 (illumina, 美国); 荧光定量 PCR ABI 7500 (ABI, 美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞和病毒培养

HRT-18 细胞在 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS, 1% 双抗)中培养。收集对数生长期的 HRT-18 细胞接种至 6 孔板, 待细胞长至单层, 弃去培养液, 用 PBS 清洗 2 次后, 加入 100 个 TCID<sub>50</sub> 的 HCoV-OC43。34℃ 孵育 2 h 后, 弃去上清, PBS 洗涤 2 次后, 弃去未吸附的病毒。分别加入 6 μg/mL (ARB6)、2 μg/mL (ARB2) 和 0.67 μg/mL (ARB067) 的 ARB, 设病毒组(V)和正常组(Ctrl), 置于 34℃、5% CO<sub>2</sub> 条件继续培养 96 h 后, 弃上清, 再加入 1 mL TRIzol。

#### 1.3.2 RNA 制备, 文库构建与 RNA 序列测定

应用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并检测 RNA 完整性和总量。通过磁性寡糖(dT)珠纯化 mRNA, 随后在 Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版, 随机寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNAPolymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 筛选 370~420 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增并再次

使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得文库。然后在 illumina NovaSeq 6000 平台上进行测序。

#### 1.3.3 主成分分析(PCA)与差异表达基因聚类分析热图

PCA 采用线性代数的计算方法, 对数以万计的基因变量进行降维及主成分提取。对所有样本的基因表达值(FPKM)进行 PCA 分析。将所有比较组的差异基因取并集之后作为差异基因集。采用主流的层次聚类对基因的 FPKM 值进行聚类分析, 对行(row)进行均一化处理(Z-score)。

#### 1.3.4 基因的差异表达分析

使用 DESeq 2 软件分析病毒感染组与各组样本基因表达情况, 以  $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$  且多重假设检验校正后的  $P \leq 0.05$  为条件, 筛选出差异表达基因。

#### 1.3.5 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

通过 ClusterProfiler(3.8.1) 软件实现差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集, GO 富集分析和 KEGG 通路富集以  $\text{padj} < 0.05$  作为显著性富集的阈值。

#### 1.3.6 冠状病毒感染相关的信号通路中 DEGs 相关网络分析

利用 STRING v10 在线分析平台, 进行蛋白互作网络(PPI)数据分析, 应用 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用网络<sup>[11]</sup>。通过 Cytoscape 中的插件 CytoHubba 来计算蛋白质节点, 根据 Degree 分值的高低, 确定 PPI 网络中的关键节点, 筛选关键基因。

#### 1.3.7 SYBR Green RT-qPCR 法检测信号通路分子的 mRNA 表达

将氯仿加入 1.3.1 的细胞 TRIzol 混合物, 振荡后以 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min。吸取上清, 加入异丙醇, 振荡后以 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min。吸弃上清后, 加入 75% 乙醇溶液, 7500 r/min、4℃ 离心 5 min。吸弃上清后, 加入经 DEPC 处理的水。在超微量分光光度计上检测核酸浓度后, 配制 cDNA 逆转录反应体系(含 5×HiScript III qRT SuperMix、RNA 样本以及经 DEPC 处理的水), 用 PCR 仪进行逆转录, 条件为: 37℃, 15 min → 85℃, 5 s → 16℃, ∞。配制 qPCR 反应体系(含上下游引物、2×SYBR Green Mix 以及经 DEPC 处理的水), 加入 cDNA 样本进行 qPCR 检测, 反应条件为: 95℃, 30 s(预变性) → 95℃, 10 s(变性) → 60℃, 30 s(退火延伸), 变性及

退火延伸共 40 个循环。结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 ARB 干预后对通路分子 mRNA 相对表达量的影响。信号通路分子引物序列见表 1。

#### 1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 对数据进行分析,结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组之间的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 测序数据产出汇总

根据本实验所建立的测序文库,15 个样品的

表 1 信号通路分子的引物序列

Table 1 Primer sequence for the molecules in signaling pathways

分子 Gene	引物 Primer
PIK3CA	5' -GAAGCACCTGAATAGCAAGTCG-3'
	5' -GAGCATCCATGAAATCTGGTCCG-3'
AKT	5' -TGGACTACCTGCACTCGGAGAA-3'
	5' -GTGCCGCAAAAAGTCTTCATGG-3'
p58	5' -GAGCGTTACCAGAACCTGTCTC-3'
	5' -AGTAACCGCAGTCTCTGTAGGT-3'
TRAF6	5' -CAATGCCAGCGTCCCTTCCAAA-3'
	5' -CCAAAGGACAGTCTGGTCATGG-3'
c-Jun	5' -CCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG-3'
	5' -TGCTGCCTTAGCATGAGTTGGC-3'
Bax	5' -TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG-3'
	5' -TGTTGCCACGGCGCAATCATC-3'
GAPDH	5' -GTCTCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	5' -ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

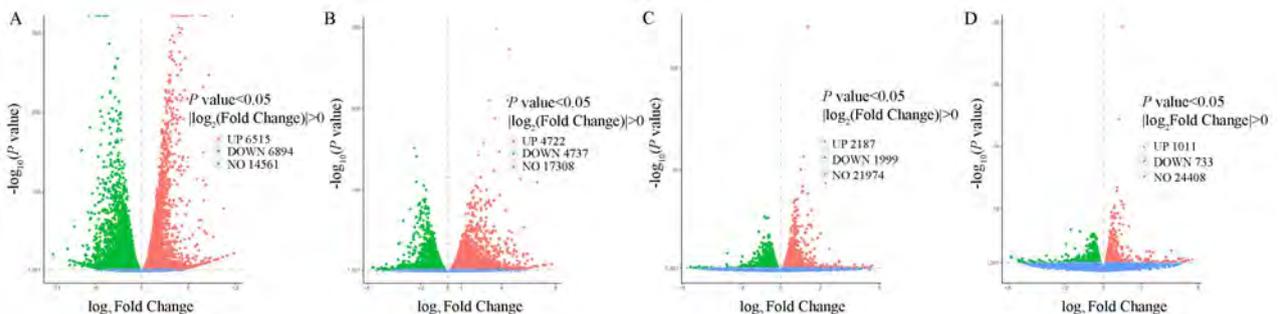
raw reads 在  $4.1\times 10^7\sim 4.3\times 10^7$ , 总计为  $63.2\times 10^7$ 。经过原始数据过滤后,约有  $58.9\times 10^7$  (93.2%) 的原始数据作为高质量的读段(clean reads)被保留下来。15 个样品的 reads 差异较小, $Q20\geq 96.96$ ,  $Q30\geq 92.09$ ,表明测序结果较好,可用于后续的分析(表 2)。

### 2.2 mRNA 筛选及差异表达基因分析

使用 DESeq2 软件(1.20.0)进行两个比较组合之间的差异表达分析。使用 Benjamini & Hochberg 的方法来调整所得  $P$  值,  $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq 1$  &  $\text{padj}\leq 0.05$  显著差异表达的阈值。结果显示,与 Ctrl 比较,HCov-OC43 感染组 V 筛选出 13 409 个 DEGs,其中上调和下调的 DEGs 分别为 6515 个和 6894 个(图 1A)。与 V 相比,ARB 的 DEGs 为 9456 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 4722 个和 4737 个(图 1B)。ARB2 的 DEGs 为 4186 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 2187 个和 1999 个(图 1C),ARB067 的 DEGs 为 1744 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 1011 个和 733 个(图 1D)。

### 2.3 主成分和聚类分析

PCA 的第一个分量(PC1)占总方差的 69.39%,而第二个分量(PC2)收集了 9.56% 的方差(图 2A)。PCA 显示 HCov-OC43 感染组样本与正常对照组样本分散,各处理组组内样本聚集。热图分析显示,V 与 ARB2 和 ARB067 类聚,与 ARB6 组距离较大,表明高剂量 ARB 可能显著影响了病毒感染 HRT-18 细胞引起的基因表达(图 2B)。



注:A:病毒组 vs 正常组;B:ARB6 vs 病毒组;C:ARB2 vs 病毒组;D:ARB067 vs 病毒组。符合  $P\leq 0.05$  和  $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq 1$  条件的为表达差异显著的基因;横坐标表示基因的表达倍数变化( $\log_2$  Fold Change),纵坐标表示表达差异的显著性水平( $-\log_{10}$  Padj);红色和绿色点分别代表上调和下调基因。

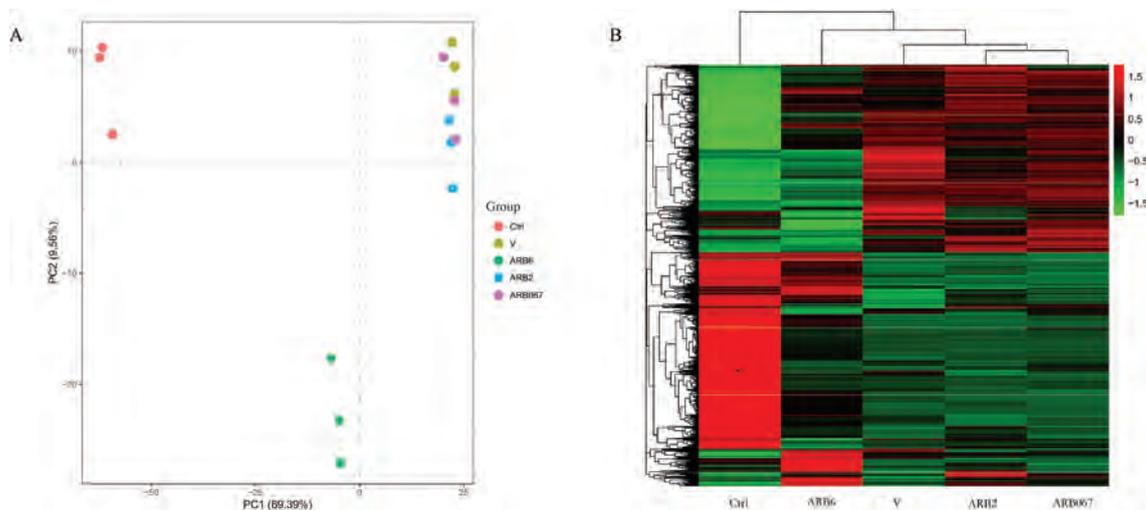
图 1 ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因火山图

Note. A, Virus vs normal control. B, ARB6 vs virus. C, ARB2 vs virus. D, ARB067 vs virus. Significantly differentially expressed genes were defined as having a  $P\leq 0.05$ ,  $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq 1$ . X axis represents fold changes in gene expression ( $\log_2$  Fold Change), while Y axis shows significance levels of DEGs. Red and green dots represent up- and down-regulated genes, respectively.

Figure 1 Volcano plots map of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells treated with ARB

**表 2** 细胞样本 cDNA 文库测序数据  
**Table 2** The cDNA sequencing data of cell samples

样本 Samples	原始读数 Raw reads	净读数 Clean reads	净碱基数 Clean bases	错误率(%) Error rate	Q20 值(%) Q20	Q30 值(%) Q30	GC 含量(%) GC content
Ctrl-1	42 168 068	38 650 830	5. 80G	0. 03	97. 15	92. 48	50. 87
ARB6-1	42 542 216	39 046 794	5. 86G	0. 03	97. 08	92. 11	46. 07
ARB2-1	41 454 118	38 884 308	5. 83G	0. 03	97. 03	92. 09	47. 62
ARB067-1	43 745 898	39 994 102	6. 00G	0. 03	97. 17	92. 43	47. 34
V-1	41 336 374	38 015 590	5. 70G	0. 03	97. 09	92. 30	48. 03
Ctrl-2	42 208 406	38 170 680	5. 73G	0. 03	97. 08	92. 28	48. 71
ARB6-2	41 763 494	41 687 318	6. 25G	0. 03	97. 04	92. 13	46. 73
ARB2-2	43 141 988	40 309 962	6. 05G	0. 03	96. 97	92. 10	48. 71
ARB067-2	41 625 968	38 577 392	5. 79G	0. 03	97. 03	92. 19	49. 11
V-2	41 904 598	39 003 642	5. 85G	0. 03	97. 03	92. 14	49. 12
Ctrl-3	41 441 876	38 712 530	5. 81G	0. 03	96. 96	92. 10	50. 87
ARB6-3	41 680 700	38 779 652	5. 82G	0. 03	97. 11	92. 28	48. 19
ARB2-3	42 240 354	39 133 272	5. 87G	0. 03	97. 13	92. 37	48. 54
ARB067-3	41 881 500	39 571 018	5. 94G	0. 03	97. 19	92. 49	48. 24
V-3	43 017 748	40 578 528	6. 09G	0. 03	97. 07	92. 17	48. 60



**图 2** ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞转录组数据的主成分分析(PCA)与 ARB 干预后差异表达基因的聚类分析  
**Figure 2** PCA of RNA-seq data from HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment and Cluster analysis of DEGs regulated by ARB treatment

**2.4 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析**

为探索 ARB 干预 HCoV-OC43 感染细胞的可能机制,进一步对 ARB6 的 9456 个 DEGs 进行 GO 和 KEGG 注释。结果表明,DEGs 显著富集到 237 条 GO 条目( $P < 0.05$ ) (图 3A)。ARB 主要干预的生物学过程是共翻译蛋白膜靶向,作用的细胞组成为粘着斑和细胞-底物间连接,影响的分子功能为钙粘蛋白结合。

因冠状病毒感染可激活多种细胞信号通路从而引起过度的炎症反应,抑制这些通路的活化

可起到缓解疾病进程的作用。本研究关注 ARB 干预后显著下调的信号通路。KEGG 结果显示,ARB 干预后出现下调的 DEGs 显著富集在 49 条通路上。在排名前 5 的通路中,细胞凋亡信号通路和神经营养因子信号通路与冠状病毒感染相关(图 3B)。

**2.5 DEGs 相关网络分析与关键基因的筛选**

利用 STRING(v11.5)分析冠状病毒感染相关的神经营养因子信号通路和细胞凋亡信号通路中 DEGs 蛋白相互作用(PPI)网络。如图 4 所示,与

HCoV-OC43 感染组相比,在经过 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ARB 干预组 (ARB6) 有 42 个 DEGs 下调, PPI 网络共涉及 42 个节点和 209 个边缘。选用 Cytoscape, 根据 Degree 计算确定了 PPI 网络中的 10 个关键基因, 即 AKT1/AKT、JUN/c-JUN、PIK3CA、TRAF-6、MAPK14/p38、RAF1、IKBKB、CRK、CRKL 和 RELA。结合 RNA-Seq 结果, 选取表达量较高的 AKT1/AKT、JUN/c-JUN、PIK3CA、TRAF6 和 MAPK14/p38 等 5 个基因进行验证。由于 Bax 是 Bcl-2 家族中的

重要促凋亡蛋白, 被认为是脑损伤发生的标志物, 因此也选取 Bax 基因进行验证。

## 2.6 ARB 对神经营养因子信号通路的抑制作用

进一步利用 RT-qPCR 法进行验证, 发现 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ARB 对 PIK3CA、AKT、TRAF-6 和 Bax 的 mRNA 表达具有显著抑制作用 (图 5A、5B、5D、5F)。此外, ARB 也可显著抑制 p38 (6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和 c-JUN (6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 mRNA 表达 (图 5C、5E)。

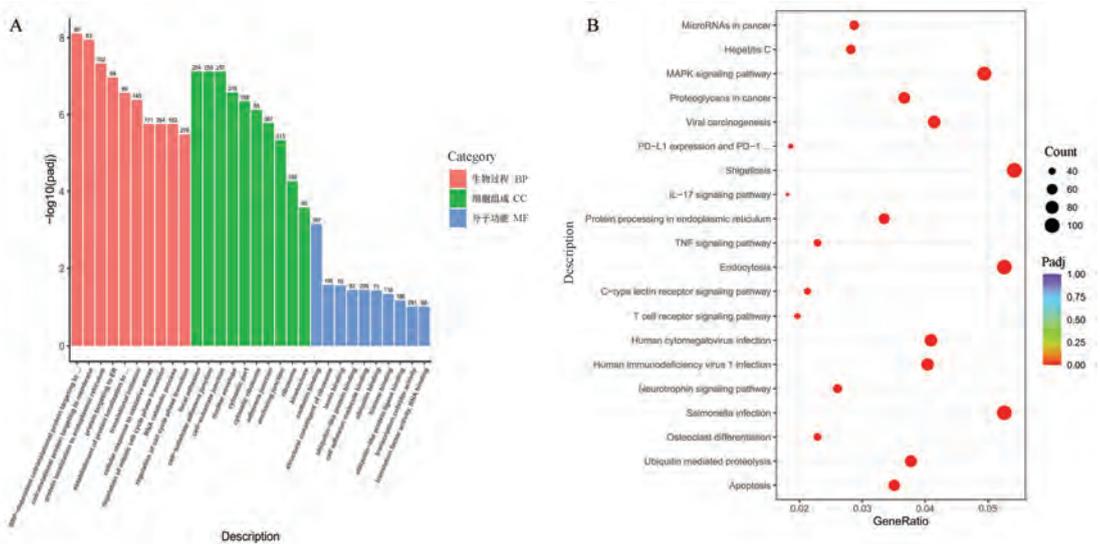
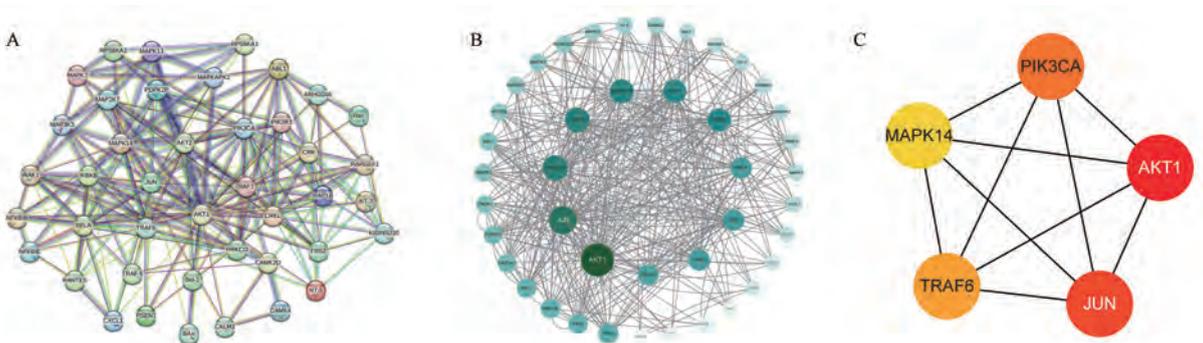


图 3 ARB 干预后差异表达基因的 GO 富集分析与引起信号通路下调表达的 KEGG 富集分析

Figure 3 GO enrichment of DEGs and KEGG enrichment of downregulated pathways regulated by ARB treatment

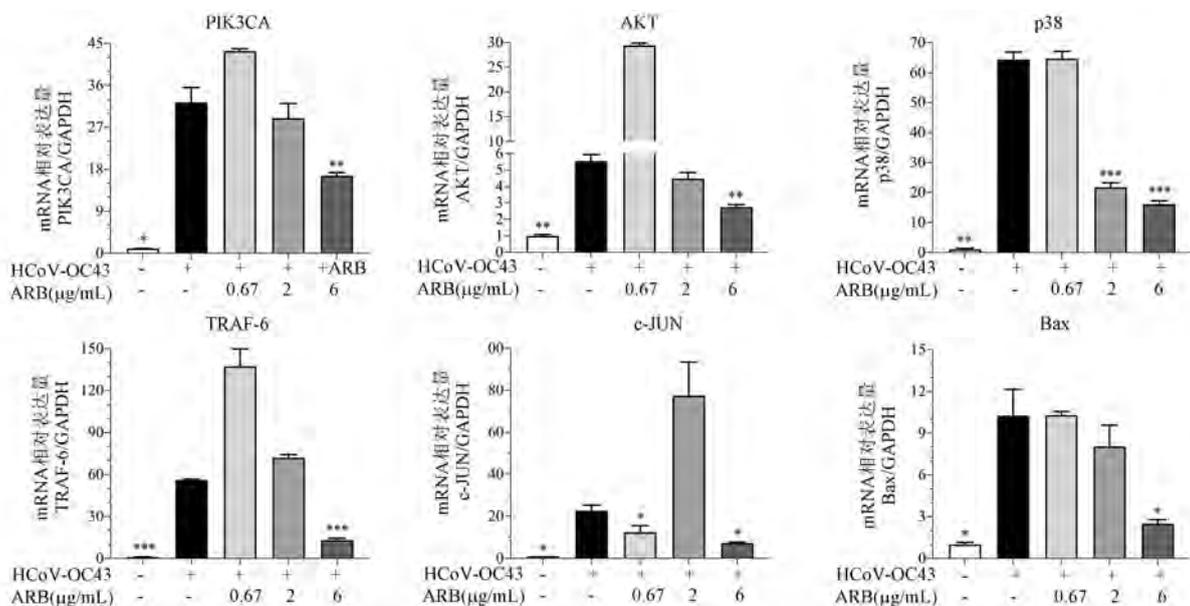


注: A: STRING 网络分析 (差异表达基因构建的蛋白质-蛋白质相互作用网络); B: ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因互作网络, 根据“Degree”进行着色, 颜色越深表示 Degree 越高; C: 关键基因相互作用网络。

图 4 ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因互作网络

Note. A, STRING network analysis. B, Interaction network of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment. The network was colored according to the level of Degree value. The higher the Degree value, the darker the color. C, Interaction network of key genes.

Figure 4 Interaction networks of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment



注:以 GAPDH 作为内参,细胞 mRNA 标准化为 1.0,与 HCoV-OC43 组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 5 RT-qPCR 检测 ARB 对神经营养因子通路分子 mRNA 表达的影响

Note. Normalized with GAPDH, the cellular mRNA standardization was 1.0. Compared with HCoV-OC43 group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 5 Effects of ARB treatment on mRNA expressions of molecules in neurotrophin pathway were detected by RT-qPCR assay

### 3 讨论

HCoV-OC43 是一种嗜神经呼吸道病毒。硬化症患者尸检发现 OC43 在脑部的核酸阳性率达 23%<sup>[12]</sup>;研究者也曾从脑脊髓炎儿童患者的脑脊液中分离获得 OC43<sup>[12]</sup>;利用 OC43 滴鼻感染小鼠后发现病毒可经嗅球达到中枢神经系统 (central nervous system, CNS)<sup>[13]</sup>。

神经营养因子如神经生长因子 (NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 和神经营养因子 3 (NT-3)、NT-4 和 NT-5,是参与 CNS 功能的重要蛋白<sup>[14]</sup>。这些神经营养因子进一步被相关受体识别,如原肌球蛋白受体激酶 (Trk) 和 75 kDa NT 受体 (p75NTR) 从而激活下游炎症信号通路。这些通路的适当活化有助于大脑正常发育、神经元存活和突触可塑性<sup>[14]</sup>。然而,神经营养因子的作用会因病毒 (如 HIV 和 HSV) 感染而发生改变。目前在冠状病毒感染方面尚缺乏关于神经营养因子作用与 CNS 疾病转归的报道<sup>[14]</sup>。有限研究发现,SARS-CoV-2 通过抑制 ACE-2 从而抑制下游 BDNF 的表达<sup>[15]</sup>。BDNF 的下调可引发 COVID-19 的神经退化性疾病 (如加剧氧化应激、神经炎症和细胞凋亡)<sup>[15]</sup>。根据本研究转录组分析结果,发现 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞后,BDNF 和 NT-4 分别出现 6.5 倍和 5.2 倍的

下调表达,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ARB 干预可将上述两个因子分别上调 3.4 倍和 2.0 倍。有研究报道,补充外源性 BDNF 可在小神经胶质细胞中抑制 COX-2 以及上调红细胞生成素 (EPO) 和音猬因子 (Shh),从而抑制促炎因子的表达<sup>[16]</sup>。结合前期我们明确 ARB 对炎症因子具有抑制活性的发现,其抗炎效应可能与上调 BDNF 的作用相关。HCoV-OC43 抑制神经营养因子表达的机制以及 ARB 干预对上述因子蛋白表达水平的影响均有待进一步研究和确认。

在正常情况下,CNS 的免疫激活主要是响应病毒入侵并产生有利于恢复机体平衡的自限性炎症反应。然而,过度的炎症可导致神经系统产生炎症介质,从而导致组织损伤的进一步加剧。神经炎症是冠状病毒感染的特征性致病机制之一。在 SARS-CoV-2 感染中,神经炎症通常伴随 CNS 损伤,可由病毒直接侵入 CNS 或间接引起全身过度炎症而引发,后者的致病机制为 SARS-CoV-2 感染导致固有免疫反应过度激活,是 COVID-19 的重要标志<sup>[17]</sup>。神经营养因子信号通路可激活多个炎症信号级联反应,包括 MAPK/Erk、MAPK/p38、MAPK/JNK、PLC- $\gamma$ 、PI3K/Akt 和 NF- $\kappa\text{B}$  等通路<sup>[18-19]</sup>。PI3K/Akt 级联在小胶质细胞功能中发挥重要作用。已证实,相比 NF- $\kappa\text{B}$ ,LPS 优先激活小胶质细胞中的 PI3K/Akt,可见 PI3K/Akt 在 NF- $\kappa\text{B}$  依赖性炎症反应中起

分子开关作用<sup>[20]</sup>。此外,阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可显著抑制 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 的复制<sup>[21-22]</sup>。因此,我们推测 ARB 通过阻断 PI3K/Akt 信号通路从而发挥对冠状病毒的抗病毒和抗炎作用。p38 激酶与多种神经系统疾病有关,尤其是与神经炎症反应有关,可通过激活毒性信号传导加剧疾病进展<sup>[23]</sup>,主要是因为 p38 在免疫细胞(包括小神经胶质细胞)的炎症因子产生和释放中发挥重要作用<sup>[23]</sup>。有报道发现,在脑组织缺血性条件下抑制 p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  可降低神经炎症和细胞因子释放<sup>[24-26]</sup>;敲除小胶质细胞的 p38 $\alpha$  在小鼠中可保护 LPS 诱导的神经炎症,降低小胶质细胞的激活、外周炎症细胞的流入、突触丧失并改善运动障碍<sup>[27-28]</sup>。本研究 RNA-Seq 数据结果与 qPCR 验证结果明确了 ARB 干预可有效抑制 p38 的 mRNA 表达,与我们前期在蛋白水平的发现一致<sup>[10]</sup>。另外,已证实 TRAF-6/JNK/p38-ATF2 轴可促进小胶质细胞的炎症的激活,从而加重脑神经元损伤<sup>[29]</sup>,这可能成为潜在的治疗靶点<sup>[29]</sup>。因此,ARB 对炎症因子的抑制作用可能与阻断 p38 和 TRAF-6 的活化相关。

Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中的抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,被认为是脑损伤发生的标志物。本研究发现 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ARB 可升高 Bcl-2 与 Bax 的 FPKM 比值 ( $V_{\text{Bcl-2/Bax}}$ : 1.54,  $\text{ARB6}_{\text{Bcl-2/Bax}}$ : 3.84),与 RNA-Seq 数据一致,qPCR 验证结果表明 ARB 可显著抑制 Bax 的 mRNA 表达,提示了 ARB 可能在 OC43 感染中具有抗凋亡作用。此外,凋亡可引发炎症反应,如 TNF 受体依赖的凋亡反应,可促进一系列促炎细胞因子和趋化因子的分泌<sup>[30]</sup>。Fas 参与的凋亡反应可招募多种相似的分子,如 FADD、RIPK1 和 IKK 复合物,从而诱导促炎细胞因子和趋化因子(如 IL-6、IL-8、CXCL1 和 RANTES)的产生<sup>[31]</sup>。可见,ARB 对细胞因子的抑制作用也可能通过抑制凋亡反应而实现。

综上,本研究提示了阿比朵尔应用于治疗冠状病毒感染引起的神经炎症的可能性。ARB 抗 HoV-OC43 感染的可能机制为抑制神经营养因子信号通路的激活,有待进一步在神经元细胞和神经胶质细胞以及在 OC43 感染小鼠致脑炎的模式中进行验证。

#### 参考文献:

[1] Alshehri MS, Alshoumi RA, Alhumidi HA, et al. Neurological complications of SARS-CoV, MERS-CoV, and COVID-19 [J].

SN Compr Clin Med, 2020, 2(11): 2037-2047.

- [2] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. JAMA, 2020, 323(11): 1061-1069.
- [3] Chen J, Subbarao K. The immunobiology of SARS [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 443-472.
- [4] Yu X, Zhang S, Jiang L, et al. Structural basis for the neutralization of MERS-CoV by a human monoclonal antibody MERS-27 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 13133.
- [5] Wang J, Li H. Editorial of special column on antiviral drug discovery and pharmacology [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(4): 1540-1541.
- [6] Blaising J, Polyak SJ, Pécheur EI. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update [J]. Antiviral Res, 2014, 107: 84-94.
- [7] 李赞, 晋月萍, 葛庆岗, 等. 阿比多尔治疗新型冠状病毒肺炎的有效性和安全性——基于目前与既往抗病毒治疗的系统评价 [J]. 药物不良反应杂志, 2020, 22(6): 333-342.
- [8] Wei S, Xu S, Pan YH. Efficacy of arbidol in COVID-19 patients: a retrospective study [J]. World J Clin Cases, 2021, 9(25): 7350-7357.
- [9] Khamitov RA, Loginova SIA, Shchukina VN, et al. Antiviral activity of arbidol and its derivatives against the pathogen of severe acute respiratory syndrome in the cell cultures [J]. Vopr Virusol, 2008, 53(4): 9-13.
- [10] Xie P, Fang Y, Shen Z, et al. Broad antiviral and anti-inflammatory activity of Qingwenjiere mixture against SARS-CoV-2 and other human coronavirus infections [J]. Phytomedicine, 2021, 93: 153808.
- [11] 刘小花, 徐鹏, 张昕薇, 等. 猪圆环病毒 2 型感染人源细胞的转录组分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 17-24.
- [12] Yeh EA, Collins A, Cohen ME, et al. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis [J]. Pediatrics, 2004, 113(1): e73-e76.
- [13] St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, et al. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion [J]. J Virol, 2004, 78(16): 8824-8834.
- [14] Bohmwald K, Andrade CA, Mora VP, et al. Neurotrophin signaling impairment by viral infections in the central nervous system [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5817.
- [15] Motaghinejad M, Gholami M. Possible neurological and mental outcomes of COVID-19 infection: a hypothetical role of ACE-2\Mas\BDNF signaling pathway [J]. Int J Prev Med, 2020, 11: 84.
- [16] Lai SW, Chen JH, Lin HY, et al. Regulatory effects of neuroinflammatory responses through brain-derived neurotrophic factor signaling in microglial cells [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(9): 7487-7499.
- [17] Tavčar P, Potokar M, Kolenc M, et al. Neurotropic viruses, astrocytes, and COVID-19 [J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 662578.

- [18] Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, et al. Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(5): 3295–3312.
- [19] Cianciulli A, Porro C, Calvello R, et al. Microglia mediated neuroinflammation: focus on PI3K modulation [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 137.
- [20] Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, et al. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(5): 858–865.
- [21] Basile MS, Cavalli E, McCubrey J, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential pharmacological target in COVID-19 [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(3): 848–856.
- [22] Kindrachuk J, Ork B, Hart BJ, et al. Antiviral potential of ERK/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling modulation for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection as identified by temporal kinome analysis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(2): 1088–1099.
- [23] Asih PR, Prikas E, Stefanoska K, et al. Functions of p38 MAP kinases in the central nervous system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 570586.
- [24] Barone FC, Irving EA, Ray AM, et al. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296(2): 312–321.
- [25] Piao CS, Che Y, Han PL, et al. Delayed and differential induction of p38 MAPK isoforms in microglia and astrocytes in the brain after transient global ischemia [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 107(2): 137–144.
- [26] Sanchez A, Tripathy D, Yin X, et al. p38 MAPK: a mediator of hypoxia-induced cerebrovascular inflammation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 32(3): 587–597.
- [27] Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, et al. The p38 $\alpha$  MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(14): 6143–6153.
- [28] Morganti JM, Goulding DS, van Eldik LJ. Deletion of p38 $\alpha$  MAPK in microglia blunts trauma-induced inflammatory responses in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 98.
- [29] Li M, Zhang D, Ge X, et al. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376(2): 133–148.
- [30] Kearney CJ, Sheridan C, Cullen SP, et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonists regulate spontaneous and tumor necrosis factor (TNF)-induced proinflammatory cytokine and chemokine production [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 4878–4890.
- [31] Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1034–1048.

[收稿日期]2022-08-26

孟寒,张兆南,杨子豪,等.基于“新三中心”的医学实验动物学教学模式创新[J].中国比较医学杂志,2023,33(6):90-94.  
Meng H, Zhang ZN, Yang ZH, et al. Teaching method innovations in medical laboratory animal science under the “new three centers” education concept [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 90-94.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.012

# 基于“新三中心”的医学实验动物学教学模式创新

孟寒<sup>1</sup>,张兆南<sup>2</sup>,杨子豪<sup>2</sup>,张彩勤<sup>1</sup>,赵亚<sup>1</sup>,秦靖<sup>1</sup>,白冰<sup>1</sup>,赵勇<sup>1</sup>,师长宏<sup>1\*</sup>

(1.空军军医大学实验动物中心,西安 710032;2.空军军医大学教研保障中心,西安 710032)

**【摘要】** 以学生为中心(student-centeredness)的“新三中心”教育模式是目前高校课程改革的主要方向。医学实验动物学作为医科院校重要的基础课程,为调动学生自主学习的积极性,全面提升学生的知识、能力和综合素质,教学模式也逐步从“传授式教学”,向“以学生为中心”的翻转课堂、线上线下混合及MOOC等新型模式转变。本文将依据医学实验动物学的课程特征,探索在“新三中心”教学模式下,通过对教学方法的创新和智慧教学环境的应用,期望提高医学实验动物学的教学质量,提高学生的科研素养。同时,顺应了思政教育同专业理论课程紧密结合的宗旨,将思政元素有机融入,期望与医学实验动物学的专业内容形成良好的协同效应。

**【关键词】** 医学实验动物学;新三中心;智慧教学环境;云课堂

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0090-05

## Teaching method innovations in medical laboratory animal science under the “new three centers” education concept

MENG Han<sup>1</sup>, ZHANG Zhaonan<sup>2</sup>, YANG Zihao<sup>2</sup>, ZHANG Caiqin<sup>1</sup>, ZHAO Ya<sup>1</sup>, QIN Jing<sup>1</sup>, BAI Bing<sup>1</sup>,  
ZHAO Yong<sup>1</sup>, SHI Changhong<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China.

2. Teaching and Research Support Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032)

**【Abstract】** The student-centered “new three centers” education concept is the direction of teaching reform in colleges and universities. Medical laboratory animal science is an important foundation subject of medical education. To fully motivate student subjective initiative, develop their experimental skills and scientific research thinking, the teaching model of medical laboratory animal science gradually changed from traditional concept of teaching knowledge to centered on students, such as a flipped classroom, online and offline mixed teaching, MOOC, and other new modes. This article examines the knowledge framework and teaching important difficult points on the basis of the curriculum features, explores the advent of the era of the new three centers education concept on the basis of curriculum features, achieves improving teaching quality in course teaching and the scientific literacy in medical students by teaching method innovations and an intelligent teaching environment. “New three center” education promotes a combination of college ideological and political education with professional theory courses for a good synergistic effect with the teaching content of medical laboratory animal science.

**【Keywords】** Medical laboratory animal science; new three centers; intelligent teaching environment; cloud classroom

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

[作者简介] 孟寒(1994—),女,硕士,助教,研究方向:人源化基因编辑猪制备。E-mail:menghan0831@fmmu.edu.cn

[通信作者] 师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型制作。E-mail:changhong@fmmu.edu.cn

医学实验动物学是一门专业性与应用性很强的前沿综合性学科<sup>[1]</sup>。作为众多现代高等医学院校的必修课,除了要向学生传授科研知识,培养动手能力,使学生认识实验动物在生命科学研究中的重要性,还要渗透思政教育,塑造学生的人文关怀意识及科研创新精神,以培养出德智体美劳全面发展的高素质人才<sup>[2]</sup>。

传统的医学实验动物学教学,多是按照德国教育家赫尔巴特提出的以“教师、教材、教室”三者为中心的“传统三中心”模式进行。该模式的运用需要树立教师的绝对权威地位,主张教学应以传授知识为主要目的,讲求高效率地灌输教学内容。但因过于强调教师、教材和教室的作用,在一定程度上限制了学生主动性和积极性的发挥,忽略了课程内容在实践中的应用,易造成“教”“学”分离的局面<sup>[3-4]</sup>。根据教学总结及课后调查问卷结果,经教研室讨论后得出,因实验动物学课程理论概念庞杂,理解起来较为困难,导致学生对理论课教学普遍兴致不高。提前的预习虽然对知识的掌握具有一定的帮助作用,但大部分学生还是缺少预习的主动性。同时,思想政治教育作为现代高校教育中的重要组成部分,需要在教学全过程中融入立德树人的宗旨,而灌输式的教育理念明显不利于思政内容与理论授课的有机融合。

由美国教育家杜威提出的以“学生”为核心的新教育教学模式,将重点集中在学生的“发展、学习、学习效果”上,简称“新三中心”模式<sup>[4]</sup>。该模式一方面打破了传统的学科界限,突出了学生的主体地位,将学习的主动权交到学生手中,促进学生自行收集、整合信息,自主构建知识框架,再通过探讨、交流,将所学应用到实际问题中。另一方面,顺应了思政教育同专业理论课程紧密结合的宗旨,将思政元素有机融入,与医学实验动物学的专业内容形成了良好的协同效应。

基于此,在本科生的医学实验动物学课程中,教研室首次开展了“新三中心”教学模式改革,尝试利用新的教学手段和智慧教学环境改善教学现状。从结果来看,基于新模式的教学方式,除了调动了学生的学习积极性与主动性,获得了良好的教学效果外,“润物细无声”地融入思政内容,提升了学员的人文关怀与科研创新意识。

## 1 “新三中心”在教学方法的体现

随着中国高校教育体制与信息化时代的不断

改革,以“学生”为核心的“新三中心”教育模式凭借其先进性与科学性,逐渐占据高校课程教育的重要地位。该模式强调学生的主体地位,重点集中在学生的“发展、学习、学习效果”上。将学习的主动权交到学生手中,提高其自行收集、整合信息、构建知识框架的意识,培养其将所学应用到实际问题中的能力。而传统的“传授式教育”比起学生的学习效果,更加重视高效率地摄入知识,反而强调了教师的主体地位,与“以学生为核心”的新教育教学理念背道而驰。

翻转课堂是在“新三中心”的教学模式下衍生出的全新教学手段。它重构了教与学的关系,注重学生在课堂外搜集与总结知识的能力。在课堂内,教师完成从纯粹的传授者向组织者或引导者的转变。根据授课内容设置相应的启发及互动环节,确立教学活动中学生的主体地位,教学生从单纯的“学会”知识,到“会学”知识。在自主收集、总结资料的过程中,激发学生的学习积极性与主动性<sup>[3-5]</sup>。在本次教学活动中,教员进行了探索与实践,将翻转课堂融入到医学实验动物学授课中,学生的积极性得到了调动,养成了自主学习的习惯,对实验动物与动物实验均产生了浓厚的兴趣,获得较好的学习效果。

### 1.1 依据课程重难点设计教学目标,将学生引入问题情境中

从本质上来说,翻转课堂是一种以学生为中心的重要方法。以问题为基础的学习(problem-based learning, PBL)模式,是其中较受欢迎的教学方法之一,它要求学生在教师的引导下,将学习置于复杂、有意义的问题情境中,以小组为单位,自发寻找答案,掌握资料筛选及归纳的方法,在解决问题的过程中建构知识<sup>[6-7]</sup>。PBL 教学可以激发学生间的互动,培养其自主学习的意识和主观能动性。

在“人类疾病动物模型”这节课中,课程的重点是疾病动物模型的概念,难点是疾病动物模型的分类以及各自的优缺点。但是,这节课的概念性内容过多,往年都是靠教师进行传统的“填鸭式教学”。由于大量内容的被动输入,容易造成学生疲劳,无法激发学习兴趣及热情,学习效果不明显。在课程的随堂测试及考试中,普遍失分较多。在新教育模式的创新下,教员采取提前分组的形式,将“疾病动物模型”作为课堂讨论问题,让学生自行分组确定主题。比如,主题为自发性动物模型的学

生,以容易引起自发性高血压的 SHR 大鼠为例,介绍该类模型的疾病发生在一定程度上减少了人为因素,其发展机制更接近人类疾病,所以具有较高的应用价值;主题为转基因动物模型的学生,选择了当下热门的 hACE2 转基因小鼠,通过其在新型冠状病毒肺炎研究中的应用,分享了利用基因编辑技术构建动物模型的方法,提出随着精准医疗的快速发展,基因编辑动物模型的应用范围将越发广泛。在教员的引导下,课堂氛围活跃,小组讨论有序。若学生的分享内容较多,教员也会适时打断,对整体节奏把控恰当。在课后的随堂测试中,学生的正确率较之前得到了明显提升。

通过本次课的尝试,发现在 PBL 的翻转课堂教学方式中,学生通过自行搜集资料,并用自己的语言概括总结分享的这一过程,比起传统模式更能提高学生积极性和解决问题的能力。在学生的综合素质及专业能力得到锻炼的同时,对教员的教学水平和专业素养的提高也有了明显的推动作用。教员需要将自己从单纯的传授者,向引导者与组织者进行转换。同时,教员需要有较深厚的知识储备,才可对课堂中学生讨论出的问题做出及时且充分的解答。由此可见,新模式的探索,对教员的教学及科研能力都有着积极的作用<sup>[8]</sup>。

## 1.2 提出辩证问题,引导学生进行辩论,训练学生的思辨能力

除了 PBL 教学,案例教学法(case-based learning, CBL)也是一种新型互动式教学模式,其核心是具体案例的先导。要求教员在遵循教学大纲的基础上,以典型且具体的临床案例素材为主线,设计与之相关的课程内容,引导并启发学生展开讨论,鼓励学生积极思考并解决实际问题的一种小组讨论式教学法,也是翻转课堂的重要方法之一。CBL 教学可以有效克服理论与实际案例间的割裂感,训练学生的推理与思辨能力<sup>[9]</sup>。

医学实验动物学的教学本质,是为了培养学生主动运用课堂中所学知识,解决今后学习及科研中实际问题的能力,与 CBL 的教学宗旨不谋而合<sup>[10]</sup>。所以基于教学的实际情况,教员将临床案例衍伸为辩论题目,有效结合到“实验动物福利伦理与法治化要求”的授课中。这节课虽然概念性内容不多,但在往年的教学中,每到课程中后半段,可明显观察到学生的注意力减弱,学习的积极性降低,其原因在于课程内容庞杂,缺乏系统性,且整体基调

偏负面,所以在课程中段设计一个抓回学生注意力的环节迫在眉睫。

结合本节课的难点,是要让学生树立“保护实验动物,维护福利伦理”的基本意识,基于之前的经验,学生在接受本节课的授课后,虽然能较好地记住概念性内容,但是对于案例的判断,容易受到教师主观想法的干扰,所以在讲到“是否需要实验动物上进行化妆品试验”时,引入辩论环节,让学生自由组合,分为赞同和反对两组。通过 5 min 的讨论与网上资料查阅后,进行组与组间意见的交流与碰撞,随后由教师引导总结,得出“不能偏执地否定任何一边,而是需要在两者之间选取平衡点”这一结论。作为医科院校的学生,要更加懂得科学、合理地使用实验动物进行动物实验,遵循 3R 原则,保护其五项自由,这样在保护了动物福利伦理的基础上,也保障了人类的健康。

本次课程的教学,从课后测试的正确率可以看出,学生对课程内容的掌握有所提升。通过将丰富的线上学习资源,有效筛选并转化为答案这一过程,学习的积极性得到了调动,学习效果有明显的好转,即在“传统三中心”与“新三中心”教学的逐步融入中取得了较好的教学效果。

## 1.3 思政教学的有机融入

习近平总书记在全国高校政治工作会议上强调:“各类课程需要与思想政治理论同向同行,形成协同效应。”他指出,现代高校教学应把思政教育作为重要的教育内容,全面融入到课堂授课,不能出现思政教育与专业课程“两张皮”的现象<sup>[11-12]</sup>。

对于医学实验动物学的教学,根据其课程特点,挖掘思政元素是教员在备课期间的关键任务。通过教研室的多次教学会议讨论,我们总结医学实验动物学的思政教育,一方面应体现在让学生领悟实验动物是生物医学的重要支撑条件,增强学生对实验动物的尊重与关爱,敬畏生命,学会感恩,提升学员平等、尊重、关爱的医学人文素养<sup>[13]</sup>,另一方面需要教员带领学员从医学热点问题入手,激发学生的科研热情,培养学生求真务实、勇于创新的科学精神。

人文关怀意识的培养,最基础的应是善待实验动物。例如,在“常用实验动物的特点及应用”章节,先列举实验小鼠在现代生命科学,尤其是在代谢类疾病中的应用,随后利用图片展示门齿生长过快,引起进食困难甚至死亡的小鼠图片,提出在利

用高脂饲料诱发肥胖小鼠模型时,因饲料的硬度较低,会使其长期得不到磨牙,从而导致门齿的过度生长,所以在进行此类动物模型制备时,应注意饲养管理问题。其次可以从动物的饲养环境,例如环境的优劣对实验动物的影响这一方面入手,引出实验动物福利伦理相关内容,增强学生对实验动物的尊重与关爱,感恩其奉献。

而对于科研精神的塑造,重点是介绍实验动物在解决医学热点问题中发挥的作用,激发学生的科研热情。比如讲解我国科学家在新型冠状病毒肺炎动物模型研究中取得的系列卓越成果,激发学生的探索创新精神;举例分析科室的科研团队如何根据医学研究需求不断完善动物模型制备与评估体系,培养学生求真务实的科学精神。并且在 PBL 与 CBL 教学模式主动融入相关内容,培养学生分析及解决实际问题的能力,最终激发学生利用实验动物开展生命科学研究的创新性和积极性<sup>[14]</sup>。

## 2 “新三中心”与“智慧教学环境”的有机融合

“新三中心”的教学方式创新,除了体现在教师教学方法的转变,也体现在硬件设施的改进。我校智慧课堂由网页端“智慧课堂云平台”、智慧教室“互动课堂软件”、手机端“空医课堂”微信小程序三部分构成,这些教学工具的出现,在互联网发展迅速的大背景下,成为了现代高校教学的教育模式主流。教员在“新三中心”教学改革中,将智慧教学模式引入到部分实验动物学教学中,实现了师生的高效互动,极大地活跃了课堂气氛。

### 2.1 利用“云课堂”教学平台,增添学生的课堂参与感

与传统教育方式相比,“云课堂”的应用,开启了线上线下混合教学的新阶段。除课前推送预习内容、发布 MOOC、微课资源、定位点名,课间开启弹幕互动、随堂测验,课后分享线上优质资源等基本内容外,还可通过对软件的开发,增强课堂互动性与趣味性<sup>[15]</sup>。

例如在进行“实验动物福利伦理与法治化要求”教学时,设置一个题为“对于一项未知的实验,在低等啮齿类与高等灵长类动物间,你更偏向使用哪类动物?”的线上投票。活动通过“云课堂”发布至每位学生的手机端,通过简单的步骤即可参与。这一环节一方面可以解决多数学生不愿举手参与的困难,同时还可活跃课堂气氛。获得的投票数据

比例可实时展示,通过与文献中投票数据的对比,增强学生的课堂参与感与代入感。

### 2.2 应用“智慧教室”多屏环境,改变师生互动方式,提升师生互动效率

多屏互动是智慧教学环境中的一种全新教学模式,它是利用多块触摸显示屏幕(互动黑板)作为教学载体,通过无线投屏,多屏同步,任意屏幕控制,任意人员投屏等功能,达到多屏同步学习、多屏分组学习的目的<sup>[16]</sup>。

在实验动物学的教学中,教员专为多屏环境设计了连线题,与传统模式的随堂测验相比,提升了问题的多样性。学生端可直接在副屏连线,操作简便,也可利用手机、平板或笔记本电脑答题后,自主投屏到小组屏幕。教师通过主控系统能够同时控制学生的副屏,将学生间的优秀答案或者典型的错误答案共享至所有屏幕,达到师生间的双向沟通与交流。

## 3 总结

综上所述,针对医学实验动物学的课程特点,在“传统三中心”教学模式的基础上,逐步融入以“学生”为核心的“新三中心”教学。对教学内容进行优化与调整,将学生引入问题情境中,训练学生的思辨能力,增强学生的医学人文素养,激发学生的科研热情,培养学生求真务实、勇于创新的科学精神。课程与“智慧教学环境”的有机融合,可以实现师生的高效互动,充分调动学生自主学习的积极性,帮助学生更好地理解课程内容,并全面提升学生的知识、能力和综合素质。

### 参考文献:

- [1] 吴艳玲,张先,崔振宇,等. “双一流”模式下高校研究生实验动物学课程教学模式探索[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 111-114.
- [2] 宋国英,许燕,朱美霖,等. 医学院校实验动物及实验室安全培训的实践探索[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(5): 450-454.
- [3] 方昕. 基于“新三中心”理念的学生学习满意度测评差异分析[J]. 安康学院学报, 2021, 33(5): 59-61, 65.
- [4] 张迪,刘丽丽,任志宏. 新工科背景下基于“新三中心”的课程体系改革研究——以软件工程专业为例[J]. 陕西教育(高教版), 2022(3): 25-27.
- [5] 骆薇,于浩洪,李勇,等. 增强“医学实验动物学”课程趣味性的教学探索[J]. 科教导刊, 2022(22): 109-111.
- [6] 吴晓玲. PBL 教学法在《医学实验动物学》教学中的应用[J]. 中国卫生产业, 2017, 14(12): 71-72.

- [7] 张彩勤, 白冰, 赵勇, 等. 新冠疫情下的实验动物学线上教学体会 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 98-101.
- [8] 罗小泉, 舒坤, 徐伟, 等. 基于教研融合的《医学实验动物学》课程教学改革探索与实践 [J]. 医学教育研究与实践, 2021, 29(1): 106-108, 117.
- [9] 魏盛, 耿希文, 徐凯勇, 等. 基于互联网交互平台三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用 [J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(3): 266-270.
- [10] 张明君, 蒋绚, 郭晓娟, 等. 基于 CBL 及体验式教学理念的临床医学消化科教学改革 [J]. 实验技术与管理, 2021, 38(7): 214-216, 231.
- [11] 邓欢琴. “互联网+”对大学生思政教育的影响及突破路径 [J]. 山西财经大学学报, 2022, 44(S02): 67-69.
- [12] 姚静仪. “思政教育+专业教育”深度融合的大思政教育探索 [J]. 学校党建与思想教育, 2022(16): 68-70.
- [13] 张茜, 肖新华. 实验动物伦理教学中翻转课堂模式的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 87-90.
- [14] 赵微, 刘念. “课堂思政”融入《医学实验动物学》课堂的初步探索 [J]. 锦州医科大学学报(社会科学版), 2021, 19(5): 52-54.
- [15] 王志昇, 杨丽, 吴璟, 等. BOPPPS 教学模式在医学实验动物学课程中的应用与探索 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(6): 534-536.
- [16] 吴伟鑫, 刘慧聪, 曲胜华, 等. 动物医学专业“实验动物学”课程线上教学的思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 109-112.

[收稿日期]2022-11-02

## 过表达 ACE2 通过抑制 NF- $\kappa$ B/VEGF/VEGFR2 通路改善 A $\beta$ -诱导的血脑屏障损伤和血管生成

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的神经退行性疾病,其发病机制尚不清楚。其主要病理特征之一是  $\beta$ -淀粉样蛋白 (A $\beta$ ) 的细胞外沉积,可对脑血管系统和血脑屏障造成损害。最近的研究表明,脑血管功能障碍、脑血流量减少、血脑屏障通透性障碍发生时间早于认知障碍。因此,改善血管功能对于 AD 的进展和治疗可能具有重要意义。血管紧张素-转换酶 2 (ACE2) 是肾素-血管紧张素系统中的重要成分。其主要生理功能是降解血管紧张素 II,血管紧张素 II 作用于血管收缩和增压,以维持血压稳定。在大脑中,ACE2 主要表达于内皮细胞和神经元。研究表明,AD 患者海马和扣带皮层中 ACE2 的表达降低。在携带载脂蛋白 E (APOE)  $\epsilon$ 4 等位基因的 AD 患者中,ACE2 的活性降低,这与 A $\beta$  水平显著相关。然而,ACE2 在 AD 中的具体作用仍不清楚。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所神经退行性疾病课题组的研究人员通过在 A $\beta$ 25-35 聚合物诱导条件下培养 bEnd. 3 细胞来诱导体外 AD 内皮细胞损伤,并通过慢病毒转染在 bEnd. 3 细胞系中实现 ACE2 过表达;使用 CCK-8 检测检测了 A $\beta$ 25-35 对细胞活力的影响,并使用血管生成检测检测了过表达 ACE2 对血管生成的影响;使用 Western blot 和细胞免疫荧光来检测 VEGF/VEGFR2 通路、紧密连接蛋白和 NF- $\kappa$ B 通路表达的变化。

结果显示,A $\beta$ 25-35 处理显著降低了 ACE2 的表达并降低了细胞活力。ACE2 过表达直接减少小管形成中分支和连接的数量,抑制 A $\beta$ 25-35 诱导的 VEGF/VEGFR2 通路的激活,增加 TJPs 的表达,包括 ZO-1 和 claudin-5,并恢复了 A $\beta$ 25-35 诱导的 NF- $\kappa$ B 通路激活。

综上所述,研究表明 ACE2 的过表达可以通过抑制 NF- $\kappa$ B/VEGF/VEGFR2 通路活性来改善体外 AD 内皮细胞模型中的病理性血管生成和血脑屏障损伤。因此,ACE2 有成为 AD 中内皮细胞功能障碍治疗靶点的潜力。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(3): 237-244. <http://doi.org/10.1002/ame2.12324>)。

董丽仙,尹爱武,李灿委,等. 肠道菌群失调与自闭症谱系障碍的相关性研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 95-101.

Dong LX, Yin AW, Li CW, et al. Research progress on the correlation between gut microbiota and autism spectrum disorders [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 95-101.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.013

## 肠道菌群失调与自闭症谱系障碍的相关性研究进展

董丽仙<sup>1,2,3</sup>, 尹爱武<sup>4</sup>, 李灿委<sup>2,3,5</sup>, 范孟然<sup>2,3</sup>, 巫秀美<sup>2,3,5</sup>, 杨自忠<sup>1,2,3</sup>,  
张成桂<sup>1,2,3</sup>, 高鹏飞<sup>1,2,3\*</sup>

(1.大理大学药学院,云南大理 671000;2.云南省昆虫生物医药研发重点实验室,云南大理 671000;  
3.药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心,云南大理 671000;4.湘潭医卫职业技术学院,湖南湘潭 411104;  
5.大理大学公共卫生学院,云南大理 671000)

**【摘要】** 自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种神经发育障碍性疾病,因其发病率持续上升,引起了全球的关注。研究发现,肠道菌群 (gut microbiota) 与 ASD 之间有一定的关联性,体内动态平衡的肠道菌群可以保证人体正常的生命活动,但当其失去稳态时可能会通过改变神经递质、代谢物、免疫系统、HPA 轴和肠道通透性等影响 ASD 的发生发展。益生菌、益生元以及粪菌移植等肠道菌群干预对于治疗 ASD 有一定效果。中医药也可通过干预肠道菌群达到一定的治疗 ASD 的目的。本文旨在通过总结肠道菌群紊乱影响 ASD 的机制,为 ASD 的研究和治疗提供参考。

**【关键词】** 肠道菌群;自闭症谱系障碍;机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0095-07

## Research progress on the correlation between gut microbiota and autism spectrum disorders

DONG Lixian<sup>1,2,3</sup>, YIN Aiwu<sup>4</sup>, LI Canwei<sup>2,3,5</sup>, FAN Mengran<sup>2,3</sup>, WU Xiumei<sup>2,3,5</sup>,  
YANG Zizhong<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Chenggui<sup>1,2,3</sup>, GAO Pengfei<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China. 2. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Dali 671000. 3. National Joint Engineering Research Center for the Development of Medicinal Special Insects, Dali University, Dali 671000. 4. Xiangtan Medicine and Health Vocational College, Xiangtan 411104. 5. College of Public Health, Dali University, Dali 671000)

**【Abstract】** Autism spectrum disorder (ASD) is a kind of neurodevelopmental disorder that has attracted global attention because of its continued rise in incidence. There is a correlation between gut microbiota and ASD. Homeostasis of gut microbiota ensures normal life activities and may affect the occurrence and development of ASD through changing neurotransmitters, metabolites, the immune system, HPA axis, and intestinal permeability by losing its homeostasis. Gut microbiota treatment method, such as probiotics, prebiotics, and fecal microbiota transplantation, have a treatment effects

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (81260676, 82160798, 81960712); 中国国家留学基金 (201708535007); 云南省重大科技专项计划—生物资源数字化开发应用 (202002AA100007)。

**【作者简介】** 董丽仙 (1998—), 女, 硕士, 研究方向: 临床药学。E-mail: dong282341@163.com

**【通信作者】** 高鹏飞 (1971—), 男, 副教授, 研究方向: 代谢组学、肠道菌群。E-mail: gaodaluan@126.com

on ASD. Additionally, traditional Chinese medicine may exert a certain treatment effect on ASD by through gut microbiota. The purpose of this review was to summarize the mechanism of gut microbiota disturbance affecting ASD as well as related research method and models to provide reference for the research and treatment of ASD.

**【Keywords】** gut microbiota; autism spectrum disorder; mechanism

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

自闭症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种常发于儿童早期, 由多因素引起的神经发育障碍性疾病, 主要症状为言语障碍、社交困难、行为刻板以及兴趣受限等, 此外还包括自残行为、焦虑、强迫、失眠及注意力不集中等非核心症状<sup>[1-3]</sup>。研究显示, ASD 的患病率约为 1%~2%, 且男性患病率高于女性<sup>[2,4]</sup>。近年来, 全球 ASD 的发病率呈上升趋势, 给家庭社会带来巨大的经济负担, 引起了国际社会的关注。

ASD 的发病机制复杂, 涉及环境、遗传、饮食等多种因素<sup>[5-7]</sup>。近年来大量研究发现, ASD 的发生发展与人体胃肠道中的肠道菌群之间有一定关联性<sup>[8]</sup>。本综述主要从肠道菌群失调导致的神经递质、代谢物、免疫系统、HPA 轴和肠道通透性异常等总结 ASD 的机制及相关的研究模型等, 为临床上 ASD 的研究和治疗提供参考。

## 1 肠道菌群

人体胃肠道中含有大量的肠道菌群(主要是细菌), 它们的基因数量远超越人体, 被称为“第二基因组”<sup>[9-10]</sup>。其在门水平上, 主要包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门等, 90% 为厚壁菌门和拟杆菌门, 厚壁菌门/拟杆菌门比值失调是肠道菌群失调的重要标志<sup>[11-12]</sup>。微生物-肠-脑轴 (Gut-brain axis, GBA) 是大脑与肠道之间进行双向交流的通道, 可以通过中枢神经系统 (central nervous system, CNS)、肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 和自主神经系统 (autonomic nervous system, ANS) 等进行信息交流; 自主神经系统的交感神经系统对肠道发挥抑制作用, 过度激活的交感神经系统会破坏肠上皮细胞的完整性以及改变肠道运动和分泌, 同时这种应激变化会导致肠道菌群组成改变; 肠道菌群又可以通过迷走神经向 CNS 传递信号, 进而影响宿主的大脑功能与行为<sup>[13]</sup>。研究提示, 肠道菌群可能是通过“微生物-肠-脑轴”通路来调节大脑的发育, 影响 ASD 的发生发展<sup>[9]</sup>。

通常情况下, 肠道菌群保持动态平衡, 维持人

体健康, 当平衡被打破时可能会影响人的 CNS, 进而影响人的认知、行为与情感<sup>[5]</sup>。研究报道, 将 ASD 患者的肠道菌群移植到野生无菌 (GF) 小鼠体内后, GF 小鼠出现交流减少、重复行为增加等 ASD 的相关症状<sup>[14-15]</sup>。另有研究显示, 与对照组相比, ASD 儿童体内肠道菌群的多样性、稳定性和组成等发生变化: 拟杆菌属、副拟杆菌属、梭菌属、粪杆菌属和梭状芽孢杆菌属丰度上升, 而双歧杆菌属、粪球菌属、*Akkermansia* 丰度下降<sup>[8,16]</sup>。研究显示, ASD 患者体内肠道真菌也有所变化; 与对照组相比, 念珠菌属 (主要是白色念珠菌) 以及酿酒酵母的丰度升高, 导致毒素被释放以及神经炎症产生, 影响 ASD 的发生发展<sup>[17]</sup>。

## 2 研究模型

目前, 研究 ASD 发病机制及干预效果的模型涉及细胞模型、动物模型及 ASD 临床患者。细胞模型常用的细胞有原代人类神经前体细胞 (phNPC)、诱导多能干细胞 (iPSC)、N2a (Neuro-2a) 和 PC12 (Pheochromocytoma-12) 神经细胞体系等<sup>[18-19]</sup>。ASD 研究常用的动物模型见表 1。

## 3 基于肠道菌群探讨 ASD 的发病机制

### 3.1 神经递质异常

神经递质是一种可以通过突触在神经元之间传递信息以控制情绪、运动和记忆等的化学物质, 包括 5-羟色胺 (serotonin, 5-HT)、 $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 和多巴胺 (dopamine, DA) 等<sup>[29]</sup>。肠道菌群的改变可能会导致外周神经递质失调, 引发神经发育障碍<sup>[30]</sup>。

#### 3.1.1 5-HT

5-HT 作为一种可以调节情绪、记忆、行为和胃肠运动的脑神经递质, 可由念珠菌属、链球菌属、埃希氏菌属和肠球菌属产生, 也可由色氨酸脱羧形成<sup>[1]</sup>。研究显示, 血液中 5-HT 水平与 ASD 相关症状呈正相关, ASD 患者体内色氨酸水平降低, 5-HT 水平增加; 使用益生菌干预后, 5-HT 水平降低, 患者的 ASD 症状得到改善<sup>[30]</sup>。

表 1 ASD 研究常用的动物模型  
Table 1 Commonly used animal models for ASD studies

动物模型 Animal models	肠道菌群变化 Changes in gut microbiota
BTBR 遗传模型 <sup>[20-21]</sup> BTBR genetic model	拟杆菌门、副拟杆菌门增多;罗伊氏乳杆菌、梭状芽孢杆菌减少 <i>Bacteroidetes</i> and <i>Parasoidetes</i> were increased; <i>Lactobacillus reuteri</i> and <i>Clostridium</i> were decreased
遗传模型 Genetic models	罗伊氏乳杆菌减少 <i>Lactobacillus reuteri</i> was reduced
Shank3 KO 模型 <sup>[21-23]</sup> Shank3 KO model	
Chd8 <sup>+/-</sup> 模型 <sup>[24]</sup> Chd8 <sup>+/-</sup> model	<i>Bacteroides uniformis</i> , <i>Bacteroides acidifaciens</i> 和 <i>Bacteroides vulgatus</i> 的丰度降低 Abundance of <i>Bacteroides uniformis</i> , <i>Bacteroides acidifaciens</i> and <i>Bacteroides vulgatus</i> was decreased
暴露于对甲酚小鼠模型 <sup>[25]</sup> Exposure to para-cresol mouse model	<i>Duncaniella dubosii</i> , <i>Barnesiella sp.</i> , <i>Turicimonas muris</i> 等丰度增加; <i>Eisenbergiella sp.</i> , <i>Lacrimispora saccharolytica</i> , <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i> 等丰度下降 Abundance of <i>Duncaniella dubosii</i> , <i>Barnesiella sp.</i> , <i>Turicimonas muris</i> was increased. Abundance of <i>Eisenbergiella sp.</i> , <i>Lacrimispora saccharolytica</i> and <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i> was reduced
母体免疫激活小鼠模型 (MIA) <sup>[26]</sup> Maternal immune-activated mouse model	<i>Alistipes</i> 、瘤胃球菌升高;粪球菌属、丹毒菌属和放线菌属降低 <i>Alistipes</i> and <i>Ruminococcus</i> were increased; <i>Coprococcus</i> , <i>Erysipelotrichaies</i> and <i>Actinobacteria</i> were reduced
其他模型 Other models	厚壁菌门/拟杆菌门比例下调,变形杆菌、脱硫弧菌、蓝细菌和糖杆菌增加;梭状芽孢杆菌、 <i>Prevotella_9</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> 下降 Ratio of <i>Firmicutes/Bacteroides</i> was reduced, <i>Proteobacteria</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Cyanobacteria</i> and <i>Saccharibacteria</i> were increased. <i>Clostridium</i> , <i>Prevotella_9</i> and <i>Phascolarctobacterium</i> were decreased
丙戊酸诱导模型 (VPA) <sup>[27]</sup> Valproic acid induction model	
高脂饮食诱导模型 (MHFD) <sup>[28]</sup> High-fat diet induction model	<i>Parabacteroides distasonis</i> 、乳酸杆菌、肝螺杆菌减少 <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Lactobacillus</i> and <i>Helicobacter hepatis</i> were reduced

注: BTBR 模型: 特发性自闭症小鼠模型; Shank3 是一种神经发育障碍相关的基因; Shank3 KO 模型为 Shank3 基因敲除小鼠; Chd8<sup>+/-</sup> 模型: 染色质解旋酶 DNA 结合蛋白 8 (CHD8) 单倍体不足模型。

Note. BTBR model, Mouse model for idiopathic autism. Shank3 is a gene associated to a neurodevelopmental disorder. Shank3 KO model is a Shank3 knockout mouse. Chd8<sup>+/-</sup> model, Chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) haploinsufficient model.

### 3.1.2 GABA

GABA 是一种抑制性神经递质, 可由乳酸杆菌属产生, 当 GABA 能神经传递改变时, 可能会破坏大脑的兴奋/抑制 (E/I) 平衡, 从而改变神经信号和信息处理以及反应行为等<sup>[31]</sup>。研究显示, ASD 个体存在感觉运动区域 GABA 减少, 摄入罗伊氏乳杆菌的 Shank3 KO 小鼠模型 GABA 受体表达增加, 且雌性小鼠的重复行为和雄性小鼠的非社会行为得到改善<sup>[22,31]</sup>。

### 3.1.3 DA

DA 是一种儿茶酚胺类神经递质, 可由芽孢杆菌属和沙雷氏菌属产生, 是注意力、记忆、动机和奖励等认知功能以及运动控制的重要调节剂<sup>[2,31]</sup>。研究发现, 无菌小鼠由于缺乏肠道菌群而导致 DA 能神经的传递改变, 患有 ASD 的个体, 中脑边缘信号通路功能改变, 黑质纹状体通路功能发生障碍, 进而导致动机减少等认知功能缺陷和刻板行为<sup>[32-33]</sup>。

### 3.1.4 其他

研究发现, 氨基酸转运体表达增高, 可以促进

血清和脑内谷氨酰胺水平升高, 改变脑内谷氨酸水平 (兴奋性神经递质) 以及 E/I 平衡, 从而促进 ASD 样行为; 补充单形拟杆菌可以降低氨基酸转运体和血清谷氨酰胺水平, 改善大脑 E/I 平衡, 进而改善小鼠 ASD 症状<sup>[24]</sup>。

### 3.2 肠道菌群代谢物异常

研究证实, 肠道菌群代谢物包括短链脂肪酸 (short chain fatty acids, SCFAs)、酚类化合物以及游离氨基酸等, 其异常会影响神经系统信号的传输, 导致 ASD 发生<sup>[2]</sup>。

#### 3.2.1 丙酸

丙酸 (propionic acid, PPA) 是 SCFAs 的一种, 可以通过血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 调节多种细胞信号传导过程, 其过量会成为一种神经毒素, 导致运动障碍、焦虑、认知缺陷和胃肠道问题等<sup>[34]</sup>。Abdelli 等<sup>[34]</sup>通过研究发现, ASD 患者的粪便中具有高水平的 PPA, 且当母体暴露于 PPA 时有利于人类神经干细胞 (hNSC) 增殖和存活, 促进神经胶质细胞分化, 从而导致神经结构紊乱和炎症特性增加,

进而导致 ASD 的发生。

### 3.2.2 对甲酚

对甲酚(p-cresol)是肠道菌群对酪氨酸的降解产物,对甲酚可抑制 N2a 和 PC12 神经元细胞系中的神经分化和神经突生长,改变神经元的树突发育、突触发生和突触功能,进而影响神经发育<sup>[19]</sup>。研究发现,在 ASD 小鼠模型的尿液及粪便中存在高水平的对甲酚;暴露于对甲酚的小鼠模型表现出社会行为缺陷、刻板、顽固等类似 ASD 的行为,且小鼠腹侧被盖区中 DA 神经元兴奋性降低;提示肠道菌群代谢物对甲酚可能会通过减少中枢 DA 神经元活动来引发 ASD<sup>[25]</sup>。

### 3.2.3 4-乙基苯酚硫酸盐

此外,4-乙基苯酚硫酸盐(4-ethylphenol sulfate, 4EPS)除了来源于食物,也可以是卵形芽孢杆菌对酪氨酸降解之后再经硫酸化后的产物。其可以进入大脑,通过影响大脑中少突胶质细胞功能和神经元髓鞘模式,促进小鼠焦虑行为,当给 ASD 患者服用 AB-2004(芳香族和酚类小分子的吸附剂)后,焦虑、易怒等 ASD 症状得到改善<sup>[35-36]</sup>。

## 3.3 免疫系统异常

免疫系统在微生物-肠-脑轴的双向连接中起着重要作用,使大脑和肠道能够相互影响,肠道微生物是维持免疫稳态的关键,肠黏膜表面不断暴露于病原微生物后,可以引发免疫反应<sup>[2]</sup>。肠道相关淋巴组织(GALT)可以利用淋巴细胞产生免疫球蛋白(IgA),当微生物细胞与 ENS 中的树突状细胞接触时,IgA 可调节先天免疫反应;而在 ASD 患者体内发现高水平的 IgA,提示 ASD 患者免疫系统异常<sup>[37]</sup>。另有研究发现,ASD 患者的炎症和免疫功能障碍之间存在相关性,ASD 个体中炎症因子 IL-1 $\beta$ (白介素-1 $\beta$ )、IL-6(白介素-6)、IL-12(白介素-12)、IFN- $\gamma$ (干扰素- $\gamma$ )和 TNF- $\alpha$ (肿瘤坏死因子- $\alpha$ )等水平升高,其可以穿过 BBB 到达大脑或刺激脑内皮细胞,诱导局部免疫反应<sup>[38]</sup>。此外,据研究报道,ASD 患者大脑中还涉及一种激活小胶质细胞的免疫反应,小胶质细胞在 CNS 中起到主动免疫防御作用,但小胶质细胞的异常激活会导致脑功能损伤<sup>[39]</sup>。研究显示,GF 小鼠在不同脑区的小胶质细胞密度更高,具有一定缺陷,且 GF 小鼠具有非典型的社交回避行为和对病毒感染的低免疫反应,补充 SCFA 后,小鼠的小胶质细胞缺陷与 ASD 相关症状得到改善<sup>[40]</sup>。

## 3.4 HPA 轴异常

下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA 轴)是一个中枢的压力系统,能够调控激素对机体内外部产生的反应。当机体受到压力刺激时,会触发下丘脑-垂体-肾上腺的级联反应,促使肾上腺分泌激素,如皮质醇<sup>[41]</sup>。Huo 等<sup>[42]</sup>的研究显示,GF 小鼠皮质醇等激素水平增高,HPA 轴活动更为活跃,GF 小鼠患有焦虑和认知功能障碍等症状,提示肠道菌群可能对 HPA 轴有影响。研究发现,肠道菌群可以通过调节 HPA 轴活动来介导中枢炎症反应,从而影响 ASD 的发展,通过补充长双歧杆菌菌株 CCFM687 可减轻 HPA 轴的过度反应,逆转外周炎症,从而改善 ASD 相关病理状态<sup>[43-44]</sup>。

## 3.5 肠道通透性异常

肠道菌群在肠上皮细胞定植后,会在肠黏膜表面形成一层抵御致病菌入侵下层组织的化学屏障,被称为肠黏膜屏障;肠道菌群失调会影响肠黏膜紧密连接蛋白(Occludin 和 Zonulin)的表达,使肠黏膜屏障的完整性受到损害<sup>[45]</sup>。研究发现,雄性 BTBR 小鼠 Occludin 和 Zonulin 表达的改变,使肠道通透性异常,进而导致血液中脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平增加<sup>[38]</sup>。LPS 通过脂蛋白转运机制进入大脑,随后激活核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路,进而激活小胶质细胞,诱导神经炎症和认知障碍<sup>[46]</sup>。此外,肠道通透性异常会促进免疫细胞因子(如 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4)的产生,细胞因子穿过 BBB,诱发全身及 CNS 炎症反应<sup>[2]</sup>。研究显示,给怀孕大鼠注射 LPS 后,后代出现 ASD 样行为,且经 LPS 处理的小鼠细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等)水平增加,NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白(TLR-4 和 I $\kappa$ B $\alpha$ )的表达增加,小鼠产生神经炎症及认知障碍<sup>[2,46]</sup>。

## 4 基于肠道菌群干预 ASD

### 4.1 益生菌、益生元

近年大量研究表明,益生菌是一种活的微生物,能通过增加黏蛋白表达、刺激黏膜免疫和减少细菌过度生长来调节肠道菌群平衡,同时改变神经递质传递,恢复 E/I 平衡和肠屏障功能,减少炎症,从而改善 ASD 相关症状<sup>[47-49]</sup>。Wang 等<sup>[30]</sup>的研究显示,补充益生菌+低聚果糖一段时间后,ASD 儿童双歧杆菌增加,SCFAs 水平改善,5-HT 水平降低,肠黏膜紧密连接蛋白的表达改变,ASD 儿童的言语交流、社交等行为改善,同时胃肠道严重程度也降低。

益生元是一种寡糖,是益生菌的补充替代品,可以刺激体内双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌的增加<sup>[49]</sup>。研究发现,使用益生元低聚半乳糖(B-GOS)之后,乳酸杆菌和双歧杆菌等有益菌的丰度上升,且皮质醇分泌下降,促炎因子减少,进而 ASD 儿童的炎症、焦虑减轻,行为改善<sup>[21,50]</sup>。

#### 4.2 粪菌移植及微生物转移疗法

研究显示,将健康供体粪便中的肠道菌群移植到 ASD 患者中,可使 ASD 患者的肠道菌群多样性、位置以及功能等恢复,达到一定的治疗 ASD 的目的<sup>[51]</sup>。粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)治疗后,ASD 患者体内肠道菌群趋于正常化,且 ASD 儿童体内的 5-HT、DA 和 GABA 水平改变,ASD 患者的胃肠道问题及社交缺陷、焦虑等症状均得到改善<sup>[51]</sup>。Abujamel 等<sup>[52]</sup>的研究发现,FMT 治疗后,双歧杆菌等有益菌丰度增加,高水平 PPA 诱导的肠道菌群失调得到改善,ASD 的相关症状减轻。

此外,研究发现,微生物转移疗法(microbiological transfer therapy, MTT)(2 周抗生素治疗后,24 h 禁食以清洁肠道,随后使用高初始剂量 FMT,最后每日口服持续低剂量的胃酸抑制剂,持续 7~8 周)也可以改变肠道微生物组,使肠道菌群的丰度和多样性提高,对甲酚硫酸盐水平降低,进而减轻 ASD 患者相关症状<sup>[53-54]</sup>。

#### 4.3 中医药

ASD 在中医理论中,属于“童昏”“语迟”“胎弱”等范畴<sup>[45]</sup>。研究提示,经中药补阳还五汤治疗,ASD 患儿相关症状有所改善;且 16S rDNA 基因测序发现,中药治疗组患者肠道菌群丰度趋于正常化,这提示补阳还五汤治疗 ASD 可能与调节肠道菌群有关<sup>[55]</sup>。研究发现,针灸治疗可以调节肠道菌群平衡,减少炎症因子含量,改善机体免疫功能,调节内分泌,同时使 ASD 患儿的理解、感知、语言和行为等症状得到改善<sup>[56-57]</sup>。

### 5 结语

ASD 作为一种发病率持续上升的神经发育障碍性疾病,给家庭及社会带来了沉重负担。大量研究表明,ASD 的发生发展可能与肠道菌群紊乱密切相关。其机制可能涉及神经递质、代谢物、免疫系统、HPA 轴和肠道通透性异常等。

研究发现,除了环境、遗传、饮食、肠道菌群会

导致 ASD 外,ASD 可能还与父母有一定关联,如父母患炎症性肠病(IBD)可能会使围产期免疫失调、微量营养素吸收不良以及贫血,进而导致婴儿 ASD<sup>[58]</sup>。

目前 ASD 筛查和诊断主要以儿童行为特征和发育史为基础,基于肠道菌群与 ASD 的关系,研究发现,肠漏相关的生物标志物(SCFAs、LPS、 $\beta$ -甲酚和细菌毒素等)以及免疫、神经递质等的相关标志物异常可以作为早期诊断 ASD 的工具,为 ASD 的诊治提供新的方向<sup>[37,59]</sup>。

现阶段,针对 ASD 的治疗主要集中在教育训练方面,以药物为辅,教育训练需科学性、系统性、个体化、社区化、长期高强度地进行,目前临床上也缺乏行之有效的治疗 ASD 的药物<sup>[3]</sup>。随着对肠道菌群与 ASD 关联性的深入研究,研究发现可以通过调节肠道菌群来干预 ASD。益生菌、益生元、FMT 和 MTT 等方法可以通过调节肠道菌群来干预 ASD。中医药可以通过调节肠道菌群起到一定的干预 ASD 的作用。

但目前,基于肠道菌群来干预 ASD 的具体机制还有待深入研究,如研究发现中医药可以干预 ASD,但是具体机制尚未明确。未来可考虑将高通量测序、宏基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白质组学、网络药理学等方法结合应用于肠道菌群与 ASD 的相关研究中,为深入研究 ASD 的病理机制及治疗提供新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Liu J, Gao Z, Liu C, et al. Alteration of gut microbiota: new strategy for treating autism spectrum disorder [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 792490.
- [2] Alharthi A, Alhazmi S, Alburae N, et al. The human gut microbiome as a potential factor in autism spectrum disorder [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1363.
- [3] 闫海虹,张喜莲,戎萍,等. 中西医结合治疗儿童孤独症谱系障碍的临床研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 933-938.
- [4] Hu T, Dong Y, He C, et al. The gut microbiota and oxidative stress in autism spectrum disorders (ASD) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8396708.
- [5] Li G, Song B, Wang C, et al. Diet, microbe, and autism: cause or consequence? [J]. *Cell Host Microbe*, 2022, 30(1): 5-7.
- [6] Yousefi B, Kokhaei P, Mehranfar F, et al. The role of the host microbiome in autism and neurodegenerative disorders and effect of epigenetic procedures in the brain functions [J]. *Neurosci*

- Biobehav Rev, 2022, 132: 998–1009.
- [ 7 ] Roe K. Autism spectrum disorder initiation by inflammation-facilitated neurotoxin transport [J]. Neurochem Res, 2022, 47 (5): 1150–1165.
- [ 8 ] Iglesias-Vázquez L, van Ginkel Riba G, Arija V, et al. Composition of gut microbiota in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 792.
- [ 9 ] 王芳, 杨广学, 郭德华. 自闭症谱系障碍成因的菌肠脑轴模型研究新进展 [J]. 中国康复医学杂志, 2018, 33(5): 598–603.
- [ 10 ] Turner PV. The role of the gut microbiota on animal model reproducibility [J]. Animal Model Exp Med, 2018, 1(2): 109–115.
- [ 11 ] Zhang Y, Si X, Yang L, et al. Association between intestinal microbiota and inflammatory bowel disease [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(4): 311–322.
- [ 12 ] 厉颖, 李灿委, 范孟然, 等. 微生物-肠-脑轴与酒精诱导脑损伤的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 124–129.
- [ 13 ] 邹荣, 郑华军. 肠道菌群与儿童自闭症谱系障碍关系的研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2020, 19(3): 320–324.
- [ 14 ] Sharon G, Cruz NJ, Kang DW, et al. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice [J]. Cell, 2019, 177(6): 1600–1618.
- [ 15 ] Andreo-Martínez P, Rubio-Aparicio M, Sánchez-Meca J, et al. A meta-analysis of gut microbiota in children with autism [J]. J Autism Dev Disord, 2022, 52(3): 1374–1387.
- [ 16 ] Xu M, Xu X, Li J, et al. Association between gut microbiota and autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Psychiatry, 2019, 10: 473.
- [ 17 ] Settanni CR, Bibbò S, Ianiro G, et al. Gastrointestinal involvement of autism spectrum disorder: focus on gut microbiota [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(6): 599–622.
- [ 18 ] Gordon A, Geschwind DH. Human *in vitro* models for understanding mechanisms of autism spectrum disorder [J]. Mol Autism, 2020, 11(1): 26.
- [ 19 ] Guzmán-Salas S, Weber A, Malci A, et al. The metabolite p-cresol impairs dendritic development, synaptogenesis, and synapse function in hippocampal neurons: implications for autism spectrum disorder [J]. J Neurochem, 2022, 161(4): 335–349.
- [ 20 ] Coretti L, Cristiano C, Florio E, et al. Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder [J]. Sci Rep, 2017, 7: 45356.
- [ 21 ] Cryan JF, O’ Riordan KJ, Cowan CSM, et al. The microbiota-gut-brain axis [J]. Physiol Rev, 2019, 99(4): 1877–2013.
- [ 22 ] Tabouy L, Getselter D, Ziv O, et al. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders [J]. Brain Behav Immun, 2018, 73: 310–319.
- [ 23 ] 罗卓慧, 庞硕, 张连峰. 常见精神疾病的大、小鼠遗传模型研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 119–126.
- [ 24 ] Yu Y, Zhang B, Ji P, et al. Changes to gut amino acid transporters and microbiome associated with increased E/I ratio in Chd8<sup>+/-</sup> mouse model of ASD-like behavior [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1151.
- [ 25 ] Bermudez-Martin P, Becker JAJ, Caramello N, et al. The microbial metabolite p-Cresol induces autistic-like behaviors in mice by remodeling the gut microbiota [J]. Microbiome, 2021, 9(1): 157.
- [ 26 ] Lee GA, Lin YK, Lai JH, et al. Maternal immune activation causes social behavior deficits and hypomyelination in male rat offspring with an autism-like microbiota profile [J]. Brain Sci, 2021, 11(8): 1085.
- [ 27 ] Gu Y, Han Y, Ren S, et al. Correlation among gut microbiota, fecal metabolites and autism-like behavior in an adolescent valproic acid-induced rat autism model [J]. Behav Brain Res, 2022, 417: 113580.
- [ 28 ] Needham BD, Tang W, Wu WL. Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder [J]. Dev Neurobiol, 2018, 78(5): 474–499.
- [ 29 ] Chen Y, Xu J, Chen Y. Regulation of neurotransmitters by the gut microbiota and effects on cognition in neurological disorders [J]. Nutrients, 2021, 13(6): 2099.
- [ 30 ] Wang Y, Li N, Yang JJ, et al. Probiotics and fructo-oligosaccharide intervention modulate the microbiota-gut brain axis to improve autism spectrum reducing also the hyper-serotonergic state and the dopamine metabolism disorder [J]. Pharmacol Res, 2020, 157: 104784.
- [ 31 ] Umesawa Y, Atsumi T, Chakrabarty M, et al. GABA concentration in the left ventral premotor cortex associates with sensory hyper-responsiveness in autism spectrum disorders without intellectual disability [J]. Front Neurosci, 2020, 14: 482.
- [ 32 ] González-Arancibia C, Urrutia-Piñones J, Illanes-González J, et al. Do your gut microbes affect your brain dopamine? [J]. Psychopharmacology (Berl), 2019, 236(5): 1611–1622.
- [ 33 ] Mandic-Maravic V, Grujicic R, Milutinovic L, et al. Dopamine in autism spectrum disorders-focus on D2/D3 partial agonists and their possible use in treatment [J]. Front Psychiatry, 2021, 12: 787097.
- [ 34 ] Abdelli LS, Samsam A, Naser SA. Propionic acid induces gliosis and neuro-inflammation through modulation of PTEN/AKT pathway in autism spectrum disorder [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 8824.
- [ 35 ] Needham BD, Funabashi M, Adame MD, et al. A gut-derived metabolite alters brain activity and anxiety behaviour in mice [J]. Nature, 2022, 602(7898): 647–653.
- [ 36 ] Stewart Campbell A, Needham BD, Meyer CR, et al. Safety and target engagement of an oral small-molecule sequestrant in adolescents with autism spectrum disorder: an open-label phase 1b/2a trial [J]. Nat Med, 2022, 28(3): 528–534.

- [37] Garcia-Gutierrez E, Narbad A, Rodríguez JM. Autism spectrum disorder associated with gut microbiota at immune, metabolomic, and neuroactive level [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 578666.
- [38] Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(2): 145-155.
- [39] Robinson-Agramonte MLA, Noris García E, Fraga Guerra J, et al. Immune dysregulation in autism spectrum disorder: what do we know about it? [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3033.
- [40] Emy D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(7): 965-977.
- [41] Scriven M, Dinan TG, Cryan JF, et al. Neuropsychiatric disorders: influence of gut microbe to brain signalling [J]. *Diseases*, 2018, 6(3): 78.
- [42] Huo R, Zeng B, Zeng L, et al. Microbiota modulate anxiety-like behavior and endocrine abnormalities in hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 489.
- [43] 杨震, 徐珊, 李爱武, 等. 基于“火生土, 土伏火”理论探讨肠道菌群与自闭症谱系障碍的关系 [J]. *中医杂志*, 2022, 63(6): 534-538.
- [44] Tian P, Zou R, Song L, et al. Ingestion of *Bifidobacterium longum* subspecies infantis strain CCFM687 regulated emotional behavior and the central BDNF pathway in chronic stress-induced depressive mice through reshaping the gut microbiota [J]. *Food Funct*, 2019, 10(11): 7588-7598.
- [45] 陶柱萍, 龙宇, 李灿委, 等. 肠道菌群在中草药抗溃疡性结肠炎中的作用 [J]. *药学学报*, 2021, 56(2): 391-402.
- [46] Zhao J, Bi W, Xiao S, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5790.
- [47] Sorboni SG, Moghaddam HS, Jafarzadeh-Esfehani R, et al. A comprehensive review on the role of the gut microbiome in human neurological disorders [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2022, 35(1): e0033820.
- [48] Shaaban SY, El Gendy YG, Mehanna NS, et al. The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: a prospective, open-label study [J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 21(9): 676-681.
- [49] El-Ansary A, Bacha AB, Bjørklund G, et al. Probiotic treatment reduces the autistic-like excitation/inhibition imbalance in juvenile hamsters induced by orally administered propionic acid and clindamycin [J]. *Metab Brain Dis*, 2018, 33(4): 1155-1164.
- [50] Grimaldi R, Cela D, Swann JR, et al. *In vitro* fermentation of B-GOS: impact on faecal bacterial populations and metabolic activity in autistic and non-autistic children [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2017, 93(2): fiw233.
- [51] Li N, Chen H, Cheng Y, et al. Fecal microbiota transplantation relieves gastrointestinal and autism symptoms by improving the gut microbiota in an open-label study [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 759435.
- [52] Abujamel TS, Al-Otaibi NM, Abuaiash S, et al. Different alterations in gut microbiota between *Bifidobacterium longum* and fecal microbiota transplantation treatments in propionic acid rat model of autism [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 608.
- [53] Kang DW, Adams JB, Gregory AC, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 10.
- [54] Kang DW, Adams JB, Vargason T, et al. Distinct fecal and plasma metabolites in children with autism spectrum disorders and their modulation after microbiota transfer therapy [J]. *mSphere*, 2020, 5(5): e00314-e00320.
- [55] Zhang Y, Hu N, Cai Q, et al. Treatment with the traditional Chinese medicine *BuYang HuanWu Tang* induces alterations that normalize the microbiome in ASD patients [J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2020, 39(3): 109-116.
- [56] 叶慧伶, 张学君. 基于肠道菌群作用探讨针灸治疗儿童自闭症的机制 [J]. *贵州中医药大学学报*, 2021, 43(6): 1-6.
- [57] 司原成, 苗维纳, 何嘉悦, 等. 基于“脑-肠-菌”轴探讨健脾益气针法对肥胖鼠肠道菌群及 TLR4 的调控机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10): 4457-4460.
- [58] Sadik A, Dardani C, Pagoni P, et al. Parental inflammatory bowel disease and autism in children [J]. *Nat Med*, 2022, 28(7): 1406-1411.
- [59] Al-Ayadhi L, Zayed N, Bhat RS, et al. The use of biomarkers associated with leaky gut as a diagnostic tool for early intervention in autism spectrum disorder: a systematic review [J]. *Gut Pathog*, 2021, 13(1): 54.

[收稿日期]2022-08-19

王泽坤,徐欣,周学东,等. 肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 102-107.

Wang ZK, Xu X, Zhou XD, et al. Role and mechanisms of intestinal microbial metabolites in cardiovascular disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 102-107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.014

# 肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用及机制研究

王泽坤<sup>1</sup>, 徐欣<sup>1</sup>, 周学东<sup>1\*</sup>, 荣书玲<sup>2</sup>

(1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床研究中心, 四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科, 成都 610041;  
2. 山西医科大学第二医院心血管内科, 太原 030001)

**【摘要】** 心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是严重危害人类健康的重大疾病。最新研究发现肠道菌群通过多种机制参与了 CVD 的发生和发展, 其引起的代谢产物紊乱是主要的作用机制。本文着重介绍肠道菌群代谢产物在 CVD 发生中的作用及机制, 以期更好地了解肠道菌群与 CVD 间的关联性, 为 CVD 微生物标志物的发现及临床上 CVD 的精准干预治疗起到积极的推动作用。

**【关键词】** 肠道菌群; 代谢产物; 心血管疾病; 分子机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0102-06

## Role and mechanisms of intestinal microbial metabolites in cardiovascular disease

WANG Zekun<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1</sup>, ZHOU Xuedong<sup>1\*</sup>, RONG Shuling<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Cariology and Endodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China. 2. Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

**【Abstract】** Cardiovascular disease (CVD) is hazardous to human health. Recent studies have found that gut microbiota participates in the occurrence and development of CVD through various mechanisms, among which the metabolite disorder is the main mechanism. To better understand the relationship between gut microbiota and CVD, this article focuses on the role and mechanism of metabolites from gut microbiota in the occurrence of CVD, which will play a positive role in the discovery of microbial markers and therapies of CVD.

**【Keywords】** gut microbiota; metabolites; cardiovascular disease; molecular mechanisms

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

肠道菌群是指寄居在动物肠道内的大量的微生物, 这些微生物不仅可以通过消化摄入的食物向宿主提供营养和能量, 还可以代谢产生具有生物活性的信号分子维持机体健康。当肠道菌群代谢紊

乱时也可引发疾病<sup>[1]</sup>。其中, 肠道菌群在心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 中的作用近年受到广泛关注。研究显示, 肠道菌群一方面通过代谢作用降解宿主饮食中的膳食纤维, 产生短链脂肪酸维

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (81870754)。

**【作者简介】** 王泽坤 (1995—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 口腔感染性疾病的研究。E-mail: 2933298299@qq.com

**【通信作者】** 周学东 (1957—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 口腔感染性疾病、口腔微生物微生态的研究等。

E-mail: zhouxid@scu.edu.cn

持肠道屏障的稳态,抑制机体对胆固醇的吸收,降低动脉粥样硬化的发生,阻止心血管疾病的发展;另一方面,一些肠道微生物的代谢产物,如氧化三甲胺、芳香族氨基酸、胆汁酸、对甲酚硫酸盐、吡喹基硫酸盐等则会加剧心血管疾病的发生发展。

## 1 肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用

### 1.1 氧化三甲胺

氧化三甲胺(trimethylamine-N-oxide, TMAO)是一种具有生物活性的血浆代谢物,主要在宿主肝中由三甲胺(trimethylamine, TMA)转化生成。食物中的磷脂酰胆碱、胆碱和肉碱经过肠道菌群酶系统(胆碱-TMA裂解酶和肉碱 Rieske 型加氧酶/还原酶)作用后转化为三甲胺,约 95%的三甲胺以被动运输的方式通过肠上皮细胞后进入门脉循环最终到达宿主肝,在含黄素单加氧酶 3(flavin monooxygenases, FMO3)的作用下氧化生成 TMAO<sup>[2]</sup>。TMAO 可以通过影响宿主糖脂代谢、血小板功能和机体免疫加剧 CVD 的发展。多项临床研究证实,TMAO 与动脉粥样硬化的发展、血栓形成、心律失常、血管内皮细胞激活、心肌重构和心力衰竭等都具有相关性<sup>[3-7]</sup>。对 4000 多名受试者进行的大规模临床研究的结果证实 TMAO 水平升高是血栓事件(心肌梗死或脑卒中)发生的独立危险因素,通过靶向抑制微生物引起的 TMA/TMAO 增加,可以降低饮食不当引起的动脉粥样硬化<sup>[4]</sup>。研究发现,与 TMAO 代谢相关的肠道菌群主要有梭状芽胞杆菌、埃希氏菌、肠杆菌、不动杆菌、变形杆菌和乳酸杆菌<sup>[8]</sup>。饮食习惯会影响肠道菌群类型,素食和杂食饮食的微生物群和 TMAO 水平存在差异,素食者产生三甲胺的能力较低<sup>[9]</sup>。因此,研究肠道微生物有可能更好地解释饮食和代谢之间的关系,有利于在临床治疗中制定基于个体化的饮食治疗方案,通过调节肠道微生物结构和功能,影响 TMAO 的代谢,减少 CVD 的发生。

### 1.2 短链脂肪酸

短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)是肠道菌群作用于蔗糖、乳糖和淀粉等碳水化合物后的代谢产物,包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸和己酸,其中乙酸在结肠中含量最丰富<sup>[2,10-11]</sup>。SCFAs 具有一定的生理活性,可以作为肠黏膜上皮细胞主要的能量来源,也可作为信号分子参与门脉循环调节宿主的新陈代谢和免疫反应,SCFAs 可以通过激活 G 蛋白

偶联受体 Gpr41 和 GPR43 来调节免疫细胞因子的释放和血管细胞黏附分子的表达,从而影响宿主的炎症反应和糖脂代谢水平<sup>[10,12]</sup>。

SCFAs 可以抑制由胰岛素介导的脂肪沉积,在饮食摄入量和运动量不变的情况下,服用 SCFAs 可降低高脂饮食喂养的小鼠体重并增加其胰岛素敏感性<sup>[13]</sup>。目前研究发现参与乙酸合成的菌属有:瘤胃球菌、普雷沃氏菌、双歧杆菌、拟杆菌、嗜黏蛋白阿克曼菌、氢养布劳特氏菌、梭状芽胞杆菌和链球菌等;参与丙酸合成的菌属有:拟杆菌、考拉杆菌、小杆菌、韦荣氏球菌、埃氏巨型球菌、灵巧粪球菌、沙门氏菌、卵瘤胃球菌等;参与丁酸合成的菌属有:灵巧粪球菌、规则粪球菌、直肠真杆菌、霍氏真杆菌、普拉梭菌、罗氏菌、毛螺菌、瘤胃球菌、氨基酸球菌等<sup>[10]</sup>。这些研究结果提示,SCFAs 作为一种信号分子,是人体健康状态下肠道菌群的发酵产物,在免疫功能、新陈代谢和肠道黏膜屏障的维持中发挥着重要作用,肠道菌群失衡会通过影响 SCFAs 的代谢,导致 CVD 的发生发展。

### 1.3 氨基酸

机体内氨基酸(amino acid)代谢在一定程度上依赖于肠道菌群,亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸等支链氨基酸是肠道菌群分解代谢的必需氨基酸。研究表明,支链氨基酸代谢异常与 CVD 发生、发展有密切联系<sup>[14]</sup>。支链氨基酸,特别是亮氨酸可以调节重要的细胞过程,如蛋白质的合成速率<sup>[15]</sup>、葡萄糖和脂质的代谢<sup>[16]</sup>。支链氨基酸代谢产物增加可激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) mTOR 信号通路,导致线粒体功能障碍,诱发压力超负荷心肌病<sup>[17]</sup>。近期有研究显示,支链氨基酸是高血压的高危因素,增加支链氨基酸的摄入量会导致高血压的发生风险增加<sup>[18]</sup>。支链氨基酸增高促进高血压的发生,可能也是依赖 mTOR 信号通路激活,并与胰岛素抵抗和糖尿病相关<sup>[19]</sup>。Pedersen 等<sup>[20]</sup>对 75 名糖尿病患者和 291 名非糖尿病患者进行血清代谢组学和肠道微生物组学联合分析,发现普雷沃氏菌和普通拟杆菌可通过增加血清中支链氨基酸的含量来引起机体胰岛素抵抗。缬氨酸的中间代谢产物 3-羟基丁酸可参与调节脂肪酸的转运,促进肌肉对脂肪酸的摄取导致肌肉中脂质过度积累,引起胰岛素抵抗<sup>[21]</sup>,胰岛素抵抗是 CVD 发生的重要危险因素,支链氨基酸水平升高与 CVD 的发病率密切相关,这种相关性更多

的表现胰岛素抵抗方面,因此支链氨基酸代谢异常可能是糖尿病和 CVD 的共同危险因素<sup>[22]</sup>。

一些芳香族氨基酸如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸等的代谢产物也会影响 CVD 的发展。酪氨酸和苯丙氨酸在肠道菌群的作用下代谢产生苯乙酸和对甲酚,对甲酚在肠道细胞中代谢生成对甲酚硫酸盐,高浓度的对甲酚硫酸盐不仅可以通过氧化应激途径对血管内皮细胞和平滑肌细胞造成损伤,它还可以作为尿毒症毒素来增加慢性肾脏病患者 CVD 的发生风险<sup>[2,23]</sup>。色氨酸可在拟杆菌属、双歧杆菌属和消化链球菌属等的作用下转化为吲哚和吲哚衍生物,3-吲哚丙酸、3-吲哚乙醇、吲哚-3-丙烯酸等物质具有抗炎活性,可对 CVD 的发生起保护作用,但吲哚在肝中代谢产生的吲哚酚硫酸盐是一种肾脏毒素,可加剧慢性肾脏病的发展<sup>[24]</sup>。丙酸咪唑是新发现的肠道菌群与组氨酸的代谢产物,研究发现前驱糖尿病和 2 型糖尿病患者血清丙酸咪唑显著上升,并发 CVD 的丙酸咪唑更高,该物质可通过 MAPK 通路破坏机体葡萄糖代谢<sup>[25]</sup>。

#### 1.4 胆汁酸

胆汁酸(bile acid)是肠道微生物的主要代谢产物之一,胆汁酸参与消化过程,是多种疾病致病过程的病原或介质。胆汁酸由肝内的胆固醇合成,胆固醇首先在肝组织中代谢生成胆酸、鹅脱氧胆酸等初级胆汁酸后随胆汁进入肠道,十二指肠部位的胆汁酸主要负责调节糖脂代谢、消化膳食中的油脂及促进脂溶性维生素的吸收,回肠段的胆汁酸通过肝肠循环经门静脉又返回肝中,回肠远端的初级胆汁酸与牛磺酸和甘氨酸结合形成胆盐,在双歧杆菌、消化球菌、梭状芽胞杆菌等菌群和胆盐水解酶的共同作用下生成石胆酸和脱氧胆酸等次级胆汁酸<sup>[10-11,26]</sup>。微生物群衍生的石胆酸和脱氧胆酸可通过激活类法尼醇 X 受体(FXR)来抑制胆固醇 7 $\alpha$ 羟化酶(Cyp7a1)的表达,进而造成机体胆固醇水平升高最终导致动脉粥样硬化斑块的形成<sup>[27]</sup>。此外,研究还发现次级胆汁酸水平与心力衰竭、心律失常、高胆固醇血症、冠心病以及各种代谢性疾病密切相关<sup>[28]</sup>。胆汁酸通过靶向肠道微生物调节胆汁酸代谢可预防 CVD。

#### 1.5 其他代谢产物

植物雌激素(phytoestrogen)与人类雌激素(estrogen)结构相似,在 CVD 发展过程中植物雌激素是一把双刃剑,其既可以促进血管扩张和一氧化

氮代谢也可以促使血栓形成,植物激素在肠道菌群的作用下可代谢生成肠内酯(enterolactone),肠内酯是一种双酚类的抗氧化剂,可以缓解脂多糖代谢对机体的影响<sup>[11]</sup>。花青素(anthocyanin)是一种存在于植物液泡中的水溶性天然色素,对肥胖、糖尿病和 CVD 具有有益作用。从饮食中摄入的花青素大部分进入机体结肠部位,在肠道菌群的作用下降解生成原儿茶酸(protocatechuic acid,PCA),花青素-3-葡萄糖苷通过其肠道微生物群代谢产物 PCA 促进胆固醇逆向转运<sup>[11]</sup>。花青素在肠道菌群作用下的另一种代谢产物没食子酸可通过促进内皮型一氧化氮合酶磷酸化来增加机体一氧化氮(NO)水平<sup>[11]</sup>。胆固醇在肠道真细菌属的作用下可被还原成粪甾醇,随粪便排出体外,动物模型研究显示,口服产粪甾醇真细菌可显著降低饮食诱导的高胆固醇血症的血浆胆固醇浓度<sup>[29]</sup>。苯甲酸(benzoic acid)是一种芳香族羧酸,由结肠段微生物菌群作用于饮食中的芳香族化合物后生成,其在肝中与甘氨酸结合后生成马尿酸(hippurate),随尿液排出体外,研究显示马尿酸水平与机体高血压呈负相关<sup>[30-31]</sup>。失衡的肠道菌群导致肠道屏障受损,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)等内毒素进入血液后,主要通过 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4,TLR4)作用后激活 NF- $\kappa$ B 通路来释放促炎细胞因子,其除了具有诱导全身炎症的作用外还可通过增加机体低密度脂蛋白水平促进泡沫细胞的形成和胆固醇的沉积,进而促进动脉粥样硬化的发生<sup>[11]</sup>。

## 2 肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用机制

### 2.1 高血压

高血压(hypertension)是指以体循环动脉血压(收缩压和/或舒张压)增高为主要特征(收缩压 $\geq$ 140 mmHg,舒张压 $\geq$ 90 mmHg),可伴有心、脑、肾等器官的功能或器质性损害的临床综合征。高血压是最常见的慢性病,也是心脑血管病最主要的危险因素。血管炎症和内皮功能障碍是高血压发生的关键因素。TMAO 对血压无直接影响,但其可以增强血管紧张素的血流动力学效应,与无菌小鼠相比,经血管紧张素转换酶处理的正常鼠的 IL-4 和 IL-10 水平较高,表明肠道菌群失调易引起血管炎症,而鼠李糖乳杆菌可通过降低 TMAO 水平,有效缓解高血压<sup>[32]</sup>。SCFAs 可通过结合位于肾、心脏、交感神经节和血管中的 Gpr41、Gpr43 和 olf079 嗅觉

受体来调节机体血压水平<sup>[33]</sup>。Natarajan 等<sup>[34]</sup>发现与野生型小鼠相比, Gpr41 基因敲除小鼠会出现单纯性收缩期高血压, 而舒张压没有明显差异, 表明 Gpr41 受体是通过降低血管张力来降低血压基线值的。Olf78 是在血管平滑肌细胞中表达的 G 蛋白耦联受体家族成员, Olf78 缺陷的小鼠表现出高血压症状, 在 Olf78 敲除小鼠中静脉注射丙酸可以通过调节肾素分泌和血管张力来调节血压水平<sup>[11]</sup>。高盐可通过诱导辅助性 T 细胞 17(Th17) 来影响机体自身免疫, 引起机体高血压, 高盐饮食小鼠模型口服鼠乳杆菌后体内吲哚乳酸水平增加, 抑制 Th17 细胞活化, 盐敏感性高血压得到改善<sup>[35]</sup>。研究证实, 高血压患者中普雷沃氏菌、普拉梭菌、克雷伯氏菌、梭状芽孢杆菌、链球菌等菌群含量比较丰富, 而普拉梭菌、颤螺菌、罗氏菌、双歧杆菌、粪球菌、丁酸弧菌等菌群的丰富度比较低<sup>[36]</sup>。因此, 通过干预或调整这些菌群有可能成为治疗高血压的有效策略。

## 2.2 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠心病、脑梗死和外周血管病的主要原因。TMAO 与动脉粥样硬化密切相关。TMAO 参与动脉粥样硬化形成的机制包括:

(1) TMAO 通过参与抑制 Cyp7a1 和多种胆汁酸转运蛋白(Oatp1、Oatp4、MRp2 和 Ntcp)表达, 抑制巨噬细胞胆固醇逆转运<sup>[1, 11, 36-38]</sup>。Warrier 等<sup>[37]</sup>在 FMO3 基因敲除的 C57BL/6 小鼠饮食中分别添加不同剂量胆固醇(0.02%, 0.2%), 发现敲除 FMO3 基因促进巨噬细胞胆固醇逆转运, 改善小鼠胆固醇平衡。FMO3 抑制剂胆碱碘化物(iodocholine iodide, IMC)可通过上调 Cyp7a1 基因的表达, 预防由高胆固醇饮食引起的肝胆固醇堆积<sup>[38]</sup>。

(2) TMAO 上调巨噬细胞清道夫受体 SR-A 和 CD36 表达, 导致胆固醇在巨噬细胞中沉积并产生泡沫细胞<sup>[1, 11, 36-38]</sup>。在 C57BL/6J. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠饮食中添加胆碱或 TMAO 饲养 3 周后发现, 与正常饮食组相比添加胆碱或 TMAO 组 CD36 和 SR-A1 受体 mRNA 和蛋白表达水平均增强, 高胆碱饮食组明显促进巨噬细胞胆固醇累积和泡沫细胞的形成<sup>[39]</sup>。

(3) TMAO 通过激活 NF- $\kappa$ B 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 来促进单核细胞黏附, 上调血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的表达, 导致内皮功能障碍<sup>[10-11, 27, 36]</sup>。探讨 TMAO 对血管内皮细胞和平滑肌细胞功能影响的

研究发现, 与正常饲料组相比, 胆碱饮食组 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠主动脉中炎症相关基因表达上调, 通过药物抑制进一步证明 TMAO 诱导 VCAM-1 等炎症基因表达是通过 NF- $\kappa$ B 信号通路实现的<sup>[6]</sup>。

(4) TMAO 通过介导 IP3 信号转导通路促进细胞内 Ca<sup>2+</sup>的释放, 增强凝血酶和胶原蛋白等激动剂对血小板的激活作用, 从而促进血小板的高反应性和血栓的形成<sup>[4, 10-11, 36]</sup>。在 FeCl<sub>3</sub> 诱导的小鼠颈动脉损伤模型中检测 FMO3 基因表达对 TMAO 水平、血小板反应性和血栓形成的影响, 研究发现 FMO3 基因过表达后 TMAO 含量显著升高, 血栓形成时间明显缩短, 而抑制 FMO3 基因的表达后血小板与胶原的黏附性及血小板聚集反应均显著降低<sup>[40]</sup>。

TMAO 并非唯一参与动脉粥样硬化形成的肠道菌群代谢物, 色氨酸是 5-羟色胺(5-hydroxytryptophan, 5-HT)的前体, 血小板从肠道中摄取 5-HT 后在血管损伤部位释放, 可促进凝血<sup>[2]</sup>。在血管内皮细胞和血小板中均能检测到 TLR4 的表达, TLR4 可通过 LPS-TLR4 信号通路促进血小板炎性细胞的聚集<sup>[32]</sup>。最近有研究对 1162 名受试者使用非靶向代谢组学分析, 发现肠道菌群衍生代谢物苯乙酰谷氨酰胺(phenylacetylglutamine, PAGln)可通过调节肾上腺素能受体增强血小板活化相关的表型并促进血栓形成<sup>[41]</sup>。在心肌梗死动物模型中, 互养菌、螺旋体、单胞菌、毛螺菌等菌群丰富度较高<sup>[32]</sup>。苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸等代谢产物通过与细胞表面受体相互作用提高了 Src 激酶的活性, 在 JAK-STAT 信号通路的介导下参与心肌梗死的发展<sup>[42]</sup>。

## 2.3 心力衰竭

心力衰竭(heart failure)是心脏的收缩功能和(或)舒张功能发生障碍, 不能将静脉回心血量充分排出心脏, 导致静脉系统血液淤积, 动脉系统血液灌注不足, 从而引起心脏循环障碍症候群。心力衰竭是心脏疾病发展的终末阶段。心力衰竭患者肠黏膜屏障受损, 肠道菌群结构发生改变, 随着病情进展, 弯曲杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌、耶尔森菌、念珠菌等致病菌数量显著增加, 且与 SCFAs 代谢相关的直肠真杆菌和毛螺菌等益生菌丰富度降低, 而与 TMAO 代谢相关的病原菌增加<sup>[43]</sup>。心力衰竭患者 TMAO 水平升高, TMAO 通过降低血管内皮细胞的自我修复功能和激活炎性反应引起内皮功能障碍, 促进心力衰竭的发展。高胆碱饮食诱导的主动脉弓狭窄小鼠模型中 TGF- $\beta$  信号通路被激活, 小鼠出

现心肌纤维化、肾纤维化及心室重构<sup>[2,43]</sup>。TMAO 还可促进心肌细胞释放  $\text{Ca}^{2+}$ , 改变心肌收缩性<sup>[32]</sup>。肠道屏障功能破坏造成肠道通透性增加, 细菌释放脂多糖引起机体炎症反应, 脂多糖诱导 TLR4 活化可促进 TNF- $\alpha$ 、IL-1 及 IL-6 等因子释放, 这些炎症因子参与心肌细胞凋亡、肥大和纤维化过程<sup>[43]</sup>。SCFAs 通过保护肠黏膜屏障, 阻止细菌及其代谢物进入血液循环, 对心力衰竭具有保护作用, 小鼠肠道内分节丝状菌可刺激 IL-6 和 IL-23 的分泌, 促进 Th17 细胞分化, 脆弱拟杆菌可以将 CD4<sup>+</sup>T 细胞转化为 Treg 细胞, 诱导抗炎因子 TGF- $\beta$  和 IL-10 的分泌, 缓解心肌梗死大鼠的心室重构<sup>[43-44]</sup>。心力衰竭的发生和发展可能与产生 SCFAs 的细菌减少和产生 TMAO 的细菌增加有关, 通过靶向抑制微生物引起的 SCFAs/TMAO 增加降低心力衰竭的发生。

## 2.4 心律失常

心律失常 (arrhythmia) 是心脏冲动的起源部位、心搏频率和节律以及冲动传导的出现异常。心律失常可由心血管病、药物中毒、电解质和酸碱平衡失调等引起, 也可以因自主神经功能紊乱所致。研究显示, 房颤患者中瘤胃球菌、链球菌和肠球菌含量显著增加, 而粪杆菌、颤杆菌和嗜胆菌含量明显减少<sup>[33]</sup>。神经丛作为心脏自主神经系统的“整合中枢”, 在调节心房电生理特性方面起着至关重要的作用, Yu 等<sup>[45]</sup> 在实验犬的心房神经节丛中注射 TMAO, 发现右前神经节的功能和神经活动显著增强, ERP 值缩短; TMAO 通过 p65 NF- $\kappa$ B 通路增强了 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等促炎因子的表达, 介导了神经活动, 表明 TMAO 通过调节心脏自主神经系统电生理活动及促进炎症反应来加剧房颤的发生。在高血压小鼠模型中, 丙酸可降低室性心律失常的易感性, 表明 SCFAs 与心律失常的发生可能存在一定的关联<sup>[46]</sup>。虽然肠道菌群和心律失常之间的联系已经确定, 但确切的作用机制有待深入探究。

## 3 总结与展望

综上, 肠道微生物及其代谢产物在 CVD 发生发展中发挥了重要作用。肠道菌群通过 TMAO、SCFAs、氨基酸类、胆汁酸等代谢产物调节机体免疫应答, 肠道菌群代谢失调可引起肠道屏障功能障碍和机体炎症反应, 进而诱发或加重 CVD。今后还需进行多中心、大规模的临床研究, 进一步明确肠道菌群及其代谢产物在 CVD 中的作用, 为 CVD 的基

础研究和临床治疗提供充分的理论依据。

## 参考文献:

- [1] Zhao Y, Wang Z. Gut microbiome and cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2020, 35(3): 207-218.
- [2] Kasahara K, Rey FE. The emerging role of gut microbial metabolism on cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2019, 50: 64-70.
- [3] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis [J]. *Cell*, 2015, 163(7): 1585-1595.
- [4] Zhu W, Gregory JC, Org E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124.
- [5] Hoseini-Tavassol Z, Hasani-Ranjbar S. Targeting TMAO and its metabolic pathway for cardiovascular diseases treatment [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2021, 20(1): 1095-1097.
- [6] Seldin MM, Meng Y, Qi H, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(2): e002767.
- [7] Organ CL, Otsuka H, Bhushan S, et al. Choline diet and its gut microbe-derived metabolite, trimethylamine N-oxide, exacerbate pressure overload-induced heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2016, 9(1): e002314.
- [8] Al-Obaide MAI, Singh R, Datta P, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide and serum biomarkers in patients with T2DM and advanced CKD [J]. *J Clin Med*, 2017, 6(9): 86.
- [9] Tomova A, Bukovsky I, Rembert E, et al. The effects of vegetarian and vegan diets on gut microbiota [J]. *Front Nutr*, 2019, 6: 47.
- [10] Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(3): 171-181.
- [11] Wang Z, Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(5): 416-431.
- [12] Kappel BA, Federici M. Gut microbiome and cardiometabolic risk [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(4): 399-406.
- [13] Ahmadmehrabi S, Wilson Tang WHW. Gut microbiome and its role in cardiovascular diseases [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2017, 32(6): 761-766.
- [14] Latimer MN, Sonkar R, Mia S, et al. Branched chain amino acids selectively promote cardiac growth at the end of the awake period [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 157: 31-44.
- [15] Dodd KM, Tee AR. Leucine and mTORC1: a complex relationship [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(11): E1329-E1342.
- [16] Supruniuk E, Żebrowska E, Chabowski A. Branched chain amino acids-friend or foe in the control of energy substrate turnover and insulin sensitivity? [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,

- 2021; 1–39.
- [17] Sun H, Olson KC, Gao C, et al. Catabolic defect of branched-chain amino acids promotes heart failure [J]. *Circulation*, 2016, 133(21): 2038–2049.
- [18] Mirmiran P, Teymouri F, Asghari G, et al. Dietary intakes of branched chain amino acids and the incidence of hypertension; a population-based prospective cohort study [J]. *Arch Iran Med*, 2019, 22(4): 182–188.
- [19] Yoon MS. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism [J]. *Nutrients*, 2016, 8(7): 405.
- [20] Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2016, 535(7612): 376–381.
- [21] Jang C, Oh SF, Wada S, et al. A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance [J]. *Nat Med*, 2016, 22(4): 421–426.
- [22] Tobias DK, Lawler PR, Harada PH, et al. Circulating branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women [J]. *Circ Genom Precis Med*, 2018, 11(4): e002157.
- [23] Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, et al. P-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2015, 3(1): e00092.
- [24] Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3294.
- [25] Molinaro A, Bel Lassen P, Henricsson M, et al. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5881.
- [26] Ferrell JM, Boehme S, Li F, et al. Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice are protected from high-fat/high-cholesterol diet-induced metabolic disorders [J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(7): 1144–1154.
- [27] Ahmad AF, Dwivedi G, O' Gara F, et al. The gut microbiome and cardiovascular disease: current knowledge and clinical potential [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(5): H923–H938.
- [28] Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, et al. Gut microbiota and cardiovascular disease: opportunities and challenges [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 36.
- [29] Li L, Baumann CA, Meling DD, et al. Effect of orally administered *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 on plasma cholesterol concentration in laying hens [J]. *Poult Sci*, 1996, 75(6): 743–745.
- [30] Holmes E, Loo RL, Stamler J, et al. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 396–400.
- [31] Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(5): 431–438.
- [32] Zhou W, Cheng Y, Zhu P, et al. Implication of gut microbiota in cardiovascular diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 5394096.
- [33] Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK, et al. The gut, its microbiome, and hypertension [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(4): 36.
- [34] Natarajan N, Hori D, Flavahan S, et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure *via* endothelial G protein-coupled receptor 41 [J]. *Physiol Genomics*, 2016, 48(11): 826–834.
- [35] Wilck N, Matus MG, Kearney SM, et al. Salt-responsive gut commensal modulates T<sub>H</sub>17 axis and disease [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 585–589.
- [36] Peng J, Xiao X, Hu M, et al. Interaction between gut microbiome and cardiovascular disease [J]. *Life Sci*, 2018, 214: 153–157.
- [37] Warrior M, Shih DM, Burrows AC, et al. The TMAO-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(3): 326–338.
- [38] Pathak P, Helsley RN, Brown AL, et al. Small molecule inhibition of gut microbial choline trimethylamine lyase activity alters host cholesterol and bile acid metabolism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318(6): H1474–H1486.
- [39] Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 57–63.
- [40] Zhu W, Buffa JA, Wang Z, et al. Flavin monooxygenase 3, the host hepatic enzyme in the metaorganismal trimethylamine N-oxide-generating pathway, modulates platelet responsiveness and thrombosis risk [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(9): 1857–1872.
- [41] Nemet I, Saha PP, Gupta N, et al. A cardiovascular disease-linked gut microbial metabolite acts *via* adrenergic receptors [J]. *Cell*, 2020, 180(5): 862–877.
- [42] Lam V, Su J, Hsu A, et al. Intestinal microbial metabolites are linked to severity of myocardial infarction in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160840.
- [43] Jia Q, Li H, Zhou H, et al. Role and effective therapeutic target of gut microbiota in heart failure [J]. *Cardiovasc Ther*, 2019, 2019: 5164298.
- [44] Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(1): 232.
- [45] Yu L, Meng G, Huang B, et al. A potential relationship between gut microbes and atrial fibrillation; Trimethylamine N-oxide, a gut microbe-derived metabolite, facilitates the progression of atrial fibrillation [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 255: 92–98.
- [46] Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, et al. Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage [J]. *Circulation*, 2019, 139(11): 1407–1421.

吴西,王中琪,宋慕格,等. 外泌体对骨组织细胞的影响及应用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 108-113.  
Wu X, Wang ZQ, Song MG, et al. Research progress on the effect of exosomes on bone histocytes and its application [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 108-113.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.015

# 外泌体对骨组织细胞的影响及应用的研究进展

吴西<sup>1,2</sup>, 王中琪<sup>1,2</sup>, 宋慕格<sup>1,2</sup>, 杨世超<sup>1,2</sup>, 高玉海<sup>2,3</sup>, 陈克明<sup>1,2,3\*</sup>

(1.甘肃中医药大学中医临床学院,兰州 730030;2.中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室,兰州 730050;3.甘肃省干细胞与基因药物重点实验室,兰州 730050)

**【摘要】** 近年来外泌体作为细胞间通讯的媒介,为细胞间的信息交换提供了新的视角。来源于不同细胞的外泌体,如间充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞及其前体被认为在骨重建过程中发挥关键作用。众多研究表明常见的骨代谢疾病如骨质疏松症、骨折和骨性关节炎等与外泌体有明显的相关性。双磷酸盐类药物干预、自体 and 同种异体植骨等治疗手段虽能起到不错的疗效,但可能会导致多种并发症以及不良反应,因此开发骨再生能力强、并发症发生率更低、更加精准的靶向新疗法是非常有意义的。本文对不同来源的外泌体对骨组织细胞的影响和相关骨代谢疾病治疗的应用进行综述,为开发新的骨再生治疗方法提供思路。

**【关键词】** 外泌体;骨质疏松;骨折;骨性关节炎

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0108-06

## Research progress on the effect of exosomes on bone histocytes and its application

WU Xi<sup>1,2</sup>, WANG Zhongqi<sup>1,2</sup>, SONG Muge<sup>1,2</sup>, YANG Shichao<sup>1,2</sup>, GAO Yuhai<sup>2,3</sup>, CHEN Keming<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University, Lanzhou 730030, China.

2. Basic Medical Laboratory, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese PLA, Lanzhou 730050.

3. Key Laboratory of Stem Cells and Gene Drug of Gansu Province, Lanzhou 730050)

**【Abstract】** In recent years, exosomes have been used as a medium for cell-cell communication, providing a new perspective for information exchange between cells. Exosomes from various cell types, such as mesenchymal stem cells, osteoblasts, osteoclasts, and their precursors, are play an important role in bone remodeling. Many studies have shown that common bone metabolic diseases, such as osteoporosis, fracture, and osteoarthritis, have obvious correlations with exocrine bodies. Although bisphosphonate drug treatment, autologous and allograft bone grafting, and other treatment method achieve good result, they may lead to various complications and adverse reactions. Therefore, it is very meaningful to develop new targeted therapies with a strong bone regeneration ability, lower complication rate, and more accuracy. Therefore, this article reviews the mechanism of exosomes from various sources acting on bone tissue cells and the application of related bone metabolism disease treatments to provide ideas for developing new bone regeneration treatment method.

**【Keywords】** exosome; osteoporosis; fracture; osteoarthritis

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

骨质疏松症、骨折和骨性关节炎是骨科常见疾病,给患者带来痛苦的同时也增加了家庭的负担,因此对于骨科医生来说采用较为适宜的治疗手段

显得十分重要。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在骨质疏松症、骨折和骨性关节炎等疾病的治疗方面具有较为出色的疗效<sup>[1]</sup>,但缺点是存

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81770879);军队后勤科研计划项目(CLB18J028)。

**【作者简介】** 吴西(1996—),女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治骨与关节疾病。E-mail:1050793325@qq.com

**【通信作者】** 陈克明(1968—),男,博士,研究生导师,研究方向:中医药防治骨与关节疾病。E-mail:chenkm@lut.edu.cn

在病原体感染和肿瘤发生等风险<sup>[2]</sup>。近年来随着分离与鉴定技术的发展,外泌体得到广泛的研究,与细胞疗法相比,外泌体作为一种无细胞治疗的手段,可大大减低感染和肿瘤发生的风险<sup>[3]</sup>,并且在骨骼重建的微环境中,外泌体是传递细胞间信息的优秀载体<sup>[4-5]</sup>,目前具有广阔的应用前景。本文就不同来源的外泌体对骨组织细胞的影响以及在相关疾病中的应用进行综述,为进一步研究提供思路。

### 1 外泌体

研究发现 MSCs 通过旁分泌效应来发挥其治疗作用, MSCs 释放的胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 参与了组织再生,并促进了 MSCs 的旁分泌效

应<sup>[6]</sup>。EVs 是一种由脂质双层膜包被的囊泡<sup>[7]</sup>,并且具有多种形式,其中根据直径、生物合成、内容物和特殊标志物等特点的不同可分为外泌体 (exosomes)、微泡 (microvesicles) 及凋亡小体 (apoptotic bodies)<sup>[8]</sup>(表 1)。

外泌体存在于大多数体液中,由脂质双分子层组成<sup>[9]</sup>,它们可以携带大量的生物活性物质,如非编码 RNA、mRNA、DNA 和蛋白质和其他分子,可有效地介导细胞间和通过运送含有特定 miRNA 进行生物体间通信<sup>[10]</sup>。如图 1 所示,外泌体通过内陷作用或内吞作用,形成的一个称之为内体 (endosome) 的胞内囊泡,在装载蛋白质、核酸和脂质等内容物后,内体与多囊体 (multivesicular body, MVB) 相互结

表 1 不同种类 Evs 的特征

Table 1 Characteristics of different Evs

分类 Classify	直径 (nm) Diameter	内容物 Cargo	标志物 Markers
外泌体 Exosomes	30~150	脂类、蛋白质、DNAs, RNAs Lipids, proteins, DNAs, RNAs	TSG101、CD9、CD63、CD81、Alix
微泡 Microvesicles	50~1000	脂类 Lipids	CK18、MMP2、整合素、选择素、CD40 CK18, MMP2, Integrins, Selectins, CD40
凋亡小体 Apoptotic bodies	50~5000	细胞器及核碎片 Cell organelles and debris	组蛋白、Caspase-3 Histones, Caspase-3

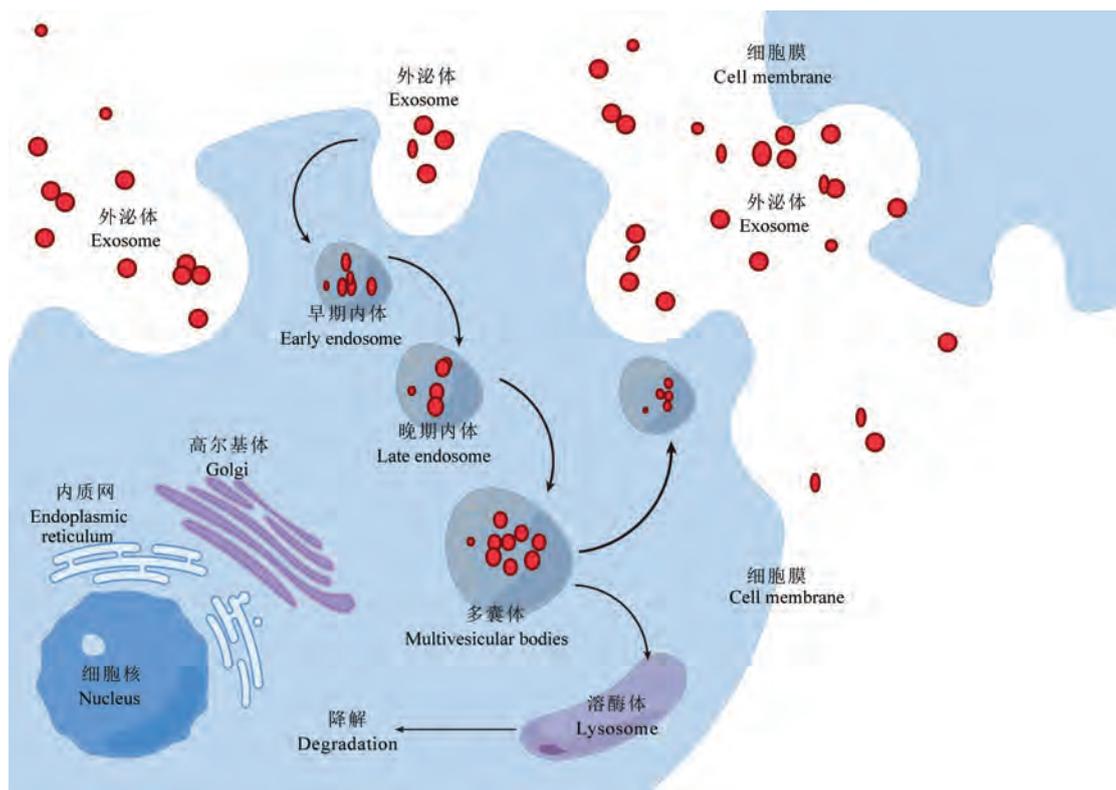


图 1 外泌体的生物发生示意图

Figure 1 Biogenesis of exosomes

合<sup>[11]</sup>,一部分 MVB 被溶酶体降解,另一部分 MVB 与细胞膜结合,通过胞吐作用释放到膜外,作用于其他细胞<sup>[12]</sup>。分离外泌体最常用的方法包括超速离心法和免疫珠分离法。同时,通过电子显微镜可观察到外泌体的形态呈一侧凹陷的半球状或杯状<sup>[13]</sup>。

## 2 外泌体对骨组织细胞的影响

### 2.1 外泌体对骨髓间充质干细胞的影响

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是来源于骨髓的基质干细胞, BMSCs 是一种具有分化为成骨、脂肪、软骨等多种分化潜能的细胞亚群。骨巨噬细胞位于骨表面,与 BMSCs 成骨密切相关,近年来越来越多的研究发现,骨表面的巨噬细胞具有调节骨代谢的作用。Qi 等<sup>[13]</sup>研究表明,在缺氧和血清剥夺条件下,来自 M1 型巨噬细胞的外泌体可以通过将 miR-222 传递到 BMSCs,降低了 BMSCs 的活力和迁移,诱导 BMSCs 凋亡。Li 等<sup>[14]</sup>发现来源于 M2 巨噬细胞的外泌体可以增加 BMSCs 中 miR690、IRS-1 和 TAZ 的表达,促进 BMSCs 成骨,抑制脂肪形成。相关研究表明,在间接共培养系统中,无须额外诱导剂即可诱导 BMSCs 向软骨细胞分化。Li 等<sup>[15]</sup>实验中发现诱导 BMSCs 向软骨细胞分化的原因可能是软骨细胞来源的外泌体中的 miR-8485,通过靶向 GSK3B 抑制 GSK-3 $\beta$  表达,并靶向 DACT1 诱导 p-GSK-3 $\beta$  (Ser9),激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路,促进 BMSCs 向软骨分化。因此, BMSCs 具有多重分化潜能,在骨形成中起着关键作用。

### 2.2 外泌体对成骨细胞的影响

成骨细胞是参与骨重塑的关键细胞之一,不同来源的外泌体通过调节成骨细胞的功能从而调节骨代谢。相关研究表明, BMSCs 源性的外泌体在体内、外实验中可通过抑制细胞凋亡,从而促进成骨细胞增殖,如 Xie 等<sup>[16]</sup>发现来源于 BMSCs 的外泌体可以促进成骨细胞增殖、抑制细胞凋亡和减少成脂分化。Zhang 等<sup>[17]</sup>研究表明,来源于 BMSCs 的外泌体 miR-935 通过下调 STAT1 促进成骨细胞分化和增殖,相反在切卵巢模型大鼠实验中, miR-935 缺失的大鼠骨微结构中骨密度、骨体积分数和骨小梁数目则显著下降。成骨细胞源性的外泌体在成骨细胞分化和功能中也具有重要的调节作用, Cui 等<sup>[18]</sup>研究发现来源于矿化前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的

外泌体可以促进骨髓基质细胞并促进其向成骨细胞分化。同时破骨细胞来源的外泌体也发挥着重要的作用, Ren 等<sup>[19]</sup> 研究发现, 炎性破骨细胞来源的外泌体通过 ephrinA2/EphA2 特异性靶向成骨细胞, lncRNA LIOCE 富集在炎性破骨细胞外泌体中, 进入成骨细胞后促进成骨细胞活性, 降低 Osterix 的泛素化水平来稳定成骨转录因子 Osterix, 促进骨形成。Yang 等<sup>[20]</sup> 证明破骨细胞来源的外泌体 miR-23a-5p 通过抑制 Runx2 和促进 YAP1 介导的 MT1DP 抑制成骨细胞分化。综上所述, 不同来源的外泌体通过调节成骨细胞增殖分化和基质钙化, 从而调节骨代谢, 其中外泌体包含的 miRNAs 可能是发挥该功能的重要因素。

### 2.3 外泌体对破骨细胞的影响

破骨细胞的骨吸收作用也参与骨重建的过程, 调节成骨细胞和破骨细胞的平衡在维持骨稳态中起关键作用, 不同来源的外泌体除了调节成骨细胞功能, 同时也影响着破骨细胞的功能。Wang 等<sup>[21]</sup> 研究发现肝素酶基因 (Hpse) 是 miR-503-3p 的靶基因之一, 成骨细胞来源的外泌体 miR-503-3p 可通过 miR503-3p/Hpse 轴抑制破骨细胞的分化; 机械负荷下, BMSCs 来源的外泌体通过 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 RANKL 诱导的破骨细胞生成, 并改善尾吊小鼠模型中机械力刺激缺失引起的骨丢失<sup>[22]</sup>; 脂肪组织衍生的间质干细胞来源的外泌体和 miR-146a 通过抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-18 和 IL-1 $\beta$  的表达, 促进细胞因子产生诱导炎症小体的失活, 最终减少骨吸收, 防止骨丢失<sup>[23]</sup>。Yu 等<sup>[24]</sup> 研究表明, 成骨肿瘤来源的外泌体通过转移破骨细胞相关的 miR-92a-1-5p 下调 I 型胶原的表达量, 从而促进破骨细胞分化并且抑制成骨细胞分化产生, 降解骨细胞外基质。总之, 不同来源的外泌体可以通过调节破骨细胞的功能, 平衡骨重建中骨形成和吸收从而调节骨稳态。

### 2.4 外泌体对骨细胞的影响

骨细胞是成熟骨组织中最常见的细胞, 骨细胞是骨重建的统帅, 常通过介导成骨细胞和破骨细胞生成或凋亡参与骨重建。Ren 等<sup>[25]</sup> 在模拟衰老过程中缺血条件下骨细胞凋亡实验中发现, 脂肪间充质干细胞来源的外泌体通过上调 Bcl-2/Bax 起到抗凋亡作用, 抑制 ROS、细胞色素 C 生成和 caspase-3、caspase-9 的活化, 同时通过下调 RANKL 的表达来抑制骨细胞凋亡和骨细胞介导的破骨细胞生成。同样在缺血缺氧条件下, Zhu 等<sup>[26]</sup> 发现低水平激光

照射处理的脂肪间充质干细胞来源的外泌体能有效抑制缺血缺氧环境诱导的骨细胞凋亡。除了脂肪间充质干细胞来源的外泌体外, Kuang 等<sup>[27]</sup>研究发现人脐带间充质干细胞沃顿胶冻的外泌体激活的 AKT 可抑制骨细胞凋亡和预防大鼠股骨头坏死, 并且 miR-21-PTEN-AKT 信号通路在骨细胞凋亡的控制中起着至关重要的作用。总而言之, 骨细胞作为一种多功能细胞通过协调破骨细胞和成骨细胞的功能维持骨重建的平衡, 与此同时外泌体在调节骨细胞凋亡的过程中也充当着一个重要的角色。

### 3 外泌体的应用

近年来, 外泌体介导细胞间通讯, 广泛应用于骨代谢、肿瘤及炎症性疾病等众多领域。骨代谢的稳态对骨骼的健康至关重要, 而外泌体所蕴含的潜力广受关注, 随着分离和鉴定技术的发展已在骨质疏松、骨折、骨关节炎等常见骨代谢疾病中得到的应用, 延伸出了许多新角度与思路。

骨质疏松是一种全身性骨骼系统疾病, 特征是骨密度降低和骨微结构和强度减弱<sup>[28]</sup>。骨质疏松症的发生与骨吸收和骨形成的失衡有关, 骨量的维持依赖于骨形成和骨吸收的相互协调<sup>[29]</sup>。导致骨质疏松症的病理生理学因素有许多, 如: 破骨细胞吸收与成骨细胞形成的不平衡; 成骨分化的减少及脂肪分化的增加; 炎症和血管生成是影响骨质疏松症的重要因素; 同时 miRNAs 调节的骨代谢失调也成为骨质疏松症的重要病理因素<sup>[30]</sup>。Qiu 等<sup>[31]</sup>的研究发现, BMSCs 来源的外泌体和 miR-150-3p 可以上调 Runx2、Osterix、ALP 和 osteocalcin, 表明 BMSCs 来源的外泌体和 miR-150-3p 可以通过调控这些成骨因子来刺激成骨细胞的增殖和分化, 为骨质疏松症患者的治疗提供了新的思路。Yang 等<sup>[32]</sup>发现由内皮细胞分泌的外泌体可以通过抑制铁死亡, 来阻止糖皮质激素引起的成骨细胞的成骨活性抑制, 预防长期使用糖皮质激素类药物造成的继发性骨质疏松症。同样 Zhang 等<sup>[23]</sup>研究发现在糖尿病引起的继发性骨质疏松症中, 脂肪间充质干细胞来源的外泌体 miR-146a 可有效抑制破骨细胞中促炎细胞因子的产生, 起到抑制骨吸收和恢复骨丢失的作用, 其机制是外泌体 miR-146a 抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-18 和 IL-1b 的表达, 诱导炎症小体失活, 最终减少骨吸收, 恢复骨丢失, 更有效地发挥破骨细胞的抗炎作用为治疗糖尿病性骨质疏松症提供思路。Qi 等<sup>[33]</sup>

将由人诱导多能干细胞衍生的间充质干细胞分泌的外泌体植入去卵巢大鼠临界尺寸骨缺损中, 发现外泌体植入后可增强去卵巢大鼠的 BMSCs 增殖及碱性磷酸酶活性, 并且上调成骨相关基因 mRNA 和蛋白表达, 最终刺激去卵巢大鼠临界大小颅骨缺损的骨再生和血管生成。

骨折愈合是一个复杂的过程, 由早期的炎症反应所驱动, 并伴随着各种生物反应, 受伤后的骨组织迅速血肿机化, 随后祖细胞和骨髓基质细胞被诱导募集、增殖、迁移并分化为成骨母细胞和软骨细胞<sup>[34]</sup>, 随后断端周围形成骨痂桥接骨折部位, 在血管生成相关基因的调控下新生血管生成并提供营养物质, 最后进入重塑阶段<sup>[35]</sup>。越来越多的证据表明 miRNA 在骨折愈合过程中起关键作用, miRNA 是骨形成和吸收中重要的转录后调节因子, 根据局部疾病的严重程度, miRNA 能够稳定地从骨骼转移至微环境和骨髓间充质干细胞, 并有助于成骨分化和促进骨折愈合。Huang 等<sup>[36]</sup>研究发现, BMSCs 来源的外泌体 miR-19b 可抑制 WWP1 或 Smurf2 的表达, 同时通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路提高了 KLF5 表达, 从而促进骨折愈合。Yu 等<sup>[37]</sup>发现, BMSCs 衍生的外泌体可以递送 miR-136-5p 至小鼠胚胎成骨细胞, 并促进其的增殖和分化, miR-136-5p 通过抑制 LRP4 表达以激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路介导增强成骨细胞增殖和分化, 最终促进骨折愈合过程。近年来骨组织工程研究将外泌体与支架相结合, 揭示了外泌体在骨再生中的积极作用, Mi 等<sup>[38]</sup>采用鸡尾酒疗法特异性递送 miR-26a-5p 和 APY29, 分别作用于成骨、破骨细胞和巨噬细胞, 可促进骨折修复并达到显著的疗效。Lin 等<sup>[39]</sup>发现通过抑制骨折部位活跃的免疫细胞可促进骨折愈合, 其研究从人脐静脉内皮细胞的外泌体中获得 PD-L1, 并证明 PD-L1 特异性结合 T 细胞表面的 PD-1 从而抑制 T 细胞的活化, 且外泌体 PD-L1 诱导 BMSCs 向成骨分化。同时将外泌体 PD-L1 载入水凝胶运用于小鼠骨折模型的实验中, 表明 PD-L1 具有显著促进骨痂形成和骨折愈合的作用。总之越来越多的研究表明, miRNA 是在骨重塑过程中起着关键作用的小分子物质, 是骨吸收和骨形成的重要调节因子。

骨关节炎是一种慢性退行性疾病, 可导致活动受限甚至残疾。BMSCs 可以修复软骨损伤, 目前常通过细胞疗法或组织工程治疗骨关节炎。Huang 等<sup>[40]</sup>研究发现含有 miR-206 的 BMSCs 外泌体能在

Elf3 参与的骨关节炎中发挥作用,含有 miR-206 的外泌体在体外能促进成骨细胞 ALP 活性、钙沉积水平、OCN 分泌和增殖并抑制成骨细胞凋亡,在对小鼠采用含有 miR-206 的外泌体治疗后,能增加小鼠股骨组织中 OCN 和 BMP2 的表达,从而减缓小鼠骨关节炎的发展。Zhang 等<sup>[41]</sup>研究发现 BMSCs 来源的外泌体可能通过缓解软骨损伤,减少骨赘形成和滑膜巨噬细胞浸润,抑制 M1 巨噬细胞生成,促进 M2 巨噬细胞生成,并在滑液中,降低促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平,增加抗炎细胞因子 IL-10 的释放来缓解骨关节炎。He 等<sup>[42]</sup>发现 BMSCs 来源的外泌体不仅能修复软骨损伤还可以缓解疼痛,他们在动物实验中发现,外泌体处理后能显著上调骨关节炎大鼠软骨组织中的 COL2A1 蛋白,下调 MMP13 蛋白。与未治疗的骨关节炎大鼠相比,外泌体治疗的骨关节炎大鼠的拔爪阈值显著改善,并且缓解了骨关节炎大鼠背根神经节组织中 CGRP 和 iNOS 的上调。最终得出结论,BMSCs 来源的外泌体能有效促进骨关节炎大鼠软骨修复和细胞外基质合成,缓解膝关节疼痛。

#### 4 展望

外泌体作为优秀的载体在骨重塑微环境中传递细胞间信息,近年来因其巨大的潜力被用于多种疾病的诊断与治疗。本文总结了多种细胞来源的外泌体对骨组织细胞的影响以及在骨折、骨质疏松和骨关节炎中的应用进展。目前大多数外泌体研究仍仅限于临床前阶段,用于分离外泌体的常规方法并不适用于临床治疗,且机制研究也较为局限,因此进一步深入研究外泌体的生产、分离、纯化的方法和具体的作用机制十分重要,以期更好地开发新的治疗方案运用于更多疾病的治疗。

#### 参考文献:

[ 1 ] 金镇雄,唐德志,肖延华. 不同来源的间充质干细胞治疗骨与软骨组织疾病的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(6): 858-862, 879.

[ 2 ] Pang HL, Zhao QQ, Ma Y, et al. Long noncoding RNA H19 participates in the regulation of adipose-derived stem cells cartilage differentiation [J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 2139814.

[ 3 ] Cheng P, Cao T, Zhao X, et al. Nidogen1-enriched extracellular vesicles accelerate angiogenesis and bone regeneration by targeting Myosin-10 to regulate endothelial cell adhesion [J]. Bioact Mater, 2021, 12: 185-197.

[ 4 ] Lyu H, Xiao Y, Guo Q, et al. The role of bone-derived exosomes in regulating skeletal metabolism and extraosseous diseases [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 89.

[ 5 ] Pawitan JA, Bui TA, Mubarak W, et al. Enhancement of the therapeutic capacity of mesenchymal stem cells by genetic modification: a systematic review [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 587776.

[ 6 ] Bansal S, Sharma M, Ranjithkumar R, et al. The role of exosomes in allograft immunity [J]. Cell Immunol, 2018, 331: 85-92.

[ 7 ] 高方园,焦丰龙,张养军,等. 外泌体分离技术及其临床应用研究进展 [J]. 色谱, 2019, 37(10): 1071-1083.

[ 8 ] Hashimoto H, Olson EN, Bassel-Duby R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(10): 585-600.

[ 9 ] 缪毛毛,王绪平,吴人杰,等. 外泌体 miRNA 介导的细胞间通讯在骨与软骨组织疾病中的作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(6): 827-832.

[ 10 ] Joshi BS, de Beer MA, Giepmans BNG, et al. Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes [J]. ACS Nano, 2020, 14(4): 4444-4455.

[ 11 ] Sato K, Meng F, Glaser S, et al. Exosomes in liver pathology [J]. J Hepatol, 2016, 65(1): 213-221.

[ 12 ] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, et al. Extracellular vesicles in angiogenesis [J]. Circ Res, 2017, 120(10): 1658-1673.

[ 13 ] Qi Y, Zhu T, Zhang T, et al. M1 macrophage-derived exosomes transfer miR-222 to induce bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis [J]. Lab Invest, 2021, 101(10): 1318-1326.

[ 14 ] Li Z, Wang Y, Li S, et al. Exosomes derived from M2 macrophages facilitate osteogenesis and reduce adipogenesis of BMSCs [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 680328.

[ 15 ] Li Z, Wang Y, Xiang S, et al. Chondrocytes-derived exosomal miR-8485 regulated the Wnt/ $\beta$ -catenin pathways to promote chondrogenic differentiation of BMSCs [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(2): 506-513.

[ 16 ] Xie Y, Hu JH, Wu H, et al. Bone marrow stem cells derived exosomes improve osteoporosis by promoting osteoblast proliferation and inhibiting cell apoptosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 1214-1220.

[ 17 ] Zhang Y, Cao X, Li P, et al. microRNA-935-modified bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes enhance osteoblast proliferation and differentiation in osteoporotic rats [J]. Life Sci, 2021, 272: 119204.

[ 18 ] Cui Y, Luan J, Li H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression [J]. FEBS Lett, 2016, 590(1): 185-192.

[ 19 ] Ren L, Zeng F, Deng J, et al. Inflammatory osteoclasts-derived exosomes promote bone formation by selectively transferring lncRNA LIOCE into osteoblasts to interact with and stabilize Osterix [J]. FASEB J, 2022, 36(2): e22115.

- [20] Yang JX, Xie P, Li YS, et al. Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2 [J]. *Cell Signal*, 2020, 70: 109504.
- [21] Wang Q, Shen X, Chen Y, et al. Osteoblasts-derived exosomes regulate osteoclast differentiation through miR-503-3p/Hpse axis [J]. *Acta Histochem*, 2021, 123(7): 151790.
- [22] Xiao F, Zuo B, Tao B, et al. Exosomes derived from cyclic mechanical stretch-exposed bone marrow mesenchymal stem cells inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis through the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(9): 798.
- [23] Zhang L, Wang Q, Su H, et al. Exosomes from adipose tissues derived mesenchymal stem cells overexpressing microRNA-146a alleviate diabetic osteoporosis in rats [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2021, 15(1): 87–97.
- [24] Yu L, Sui B, Fan W, et al. Exosomes derived from osteogenic tumor activate osteoclast differentiation and concurrently inhibit osteogenesis by transferring COL1A1-targeting miRNA-92a-1-5p [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(3): e12056.
- [25] Ren L, Song ZJ, Cai QW, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate hypoxia/serum deprivation-induced osteocyte apoptosis and osteocyte-mediated osteoclastogenesis *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(1): 138–144.
- [26] Zhu CT, Li T, Hu YH, et al. Exosomes secreted by mice adipose-derived stem cells after low-level laser irradiation treatment reduce apoptosis of osteocyte induced by hypoxia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24): 5562–5570.
- [27] Kuang MJ, Huang Y, Zhao XG, et al. Exosomes derived from Wharton's jelly of human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats *via* the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 1861–1871.
- [28] Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(10): 1468–1475.
- [29] Peng Y, Wu S, Li Y, et al. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling [J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 426–436.
- [30] Barnsley J, Buckland G, Chan PE, et al. Pathophysiology and treatment of osteoporosis: challenges for clinical practice in older people [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2021, 33(4): 759–773.
- [31] Qiu M, Zhai S, Fu Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-150-3p promotes osteoblast proliferation and differentiation in osteoporosis [J]. *Hum Gene Ther*, 2021, 32(13–14): 717–729.
- [32] Yang RZ, Xu WN, Zheng HL, et al. Exosomes derived from vascular endothelial cells antagonize glucocorticoid-induced osteoporosis by inhibiting ferritinophagy with resultant limited ferroptosis of osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(9): 6691–6705.
- [33] Qi X, Zhang J, Yuan H, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(7): 836–849.
- [34] Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, et al. Inflammation, fracture and bone repair [J]. *Bone*, 2016, 86: 119–130.
- [35] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(1): 45–54.
- [36] Huang Y, Xu Y, Feng S, et al. miR-19b enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes fracture healing through the WWP1/Smurf2-mediated KLF5/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(5): 973–985.
- [37] Yu H, Zhang J, Liu X, et al. microRNA-136-5p from bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates fracture healing by targeting LRP4 to activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Bone Joint Res*, 2021, 10(12): 744–758.
- [38] Mi B, Chen L, Xiong Y, et al. Osteoblast/osteoclast and immune cocktail therapy of an exosome/drug delivery multifunctional hydrogel accelerates fracture repair [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(1): 771–782.
- [39] Lin Z, Xiong Y, Meng W, et al. Exosomal PD-L1 induces osteogenic differentiation and promotes fracture healing by acting as an immunosuppressant [J]. *Bioact Mater*, 2022, 13: 300–311.
- [40] Huang Y, Zhang X, Zhan J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-206 promotes osteoblast proliferation and differentiation in osteoarthritis by reducing Elf3 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7734–7745.
- [41] Zhang J, Rong Y, Luo C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25138–25152.
- [42] He L, He T, Xing J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 276.

顾家博, 刘建磊, 张春霞, 等. 肠道微生物群改善免疫检查点抑制剂耐药的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 114-119.

Gu JB, Liu JL, Zhang CX, et al. Research progress of gut microbiota in improving resistance against immune checkpoint inhibitors [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 114-119.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.016

# 肠道微生物群改善免疫检查点抑制剂耐药的研究进展

顾家博<sup>1,3</sup>, 刘建磊<sup>1</sup>, 张春霞<sup>1</sup>, 金黑鹰<sup>1</sup>, 韦平<sup>2</sup>, 孟君<sup>2</sup>, 徐小龙<sup>2\*</sup>

(1.江苏省第二中医院, 南京 210017; 2.连云港市中医院, 江苏 连云港 222004;  
3.南京中医药大学, 南京 210029)

**【摘要】** 免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 疗法是目前最重要的抗肿瘤治疗方法, 但免疫治疗耐药现象严重影响着治疗效果。本文拟对免疫检查点抑制剂耐药相关机制和肠道微生物群与免疫检查点抑制剂耐药机制间的关系作一综述, 以期通过改善肠道微生物群提高治疗敏感性缓解免疫治疗耐药现象, 为解决免疫检查点抑制剂耐药探索出有效方法。

**【关键词】** 免疫检查点抑制剂; 肠道微生物群; 耐药

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0114-06

## Research progress of gut microbiota in improving resistance against immune checkpoint inhibitors

GU Jiabo<sup>1,3</sup>, LIU Jianlei<sup>1</sup>, ZHANG Chunxia<sup>1</sup>, JIN Heiyang<sup>1</sup>, WEI Ping<sup>2</sup>, MENG Jun<sup>2</sup>, XU Xiaolong<sup>2\*</sup>

(1. Jiangsu Provincial Second Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210017, China.

2. Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang 222004.

3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029)

**【Abstract】** Immune checkpoint inhibitors is currently the most important anti-tumor therapy, but immunotherapy resistance affects the therapeutic effect. This article reviews the related mechanisms of immune checkpoint inhibitor resistance and the mechanisms of the relationship between gut microbiota and immune checkpoint inhibitor resistance. By improving gut microbiota to increase treatment sensitivity and alleviate immunotherapy resistance, an effective method has been explored to address immune checkpoint inhibitor resistance.

**【Keywords】** immune checkpoint inhibitors; gut microbiota; drug resistance

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

在肿瘤免疫治疗领域中, 免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 因在治疗黑色素瘤、非小细胞肺癌、霍奇金淋巴瘤、胃癌和肝细胞癌

等<sup>[1-9]</sup>疾病中表现出广泛的生物活性和持久的抗肿瘤作用, 使之成为目前最重要的抗肿瘤治疗方法之一<sup>[10]</sup>。ICIs 靶向作用于 T 淋巴细胞、抗原呈递细胞

**【基金项目】** 江苏省中医药管理局面上项目 (MS2021030)。

**【作者简介】** 顾家博 (1992—), 男, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 炎症性肠病耐药机制。E-mail: gujiabo@njuem.edu.cn

**【通信作者】** 徐小龙 (1987—), 男, 医学硕士, 主管药师, 研究方向: 生物制剂耐药。E-mail: 673377498@qq.com

和肿瘤细胞上的抑制性受体和配体上,如 CTLA-4、PD-1、LAG-3、TIM-3 及 PD-L1,通过刺激免疫系统达到抗肿瘤效果。ICIs 免疫治疗改变了多种肿瘤的治疗模式,提高了晚期或转移性肿瘤患者的生存率,特别是在治疗晚期黑色素瘤和早期高危风险型黑色素瘤时表现出良好的治疗效果,但仍有一多半患者出现原发性或继发性耐药导致治疗中断<sup>[1]</sup>。肠道微生物群作为肿瘤微环境的重要组成部分,通过降低肠道通透性和增加上皮细胞防御机制形成黏膜屏障,帮助肠黏膜免疫系统在宿主体内和防御系统中起关键的平衡作用<sup>[11]</sup>。本文拟结合 ICIs 耐药相关机制,研究其耐药机制与肠道微生物群的关系,探究改善肠道微生物群与缓解 ICIs 治疗耐药之间的联系,以期通过改善肠道微生物群在 ICIs 耐药中发挥重要作用,为临床解决治疗耐药探寻新的方法并给予一定理论支撑。

## 1 免疫检查点抑制剂耐药相关机制

### 1.1 新抗原的低可用性

研究表明,低肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)导致可用的新抗原(neoantigens)较少是 ICIs 原发性耐药的主要原因。免疫系统识别由 TMB 高表达肿瘤分泌出的大量抗原表达异常的蛋白,并将这些异常蛋白识别为肿瘤新抗原,而免疫检查点抑制剂释放的 T 细胞会识别这种肿瘤新抗原,从而起到有效抗肿瘤的目的<sup>[12]</sup>,同时来源于肿瘤细胞中突变基因产生的新抗原,会激活 CD8<sup>+</sup>T 细胞引起一系列抗肿瘤免疫反应<sup>[13]</sup>。由于新抗原具有较高的肿瘤特异性,所以更适用于肿瘤突变负荷低的实体瘤。新抗原免疫疗法和 ICIs 疗法的结合可以通过模拟抗原表位传递和抑制免疫逃逸相关途径,来增强免疫系统识别低免疫原性分子达到抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>。研究数据表明,微卫星高度不稳定型实体瘤多具有错配修复缺陷基因,会导致大量继发于 DNA 错配修复缺陷而产生的体细胞突变,而这种高肿瘤突变负荷通过抗原特异性效应 T 细胞的发育及浸润,使抗 PD-1 抑制剂等 ICIs 恢复治疗敏感性<sup>[15]</sup>。通过研究微卫星高度不稳定胃癌患者的基因组、免疫学和临床疗效的异质性,发现约 70% 的耐药患者, TMB 减少超一半,提示肿瘤突变负荷的表达与抗 PD-1 抑制剂耐药程度相关<sup>[16]</sup>。以上研究均表明, TMB 偏低导致可用的新抗原较少是发生原发性耐药可能的机制。

### 1.2 信号通路异常

异常基因表达诱导细胞信号通路异常也是导致免疫治疗耐药的重要因素,如 PI3K/AKT/mTor 信号通路、IFN- $\gamma$  信号通路、WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路和 MAPK 信号通路异常等。

PI3K/AKT/mTor 信号通路是调控细胞自噬的重要途径, mTor 受体是在细胞发育、分化及蛋白质合成等生物过程中重要信号传导机制,促进肿瘤的发生和发展<sup>[17]</sup>。肿瘤抑制因子(PTEN)是一种脂质磷酸酶,可以抑制 PI3K 的激活,介导 PI3K/AKT 丧失活性<sup>[18]</sup>。在一项关于黑色素瘤基因谱研究的报告中发现, PTEN 的缺失与 IFN- $\gamma$  的低表达和 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润减少显著相关<sup>[19]</sup>, 实验中运用 PI3K 抑制剂疗法,增加了 PTEN 蛋白表达,下调了 AKT 和 STAT3 信号通路的表达,抑制了黑色素瘤小鼠模型肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭、上皮-间质转化和黑色素合成,增强了抗 PD-1/PD-L1 抑制剂或抗 CTLA4 单抗的敏感性,改善了免疫检查点疗法的耐药<sup>[20]</sup>。

IFN- $\gamma$  信号通路不仅促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞激活和 Th1 细胞免疫应答,还通过抗增殖作用,达到促进细胞凋亡及诱导肿瘤细胞主要组织相容复合体上调<sup>[21]</sup>。回顾性研究发现对抗 PD-1 和抗 CTLA-4 治疗中临床失应答患者中,多表现为 JAK1/2 和 IFNGR1/2 基因突变的肿瘤<sup>[22]</sup>,对 ICIs 治疗耐药病例黑色素瘤组织样本进行通路基因测序,发现 IFN- $\gamma$  信号通路基因比例明显高于产生应答的组织样本,且缺少如 IFNGR1、IRF1、JAK2 和 IFNGR2 等 IFN- $\gamma$  信号通路基因组<sup>[23]</sup>,提示耐药患者肿瘤中包含更多的基因组缺陷,该缺陷引起的 IFN- $\gamma$  信号通路异常是产生治疗耐药的机制之一。

肿瘤细胞中 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活与 ICIs 耐药有关。在荷瘤小鼠模型中观察到, WNT 抑制剂激活了抗 PD-1 抑制剂抗胶质母细胞瘤作用,使 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞和 IFN- $\gamma$  在胶质母细胞瘤组织中的表达,恢复了抗 PD-1 治疗敏感性,表明 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制了胶质母细胞瘤细胞的生长和迁移,增加免疫抑制剂疗效<sup>[24]</sup>。Ruiz 等<sup>[25]</sup>研究发现,  $\beta$ -catenin 的异常激活会损伤肝癌细胞中 CD103<sup>+</sup> 树突状细胞募集,抑制了抗肿瘤免疫反应,而这种有功能缺陷的树突状细胞又可以损伤肝中抗原特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的存在,削弱抗 PD-1 治疗敏感性,阐释了  $\beta$ -catenin 信号通路的表达与抗 PD-

## 1 治疗耐药之间的联系。

MAPK 信号通路的过度激活也可能与 ICI 治疗耐药有关。在诱导黑色素瘤样本中, MAPK 信号通路抑制了 T 细胞募集及其功能, 抑制 MAPK 信号通路促进 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活化和浸润, 并检测到肿瘤抗原表达<sup>[26]</sup>。此外, 抗 PD-1 抑制剂和 BRAF、MEK 的短期双重抑制相结合可以增强肿瘤免疫浸润并改善肿瘤消退, 这表明 MAPK 抑制剂作用机制可能介导对抗 PD-1 治疗耐药<sup>[27]</sup>。

### 1.3 肿瘤微环境改变

作为肿瘤细胞依赖的生存场所, 肿瘤微环境具有导致慢性炎症、组织缺氧及免疫抑制的特性, 影响肿瘤的发生发展, 其变化对免疫应答及肿瘤治疗耐药的影响具有十分重要的作用。介导肿瘤微环境恢复正常稳态是提高免疫应答, 增加治疗敏感性以改善耐药的重要方法<sup>[28]</sup>。肿瘤微环境介导一系列细胞串扰和细胞到细胞外基质通信。这种相互作用诱导了免疫逃避, 也介导了细胞外基质重塑的可溶性因子释放, 导致了治疗耐药的产生, 同时循环失调的 microRNA 和肿瘤微环境特异性代谢模式也进一步导致了 ICI 耐药。除了信号通路外, 低氧环境、代谢紊乱和异常机械力等特定特征也与治疗耐药有关<sup>[29]</sup>。

Briere 等<sup>[30]</sup>在接受抗 PD-1 治疗的 Kras<sup>G12C</sup> 突变小鼠荷瘤模型中, 观察到突变基因主要负责介导免疫抑制, 当联合使用 Kras<sup>G12C</sup> 抑制剂时则观察到, 肿瘤内骨髓来源的抑制细胞减少和 M1 极化巨噬细胞、树突状细胞、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞的增加, 且 T 细胞多样性增加, 介导了肿瘤杀伤细胞和免疫抑制逆转后免疫系统识别的肿瘤抗原数量的增加, 获得了适应性肿瘤免疫, 显示出持久的免疫应答能力, 提示修复肿瘤微环境, 可以恢复对 ICI 敏感性达到缓解治疗耐药的目的。有研究通过 ICI 联合使用西达本胺加塞来昔布治疗实体瘤小鼠模型, 观察到免疫抑制调节性 T 细胞、髓源性抑制细胞和肿瘤相关巨噬细胞的数量减少, 上调了 IFN- $\gamma$  相关基因表达, 通过改变肿瘤浸润淋巴细胞免疫逃逸, 激活肿瘤微环境中的免疫细胞, 增强了免疫治疗敏感性<sup>[31]</sup>。

### 1.4 表观遗传学机制

表观遗传改变参与了肿瘤微环境的重塑, 促进了肿瘤的生长, 激活了免疫逃逸系统, 染色质重塑通过染色质重塑复合物的突变参与了对 ICI 的耐药。PBAF 是一种染色质调节复合物 (PBRM1、

ARID2 和 BRD7), 可调节肿瘤细胞内 IFN- $\gamma$  通路的染色质可及性, 从而提高对 T 细胞介导的细胞毒性的耐药<sup>[32]</sup>。研究发现, 基于上皮间质转化信号通路的识别, 发现上皮间质转化、免疫细胞的消耗、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T 细胞的低表达和 ICI 之间的关系, 上皮间质转化的表观调控与 ICI 治疗敏感性有关, 影响 ICI 耐药<sup>[33]</sup>。研究通过测序和数据分析评估 ADAMTSL5 基因甲基化状态, 对 ADAMTSL5 基因 RNA 和蛋白质在小鼠模型和肝癌患者样本中的表达进行分析, 得出高甲基化基因体 CpG 岛与 ADAMTSL5 基因高表达有关, 该基因靶向干扰体内外肝癌细胞致瘤特性, 使 EGFR、PDGFR $\beta$ 、IGF1R $\beta$  和 FGFR4 的表达处于较低水平, 而这些表型与 ICI 对肝癌细胞敏感性有关。以上研究均提示表观遗传激活基因介导了对 ICI 的耐药<sup>[34]</sup>。

## 2 肠道微生物群与免疫检查点抑制剂耐药机制的联系

人类肠道微生物群由 10<sup>14</sup> 种常驻微生物组成, 肠道微生物群在调节免疫、保护胃肠道功能、提供营养物质和新陈代谢中具有重要作用<sup>[35]</sup>, 并在调节接受 ICI 治疗的患者的免疫反应中发挥关键作用<sup>[36]</sup>。

为探究新抗原对 ICI 临床应答情况, 通过研究肿瘤组织及血液中免疫激活模式<sup>[37]</sup>, 利用 MHC-抗原肽多聚体技术对新抗原特异性 T 细胞的追踪与纯化, 发现抗 CTLA-4 治疗的功效取决于针对某些脆弱拟杆菌抗原特异性的免疫反应, 同时明确肿瘤细胞和肠道微生物群之间的免疫相似性程度, 并将其归结为“肿瘤抗原相似性”(TAS)。类似研究还表明, CD4<sup>+</sup>T 细胞的免疫原性往往与有相似序列的微生物群的性质有关<sup>[38]</sup>, 微生物群衍生的信号能够将抗原引起的 CD4<sup>+</sup>T 细胞极化为不同的 T 细胞亚群, 从而激活不同的免疫反应。所以肠道微生物群和肿瘤新抗原之间的抗原相似性, 影响了免疫检查点抑制剂的功效, 因此有理由推测, 改善肠道微生物群可以缓解由新抗原免疫应答异常引起的 ICI 耐药<sup>[39]</sup>。

作为肿瘤微环境的重要组成部分, 肠道微生物群和改善 ICI 药物疗效间的作用是相互影响且互为因果的。Gong 等<sup>[40]</sup>通过口服拟杆菌属或伯克霍尔德氏菌属混合喂养荷瘤小鼠模型, 发现经过添加菌群喂养的小鼠恢复了抗 CTLA-4 治疗的疗效, 考虑与肿瘤引流淋巴结 TH1 细胞免疫应答和树突状

细胞成熟有关<sup>[41]</sup>。该研究还发现, 抗生素治疗会对影响肉瘤和黑色素瘤小鼠 ICI 治疗效果<sup>[42]</sup>, 运用 *A. muciniphila* 菌和 *E. hirae* 菌共同喂养后, 可提高小鼠对 ICI 治疗敏感性, 缓解治疗耐药。肠道微生物群是调节内环境稳态、干预抗肿瘤治疗的重要方法, 已被证明是介导骨髓细胞浸润肿瘤、促进活性氧产生治疗肿瘤的必需条件<sup>[43]</sup>。肠道微生物群对 ICI 药物的免疫治疗影响是由于 ICI 破坏黏液层内肠上皮内淋巴细胞和肠上皮细胞之间的稳态平衡, 诱导不同拟杆菌属的积累, 引起 IL-12 依赖性 Th1 细胞免疫反应, 有利于宿主激活肿瘤内树突状细胞加工和呈递机制对抗肿瘤<sup>[44]</sup>。

基于肠道微生物群与免疫检查点抑制剂耐药机制间的联系, 肠道微生物群的调节成为当前抗肿瘤治疗的一种新颖的辅助手段, 同时也是监测 ICI 治疗耐药的生物标志物<sup>[45]</sup>。监测肠道微生物群组成及菌群丰度的变化, 预测 ICI 疗法是否产生临床应答, 为及时纠正治疗方案提供客观证据。

### 3 改善肠道微生物群提高免疫检查点抑制剂疗效的研究

无论是缓解由新抗原异常免疫应答, 还是促进树突状细胞成熟或是改变肿瘤内环境, 肠道微生物群对肿瘤免疫的影响越来越受到重视。研究肠道微生物群与 ICI 疗效的相关性, 为解决耐药问题提供新途径, 改善肠道微生物群丰度与组成并联合益生菌临床应用对提高 ICI 的抗肿瘤药理作用, 增加治疗敏感性以缓解耐药被寄予厚望<sup>[46]</sup>。一些研究揭示了影响 ICI 疗效的肠道微生物群的组成变化。

肠菌移植技术作为改善肠道微生物群的有效方式, 已被运用在抗 PD-1 治疗中转移性难治性黑色素瘤患者, 取得良好疗效。Baruch 等<sup>[47]</sup>通过联合口服肠道微生物群的治疗方式, 对粪便样本进行免疫组化分析及 RNA 测序, 评估免疫细胞浸润情况和活性表达, 发现经过肠菌移植后的肠道黏膜固有层及肿瘤微环境中免疫细胞浸润和基因表达谱均发生有利变化, 肠道微生物群中益于免疫治疗的韦荣氏球菌属、瘤胃球菌属丰度提高, 双歧杆菌丰度下降, 共同调节 T 细胞促进免疫耐受, 改善了抗 PD-1 治疗耐药。Davar 等<sup>[48]</sup>通过肠镜下肠道微生物群定植, 发现可以引起肠道微生物群快速而持久的改变, 在接受抗 PD-1 治疗的黑色素瘤产生临床应答的患者, 同样表现出微生物群丰度的增加, CD8<sup>+</sup>T 细胞活化增加及 IL-8 髓样细胞低表达, 阐明

重新调控肿瘤微环境可以克服晚期黑色素瘤患者对抗 PD-1 治疗的耐药。

微生物组分析结果表明<sup>[49]</sup>, 双歧杆菌在基于抗 PD-1 治疗肿瘤生长延迟的小鼠中丰度增加, 口服双歧杆菌益生菌可以恢复对肠道微生物群失调小鼠的肿瘤耐药, 其机制可能是介导了树突状细胞的成熟, 提高肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活性。研究将对 ICI 治疗敏感的肿瘤患者肠道微生物群移植到荷瘤小鼠体内, 达到提高抗 PD-1 治疗的抗肿瘤作用。结果显示, ICI 的治疗效果与 *Akkermansia muciniphila* 的相对丰度相关, 口服补充 *Akkermansia muciniphila* 的微生物群制剂, 可以通过树突状细胞和 IL-12 依赖性方式增加小鼠肿瘤组织中 CCR9<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞的募集, 增加 IFN- $\gamma$  的分泌, 恢复对 PD-1 受体的阻滞<sup>[50]</sup>。作为肿瘤微环境的组成部分, 肠道微生物群的优化可以恢复 T 细胞功能, 改善由免疫耐受的微生物群引起的代谢变化导致的肿瘤治疗耐药。通过宏基因组学研究分析了经抗 PD-1 治疗耐药患者的粪便样本, 与治疗敏感患者粪便样本进行比较发现, 富含梭菌及瘤胃球菌的患者更容易对抗 PD-1 抑制剂产生有效临床应答, 粪杆菌丰度高的患者具有更长的生存期<sup>[50]</sup>。免疫治疗的失败和肿瘤的发生发展, 与肠道微生物群的减少及组成失调有直接关系, 调节肠道微生物群改善肿瘤微环境可以重新诱导对抗 PD-1 免疫治疗的耐药, 部分微生物群可以召集免疫细胞抵抗肿瘤, 提高免疫治疗的疗效<sup>[51]</sup>。肠道微生物群的多样性和稳定性与肿瘤的生长之间似乎存在一定的相关性, 免疫监视和清除可能是它们之间的联系。肠道微生物群丰度的变化对肿瘤的预后具有相关性影响, 微生物群丰度越高, 预后越好<sup>[52]</sup>。

### 4 小结

免疫检查点抑制剂在肿瘤治疗中广泛运用, 已成为不可代替的治疗手段, 但原发性或继发性耐药也是不可回避且亟待解决的临床问题, 本文通过对 ICI 耐药相关机制的研究, 发现新抗原的低可用性、信号通路异常表达、肿瘤微环境改变及表观遗传学等机制, 可能导致 ICI 治疗时的免疫耐药。本文探究肠道微生物群在产生治疗耐药中的作用, 基于 ICI 耐药相关机制, 发现通过改善肠道微生物群可以提高 ICI 治疗敏感性以缓解治疗耐药, 为临床解决治疗耐药探寻新的方法并予以一定理论支撑。

## 参考文献:

- [ 1 ] Carlino MS, Larkin J, Long GV. Immune checkpoint inhibitors in melanoma [J]. *Lancet*, 2021, 398(10304): 1002–1014.
- [ 2 ] Tang S, Qin C, Hu H, et al. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: progress, challenges, and prospects [J]. *Cells*, 2022, 11(3): 320.
- [ 3 ] Lee NY, Ferris RL, Psyrri A, et al. Avelumab plus standard-of-care chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22(4): 450–462.
- [ 4 ] Armengol M, Santos JC, Fernández-Serrano M, et al. Immune-checkpoint inhibitors in B-cell lymphoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(2): 214.
- [ 5 ] Choueiri TK, Powles T, Burotto M, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(9): 829–841.
- [ 6 ] Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, et al. Adjuvant nivolumab versus placebo in muscle-invasive urothelial carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(22): 2102–2114.
- [ 7 ] Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: a review [J]. *J Cutan Pathol*, 2021, 48(3): 411–421.
- [ 8 ] Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 27–40.
- [ 9 ] Llovet JM, De Baere T, Kulik L, et al. Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(5): 293–313.
- [ 10 ] Vafaei S, Zekiy AO, Khanamir RA, et al. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs); a new frontier [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 2.
- [ 11 ] Wastyk HC, Fragiadakis GK, Perelman D, et al. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status [J]. *Cell*, 2021, 184(16): 4137–4153.
- [ 12 ] Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, et al. The challenges of tumor mutational burden as an immunotherapy biomarker [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(2): 154–173.
- [ 13 ] Veldman J, Visser L, Berg AVD, et al. Primary and acquired resistance mechanisms to immune checkpoint inhibition in Hodgkin lymphoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2020, 82: 101931.
- [ 14 ] Fang X, Guo Z, Liang J, et al. Neoantigens and their potential applications in tumor immunotherapy [J]. *Oncol Lett*, 2022, 23(3): 88.
- [ 15 ] Mandal R, Samstein RM, Lee KW, et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response [J]. *Science*, 2019, 364(6439): 485–491.
- [ 16 ] Kwon M, An M, Klemptner SJ, et al. Determinants of response and intrinsic resistance to PD-1 blockade in microsatellite instability-high gastric cancer [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(9): 2168–2185.
- [ 17 ] Zughalbi TA, Suhail M, Tarique M, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR pathway by different flavonoids: a cancer chemopreventive approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12455.
- [ 18 ] Bai J, Gao Z, Li X, et al. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(66): 110693–110707.
- [ 19 ] di Leo L, Bodemeyer V, Bosisio FM, et al. Loss of Ambra1 promotes melanoma growth and invasion [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2550.
- [ 20 ] Chen J, Huang L, Quan J, et al. TRIM14 regulates melanoma malignancy via PTEN/PI3K/AKT and STAT3 pathways [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(9): 13225–13238.
- [ 21 ] Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, et al. Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 [J]. *Immunity*, 2022, 55(9): 1749.
- [ 22 ] Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(2): 188–201.
- [ 23 ] Gao J, Shi LZ, Zhao H, et al. Loss of IFN- $\gamma$  pathway genes in tumor cells as a mechanism of resistance to anti-CTLA-4 therapy [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 397–404.
- [ 24 ] Zhang H, Bi Y, Wei Y, et al. Blocking Wnt/ $\beta$ -catenin signal amplifies anti-PD-1 therapeutic efficacy by inhibiting tumor growth, migration, and promoting immune infiltration in glioblastomas [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20(7): 1305–1315.
- [ 25 ] Ruiz de Galarreta M, Bresnahan E, Molina-Sánchez P, et al.  $\beta$ -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(8): 1124–1141.
- [ 26 ] Brägelmann J, Lorenz C, Borchmann S, et al. MAPK-pathway inhibition mediates inflammatory reprogramming and sensitizes tumors to targeted activation of innate immunity sensor RIG-I [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5505.
- [ 27 ] Wang Y, Liu S, Yang Z, et al. Anti-PD-1/L1 lead-in before MAPK inhibitor combination maximizes antitumor immunity and efficacy [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(10): 1375–1387.
- [ 28 ] Khalaf K, Hana D, Chou JT, et al. Aspects of the tumor microenvironment involved in immune resistance and drug resistance [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 656364.
- [ 29 ] Pan G, Liu Y, Shang L, et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(3): 199–217.
- [ 30 ] Briere DM, Li S, Calinisan A, et al. The KRAS<sup>G12C</sup> inhibitor MRTX849 reconditions the tumor immune microenvironment and sensitizes tumors to checkpoint inhibitor therapy [J]. *Mol Cancer*

- Ther, 2021, 20(6): 975–985.
- [31] Chen JS, Chou CH, Wu YH, et al. CC-01 (chidamide plus celecoxib) modifies the tumor immune microenvironment and reduces tumor progression combined with immune checkpoint inhibitor [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1100.
- [32] Pan D, Kobayashi A, Jiang P, et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing [J]. *Science*, 2018, 359(6377): 770–775.
- [33] Taki M, Abiko K, Ukita M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4669–4679.
- [34] Arechederra M, Bazai SK, Abdoumi A, et al. ADAMTSL5 is an epigenetically activated gene underlying tumorigenesis and drug resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(4): 893–906.
- [35] Waller KMJ, Leong RW, Paramsothy S. An update on fecal microbiota transplantation for the treatment of gastrointestinal diseases [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2022, 37(2): 246–255.
- [36] Wu J, Wang S, Zheng B, et al. Modulation of gut microbiota to enhance effect of checkpoint inhibitor immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 669150.
- [37] Boesch M, Baty F, Rothschild SI, et al. Tumour neoantigen mimicry by microbial species in cancer immunotherapy [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(3): 313–323.
- [38] Carrasco Pro S, Lindestam Arlehamn CS, Dhanda SK, et al. Microbiota epitope similarity either dampens or enhances the immunogenicity of disease-associated antigenic epitopes [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196551.
- [39] Leng Q, Tarbe M, Long Q, et al. Pre-existing heterologous T-cell immunity and neoantigen immunogenicity [J]. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(3): e01111.
- [40] Gong J, Chehrizi-Raffle A, Placencio-Hickok V, et al. The gut microbiome and response to immune checkpoint inhibitors: preclinical and clinical strategies [J]. *Clin Transl Med*, 2019, 8(1): 9.
- [41] Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota [J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1079–1084.
- [42] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 91–97.
- [43] Murtas G, Sacchi S, Tedeschi G, et al. Antimicrobial D-amino acid oxidase-derived peptides specify gut microbiota [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(7): 3607–3620.
- [44] Coutzac C, Jouniaux JM, Paci A, et al. Systemic short chain fatty acids limit antitumor effect of CTLA-4 blockade in hosts with cancer [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2168.
- [45] Rezasoltani S, Yadegar A, Asadzadeh Aghdai H, et al. Modulatory effects of gut microbiome in cancer immunotherapy: a novel paradigm for blockade of immune checkpoint inhibitors [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(3): 1141–1154.
- [46] Lee SH, Cho SY, Yoon Y, et al. *Bifidobacterium bifidum* strains synergize with immune checkpoint inhibitors to reduce tumour burden in mice [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(3): 277–288.
- [47] Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients [J]. *Science*, 2021, 371(6529): 602–609.
- [48] Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2021, 371(6529): 595–602.
- [49] Jin Y, Dong H, Xia L, et al. The diversity of gut microbiome is associated with favorable responses to anti-programmed death 1 immunotherapy in Chinese patients with NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(8): 1378–1389.
- [50] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients [J]. *Science*, 2018, 359(6371): 97–103.
- [51] Shui L, Yang X, Li J, et al. Gut microbiome as a potential factor for modulating resistance to cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2989.
- [52] Spencer CN, McQuade JL, Gopalakrishnan V, et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response [J]. *Science*, 2021, 374(6575): 1632–1640.

[收稿日期]2022-02-28

马晓月,李钦钦,陆华贞,等.非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2023,33(6):120-127.  
Ma XY, Li QQ, Lu HZ, et al. Research progress on animal and cell models of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 120-127.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.017

# 非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展

马晓月<sup>1</sup>,李钦钦<sup>2</sup>,陆华贞<sup>3</sup>,马继艳<sup>4</sup>,林宇宁<sup>5</sup>,陈婉君<sup>5</sup>,陈永欣<sup>5\*</sup>

(1.广西中医药大学瑞康临床医学院,南宁 530001;2.广西中医药大学护理学院,南宁 530200;  
3.苏州大学护理学院,江苏 苏州 215006;4.广西中医药大学第一临床医学院,南宁 530001;  
5.广西中医药大学基础医学院,南宁 530200)

**【摘要】** 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的建模方法一直是研究的重点,根据不同的实验目的选择合适的动物模型和细胞模型对于研究非酒精性脂肪肝的发病机制具有重要意义。目前常用的建模方法有高脂高糖饲料、胆碱-蛋氨酸缺乏(MCD)、药物诱导、饱和或不饱和脂肪酸诱导等。其中,大鼠、小鼠、基因鼠及细胞在非酒精性脂肪肝模型中使用最频繁,因此本文重点围绕非酒精性脂肪肝的大鼠、小鼠、基因缺陷鼠及细胞模型的研究进展进行综述。

**【关键词】** 非酒精性脂肪肝;动物模型;细胞模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0120-08

## Research progress on animal and cell models of nonalcoholic fatty liver disease

MA Xiaoyue<sup>1</sup>, LI Qinqin<sup>2</sup>, LU Huazhen<sup>3</sup>, MA Jiyan<sup>4</sup>, LIN Yuning<sup>5</sup>, CHEN Wanjun<sup>5</sup>, CHEN Yongxin<sup>5\*</sup>

(1. Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China.  
2. School of Nursing, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200. 3. School of Nursing, Suzhou University, Suzhou 215006. 4. the First School of Clinical Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001. 5. Basic Medical College, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200)

**【Abstract】** The modeling method of non-alcoholic fatty liver has always been a research focus. The selection of appropriate animal and cell models in accordance with experimental purposes is of great significance to study the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. The commonly used modeling method are high fat and sugar feeding, choline-methionine deficiency, drug induction, and saturated or unsaturated fatty acid induction. Rats, mice, gene-modified mice, and cells are most frequently used to model non-alcoholic fatty liver. This review focuses on the research progress of rats, mice, genetically defective mice, and cell models of non-alcoholic fatty liver.

**【Keywords】** nonalcoholic fatty liver; animal model; cell model

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

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD),又称为“富贵病”,是一种以除酒精和其他明确的损肝因素所致的肝细胞脂肪变性和肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理

**【基金项目】** 广西自然科学基金项目青年科学基金项目(2020GXNSFBA159043);2022年自治区级大学生创新创业训练计划项目(S202210600107, S202210600103);2021年自治区级大学生创新创业训练计划项目(S202110600087, S202110600100);广西中医药大学2019~2021年广西一流学科建设开放课题项目(2019XK083);2020年广西中医药大学一方制药大学生科技创新课题(2020DXS47)。

**【作者简介】** 马晓月(2001—),女,在读本科生,研究方向:中医药防治肝病的基础研究。E-mail:2306213932@qq.com

**【通信作者】** 陈永欣(1988—),女,副教授,硕士研究生导师,硕士,研究方向:中医药防治肝病的基础研究。E-mail:965643897@qq.com

综合征,包括从单纯性脂肪肝 (NAFL) 到非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、非酒精性脂肪性肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[1-2]</sup>。近年来, Eslam 等<sup>[3]</sup> 为了更准确地反映其发病机制,建议将 NAFLD 更名为代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)。据临床调查研究显示, NAFLD 常常与糖尿病、高脂血症及肥胖等疾病相关,其发生原因与饮食结构、生活方式等有密切联系。NAFLD 一般从病史、临床表现、影像学、血清学和组织病理学进行诊断,目前普遍将脂肪变性作为其最基本的病理学表现<sup>[4]</sup>。肝活检是评价 NAFLD 的金标准,肝活检标本的肝脂肪变在 5% 以上可诊断 NAFLD,用肝活检可以区分 NAFL 与 NASH,并评价肝纤维化程度。NAFLD 的病理过程复杂,本文就与人类 NAFLD 相似的动物模型与细胞模型研究进展作一综述,依据不同模型出现的组织病理学改变,以期进一步研究本病的发病机制与治疗药物。

## 1 非酒精性脂肪肝大鼠模型

大鼠体型适中,生育能力与采血能力较强。结合 NAFLD 的发病机制,可以将大鼠分为营养型模型、药物型模型和特殊品系模型。营养型模型的造模方法是喂养大鼠高糖、高糖、高热量,或者制造 MCD;药物型模型通过施加四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>)、四环素、多氯联苯 118 等药物,使药物发挥药效甚则引起中毒达到建造模型的目的;特殊品系模型是选取某些可以自发形成脂肪肝、高脂血症等与 NAFLD 关系密切的疾病或者是可以自发出现 NAFLD 相关症状的大鼠。现阶段实验室构造 NAFLD 疾病常用的大鼠模型有 Wistar 大鼠、SD 大鼠、Zucker 大鼠等。

### 1.1 Wistar 大鼠模型

Wistar 大鼠是我国实验室研究中引进最早、使用最广泛,数量最多的品种。Gheibi 等<sup>[5]</sup> 通过对雄性 Wistar 大鼠喂食含有 35% 脂肪 (31.6% 饱和脂肪和 3.2% 不饱和脂肪), 57% 的可代谢能量的高脂饮食持续 14 d 来诱导大鼠 NAFLD 模型。周琪等<sup>[6]</sup> 选择健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠进行多氯联苯 118 (PCB118) 与玉米油的对照实验,持续 13 周,实验表明,慢性低浓度 PCB118 以剂量依赖方式诱导肝脏组织,血清学表现为 ALT、TG、TC、GLU、LDL-C、HDL-C 水平显著增加,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、MMP-

2、 $\alpha$ -SMA mRNA 水平显著增加,病理学 HE 染色示肝脏脂肪变性、炎症浸润,肝小叶结构紊乱,明显纤维化,表现出 NAFLD 的症状。Stephen 等<sup>[7]</sup> 将 Wistar 大鼠饲养在 (21 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C 的室温、(50 $\pm$ 20)% 的相对湿度和 12 h 的明暗 (L/D) 循环下,用植物油 (1:1) 稀释的 CCl<sub>4</sub> 1 mL/kg,每周 2 次腹腔注射,模型体重升高,病理学显示肝细胞出现肝毒性,肝损伤,血清学 ALT、ALP、AST 和 GGT 等敏感酶升高。孙红爽等<sup>[8]</sup> 对清洁级雄性 Wistar 大鼠给予自制高热量饲料 (配方:22% 猪油+8% 糖+2% 胆固醇+2% 食盐+66% 基础饲料),饮用自来水,大鼠食欲减退、肥胖、肝指数显著增大,病理学显示肝组织发生脂肪变性 with 纤维化,且 AST、ALT、血糖、血脂、胰岛素及炎性因子 TNF- $\alpha$  水平均显著升高,大鼠表现 NAFLD 疾病特征。

Wistar 大鼠有性周期稳定、繁殖力强、易于繁殖、生长发育快、对传染病的抵抗力较强等特点。其优良的抵制传染病能力和低自发性肿瘤发生率,使其不容易产生其他疾病。该大鼠杂食,解剖和生理性质与人相似,生长及代谢快,对营养缺乏十分敏感,其特性适用于各种营养、代谢性疾病研究,但该大鼠的生活习性繁殖规律容易受到外界环境方面的影响,所以用于建造 NAFLD 的过程中受到外界干扰较大,很容易影响实验结果,且世界各地饲养 Wistar 大鼠的遗传状况差异较大,使用此类大鼠时,应注意甄别。

### 1.2 SD 大鼠模型

SD 大鼠是用 Wistar 大鼠培育而成的品种,拥有许多优点,也是现阶段 NAFLD 大鼠模型中最常用的大鼠类型,其中以雄性 SD 大鼠和清洁级大鼠最为多见。Amirinejad 等<sup>[9]</sup> 选择 18 只 SD 大鼠进行高脂饮食,持续 7 周,模型组体重升高,食量增加、低密度脂蛋白胆固醇、AST、肝脂肪变性和 NAFLD 在预防阶段结束时均高于其他组,成功造出大鼠 NAFLD 模型。林敏华等<sup>[10]</sup> 选择 16 只 SD 大鼠随机分组后进行普通饲料与高脂饲料的对照喂养,6 周后病理学发现高脂饲料组中 87.5% 大鼠肝脂肪变程度 > 33%,肝细胞体积增大,细胞质中出现大小不等的脂肪空泡,细胞核被推向一边,部分区域可见炎细胞浸润,提示成功造出高脂饮食大鼠 NAFLD 模型。Qin 等<sup>[11]</sup> 对成年 SD 大鼠进行常规饮食 (60% 碳水化合物,25% 蛋白质,8% 脂肪) 与高脂饮食 (HFD,

50%碳水化合物,15%蛋白质,35%脂肪)对照喂养,5 周后高脂饮食大鼠肝组织病理学显示肝细胞肿胀、局灶性坏死,出现 NAFLD 的相关症状和体征。金毅等<sup>[12]</sup>选择 SPF 级雄性 SD 大鼠进行 CCl<sub>4</sub> 组与溶媒组的对照实验,给予 CCl<sub>4</sub> 模型组每周 2 次,每次 2 mL/kg 的 CCl<sub>4</sub>(40% CCl<sub>4</sub> 溶于橄榄油)皮下注射,溶媒组做相同处理,注射部位改为背部皮下,注射用物改为橄榄油,实验持续 4 周,组织病理学观察肝表面发黄,重量增加,以大泡性脂肪变性为主的病变,提示大鼠已经患 NAFLD。陈新群等<sup>[13]</sup>将一组大鼠进行胆碱的氨基酸饮食喂养,另一组给予缺乏胆碱的氨基酸饮食建立 NAFLD 模型,结果是缺乏胆碱的氨基酸饮食可诱导大鼠肝组织病理学呈现变性、坏死、再生等形态,出现脂肪肝变,甚至肝纤维化。李易水等<sup>[14]</sup>使用 60 只清洁级 SD 雄性大鼠随机分组,喂养高脂饲料(78.8%基础饲料+15%猪油+1%胆固醇+5%蔗糖+0.2%胆酸钠)建立大鼠 NAFLD 模型,以血清中 TC、TG、ALT、AST、TNF- $\alpha$  以及肝组织中 TC、TG、FFA 的含量或活性、肝脏中 TLR4、MyD88 和 JNK 的 mRNA 和蛋白表达及 p-JNK 的蛋白表达水平显著升高,IL-10 的含量显著降低,病理学大鼠肝细胞内出现大小不一的脂滴空泡和气球样变为造模成功的标准。廖庆辉等<sup>[15]</sup>将 24 只 SD 大鼠随机分成正常组和模型组,两组大鼠均正常饮食,模型组另使用 5% CCl<sub>4</sub> 花生油溶液(0.3 mL/10 g)多点皮下注射,每 5 d 1 次,病理学显示肝细胞肿胀,胞质疏散,含脂肪粒,肝细胞核固缩,肝组织 UCP2mRNA 和蛋白表达均明显高于正常组,建立 NAFLD 大鼠模型。车兴影等<sup>[16]</sup>对新生 SD 大鼠自出生第 2、4、6、8、10 天皮下注射谷氨酸钠(MSG)溶液,病理学检测肝细胞发生脂肪变性伴炎性细胞浸润,肝重、ALT、AST、ALP 水平升高,诱导产生出 NAFLD 模型。

SD 大鼠性格较为暴躁,生长周期较长,所以有较为顽强的生命力,饲养过程中不易死亡,并且生长发育较 Wistar 大鼠更快,繁殖力更强。它对血压及血管阻力对药物反应敏感,使用药物作用在此类动物模型身上,观察其心血管反应取得 NAFLD 的模型效果明显。而且适应性和抗病能力更强,容易饲养并且不容易患其他疾病而影响实验结果,但是其价格较贵,饲养的规模没有 Wistar 大鼠广泛。

### 1.3 Zucker 大鼠

遗传性肥胖 Zucker 大鼠,它是由 Fa 基因突变

而成的隐性基因 fa 所致,包括瘦型和肥胖型两个亚系,又称 fa/fa 大鼠,是一种肥胖遗传大鼠,为广泛应用的遗传性肥胖病模型,可自发形成糖尿病、肥胖、NAFLD,表现为贪食、肥胖、肝脂肪变性、高胰岛素血症和胰岛素抵抗<sup>[17]</sup>。此类大鼠进食量大、食欲亢进,KLP 酶的合成和降解速度加快。肥胖 2 型糖尿病大鼠(Zucker diabetic fatty rats,ZDF 大鼠)是在肥胖型 Zucker 大鼠中发现的能够发展成严重的 2 型糖尿病的大鼠,非常类似于人类肥胖,也经常用于 NAFLD 模型建造。Matsumoto 等<sup>[18]</sup>对照喂养 7 周龄的雄性肥胖 Zucker(fa/fa)大鼠,使用 53%玉米淀粉喂养大鼠,病理数据提示肝细胞中有大脂滴,ALP、ALT 和 AST 等标志物的血浆水平明显升高,大鼠出现 NAFLD 疾病。Hong 等<sup>[19]</sup>用肥胖遗传的 Zucker 大鼠喂食含有大豆油的 AIN-93G 饮食,大鼠的采食量、体重均增加,病理学显示肝组织发生明显脂肪变性,ALT、AST 等功能相关的生物标志物升高等 NAFLD 的表现。

该类大鼠是从肥胖基因遗传的角度来建造 NAFLD 动物模型,会自发地形成 NAFLD 相关的症状或疾病,符合人类发生 NAFLD 的过程,同时从基因的独特角度诠释了 NAFLD 的发病,为多角度研究 NAFLD 提供了新思路,同时缩短了建造 NAFLD 的时间,极大地提高了效率。

## 2 非酒精性脂肪肝小鼠模型

小鼠基因组 93%的区域排列顺序与人类相似,其具有饲养廉价、繁殖迅速、易于造模、个体间差异小便于平行实验的观察等特点,NAFLD 小鼠模型可模拟不同致病因素及 NAFLD 每个阶段的病情发展,指导寻找出 NAFLD 的发病机制和其潜在的治疗靶点,也可用于 NAFLD 药物的筛选评估,与 NAFLD 的研究密切相关。小鼠模型有高脂高糖饲料、皮下注射 CCl<sub>4</sub>、灌胃肠营养液等诱导,主要的方式是高脂饮食。当前实验研究中常用的小鼠有 C57BL/6J 小鼠、昆明小鼠、基因缺陷小鼠等。

### 2.1 C57BL/6J 小鼠

C57BL/6 小鼠对肥胖、2 型糖尿病和 NAFLD 的发展具有固有的方向偏好,是研究 NAFLD 疾病常用的动物模型。石英等<sup>[20]</sup>用 32 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠,置于 12 h 的光照下循环和温度控制的环境,高脂肪饮食(Research Diet D12492)24 周后,病理学检测其肝大量脂滴沉积,形成空泡样变,

形成小鼠 NAFLD 模型。有学者改良了高脂饮食,将普通鼠粮研磨成粉末,蛋黄碾碎用漏斗过筛,豆油和猪油在锅中加热至冒烟,趁热将普通鼠粮(59%)、猪油(15%)、豆油(3%)、绵白糖(18%)、蛋黄(5%)倒入大盆中搅匀,加热水拌好,压成条状,放入鼓风干燥箱中 100℃干燥制成,12 周后,病理学检测肝细胞肿胀,含有大量的脂肪沉积、坏死,细胞间质可以看见有大量的炎细胞聚集<sup>[21]</sup>。冯钟文等<sup>[22]</sup>每天腹腔注射地塞米松 1 mg/kg,同时联合高脂饲料喂养 23 d,模型组小鼠肝细胞内病理学检测出现大量红色脂滴,血清检测 ALT、AST、TG、TC、LDL 水平显著升高,HDL 水平显著降低,形成小鼠 NAFLD 模型。李晓冲等<sup>[23]</sup>除给小鼠喂养高脂饮食外,还给小鼠注射 CCl<sub>4</sub> 溶液,首次给小鼠皮下注射 CCl<sub>4</sub> 溶液时,以 0.72 ml/100 g 剂量注射,接下来的 3 周每周 1 次 0.42 ml/100 g,40%的 CCl<sub>4</sub> 植物油溶液进行皮下注射,病理学发现,4 周后 2/3 以上的肝细胞发生脂肪变性,8 周时有炎性细胞浸润灶,出现纤维化和大量空泡样变的肝细胞,形成小鼠 NAFLD 模型。马浩鑫等<sup>[24]</sup>采用 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,先适应性喂养 1 周,再给小鼠灌胃肠营养液(配方为 10%蔗糖、10%猪油、3%鸡蛋黄、2%胆固醇、1%胆酸钠、0.5%丙硫氧嘧啶),为减少灌胃对小鼠的应激反应,从小剂量开始逐渐增加,每天两次,持续 16 周,试验期间小鼠自由采食和饮水,14 周时小鼠 TG、TC 含量显著增加,16 周时,小鼠肝内由大量的脂质沉积,试验末期病理学发现小鼠肝细胞出现脂质空泡(超过 30%),形成典型的 NAFLD 病变。

C57BL/6J 可用作同类系、易于繁殖、体格健壮、干预方便,是使用范围最广、销售最好的一支鼠株品种,现用 C57BL/6J 构造 NAFLD 模型,使用最多的方法是高脂饲料诱导,高脂饲料引起 C57BL/6J 小鼠血脂 TC 和 ALT 升高迅速、明显,适合 NAFLD 模型的制作,但是比较难以达到肝硬化阶段。

## 2.2 昆明小鼠

昆明小鼠是我国生产量、使用量最大的远交群小鼠,具有适应力强、繁殖力强、造模成活率高等优点,被广泛应用于药理学、毒理学等领域研究以及药品、生物制品的生产与检定。有学者用 6~8 周龄的雄性昆明小鼠,给予高热量饮食(60%脂肪,20%碳水化合物,20%蛋白质),8 周后病理学显示小鼠肝组织中明显的脂肪沉积,NAFLD 模型建立成功<sup>[25]</sup>。王俊杰等<sup>[26]</sup>给昆明小鼠喂养复合高脂饮食

(基础饲料+2%胆固醇+10%猪油+0.2%丙基硫氧嘧啶+0.5%胆酸钠,构成比均为质量分数)结合腹腔注射 5%CCl<sub>4</sub>,病理学显示第 6 周末变形成了典型的脂肪肝病变,第 8 周末部分小鼠出现了典型的肝纤维化病变,提示 NAFLD 模型成功建立。Liu 等<sup>[27]</sup>首先给予小鼠自由饮水和标准饲料,14 d 后,腹腔注射化学诱导剂 CCl<sub>4</sub>(0.8%,CCl<sub>4</sub>:花生油=1:125,v/v),注射后小鼠禁食 24 h,可获得饮用水,血清学检测小鼠血清 TG、TC 水平显著升高,病理学检测肝组织显示大面积坏死细胞,炎症细胞浸润。

昆明小鼠构建模型所需时间短,小鼠适应力很强,死亡率低,而且价格比较便宜,为 NAFLD 的发病机制和药物筛选研究提供了便利,但是目前用昆明小鼠造模多采用灌胃或腹腔注射配合高脂饲料,不符合动物伦理,易造成死亡率上升。

## 2.3 基因缺陷小鼠

ob/ob 小鼠存在 ob(Lepo)纯合突变,易发生肥胖和脂肪变性,联合高脂饮食等,可进展为 NAFLD 模型。ob/ob 小鼠基因由于自然突变,造成瘦素缺乏,其肝纤维化发生率极低,甚至导致抗纤维化的发生,但人类极少出现瘦素缺乏的情况,故该模型与人类 NAFLD 发病机制存在差异。db/db 小鼠表现类似 ob/ob 小鼠,而瘦素含量比 ob/ob 小鼠高,给小鼠喂养 MCD 饮食,肝脏能出现明显的脂肪变性和纤维化,可作为典型的 NAFLD 模型,用于药物筛选评估<sup>[28-29]</sup>。ob/ob 小鼠和 db/db 小鼠都是遗传性瘦素缺乏和瘦素抵抗类型。黑皮素 4(melanocortin receptor 4, MC4R)可用于调控动物体重,Mc4r<sup>-/-</sup>小鼠通过喂食 HFD,20 周后,出现肥胖并有明显的纤维化,该模型具有研究非酒精性脂肪性肝炎晚期肝功能障碍的潜力<sup>[30]</sup>。于温温等<sup>[31]</sup>给载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠高脂饲料(10.0%猪油、20.0%蔗糖、10.0%蛋黄粉、0.5%胆酸钠和 59.5%常规饲料)喂养 7 周后,小鼠血清 TG、TC 水平显著升高,病理学检查肝可见弥漫性分布的肝细胞大小不均的空泡样变,为显著的肝脂肪变,提示 NAFLD 模型建立。Yang 等<sup>[32]</sup>采用西方饮食喂养肝 CGI-58 基因敲除(LivKO)小鼠,14 周后,病理学显示小鼠肝细胞中出现大量脂滴堆积,NAFLD 模型成功建立。

上述模型中,小鼠的体重明显增加,均发生了肝脂肪变性,但 ob/ob、db/db 小鼠并没有出现肝纤维化和肝的炎症。用基因小鼠缺陷性小鼠制备 NAFLD 模型,成本较高,造模时间长,多用于联合模

型的制造,且多数基因缺陷小鼠与人类 NAFLD 发病机制存在较大的差异,故很少单独用于构建 NAFLD 模型。

## 2.4 其他鼠类模型

**FVB/N 小鼠:**喻兆阳等<sup>[33]</sup>选择 6 周龄健康雌性 FVB/N 小鼠,通过给小鼠尾静脉高压注射生理盐水和 AKT/SB 质粒 1 次,病理学显示 1 周后胞质内充满大小不等的脂肪空泡,少部分细胞有明显的脂肪沉积,2 周后大部分细胞肿胀,细胞出现明显的脂肪沉积,3 周后肝细胞肿胀,呈中至重度脂肪变,部分小鼠肝脏出现多个炎症坏死灶,但未见明显的肝纤维化发生,成功建立 NAFLD 模型。通过该方法建立的模型用时短、死亡率低、成本低、与人类疾病特征相似,可用于今后的临床研究。

**东方田鼠:**东方田鼠在实验条件饲养下易发生脂肪肝病变,在基础饲料上添加 5% 猪油、0.5% 胆固醇、0.1% 胆盐喂养东方田鼠,6 周后,病理学显示肝细胞出现脂肪变性,且为弥漫性脂肪变性,并出现了几个较大的脂肪滴,肝细胞核相对大小不均,成功建立 NAFLD 模型,所需时间较短,可以用于早期临床干预等方面的研究<sup>[34]</sup>。

**ICR 小鼠:**Li 等<sup>[35]</sup>用 7 周的 ICR 小鼠,先安置在温度(23±3)℃、湿度(50±10)%的受控房间中,光照 12 h/黑暗 12 h 循环,在适应 1 周后,给小鼠高脂饮食(总能量 60% 来自脂肪),8 周后,病理学显示大量巨噬细胞浸润肝脂肪组织,结合小鼠血清 TAG、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇等的测定显示造模成功,成功构建模型时间较短,但是国内的 ICR 小鼠由国外引进,研究结果可能受到基因改变等因素的干扰。

**沙鼠:**沙鼠是良好的肥胖症动物模型,王妍璐等<sup>[36]</sup>用清洁级雄性沙鼠,给予定制高脂饲料(89% 基础饲料+1% 胆固醇+10% 猪油),自由进食,单笼喂养,16 周后病理学检查显示肝细胞充满脂滴,胶原纤维大量增生并形成纤维间隔,汇管区出现纤维化,提示造模成功。该试验模拟了人类由肝纤维化到 NAFLD 发展的过程,构建稳定的与人类疾病发展过程高度一致,且造模方法简单,考虑到后续需要取血的实验,成年沙鼠比大小鼠更方便。

**长爪沙鼠:**余兆硕等<sup>[37]</sup>给予长爪沙鼠 80.5% 的基础饲料与 19.5% 高脂成分(蛋黄粉 10%,猪油 7%,胆固醇 2%,3 号胆盐 0.5%)的高脂饲料喂养,4 周后,病理学显示长爪沙鼠肝组织中出现明显的

肝细胞点状和灶状坏死,甚至有连成片的趋势,成功建立 NAFLD 长爪沙鼠模型。高脂饲料喂养长爪沙鼠形成的模型与临床患者有一定的相似性,且构建模型时间短。

## 3 非酒精性脂肪肝细胞模型

对于 NAFLD 的研究目前最常采用的是动物模型,但动物模型存在个体差异大、造模周期长、实验条件不易控制、动物本身与人类存在差异等不利因素,而细胞模型能较好地克服上述因素,根据实验要求可始终保持细胞活力,与人类疾病过程相近,可针对性地研究疾病的细胞机制。因此,建立 NAFLD 体外细胞模型对研究其发病机制与疾病发展,为进一步防治 NAFLD 具有重要的理论意义与广泛的应用价值。国内外学者常利用饱和或不饱和脂肪酸等诱导人肝细胞株 L-02(HL-7702)细胞和肝癌细胞株 HepG2 细胞构建 NAFLD 细胞模型。棕榈酸(palmitic acid, PA)是饮食和血清中最丰富的饱和脂肪酸,而油酸(oleic acid, OA)是最丰富的不饱和脂肪酸,将 PA 和(或)OA 加入肝细胞中,诱导肝细胞内的脂质沉积,以此得到的 NAFLD 模型已普遍应用<sup>[38-39]</sup>。

### 3.1 L-02(HL-7702)细胞

L-02(HL-7702)细胞是人正常肝细胞,该细胞群体增殖迅速,倍增时间约为 20 h,呈现上皮样细胞形态,在电子显微镜下,可显示出桥粒和张力原纤维。尉捷等<sup>[40]</sup>在正常人的 L02 细胞株中加入游离脂肪酸的混合物(OA:软脂酸=2:1),在培养 24 h 后,L02 细胞肝脂肪堆积,成功建立 NAFLD 细胞模型。王晨薇<sup>[41]</sup>用 0.4 mmol 和 0.8 mmol 浓度 PA 处理 L02 细胞,72 h 后,L02 细胞中有大量脂质沉积,成功建成 NAFLD 模型。张艳玲<sup>[42]</sup>通过体外培养 HL-7702 细胞,饥饿处理 24 h 后加入终浓度为 0.6 mmol/L 的 OA,培养 24 h,病理学显示细胞内出现大面积脂肪变性,结合细胞内 TC、SOD 活性等指标,提示建模成功。吴鸿儒等<sup>[43]</sup>用 50% 胎牛血清、OA 分别建立 HL-7702 细胞脂肪肝的离体细胞模型,并通过检测细胞活性、细胞内脂滴数量、细胞内 TG 含量,0.5 mmol/ml OA 组和 50% 胎牛血清组都能建立较好的肝细胞脂肪变性模型,但 0.5 mmol/ml OA 诱导的细胞脂变更为明显、更具有实用性和可重复性。上述实验中,PA 浓度越高,作用时间越长,L02 细胞的存活率越低,PA 处理细胞可导致 L-

02(HL-7702)细胞的凋亡;OA 诱导细胞脂滴积累明显,实验现象显著,但是其凋亡率较高。

另有学者采用脂肪乳来诱导,王炳芳等<sup>[44]</sup>采用正常人的肝细胞 HL-7702,在其细胞培养液中加入静脉营养脂肪乳剂,病理学显示肝细胞产生明显中性脂肪堆积,传代培养两代发现肝细胞损伤,产生炎症性损伤,建立 NAFLD 细胞模型。陈益耀等<sup>[45]</sup>采用人 L02 细胞,加入 20%脂肪乳的 1640 培养液培养,24 h 后传代继续加入相同培养液培养,24 h 后病理学显示 L02 细胞内出现大量橘红色脂滴,且细胞形态及活力均好,形成 NAFLD 模型。王曦<sup>[46]</sup>采用肝 L02 细胞用 5%医用脂肪乳造模,24 h 后,细胞内产生脂滴,建立 NAFLD 模型。相比于普通脂肪乳,医用脂肪乳诱导 L-02(HL-7702)肝细胞,脂变率高、脂变细胞形态好、成功构建模型时间短,适合 L-02(HL-7702)肝细胞 NAFLD 模型的建立。

L-02(HL-7702)是最常用的构建 NAFLD 的细胞模型,现使用建模的方法主要为 PA、OA、脂肪乳诱导,脂肪酸诱导需要找到所需的最佳溶度,高溶度易造成细胞凋亡,医用脂肪乳可用于造模溶度与培养时间的研究。

### 3.2 HepG2 细胞

HepG2 细胞属于肝细胞系,保留着肝细胞的众多生物学特性,体外便于培养。杨妙婷等<sup>[47]</sup>利用 OA 和 PA 以 2:1 比例混合制备成 1 mmol/L 游离脂肪酸混合液,添加在大鼠血清中培养的 HepG2 细胞中,24 h 后,病理学显示 HepG2 细胞脂滴明显增加,发生脂肪变性,成功建成 NAFLD 模型。肖素军等<sup>[48]</sup>采用含 0.4 mmol 油酸的 1%无脂肪酸 BSA-MEM 培养 Hep G2 细胞 24 h,病理学检测细胞内脂质沉积明显,细胞发生脂肪变性,成功构建体外 NAFLD 模型。高月等<sup>[49]</sup>在含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 HepG2 细胞于含 5%CO<sub>2</sub> 的 37℃ 恒温培养箱中,当孔板内细胞密度达到 70%~80% 时,加入 OA 和 PA 混合物(OA:PA=2:1),培养 24 h,细胞内脂质 A、TG 含量极显著增加,形成脂滴,模型构建成功。吴鹏波等<sup>[50]</sup>用含 10%胎牛血清的培养基培养,置于温度为 37℃、含有 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中,取对数生长期的 HepG2 细胞,接种于培养皿中,培养细胞过夜,加入 0.6 mmol/L OA 处理 8 h,病理学检测大量脂滴密集分布,脂质沉积明显,模型构建成功。

构建 HepG2 细胞 NAFLD 模型,大多数为脂肪

酸直接诱导,方法较简单,模型构建所需时间短。做实验时,应做好预实验,找准脂肪酸最佳溶度,减少细胞死亡率。

## 4 小结

通过不同方法、不同因素诱发的脂肪肝动物模型、细胞模型对脂肪肝的发病机制研究和药物治疗开发尤为重要。在上述多种构建 NAFLD 的动物模型中,高脂饲料诱导的 NAFLD 模型具有操作简便、成本较低、死亡率低,且形成的 NAFLD 模型与人类患病的病理生理方面较为相等等优点,是国内外研究者较常选用的造模方法。分析动物种类,其中基因型可通过基因的改变自发形成脂肪肝,在 NAFLD 的患病程度和疾病相关的代谢特征上有一定优势,但综合价格、培养时间、实验难易程度等多方面因素,Wistar 大鼠、SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠是构造模型最常用的老鼠种类。相对于动物模型,细胞构建模型在时间上占了很大的优势,其中 PA、OA 诱导是细胞模型最常选用的方法,L02 细胞与 HepG2 细胞是最常用的细胞种类。细胞模型实验步骤简单,可以较为细致地研究 NAFLD 的分子机制,有利于基因功能分子水平的探索,但细胞模型缺乏模拟人类疾病的经过。

NAFLD 是一种进行性的涉及多种肝损伤的代谢性疾病,对于其了解从单纯的“二次打击”学说发展到多重打击学说,从一开始认为的脂质代谢紊乱到联合细胞功能障碍、线粒体障碍、氧化应激、肠源性细菌毒素等多种因素相互促进,共同推动了 NAFLD 的发展。随着 NAFLD 的发病机制不断加深,其最主要的因素还是在现代人们的生活方式上,该疾病的治疗药物多集中在靶向治疗方向,而个体化饮食管理与生活方式的改变是治疗的基础,由于其复杂的发病机制,从代谢、炎症、肠道菌落等不同方面分别调控,联合用药理论上优于单一用药,可以更快控制多因素的影响。且肝活检为金标准的临床确诊,存在着有创等缺陷,引入无创肝检查将为临床试验与药效评估提供更直观的评判标准。

疾病实验模型对于疾病的药物研发和治疗起着十分重要的作用,实验模型的成功与否与整个实验的准确性和代表性息息相关,但不同致病因素所形成的 NAFLD 机制与临床病理变化存在差异,造模时间也有所不同。因此,根据需求选择合适的实验模型至关重要。

## 参考文献:

- [1] 樊亚东, 贾建伟, 张晓雨, 等. 非酒精性脂肪性肝病发病机制和临床治疗研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(1): 93-96.
- [2] Cariello M, Piccinin E, Moschetta A. Transcriptional regulation of metabolic pathways *via* lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(5): 1519-1539.
- [3] Eslam M, Sanyal AJ, George J. MAFLD: a consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1999-2014.
- [4] Hashimoto E, Tokushige K, Ludwig J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: current concepts and remaining challenges [J]. Hepatol Res, 2015, 45(1): 20-28.
- [5] Gheibi S, Gouvarchin Ghaleh HE, Motlagh BM, et al. Therapeutic effects of curcumin and ursodexycolic acid on non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108938.
- [6] 周琪, 许文立, 王莉, 等. 多氯联苯 118 诱导大鼠非酒精性脂肪肝病的研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(5): 659-663.
- [7] Stephen Robert JM, Peddha MS, Srivastava AK. Effect of silymarin and quercetin in a miniaturized scaffold in wistar rats against non-alcoholic fatty liver disease [J]. ACS Omega, 2021, 6(32): 20735-20745.
- [8] 孙红爽, 李鹏霖, 刘永双, 等. 大黄素对大鼠非酒精性脂肪肝及肝组织 11 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 1 表达的影响 [J]. 实验动物科学, 2022, 39(3): 22-26, 32.
- [9] Amirnejad A, Hekmatdoost A, Ebrahimi A, et al. The effects of hydroalcoholic extract of spinach on prevention and treatment of some metabolic and histologic features in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Sci Food Agric, 2020, 100(4): 1787-1796.
- [10] 林敏华, 邓桂清, 欧宇轩, 等. 高脂饲料诱导幼鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 医学理论与实践, 2019, 32(15): 2321-2323, 2326.
- [11] Qin H, Chen H, Zou Y, et al. Systematic investigation of the mechanism of *Cichorium glandulosum* on type 2 diabetes mellitus accompanied with non-alcoholic fatty liver rats [J]. Food Funct, 2019, 10(5): 2450-2460.
- [12] 金毅, 邢伟, 吕爱贞, 等. 不同方法诱导大鼠非酒精性单纯性脂肪肝模型的 CYP 酶活性比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 75-83.
- [13] 陈新群, 徐丽姝, 李东风, 等. GLP-1 对胆碱缺乏氨基酸饮食介导的非酒精性脂肪肝纤维化大鼠的治疗作用 [J]. 循证医学, 2017, 17(3): 163-170.
- [14] 李易水, 储心乔, 彪雅宁, 等. 当归芍药散对非酒精性脂肪肝大鼠 TLR4/MyD88/JNK 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 24-31.
- [15] 廖庆辉, 郭中秋, 赖康保, 等. 维格列汀对大鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. 广州医科大学学报, 2019, 47(2): 22-24, 36.
- [16] 车兴影, 韩继武. FGF21 对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞 TLR4/p38MAPK 通路的影响 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(5): 130-135.
- [17] LaBranche TP, Kopec AK, Mantena SR, et al. Zucker lean rats with hepatic steatosis recapitulate asymptomatic metabolic syndrome and exhibit greater sensitivity to drug-induced liver injury compared with standard nonclinical sprague-dawley rat model [J]. Toxicol Pathol, 2020, 48(8): 994-1007.
- [18] Matsumoto Y, Fujita S, Yamagishi A, et al. Brown rice inhibits development of nonalcoholic fatty liver disease in obese zucker (*fa/fa*) rats by increasing lipid oxidation *via* activation of retinoic acid synthesis [J]. J Nutr, 2021, 151(9): 2705-2713.
- [19] Hong L, Zahradka P, Cordero-Monroy L, et al. Dietary docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) operate by different mechanisms to modulate hepatic steatosis and hyperinsulemia in *fa/fa* zucker rats [J]. Nutrients, 2019, 11(4): 917.
- [20] 石英, 拉巴普尺, 张丹瑛, 等. 双歧杆菌对高脂饮食诱导的 C57BL/6 小鼠非酒精性脂肪肝的影响 [J]. 中国临床医学, 2022, 29(3): 473-480.
- [21] 李美菓, 田书云, 张迪. 非酒精性脂肪肝 C57BL/6J 小鼠模型建立 [J]. 山东化工, 2021, 50(20): 162-164, 167.
- [22] 冯钟文, 庞丽君, 陈思韵, 等. 香蜂草苷对地塞米松诱导 C57BL/6J 小鼠非酒精性脂肪肝的保护作用及其机制 [J]. 中药材, 2021, 44(4): 961-965.
- [23] 李晓冲, 张秀英, 徐尚, 等. C57BL/6J 小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(1): 6-8.
- [24] 马浩鑫, 朱桂达, 张晓霞, 等. 一种非酒精性脂肪肝小鼠模型的建立方法 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(14): 80-84.
- [25] Huang X, Gao Y, Cao H, et al. Effects of scoparone on non-alcoholic fatty liver disease revealed by RNA sequencing [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1004284.
- [26] 王俊杰, 方会龙, 李纯伟, 等. 非酒精性脂肪肝模型小鼠的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(24): 4395-4399.
- [27] Liu T, Tan F, Long X, et al. Improvement effect of lotus leaf flavonoids on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. Biomedicine, 2020, 8(2): 41.
- [28] Trak-Smayra V, Paradis V, Massart J, et al. Pathology of the liver in obese and diabetic ob/ob and db/db mice fed a standard or high-calorie diet [J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(6): 413-421.
- [29] Wang B, Chandrasekera P, Pippin J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes [J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10(2): 131-145.
- [30] Yamada T, Kashiwagi Y, Rokugawa T, et al. Evaluation of hepatic function using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in melanocortin 4 receptor-deficient mice as a model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Magn Reson Imaging,

- 2019, 57: 210-217.
- [31] 于温温, 张金华, 刘云娜, 等. 贻贝多糖对高脂饮食诱导的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 369-376.
- [32] Yang P, Wang Y, Tang W, et al. Western diet induces severe nonalcoholic steatohepatitis, ductular reaction, and hepatic fibrosis in liver CGI-58 knockout mice [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4701.
- [33] 喻兆阳, 何阳, 罗伟, 等. AKT 基因介导的小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(2): 170-175.
- [34] 杨玉琴, 冯洁, 柏熊, 等. 东方田鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 34-38, 封 2.
- [35] Li Z, Jin H, Oh SY, et al. Anti-obese effects of two *Lactobacilli* and two *Bifidobacteria* on ICR mice fed on a high fat diet [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480(2): 222-227.
- [36] 王妍璐, 彭伟康, 梁嘉乐, 等. 高脂饮食诱导沙鼠非酒精性脂肪肝性纤维化模型的建立 [J]. 广东医科大学学报, 2022, 40(3): 263-266, 271.
- [37] 余兆硕, 汪惠勤, 高观祯, 等. 河蚬汤食源纳米颗粒对非酒精性脂肪肝长爪沙鼠的影响 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 116-120.
- [38] Lee MR, Yang HJ, Park KI, et al. *Lycopus lucidus* Turcz. ex Benth. Attenuates free fatty acid-induced steatosis in HepG2 cells and non-alcoholic fatty liver disease in high-fat diet-induced obese mice [J]. Phytomedicine, 2019, 55: 14-22.
- [39] Jiang H, Guan Q, Xiao Y, et al. Strontium alleviates endoplasmic reticulum stress in a nonalcoholic fatty liver disease model [J]. J Med Food, 2018; Nov 17.
- [40] 尉捷, 董艳敏, 王辉, 等. 五味子乙素对 NAFLD 细胞模型肝脂质堆积、内质网应激信号通路蛋白及脂肪酸合成相关基因表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(12): 45-49.
- [41] 王晨薇. LPS 对 PA 诱导的脂质沉积的肝细胞的影响及 PPAR $\delta$  的作用和机制的体外研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [42] 张艳玲. 丁酸钠与小檗碱联合应用对非酒精性脂肪性肝病改善作用的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [43] 吴鸿儒, 陈韶华, 卢轶, 等. 两种非酒精性肝细胞脂肪变性模型的比较 [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(4): 297-299.
- [44] 王炳芳, 朱韶杰, 田培营. 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(35): 3674-3677.
- [45] 陈益耀, 陈轶, 何周桃, 等. 原儿茶酸、白杨素对非酒精性脂肪肝肝细胞模型的抗氧化作用 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2018, 28(5): 294-296, 后插 1.
- [46] 王曦. 基于线粒体功能调节的滇黄精缓解非酒精性脂肪肝药效及机制探究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2019.
- [47] 杨妙婷, 陈芝娟, 肖淳欣, 等. 护肝清脂片药物血清对非酒精性脂肪肝细胞模型内质网应激的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(11): 1277-1287.
- [48] 肖素军, 肖亚君, 吴培赛, 等. 水飞蓟宾缓解油酸诱导的 HepG2 细胞脂质沉积的机制探讨 [J]. 中国临床新医学, 2021, 14(11): 1092-1096.
- [49] 高月, 黄文祥, 章述军, 等. 人参皂苷 Rg1 对非酒精性脂肪肝 HepG2 细胞脂质摄取和氧化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 100-106.
- [50] 吴鹏波, 宋琪, 俞媛洁, 等. 姜黄素对非酒精性脂肪肝细胞模型保护作用以及机制研究 [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(3): 324-327.

[收稿日期] 2022-10-28

范容晖, 阳志强, 李勃深, 等. 中药纳米技术靶向治疗脑部疾病研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 128-140.  
Fan RH, Yang ZQ, Li BS, et al. Research progress of targeted treatment of brain diseases with Chinese medicine nanotechnology [J].  
Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 128-140.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.018

## 中药纳米技术靶向治疗脑部疾病研究进展

范容晖<sup>1,2,3</sup>, 阳志强<sup>2,3,5</sup>, 李勃深<sup>1,2,3</sup>, 张宇轩<sup>1,2,3</sup>, 李晓琳<sup>1,2,3</sup>, 李茂星<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院临床药学科, 兰州 730050;  
3. 甘肃省高原药行业技术中心, 兰州 730050; 4. 兰州大学药学院, 兰州 730000;  
5. 西北民族大学化工学院, 兰州 730030; 6. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

**【摘要】** 脑部疾病在临床上较为常见, 危害着人类的生命健康。血脑屏障的存在能够防止血液中的有害物质进入大脑, 维持大脑的稳态环境, 但同时也阻止药物进入大脑发挥药效。纳米技术具有组织靶向的优点, 中药活性物质治疗脑部疾病具有良好的效果, 纳米技术与中药活性物质结合治疗脑部疾病可增强靶向性。

**【关键词】** 血脑屏障; 药物递送; 纳米粒; 中药制剂; 靶向技术

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0128-13

## Research progress of targeted treatment of brain diseases with Chinese medicine nanotechnology

FAN Ronghui<sup>1,2,3</sup>, YANG Zhiqiang<sup>2,3,5</sup>, LI Boshen<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yuxuan<sup>1,2,3</sup>, LI Xiaolin<sup>1,2,3</sup>, LI Maoxing<sup>1,2,3,4,5,6\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Department of Clinical Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050. 3. Gansu Plateau Pharmaceutical Technology Center, Lanzhou 730050. 4. College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000. 5. Institute of Chemical Technology, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030. 6. Institute of Radiation Medicine Sciences, Academy of Military Medical, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

**【Abstract】** Brain diseases are common in clinical practice. The blood-brain barrier prevents harmful substances from entering the brain and maintains homeostasis, but it also prevents drugs from entering the brain to exert effects. Nanotechnology has the advantage of tissue targeting. Active substances in Chinese traditional medicine have a good treatment effect on brain diseases. The combination of nanotechnology and active substances in Chinese traditional medicine for the treatment of brain diseases enhances targeting.

**【Keywords】** blood-brain barrier; drug delivery; Nanoparticle; Chinese medicine; targeting technology

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest; targeting technology

脑卒中、高原脑水肿、脑胶质瘤、阿尔茨海默病、帕金森综合征等脑部疾病危害人类生命安全。且由于血脑屏障的存在使药物难以进入脑部发挥药效, 使得治疗脑部疾病成为医学难题。现今运用

**【基金项目】** 后勤科研项目 (CLB21J036); 拔尖培育项目 (2021yxky001); 青年培育项目 (2021yxky060); 应急医学科研项目 (20yjk018); 甘肃省卫生行业科研计划项目 (GSWSKY2020-41); 甘肃省中医药管理局科研项目 (GZK-2019-36)。

**【作者简介】** 范容晖 (1999—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理学研究。E-mail: fanronghui@petalmail.com

**【通信作者】** 李茂星 (1972—), 男, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 天然药物化学。E-mail: limaoxing2020@aliyun.com

卡莫司汀、替莫唑胺治疗脑胶质瘤,左旋多巴治疗帕金森综合征,但西药治疗脑部疾病多具有低选择性和一定毒副作用。现代药理学发现,一些中药活性物质如当归多糖、长春新碱、厚朴酚、雷公藤红素和大黄素具有抗肿瘤的作用,可用于治疗脑胶质瘤<sup>[1-3]</sup>;缬草烯酸具有神经保护作用,可用于治疗阿尔茨海默病;白藜芦醇具有抗氧化作用,可用于治疗帕金森综合征,且中药活性物质具有安全性高的优点。但同时部分中药活性成分具有溶解性差,靶向性不足,难以吸收的缺点,因此可进行纳米剂型改造弥补这一缺点。如姜黄素脂溶性强,在水中难以溶解,但通过纳米技术进行剂型改造,变成姜黄素纳米乳后能显著改善溶解度,增加药物在体内的摄取<sup>[4]</sup>;丹皮酚为水不溶性中药活性成分且生物利用度低,通过 PLGA 包载变为丹皮酚 PLGA 纳米粒后能提高溶解性,增加体内循环时间,实现被动靶向<sup>[5]</sup>;甘草酸为酸性三萜皂苷类化合物在体内碱性环境下甘草酸成盐(变为离子态)从而降低溶解性,当进行纳米剂型改造变为甘草酸脂质体后可显著提高溶解性和靶向性<sup>[6]</sup>。

纳米靶向技术介导的药物递送,可以靶向结合目标组织上的受体,同时以可控的方式释放药物。进一步研究发现,通过动物成像和同位素示踪技术帮助,纳米技术修饰的中药活性成分在体内的药代动力学发生改变,且能够有效富集在目标组织<sup>[7-10]</sup>。

纳米靶向技术修饰的药物相较于传统药物,可增加药物的生物利用度,减少药物毒性,增加药物溶解度,药物更容易被机体吸收<sup>[11-12]</sup>,增强治疗作用<sup>[13-14]</sup>,并可将药物靶向性地运输至目标组织或器官。中药活性物质与纳米技术结合能有效提高药物透过血脑屏障的效率,进而提高药物在脑组织的浓度,发挥药效。

## 1 血脑屏障

### 1.1 血脑屏障的生理结构

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)在 1919 年首次被德国 Edwin Goldman 提出<sup>[15]</sup>,他假设血与大脑之间有某种屏障,并且屏障阻止了血液中的物质进入大脑,血脑屏障由六种成分组成,分别是周皮细胞、星形胶质细胞、神经元、基膜、连接复合体和紧密连接(tight junction, TJ)。血脑屏障的生理功能是阻止血液中有毒物质进入大脑,维持大脑的稳态环境。

### 1.2 纳米药物透过血脑屏障的方式

药物顺利透过血脑屏障,进入大脑才可以起到治疗效果。然而大多数大分子物质都不能透过血脑屏障。药物透过血脑屏障的方式主要分为饱和转运和不饱和转运<sup>[16]</sup>,见图 1。

#### 1.2.1 不饱和转运

不饱和转运包括被动扩散和特殊区域的药物

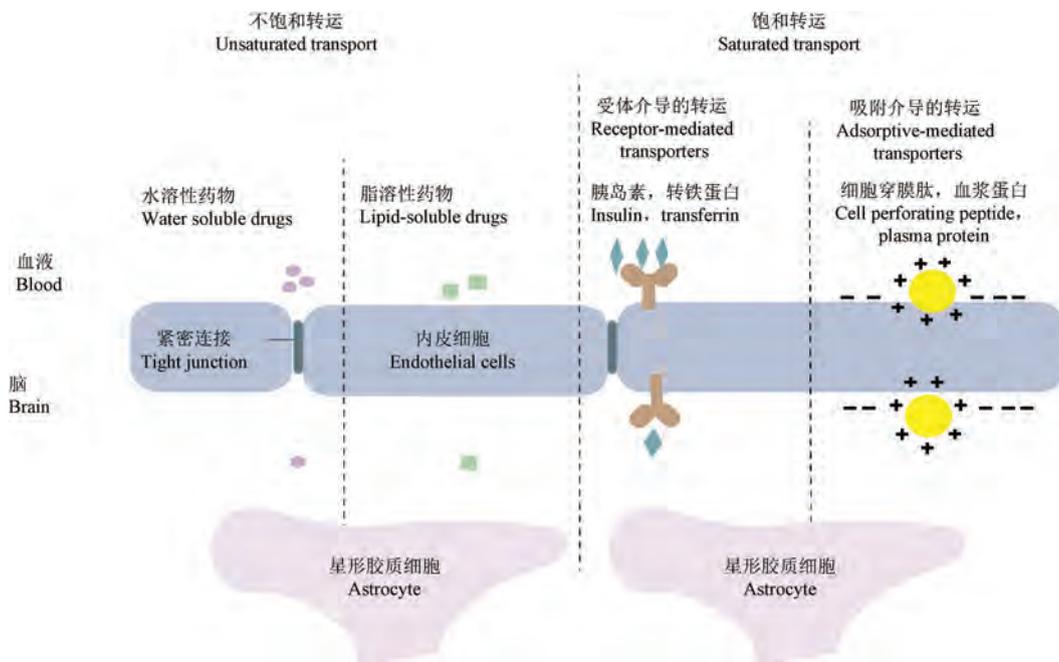


图 1 药物透过血脑屏障方式

Figure 1 Way drugs cross the blood-brain barrier

转运。被动扩散是指脂溶性药物可以通过溶膜扩散,透过内皮细胞进入大脑。例如脂溶性小分子  $\text{CO}_2$  通过被动扩散的方式透过血脑屏障<sup>[17]</sup>。特殊区域的药物转运是指水溶性药物由脑毛细血管内皮细胞上 1.4~1.8 nm 的孔径进入大脑,直径 < 1.8 nm 的水溶性小分子药物可以从浓度高的一侧顺浓度梯度,透过孔径转运到另一侧,不消耗 ATP。

### 1.2.2 饱和转运

饱和转运需要载体与酶的参与,且需消耗 ATP。饱和转运主要包括受体介导转运系统和吸附介导转运系统。①受体介导转运系统(receptor-mediated transporters, RMT):血脑屏障上具有特异性识别的受体,如低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor-related protein)、转铁蛋白受体(transferrin receptor, Tf)、N-乙酰胆碱受体(N-acetylcholine receptor)、胰岛素受体和缓激肽受体  $\text{B}_2$ 。这些受体能与对应的配体特异性结合,从而实现跨膜转运。例如 Sun 等<sup>[18]</sup>制备聚山梨酯-80 包裹的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒透过血脑屏障的原理是表面活性剂聚山梨酯-80(Polysorbate-80)吸附载脂蛋白从而与血脑屏障上载脂蛋白受体紧密结合,通过上皮细胞的胞吞作用透过血脑屏障。②吸附介导转运系统(adsorptive-mediated transporters, AMT):阳离子药物能够与脑部微脉管带负电的细胞进行结合,通过胞吞作用进入大脑<sup>[19]</sup>。例如带正

电荷的细胞穿膜肽能通过吸附介导的内吞途径实现跨膜转运。孟缘<sup>[20]</sup>制备的重组腺相关病毒与细胞穿膜肽复合物能穿过血脑屏障。Lu 等<sup>[21]</sup>制备的阳离子化牛血清白蛋白纳米粒与未阳离子化的纳米粒相比透过血脑屏障的能力提高 8 倍。

## 2 脑靶向中药纳米技术分类

脑靶向中药纳米技术可分为聚合物纳米粒、脂质载体、纳米乳、蛋白纳米粒和中药自身纳米化,具体分类如图 2 所示。

### 2.1 脂质载体

脂质载体具有良好的生物相容性,生物可降解性和低毒性,并且能与亲水或亲脂的药物结合。因其小粒径和脂溶性,所以能通过血脑屏障,因此脂质载体具有良好的临床转化前景。脂质纳米粒包括脂质体、固体脂质体纳米粒和纳米结构脂质载体。

#### 2.1.1 脂质体

脂质体(liposome, Lip)具有球状囊泡结构,通常具有一层或多层脂质分子。脂质体内部形成一个水室,外部形成相对不渗透的亲脂性外壳。脂质体作为纳米材料一般为天然脂质卵磷脂或人工脂质三酰甘油。因此载药之后,拥有很好的生物相容性,能够透过生物膜且具有很好的靶向性。

脂质体通过血脑屏障的途径主要有 3 条:(1)

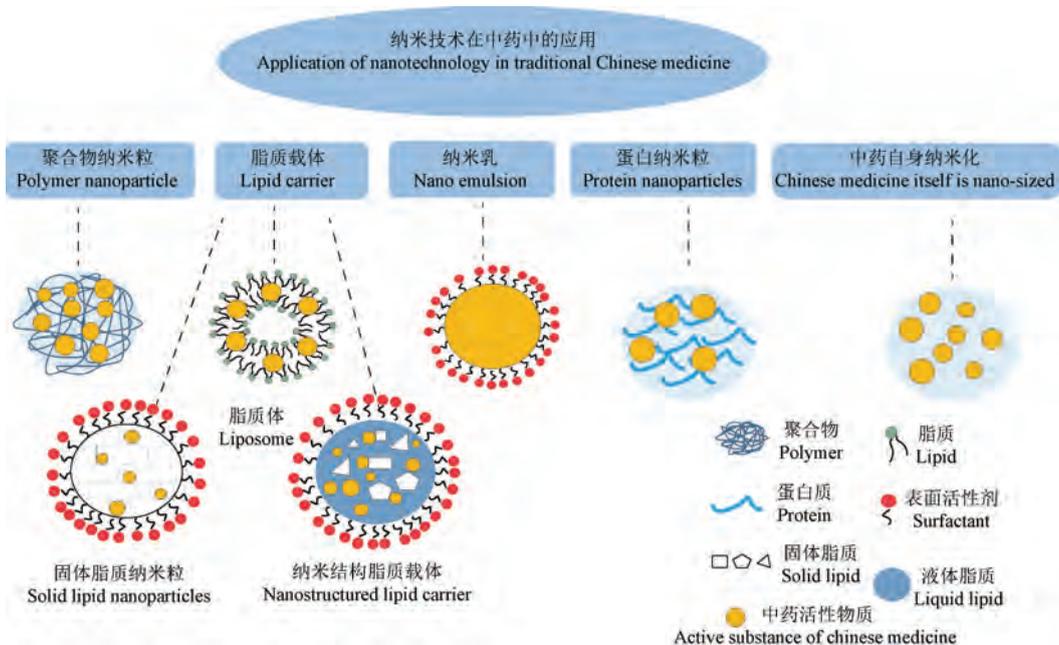


图 2 脑靶向纳米技术分类

Figure 2 Classification of brain-targeted nanotechnology

吸附介导的转运:内皮细胞的细胞膜带负电荷而脂质体带正电荷,因此脂质体能够与内皮细胞细胞膜作用通过吸附介导的转运进入大脑;(2)受体介导的转运:有大量受体在内皮细胞表面,脂质体可以与特殊的配体如抗体、肽、和转铁蛋白结合通过受体介导的胞吞通过血脑屏障;(3)通过外力破坏血脑屏障:外力可以导致短暂的血脑屏障破坏,使药物直接进入中枢神经系统。

肖亚若<sup>[22]</sup>采用膜分散法制备狂犬病毒糖蛋白(rabies-derived peptide, RDP)修饰的姜黄素脂质体。通过体外建立 U87 裸鼠原位脑胶质瘤动物模型,给药后发现姜黄素脂质体组中位生存期为 30 d,相比生理盐水组的 22 d 延长 36%,证明姜黄素脂质体有良好的抗肿瘤活性。小鼠尾静脉给药后,通过活体荧光成像发现,姜黄素脂质体组与未修饰的姜黄素相比,可以大量入脑并通过增加渗透滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)富集于胶质瘤部位。脑组织 HE 染色结果表明姜黄素脂质体组能降低脑肿瘤恶性程度。RDP 与内皮细胞上的受体结合能促进姜黄素入脑。

喜树碱具有广谱抗肿瘤效果,姜黄素能下调鼠胶质瘤细胞(rat glioma cell, C6)中程序性死亡 1 配体(programmed death-ligand1, PD-L1)的表达,然而两种中药有效成分均不能通过血脑屏障。因此, Wang 等<sup>[23]</sup>制备了色胺修饰包载喜树碱和姜黄素两种有效成分的脂质体纳米粒。通过 MTT 实验发现,脂质体纳米粒与未修饰的喜树碱相比可显著限制 C6 细胞增殖。喜树碱能抑制肿瘤细胞的增殖,与姜黄素的联合运用能防止 T 细胞失活且增强化学免疫治疗效果。色胺与姜黄素通过干扰吡啶胺 2,3 双加氧酶通路减少 T 细胞介导的免疫抑制,从而产生抗肿瘤作用。上述实验结果表明脂质体纳米粒能递送药物入脑发挥抗胶质瘤效果。

肖瑶<sup>[24]</sup>制备麦胚凝集素修饰的长春花碱脂质体。通过体内体外实验发现,长春花碱脂质体相比于游离药物能够显著抑制脑胶质瘤细胞增殖,延长荷瘤小鼠存活时间,麦胚凝集素与血脑屏障上受体结合进入大脑,从而增加药物在脑部的浓度,增加脑靶向性。

Ni 等<sup>[25]</sup>制备表面趋化受体 4 肽(chemokine receptor 4 peptide, CXCR4)修饰的蛇床子素脂质体。通过体内和体外实验发现,蛇床子素脂质体相比于游离药物能够改善 A $\beta$  沉积引起的免疫炎症级联反

应和氧化应激,具有显著的神经保护作用。CXCR4 肽可与受体结合使蛇床子素脂质体透过血脑屏障。

赵孟楠<sup>[26]</sup>制备狂犬病毒糖蛋白修饰的胡椒碱脂质体。通过体内实验发现,胡椒碱脂质体相比原研药能缩小 SD 大鼠的脑缺血体积,表现出良好的治疗作用。通过组织分布实验发现,脑部胡椒碱脂质体含量远高于其他器官,表明胡椒碱脂质体具有良好的脑靶向作用。

## 2.1.2 固体脂质体纳米粒

固体脂质体纳米粒(solid lipid nanoparticle, SLN)自身具有一定脑靶向性,由可降解的固态天然类脂或合成类脂(卵磷脂、脂肪酸、三酰甘油)组成。固体脂质体纳米粒具有可控释性,低毒性,良好生物相容性,且能提高药物的稳定性<sup>[27]</sup>。

Song 等<sup>[28]</sup>运用双乳液溶剂蒸发法制备了二油酰磷脂酰乙醇胺修饰的冰片脂质体纳米粒。小鼠静脉给药后,冰片固体脂质体纳米粒的脑组织荧光强度是普通纳米粒的 6 倍,表明冰片脂质体纳米粒能够有效穿越血脑屏障进入脑组织。其透过血脑屏障的机制是冰片松弛血脑屏障中的紧密连接。

魏曼<sup>[29]</sup>采用复乳溶剂挥发法制备 PEG 修饰的冰片固体脂质体纳米粒。小鼠尾静脉注射给药后,冰片固体脂质体纳米粒的跨膜表观渗透系数  $P_{app, max}$  是普通脂质体纳米粒 1.85 倍。冰片固体脂质体纳米粒组 4 h 后体内仍具有强荧光。表明冰片固体脂质体纳米粒能促进药物的脑内转运和延长体内循环时间,从而增强其脑靶向性。

Liu 等<sup>[30]</sup>制备 PEG 修饰的灯盏花素固体脂质体纳米粒。通过体内体外实验发现,灯盏花素固体脂质体纳米粒能延长血浆中药物半衰期,增加药物在脑内平均滞留时间。透过血脑屏障的机制为 PEG 能够抑制 P-gp 外排蛋白活性,从而使药物更多地滞留在脑内,不会被 P-gp 外排蛋白排出。

Liu 等<sup>[31]</sup>采用乳化蒸发-低温固化法制备 OX26 抗体修饰的黄芩苷聚乙二醇化阳离子固体脂质体纳米粒。通过体内体外实验发现,黄芩苷固体脂质体纳米粒相比于游离药物在脑脊液中有更高的 AUC、 $T_{max}$ 、 $C_{max}$  和生物利用度。生物利用度的提高与带正电的固体脂质体粒子有关,因为细胞膜的组成带负电,便于吸附。透过血脑屏障的机制为 OX26 抗体能与内皮细胞上的转铁蛋白结合从而实现药物的跨膜转运。

Wang 等<sup>[32]</sup>制备冰片修饰的葛根黄酮固体脂质

纳米粒。通过大鼠鼻腔给药发现葛根黄酮固体脂质纳米粒的脑内  $AUC$  和  $C_{max}$  分别是未修饰药物的 7.31 和 7.29 倍,表明固体脂质体纳米粒促进葛根黄酮进入脑部。

### 2.1.3 纳米结构脂质载体

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carries, NLC)为改善固体脂质体纳米粒的不足应运而生。固体脂质体纳米粒的晶型容易从  $\alpha$  型转为  $\beta$  型,且固体脂质体纳米粒的脂质核在结晶化之后没有足够空间容纳药物,从而导致生物活性成分泄漏,载药量下降,稳定性降低。Müller 等<sup>[33]</sup>提出改造脂质核,增加脂质核内部自由空间,从而能够容纳更多药物。具体改造方法是液体脂质与固体脂质混合增加结晶缺陷,以及使用不同链长的脂质,从而提高载药量增加核内药物稳定性。纳米结构脂质体与固体脂质体纳米粒相比,平均粒径在 100 nm 左右,载药能力提升,药物在长期存储中具有较好的稳定性。

李厚丽等<sup>[34]</sup>采用乳化蒸发-低温固化法制备冰片和 PEG 双修饰的丹参酮 IIA 纳米结构脂质载体。通过体外释放实验,发现丹参酮 IIA 体外 96 h 内累积释放率为 48.13%,表明药物经过 PEG 修饰后具有明显的缓释效果,可延缓脂解增加长循环效应,利于丹参酮 IIA 进入大脑。

李亚南等<sup>[35]</sup>制备 PEG 修饰的鱼藤酮纳米结构脂质体。鱼藤酮纳米结构脂质体与未修饰的鱼藤酮溶液相比, $T_{max}$  提高 2 倍, $AUC$  提高 42.03 倍。鱼藤酮纳米结构脂质体在脑组织(黑质、纹状体)中的分布明显升高,在外周组织中的分布减少,表明纳米结构脂质体能够促进鱼藤酮进入大脑。

Han 等<sup>[36]</sup>制备白藜芦醇(resveratrol, RSV)纳米结构脂质载体。通过将白藜芦醇与红细胞膜包被的纳米结构脂质载体结合,同时狂犬病毒糖蛋白(rabies virus glycoprotein, RVG29)和三苯基磷酸阳离子(triphenylphosphine cation, TPP)作为配体附着在该载体上。在体内实验中,尾静脉给药 5 mg/kg 的白藜芦醇纳米结构脂质载体后进行眼眶取血,运用 LC-MS 测定药物浓度,发现白藜芦醇纳米结构脂质载体具有较好稳定性并能够缓慢持续释放药物。阿尔茨海默病 SD 鼠的记忆障碍得到显著改善,表明在 RVG29 和 TPP 的协同作用下,白藜芦醇纳米结构脂质载体不仅可以穿过血脑屏障,还可以靶向神经元细胞,在脑内发挥神经保护作用。在体外实

验中,培养 BBB/HT22 细胞制备血脑屏障模型,通过流式细胞计观察荧光信号后发现搭载香豆素-6 的白藜芦醇纳米结构脂质载体能够通过血脑屏障被 BBB/HT22 细胞摄取。结果表明双修饰的白藜芦醇纳米结构脂质载体能够通过血脑屏障,并通过减轻线粒体氧化应激缓解阿尔茨海默病症状。

## 2.2 聚合物纳米粒

聚合物纳米粒(polymeric nanoparticles)是一种 1~1000 nm 范围内的颗粒,可以将药物包裹在聚合物核心或将药物吸附在表面。聚合物纳米粒具有稳定、易于制备、控制药物缓释、保护药物不受环境影响、提高其生物利用度和治疗指数的优点,被广泛应用于临床<sup>[37]</sup>。

### 2.2.1 PBCA

聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutylcyanoacrylat, PBCA)纳米粒是第一个能够透过血脑屏障递送药物的聚合物纳米粒<sup>[38]</sup>。Zhao 等<sup>[39]</sup>用阴离子聚合法制备聚山梨醇酯-80 修饰的葛根素 PBCA 纳米粒,小鼠静脉给药后,葛根素 PBCA 纳米粒与未经修饰药物相比,脑部  $AUC$  提高 2.27 倍,平均滞留时间提高 19 倍。表明 PBCA 纳米粒能够帮助葛根素通过血脑屏障。表面活性剂聚山梨醇酯-80 修饰的 PBCA 纳米粒能够快速被人脑内皮细胞吸收,吸收效率是传统纳米粒的 20 倍。这是因为聚山梨醇酯-80 能够吸附血浆中的载脂蛋白 E,被包裹聚山梨醇酯-80 的 PBCA 纳米粒被识别为极低密度脂蛋白,因此脑内皮细胞上的极低密度脂蛋白受体与包裹聚山梨醇酯-80 的 PBCA 纳米粒结合,通过受体介导的胞吞作用进入大脑。

### 2.2.2 PLGA/PLA

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)/聚乳酸(poly lactic acid, PLA)纳米粒能通过克雷布循环(Kreb's cycle)可转化为乳酸和羟基乙酸,最终在人体内降解为水和二氧化碳<sup>[40]</sup>,具有较高安全性,已被美国药监局(FDA)认证为可供医疗使用的制剂材料<sup>[41]</sup>。PLGA/PLA 纳米粒具有低毒性,生物可降解性和无免疫原性,经过表面活性剂修饰或者连接配体之后能提高纳米粒对血脑屏障的渗透性。

孙德清<sup>[42]</sup>运用溶剂扩散法制备聚山梨醇酯-80 修饰的乙酰葛根素 PLGA 纳米粒。大鼠静脉给药乙酰葛根素 PLGA 纳米粒后发现大鼠脑缺血再灌注损伤得到改善。静脉给药后,PLGA 纳米粒可显著改变

乙酰葛根素的药代动力学行为,提高其在脑组织中的分布,呈现脑靶向特征。

Chen<sup>[43]</sup>制备 mPEG-PLGA 五味子素 A 纳米粒用于治疗帕金森综合征。mPEG-PLGA 五味子素 A 纳米粒的体外释放时间为 48 h 且具有缓释作用。当 mPEG-PLGA 五味子素 A 纳米粒口服给予大鼠后,相比未修饰的五味子素 A,能显著提高大鼠血浆中的  $C_{max}$  和  $AUC$ 。mPEG-PLGA 五味子素 A 纳米粒对帕金森病模型的斑马鱼和细胞具有较强的神经保护作用。mPEG-PLGA 五味子素 A 纳米粒能提高跨血脑屏障运输效率和口服生物利用度。

张林<sup>[44]</sup>采用乳化溶剂挥发法制备了抑肽酶与冰片双修饰的石杉碱甲 PEG-PLGA 纳米粒。小鼠组织分布实验中,冰片灌胃后,可提高纳米粒入脑量。通过 Morris 水迷宫实验发现,抑肽酶与冰片双修饰的石杉碱甲 PEG-PLGA 纳米粒对阿尔茨海默病模型的大鼠有记忆恢复的效果。进一步研究发现冰片能够耗竭脑毛细血管内皮细胞的 ATP,抑制 P-gp 外排蛋白的表达和增加膜流动性从而增加载药纳米粒的入脑量。

缬草烯酸影响 GLUT1/LRP1/NF- $\kappa$ B 通路发挥神经保护和改善阿尔茨海默病作用,但由于缬草烯酸水溶性差,半衰期短的特点,无法通过血脑屏障。刘抒雯<sup>[45]</sup>采用溶剂挥发法制备缬草烯酸聚乙二醇-聚乳酸纳米粒子,通过实验发现缬草烯酸与纳米技术结合能够通过血脑屏障发挥药效。

### 2.2.3 PCL

聚己内酯(polycaprolactone, PCL)具有良好的生物相容性、可降解性和安全性,已被美国药监局(FDA)批准用于人体治疗<sup>[46]</sup>。

银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)具有神经保护作用,可用于治疗帕金森病。但银杏内酯 B 的生物利用度较差,这使其治疗效果降低。Zhao 等<sup>[47]</sup>制备 PEG 修饰的银杏内酯 B PCL 纳米粒。在斑马鱼实验中发现,PCL 纳米粒可以通过血脑屏障,和血视网膜屏障。大鼠口服给药后发现,PCL 纳米粒相比未修饰的药物在血液中拥有更长的释放时间。在帕金森病小鼠模型中发现,口服给予 PCL 纳米粒能减少动物的行为失常,减少 DA(dopamine)消耗,提高 DA、DOPAC(3,4-dihydroxyphenylacetic acid)和 HVA(homovanillic acid)水平。PCL 纳米粒具有缓释作用,并显著提高药物口服生物利用度、药物在

大脑的积累量和生物活性。

Zhen 等<sup>[48]</sup>制备了 PEG 修饰的 6-姜酚 PCL 纳米粒,在大鼠体内发现,6-姜酚 PCL 纳米粒与未修饰的药物相比生物利用度提高 3 倍。通过体内组织分布实验发现,6-姜酚 PCL 纳米粒与未修饰的药物相比脑内药物浓度显著上升,表明 PCL 纳米粒具有脑靶向性。

### 2.3 纳米乳

纳米乳(nanoemulsion)是由水、油、表面活性剂和助表面活性剂等自发形成。纳米乳分为三种类型,即水包油型纳米乳(O/W)、油包水型纳米乳(W/O)以及双连续型纳米乳(B.C)。纳米乳液滴通常 $<400$  nm,且具有热力学稳定的性质。因此在给药系统中具有许多潜在的优势,例如延长体内循环时间和保护药物免受物理化学和酶降解的能力<sup>[49]</sup>。研究表明纳米乳能够提高药物转运入脑效率<sup>[50-51]</sup>。

Wu 等<sup>[52]</sup>制备乳铁蛋白修饰的丹参酮 I 纳米乳。通过脑部荧光强度实验发现,乳铁蛋白修饰的纳米乳相比未修饰的纳米乳脑部荧光强度更高,表明乳铁蛋白与血脑屏障表面的转铁蛋白受体结合,通过受体介导的内吞作用介导纳米乳转运至大脑。

Wang 等<sup>[53]</sup>制备丹参酮 II A 与四甲基吡嗪复合纳米乳。与原始化合物相比,丹参酮 II A 与四甲基吡嗪复合纳米乳被证明可以延长体外的释放时间。在药代动力学研究中,丹参酮 II A 与四甲基吡嗪复合纳米乳与丹参酮 II A 溶液相比, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$  提高 481.50 mg/(L·min), $t_{1/2}$  提高 346.39 min。与原始丹参酮 II A 相比,丹参酮 II A 与四甲基吡嗪复合纳米乳提高了药物的脑组织浓度,表明纳米乳是一种有效的载体,可以提高药物的包封效率,提高生物利用度和脑穿透性。

Yang 等<sup>[54]</sup>制备银杏内酯 B 纳米乳。HE、Nissl、CR 染色实验证实,在损伤海马区银杏内酯 B 纳米乳可减少淀粉样蛋白含量。在体内实验,银杏内酯 B 纳米乳能改善阿尔茨海默病大鼠的记忆缺失。在组织分布实验,银杏内酯 B 纳米乳与未修饰药物相比,脑内药物浓度显著提高,表明具有脑靶向效果。

### 2.4 蛋白纳米粒

蛋白纳米粒包括白蛋白纳米粒和酪蛋白纳米粒。因为血脑屏障上 LAT-1、GLUT-1、LDL 和转铁蛋白受体需要耗能<sup>[55]</sup>,脑胶质瘤区域同样消耗大量能

量物质,所以蛋白纳米粒作为能量物质可成为潜在的载体,递送药物透过血脑屏障进入肿瘤区域<sup>[56]</sup>。

从芳香开窍药冰片、麝香和薄荷中提取的中药有效成分 2-茨醇、麝香酮和薄荷醇为优良的脑部渗透促进剂。冰片能够下调 ZO-1 蛋白的表达增加血脑屏障透过性<sup>[57]</sup>,麝香酮和薄荷醇可降低紧密连接相关蛋白的表达,有效提高血脑屏障的通透性<sup>[58]</sup>。Liang 等<sup>[59]</sup>分别制备了 2-茨醇、麝香酮和薄荷醇三种白蛋白纳米粒,通过体内成像和药物分布实验发现,三种中药白蛋白纳米粒能显著提高脑内荧光强度和药物浓度,表明经过修饰的白蛋白纳米粒能够透过血脑屏障。体外细胞实验中,三种中药白蛋白纳米粒均能够透过脑毛细血管内皮细胞富集在脑胶质瘤中,表明中药白蛋白纳米粒具有脑靶向性。

酪蛋白是一种具有脑靶向能力的天然食物蛋白。10-羟基喜树碱能广谱抗肿瘤但半衰期短,难以透过血脑屏障。Gao 等<sup>[60]</sup>采用化学交联法制备薄荷醇和酪蛋白共修饰的 10-羟基喜树碱纳米粒。细胞实验中显示,与牛血清蛋白纳米粒相比薄荷醇和酪蛋白共修饰的 10-羟基喜树碱纳米粒在脑胶质瘤细胞和脑毛细血管内皮细胞中荧光强度增大 8.72 倍,证明薄荷醇和酪蛋白共修饰的纳米粒有良好的脑靶向性。在体内实验中,胶质瘤小鼠给药 10-羟基喜树碱酪蛋白纳米粒,结果发现胶质瘤小鼠体重下降缓慢,中位生存时间显著延长,证明酪蛋白纳

米粒协助 10-羟基喜树碱进入大脑并且在一定程度上抑制胶质瘤生长。

## 2.5 中药自身纳米化

许多中药对治疗脑部疾病具有良好的效果,传统加工方法生物利用度低,通过中药自身纳米化能够将粒径减小到纳米级别,显著提高生物利用度、溶出度和血脑屏障透过效率。范雯等<sup>[61]</sup>运用 SXQM 型双行星式球磨机制备中药复方苁蓉精纳米微粉。中药复方苁蓉精含有肉苁蓉和淫羊藿。通过 Western blot 检测帕金森综合征小鼠中脑黑质部位有关蛋白发现,通过使用苁蓉精纳米微粉制剂给药帕金森综合征模型小鼠,其大脑黑质部分胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)及其受体 GFR $\alpha$ 1、Ret、NCAM 蛋白表达均提高。苁蓉精纳米微粉可以透过血脑屏障并且提高帕金森模型动物脑中 GDNF 及其受体的表达,从而达到改善帕金森病的效果。

Qu 等<sup>[62]</sup>制备纳米化的和厚朴酚,纳米化的和厚朴酚通过抑制 JNK/CDK5/GSK-3 $\beta$  信号通路的激活,抑制 A $\beta$  沉积,tau 过度磷酸化,从而改善小鼠的认知障碍,其效果优于游离化的和厚朴酚。纳米化的和厚朴酚比游离化的和厚朴酚具有更好的神经保护作用。这些结果表明,纳米化和厚朴酚能改善阿尔茨海默病。

中药脑靶向纳米技术的作用机制及其治疗疾病如表 1 所示。

表 1 中药纳米技术在脑部的作用机制  
Table 1 Mechanism of Chinese medicine nanotechnology on brain

纳米技术 Nanotechnology	中药活性成分 Active ingredients of Chinese medicine	载体材料 Carrier material	性能 Performance parameter	治疗疾病 Treat the disease	作用机制 Mechanism of action
脂质体 <sup>[22]</sup> Liposome	姜黄素 Curcumin	狂犬病毒糖蛋白 Rabies glycoprotein	粒径为 102.7 nm, PDI 值为 0.239, Zeta 电位为 -30.8 mV, 封装率为 88.72% $\pm$ 0.9% Particle size was 102.7 nm, the PDI value was 0.239, the Zeta potential was -30.8 mV, and the encapsulation efficiency was 88.72% $\pm$ 0.9%	脑胶质瘤 Glioma	狂犬病毒糖蛋白与受体结合, 通过血脑屏障 Rabies virus glycoproteins bind to receptors and cross the blood-brain barrier
脂质体 <sup>[23]</sup> Liposome	喜树碱, 姜黄素 Camptothecin, curcumin	色胺 Tryptamine	粒径为 (181 $\pm$ 2.3) nm, PDI 值为 0.228, Zeta 电位为 + (16.5 $\pm$ 0.9) mV Particle size was (181 $\pm$ 2.3) nm, the PDI value was 0.228, and the Zeta potential was + (16.5 $\pm$ 0.9) mV	脑胶质瘤 Glioma	色胺促进药物入脑转运, 降低 PD-L1 表达 Tryptamine promotes drug transport into the brain and reduces PD-L1 expression
脂质体 <sup>[63]</sup> Liposome	白藜芦醇 Resveratrol	卵磷脂, 胆固醇 Ovolecithin, cholesterol	粒径为 (139.97 $\pm$ 0.64) nm, Zeta 电位 - (7.00 $\pm$ 0.74) mV Particle size is (139.97 $\pm$ 0.64) nm and Zeta potential is - (7.00 $\pm$ 0.74) mV	脑胶质瘤 Glioma	诱导脑胶质瘤凋亡, 抑制脑胶质瘤细胞增殖 Apoptosis of glioma was induced and the proliferation of glioma cells was inhibited

续表 1

纳米技术 Nanotechnology	中药活性成分 Active ingredients of Chinese medicine	载体材料 Carrier material	性能 Performance parameter	治疗疾病 Treat the disease	作用机制 Mechanism of action
脂质体 <sup>[24]</sup> Liposome	长春花碱 Vinblastine	麦胚凝集素 Wheat germ agglutinin	粒径约 100 nm, 封装率 90% Particle size is about 100nm and the encapsulation rate is 90%	脑胶质瘤 Glioma	下调肿瘤转移蛋白 MMP-9、MMP-2、FAK 和 PI3K 的表达, 麦胚凝集素与受体结合透过血脑屏障 Down-regulated expression of tumor transfer proteins MMP-9, MMP-2, FAK and PI3K, wheat germ lectin binds to receptors and transits the blood-brain barrier
脂质体 <sup>[25]</sup> Liposome	蛇床子素 Cnidium lactone	CXCR4 肽 CXCR4 peptide	粒径为 (107.57 ± 2.62) nm, PDI 值为 0.2, Zeta 电位为 -(10.2 ± 0.5) mV, 封装率为 94.12% ± 1.8% Particle size was (107.57 ± 2.62) nm, the PDI value was 0.2, the Zeta potential was -(10.2 ± 0.5) mV, and the encapsulation rate was 94.12% ± 1.8%	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	CXCR4 与受体结合增加脑靶向性, 降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平, 增加 SOD 活力, 降低 MDA 含量 CXCR4 binding to the receptor increased brain targeting, decreased IL-1β, IL-6 and TNF-α levels, increased SOD activity, and decreased MDA content
脂质体 <sup>[26]</sup> Liposome	胡椒碱 Piperine	狂犬病毒糖蛋白 Rabies glycoprotein	粒径为 (115.39 ± 4.29) nm, 封装率为 81.84% ± 1.84% Particle size was (115.39 ± 4.29) nm, and the encapsulation rate was 81.84% ± 1.84%	脑缺血 Cerebral ischemia	降低 MDA 含量, 上调谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶水平, 抑制缺血大脑中活性氧的产生, 狂犬病毒糖蛋白与受体结合, 通过血脑屏障 MDA content was decreased, glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels were up-regulated, the production of reactive oxygen species was inhibited in ischemic brain, and the rabies virus glycoprotein was bound to the receptor to pass the blood-brain barrier
固体脂质体纳米粒 <sup>[28]</sup> Solid liposome nanoparticles	龙脑 Borneol	二油酰磷脂酰乙醇胺, 琥珀酸酐, PEG Dioleoyl phosphatidylethanolamine, succinic anhydride, PEG	粒径约 87 nm, PDI 值为 0.017, Zeta 电位为 -24.97 mV Particle size was 87 nm, the PDI value was 0.017, and the Zeta potential was -24.97 mV	脑梗死 Cerebral infarction	冰片松弛血脑屏障上的的紧密连接 Borneol relaxes the tight connections in the blood-brain barrier
固体脂质体纳米粒 <sup>[29]</sup> Solid liposome nanoparticles	龙脑 Borneol	二油酰基磷脂酰乙醇胺, PEG 化硬脂酸 Dioleoyl phosphatidylethanolamine, Pegylated stearic acid	粒径为 (75.8 ± 7.5) nm, Zeta 电位为 -(26.92 ± 1.95) mV, 封装率为 80.1%, 载药量为 0.75% Particle size was (75.8 ± 7.5) nm, Zeta potential was -(26.92 ± 1.95) mV, encapsulation rate was 80.1%, drug loading was 0.75%	脑梗死 Cerebral infarction	冰片松弛血脑屏障上的的紧密连接 Borneol relaxes the tight connections in the blood-brain barrier
固体脂质体纳米粒 <sup>[30]</sup> Solid liposome nanoparticles	灯盏花素 Breviscapine	PEG	粒径为 (21.60 ± 0.10) nm, 封装率为 46.89% ± 0.73% Particle size was (21.60 ± 0.10) nm, and the encapsulation rate was 46.89% ± 0.73%	缺血性脑卒中 Ischemic stroke	PEG 抑制 P-gp 外排蛋白活性 PEG inhibits P-gp efflux protein activity
固体脂质体纳米粒 <sup>[31]</sup> Solid liposome nanoparticles	黄芩苷 Baicalin	OX26 抗体, 甘油酸脂, PEG Antibodies to OX26, glycerate, PEG	粒径为 (47.68 ± 1.65) nm, Zeta 电位值为 (0.533 ± 0.115) mV, 封装率为 83.03% ± 0.01% Particle size was (47.68 ± 1.65) nm, the Zeta potential was (0.533 ± 0.115) mV, and the encapsulation rate was 83.03% ± 0.01%	脑缺血再灌注 Cerebral ischemia reperfusion	提高 AUC、T <sub>max</sub> 、C <sub>max</sub> 和生物利用度, OX26 抗体能与内皮细胞上的转铁蛋白受体结合透过血脑屏障 Improve AUC, T <sub>max</sub> , C <sub>max</sub> and bioavailability. The OX26 antibody binds to transferrin receptors on endothelial cells to cross the blood-brain barrier
固体脂质体纳米粒 <sup>[32]</sup> Solid liposome nanoparticles	葛根黄酮 Pueraria flavones	冰片, 硬脂酸 Borneol, stearic acid	粒径为 (154.2 ± 1.1) nm, PDI 值为 0.12 ± 0.01, Zeta 电位值为 -(41.5 ± 2.0) mV, 载药量为 4.60% ± 0.01% Particle size was (154.2 ± 1.1) nm, PDI was 0.12 ± 0.01, Zeta potential was -41.5 ± 2.0, drug loading was 4.60% ± 0.01%	帕金森病 Parkinson's disease	提高 AUC、T <sub>max</sub> 、C <sub>max</sub> , 冰片松弛血脑屏障上的紧密连接 Increase AUC, T <sub>max</sub> , C <sub>max</sub> , borneol relaxes tight connections on the blood-brain barrier

续表 1

纳米技术 Nanotechnology	中药活性成分 Active ingredients of Chinese medicine	载体材料 Carrier material	性能 Performance parameter	治疗疾病 Treat the disease	作用机制 Mechanism of action
纳米结构脂质 载体 <sup>[34]</sup> Nanostructured lipid carriers	丹参酮 IIA Tanshinone IIA	PEG, 中链脂肪酸 PEG, medium- chain fatty acid	粒径为 102.49 nm, Zeta 电位为 -21.11 mV, 包封率 Particle size was 102.49 nm, the Zeta potential was -21.11 mV, and the encapsulation rate was 84.12% 为 84.12%	脑供血不足 Blood shortage to the brain	冰片松弛血脑屏障上的紧密连接, PEG 增加长效循环实现脑部被动靶向 Borneol relaxes tight connections in the blood-brain barrier, and PEG increases long-term circulation to achieve passive targeting in the brain
纳米结构脂质 载体 <sup>[35]</sup> Nanostructured lipid carriers	鱼藤酮 Nicouline	PEG, 大豆磷脂, 三硬脂酸甘油酯 PEG, granulesten, glyceryl tristearate	/	帕金森病 Parkinson's disease	提高 AUC、T <sub>max</sub> , PEG 修饰的纳米粒被脑内皮细胞通过吞饮作用摄取 Increase AUC and T <sub>max</sub> , PEG modified nanoparticles are taken up by brain endothelial cells through ingestion
纳米结构脂质 载体 <sup>[36]</sup> Nanostructured lipid carriers	白藜芦醇 Resveratrol	红细胞膜, 狂犬病 毒糖蛋白, 三苯基 磷酸阳离子 Red cell membrane, rabies glycoprotein, triphenyl phosphate cation	粒径为 160 nm, Zeta 电位为 24 mV Particle size was 160 nm and the Zeta potential was 24 mV	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	狂犬病毒糖蛋白与受体结合, 三苯基磷酸阳离子与负电的细胞壁吸附, 红细胞膜提高长效循环实现被动靶向 Rabies virus glycoprotein binds to the receptor, the triphenyl phosphate cation adsorbs to the negative cell wall, and the erythrocyte membrane improves the long-term circulation to achieve passive targeting
PBCA <sup>[39]</sup>	葛根素 Puerarin	聚山梨酯-80 Triphenyl phosphate cationic polysorbate-80	粒径为 201.2 nm, Zeta 电位为 -7.72 mV Particle size was 201.2 nm and the Zeta potential was -7.72 mV	脑缺血再 灌注 Cerebral ischemia reperfusion	聚山梨酯 80 与脑内皮细胞上的 极低密度脂蛋白受体结合, 通过 血脑屏障 Polysorbate 80 binds to very low density lipoprotein receptors on brain endothelial cells and crosses the blood-brain barrier
PLGA <sup>[42]</sup>	葛根素 Puerarin	聚山梨酯-80 Triphenyl phosphate cationic polysorbate-80	粒径为 145.0 nm, Zeta 电位为 -14.81 mV, 包封率为 90.51% Particle size was 145.0 nm, the Zeta potential was -14.81 mV, and the encapsulation rate was 90.51%	脑缺血再 灌注 Cerebral ischemia reperfusion	提高 AUC、T <sub>max</sub> 、C <sub>max</sub> , 抑制 HMGB1、TLR4、NF-κB (P65) 的 蛋白表达 Increase AUC, T <sub>max</sub> and C <sub>max</sub> , and inhibit the protein expression of HMGB1, TLR4 and NF-κB (P65)
PLGA <sup>[43]</sup>	五味子素 A Schizandrin A	PEG	粒径为 70 nm, 包封率为 91%、载 药率为 28% Particle size 70 nm, encapsulation rate 91%, drug loading rate 28%	帕金森病 Parkinson's disease	提高 AUC、C <sub>max</sub> , 激活蛋白激酶 B (Akt)/糖原合酶激酶-3β (Gsk3β) 通路 Increase AUC, C <sub>max</sub> , and activate protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3β (Gsk3β) pathway
PLGA <sup>[44]</sup>	石杉碱甲 Hupezine	PEG, 冰片 PEG, borneol	粒径在 100 nm 以下, Zeta 电位为 -22 mV Particle size is below 100 nm and the Zeta potential is -22 mV	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	冰片耗竭脑毛细血管内皮细胞的 ATP, 抑制 P-gp 外排蛋白活性 Borneol depleted ATP and inhibited P-gp effector protein activity in brain capillary endothelial cells
PLA <sup>[45]</sup>	缬草烯酸 Valoxenoic acid	PEG	粒径为 716.65 nm, Zeta 电位为 10.42 mV, 载药量为 8.6% Particle size was 716.65 nm, the Zeta potential was 10.42 mV, and the drug loading was 8.6%	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	下调 GLUT1/LRP1/NF-κB 通路 Down-regulated GLUT1/LRP1/ NF-κB pathway
PCL <sup>[47]</sup>	银杏内酯 B Ginkgolide B	PEG	粒径为 (91.6 ± 1.34) nm, PDI 为 0.17 ± 0.01, Zeta 电位为 -(12.09 ± 0.97) mV, 包封率为 87.52%, 载 药量为 26.93% Particle size was (91.6 ± 1.34) nm, PDI was 0.17 ± 0.01, Zeta potential was (-12.09 ± 0.97) mV, encapsulation rate was 87.52%, drug loading was 26.93%	帕金森病 Parkinson's disease	减少 DA 消耗, 提高 DA、DOPAC 和 HVA 水平 Reduce DA consumption and increase DA, DOPAC and HVA levels

续表 1

纳米技术 Nanotechnology	中药活性成分 Active ingredients of Chinese medicine	载体材料 Carrier material	性能 Performance parameter	治疗疾病 Treat the disease	作用机制 Mechanism of action
PCL <sup>[48]</sup>	6-姜酚 6-Gingerol	PEG	粒径为 (73.24±2.84) nm PDI 为 0.129 ± 0.03, Zeta 电位-(2.74±0.92) mV, 载药量为 4.64%, 包封率为 79.68% Particle size was (73.24 ± 2.84) nm, PDI was 0.129 ± 0.03, Zeta potential was -(2.74±0.92) mV, drug loading was 4.64%, encapsulation rate was 79.68%	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	提高 $C_{max}$ 和生物利用度 Improve $C_{max}$ and bioavailability
纳米乳 <sup>[52]</sup> Nanoemulsion	丹参酮 I Tanshinone I	乳铁蛋白 Lactoferrin	粒径为 20.96 ± 0.15, PDI 为 0.15, Zeta 电位为-2.74±0.84 Particle size was 20.96 ± 0.15, PDI was 0.15, and Zeta potential was -2.74±0.84	脑低氧缺血 Cerebral hypoxia ischemia	乳铁蛋白与乳铁蛋白受体结合通过受体介导的内吞作用进入大脑 Lactoferrin binds to lactoferrin receptors and enters the brain through receptor-mediated endocytosis
纳米乳 <sup>[53]</sup> Nanoemulsion	丹参酮 II A Tanshinone IIA	四甲基吡嗪 Tetramethyl pyrazine	粒径为 32.5 nm, 包封率为 95% Particle size is 32.5 nm and the encapsulation rate is 95%	脑血管疾病 cerebrovascular disease	提高 $AUC_{0-∞}$ 、 $t_{1/2}$ 和生物利用度 Improve $AUC_{0-∞}$ , $t_{1/2}$ and bioavailability
纳米乳 <sup>[54]</sup> Nanoemulsion	银杏内酯 B Ginkgolide B	大豆磷脂, 乳酸乙酯 Granulesten, ethyl lactate	粒径为 80~100 nm Particle size is 80~100 nm	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	提高 $AUC$ 、 $T_{1/2}$ 、 $C_{max}$ , 减少淀粉样蛋白, 增强胆碱乙酰转移酶活性 Increase $AUC$ , $T_{1/2}$ , $C_{max}$ , reduce amyloid protein, enhance choline acetyltransferase activity
白蛋白纳米粒 <sup>[59]</sup> Albumin nanoparticles	2-茨醇、麝香酮和薄荷醇 2-Butanol, muscone and menthol	牛血清白蛋白 Bovine serum albumin	粒径为 100~200 nm, PDI 为 0.3 Particle size is 100~200 nm and the PDI is 0.3	脑胶质瘤 Glioma	下调 ZO-1 蛋白表达增强血脑屏障透过性 Down-regulating ZO-1 protein expression enhances blood-brain barrier permeability
酪蛋白纳米粒 <sup>[60]</sup> Casein nanoparticles	10-羟基喜树碱 10-Hydroxycamp-tothecine	酪蛋白, 薄荷醇 Casein, menthol	Zeta 电位为-30.26 mV, 包封率为 90%, 载药量为 9% Zeta potential was -30.26 mV, encapsulation rate was 90%, drug loading was 9%	脑胶质瘤 Glioma	提高药物在脑部荧光强度, 延长荷瘤小鼠中位生存时间 To improve the fluorescence intensity in brain and prolong the median survival time of tumor bearing mice
中药自身纳米化 <sup>[61]</sup> Nanification of Chinese medicine itself	肉苁蓉, 淫羊藿 Cistanche, epimedium	/	粒径为 200 nm Particle size is 200 nm	帕金森病 Parkinson's disease	提高 GFR $\alpha$ 1、Ret 和 NCAM 蛋白活性, 改善黑质神经细胞凋亡 Increase the activity of GFR $\alpha$ 1, Ret and NCAM proteins, and improve the apoptosis of substantia nigra nerve cells
中药自身纳米化 <sup>[62]</sup> Nanification of Chinese medicine itself	和厚朴酚 Honokiol	PEG	粒径为 (23.30±0.46) nm, PDI 为 0.087±0.00, Zeta 电位为 (6.19±1.70) mV. Particle size was (23.30 ± 0.46) nm, the PDI was 0.087 ± 0.00, and the Zeta potential was (6.19 ± 1.70) mV	阿尔茨海默病 Alzheimer's disease	提高 $AUC_{0-12}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{max}$ 、 $MRT_{0-12}$ 和相对生物利用度。通过抑制大脑中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$ 的水平, 阻止小胶质细胞 (IBA-1) 和星形胶质细胞 (GFAP) 的激活, 显著改善认知缺陷。 Increase $AUC_{0-12}$ , $t_{1/2}$ , $C_{max}$ , $MRT_{0-12}$ and relative bioavailability. By inhibiting the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ in the brain, blocking the activation of microglia (IBA-1) and astrocytes (GFAP), significantly improving cognitive deficits
中药自身纳米化 <sup>[64]</sup> Nanicoation of Chinese medicine itself	丹参 Salvia miltiorrhiza	明胶, 羧甲基纤维素钠盐 Gelatin, sodium cellulose methyl carboxylate	粒径为 133 nm Particle size is 133 nm	脑卒中 Cerebral apoplexy	脂溶性成分如丹参酮、隐丹参酮的溶出量与原粉相比也得到了提高。提高生物利用度和 MRT Dissolution of fat soluble ingredients such as tanshinone and cryptotanshinone was also improved compared with the original powder. Improve bioavailability and MRT

### 3 讨论

近年来,脑部疾病发生率不断升高,阿尔茨海默病、帕金森综合征和脑胶质瘤威胁着人们的安全。一些中药有效成分对疾病有一定治疗作用,但由于血脑屏障的存在,无法直达病灶。随着纳米医学的发展,纳米技术可以提高药物透过血脑屏障的能力,提升药物转运入脑效率。中药纳米技术应用于脑部具有非侵入性、有效性和较好的生物相容性。纳米技术与中药结合通过血脑屏障发挥药效成为一种治疗脑部疾病的方法。

从中药角度看,许多中药如川芎、冰片、麝香、薄荷等具有引药上行,直达巅顶的作用,可以作为药物入脑的促进剂。冰片具有开窍醒神引药上行的功效,现代研究认为冰片能够上调 5-羟色胺与组胺的含量,松弛紧密连接,从而开放血脑屏障。一些中药有效成分如长春新碱、紫杉醇,具有抗肿瘤的作用,可用于治疗脑胶质瘤,银杏内酯 B 具有神经保护作用,可用于治疗帕金森病,但是这些中药有效物质无法通过血脑屏障,因此限制了其在脑部疾病的应用。

从纳米技术角度看,纳米载体自身具有良好的生物相容性、安全性和长循环性,其中长循环性能能够帮助药物在体内长时间停留,在脑部富集,实现被动靶向作用。纳米载体表面能够安装配体,例如聚山梨酯-80、狂犬病毒蛋白和转铁蛋白,这些配体能够与血脑屏障上的受体特异性结合通过血脑屏障,实现主动靶向作用。纳米粒可以制作为正电性,正电性的纳米粒与负电性的脑毛细血管内皮细胞作用,通过吸附介导的内吞作用通过血脑屏障。但同时中药纳米技术也存在缺点,纳米粒的应用被潜在毒性限制,毒性主要包括由纳米粒纯度和浓度导致的化学毒性及粒径、表面电荷和形状导致的纳米毒性。纳米技术主要与单一的中药有效成分结合,很少与中药复方相结合,这使得中药复方的多靶点作用难以发挥。在未来的纳米药物制造中,可以使用天然高分子材料如壳聚糖、海藻酸钠和绞股蓝皂苷从而降低纳米毒性。为发挥中药复方的多靶点优势,可根据传统中药方剂理论,提取方剂中有效成分并与纳米技术结合,二者有效结合从而发挥中药复方多靶点的优势。

不同类型的纳米技术与中药结合后,在一定程度上克服血脑屏障,帮助药物递送入脑。中药与纳

米粒结合后具有长效循环作用、良好的生物相容性和透过血脑屏障的性能。在中医药理论思想指导下,中药与纳米技术结合透过血脑屏障,为治疗脑部疾病提供更多的方法。

#### 参考文献:

- [1] Zhang Y, Zhai M, Chen Z, et al. Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 1045-1055.
- [2] Fan Y, Xue W, Schachner M, et al. Honokiol eliminates glioma/glioblastoma stem cell-like cells *via* JAK-STAT3 signaling and inhibits tumor progression by targeting epidermal growth factor receptor [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 11(1): 22.
- [3] Zhang WF, Yang Y, Li X, et al. Angelica polysaccharides inhibit the growth and promote the apoptosis of U251 glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2017, 33: 21-27.
- [4] 李迪, 李杨, 吴迪. 姜黄素纳米乳的制备及对大鼠心肌缺血再灌注的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(5): 97-103.
- [5] 刘静, 肖明中. 有氧运动联合丹皮酚 PLGA 纳米粒对肥胖伴高脂血症大鼠的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(12): 88-93.
- [6] 扈本荃, 廉江平, 徐玥, 等. 甘草酸脂质体的制备及小鼠体内肝靶向效率的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2015(4): 401-405.
- [7] 张凤梅, 李可欣, 余忠妹, 等. 尼罗红示踪纳米制剂在荷瘤裸鼠体内活体成像的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(1): 91-95.
- [8] 师长宏. 基于近红外荧光制剂的多模态多功能分子影像技术在肿瘤模型中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2): 234-238.
- [9] 秦波音, 张小楠, 杨华, 等. 新型造影剂在小鼠肝脏肿瘤 Micro-CT 活体成像中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, (6): 22-27.
- [10] 赵勇, 王浩, 师长宏. 近红外荧光 (NIRF) 染料在肿瘤诊断中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 98-102.
- [11] 崔淑芳, 赵勇, 孙伟, 等. 纳米珍珠粉对大鼠钙吸收利用的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(4): 204-207.
- [12] 韩金霞, 朱亚南, 王金文, 等. 辛伐他汀纳米粒的构建及对动脉粥样硬化模型大鼠作用的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 78-83.
- [13] 付超, 常静林, 姜轩, 等. 响应性聚集金纳米粒子体系用于细菌的体外热疗研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(3): 278-285.
- [14] 张欢欢, 方杰, 俞文英, 等. Anti-miR34c 树状纳米颗粒对裸鼠肝纤维化的治疗作用 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(5): 587-591.
- [15] Ribatti D, Nico B, Crivellato E, et al. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view [J]. *Anat Rec B*

- New Anat, 2006, 289(1): 3-8.
- [16] Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging [J]. Part Fibre Toxicol, 2010, 7: 3.
- [17] Fischer H, Gottschlich R, Seelig A. Blood-brain barrier permeation; molecular parameters governing passive diffusion [J]. J Membr Biol, 1998, 165(3): 201-211.
- [18] Sun W, Xie C, Wang H, et al. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain [J]. Biomaterials, 2004, 25(15): 3065-3071.
- [19] Liu X, Ye M, An C, et al. The effect of cationic albumin-conjugated PEGylated tanshinone IIA nanoparticles on neuronal signal pathways and neuroprotection in cerebral ischemia [J]. Biomaterials, 2013, 34(28): 6893-6905.
- [20] 孟缘. 利用细胞穿膜肽提高 AAV9 型基因治疗载体在中枢神经系统中表达效率的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [21] Lu W, Tan YZ, Hu KL, et al. Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier [J]. Int J Pharm, 2005, 295(1/2): 247-260.
- [22] 肖亚若. RDP 修饰的姜黄素长循环脂质体靶向脑胶质瘤递药系统的研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2017.
- [23] Wang Z, Wang X, Yu H, et al. Glioma-targeted multifunctional nanoparticles to co-deliver camptothecin and curcumin for enhanced chemo-immunotherapy [J]. Biomater Sci, 2022, 10(5): 1292-1303.
- [24] 肖瑶. WGA 修饰异长春花碱阳离子脂质体构建及对脑胶质瘤作用评价 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [25] Ni YN, Kong L, Li XT, et al. Multifunctional osthole liposomes and brain targeting functionality with potential applications in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Liposome Res, 2021, 31(3): 267-278.
- [26] 赵孟楠. 胡椒碱脂质体的制备及通过 RDP 介导对脑缺血大鼠的脑保护作用及机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [27] Venishetty VK, Komuravelli R, Kuncha M, et al. Increased brain uptake of docetaxel and ketoconazole loaded folate-grafted solid lipid nanoparticles [J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2013, 9(1): 111-121.
- [28] Song H, Wei M, Zhang N, et al. Enhanced permeability of blood-brain barrier and targeting function of brain via borneol-modified chemically solid lipid nanoparticle [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 1869-1879.
- [29] 魏曼. 冰片聚乙二醇共修饰固体脂质纳米粒的构建及脑靶向研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [30] Liu Z, Okeke CI, Zhang L, et al. Mixed polyethylene glycol-modified breviscapine-loaded solid lipid nanoparticles for improved brain bioavailability: preparation, characterization, and *in vivo* cerebral microdialysis evaluation in adult Sprague Dawley rats [J]. AAPS PharmSciTech, 2014, 15(2): 483-496.
- [31] Liu Z, Zhao H, Shu L, et al. Preparation and evaluation of Baicalin-loaded cationic solid lipid nanoparticles conjugated with OX26 for improved delivery across the BBB [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2015, 41(3): 353-361.
- [32] Wang L, Zhao X, Du J, et al. Improved brain delivery of pueraria flavones via intranasal administration of borneol-modified solid lipid nanoparticles [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(16): 2105-2119.
- [33] Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs [J]. Int J Pharm, 2002, 242(1/2): 121-128.
- [34] 李厚丽, 马晶晶, 贺雯, 等. 冰片修饰的丹参酮 II A 口服脑靶向 pNLC 的制备及质量评价 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(5): 46-49.
- [35] 李亚南, 毛全高. 鱼藤酮纳米脂质载体及其修饰物在大鼠体内的分布 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2016(4): 346-351, 366.
- [36] Han Y, Chu X, Cui L, et al. Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer's disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems [J]. Drug Deliv, 2020, 27(1): 502-518.
- [37] Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology [J]. Molecules, 2020, 25(16): 3731.
- [38] Kreuter J, Alyautdin RN, Kharkevich DA, et al. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles) [J]. Brain Res, 1995, 674(1): 171-174.
- [39] Zhao LX, Liu AC, Yu SW, et al. The permeability of puerarin loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 on the blood-brain barrier and its protective effect against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(8): 1263-1270.
- [40] Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed *in-vivo* delivery of drugs and vaccines [J]. J Nanobiotechnology, 2011, 9: 55.
- [41] Patel T, Zhou J, Piepmeyer JM, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012, 64(7): 701-705.
- [42] 孙德清. 乙酰葛根素纳米制剂的脑靶向性及其基于 HMGB1-TLR4-NF- $\kappa$ B 信号通路的抗炎机制 [D]. 济南: 山东大学, 2014.
- [43] Chen T, Li C, Li Y, et al. Small-sized mPEG-PLGA nanoparticles of schisantherin A with sustained release for enhanced brain uptake and anti-parkinsonian activity [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(11): 9516-9527.
- [44] 张林. 基于抑肽酶介导和冰片开窍作用的脑靶向纳米递药系统研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2011.
- [45] 刘抒雯. 中药单体缬草烯酸负载 dCas9 VP64 mRNA 及其 sgRNA 纳米粒对阿尔茨海默病作用机制的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2019.
- [46] Catauro M, Bollino F, Papale F, et al. Modulation of indomethacin release from ZrO<sub>2</sub>/PCL hybrid multilayers

- synthesized *via* Sol-gel dip coating [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2015, 26; 10-16.
- [47] Zhao Y, Xiong S, Liu P, et al. Polymeric nanoparticles-based brain delivery with improved therapeutic efficacy of ginkgolide B in Parkinson's disease [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15; 10453-10467.
- [48] Zhen L, Wei Q, Wang Q, et al. Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of 6-gingerol TPGS/PEG-PCL polymeric micelles [J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(1): 1-8.
- [49] Ravi T P U, Padma T. Nanoemulsions for drug delivery through different routes [J]. *Research in Biotechnology*, 2011.
- [50] Li X, Tsibouklis J, Weng T, et al. Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier [J]. *J Drug Target*, 2017, 25(1): 17-28.
- [51] Tan SF, Kirby BP, Stanslas J, et al. Characterisation, *in-vitro* and *in-vivo* evaluation of valproic acid-loaded nanoemulsion for improved brain bioavailability [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2017, 69(11): 1447-1457.
- [52] Wu Y, Zhang B, Kebebe D, et al. Preparation, optimization and cellular uptake study of tanshinone I nanoemulsion modified with lactoferrin for brain drug delivery [J]. *Pharm Dev Technol*, 2019, 24(8): 982-991.
- [53] Wang B, Hong L, Liu Y, et al. Preparation, preliminary pharmacokinetics and brain tissue distribution of Tanshinone IIA and Tetramethylpyrazine composite nanoemulsions [J]. *Pharm Dev Technol*, 2019, 24(10): 1236-1242.
- [54] Yang P, Cai X, Zhou K, et al. A novel oil-body nanoemulsion formulation of ginkgolide B; pharmacokinetics study and *in vivo* pharmacodynamics evaluations [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(4): 1075-1084.
- [55] Mittapalli RK, Manda VK, Adkins CE, et al. Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules [J]. *Ther Deliv*, 2010, 1(6): 775-784.
- [56] Wunder A, Stehle G, Sinn H, et al. Enhanced albumin uptake by rat tumors [J]. *Int J Oncol*, 1997, 11(3): 497-507.
- [57] Duan M, Xing Y, Guo J, et al. Borneol increases blood-tumour barrier permeability by regulating the expression levels of tight junction-associated proteins [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(12): 3009-3018.
- [58] Zhang L, Du S, Lu Y, et al. Influence of puerarin, paeoniflorin, and menthol on structure and barrier function of tight junctions in MDCK and MDCK-MDR1 Cells [J]. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2015, 2(2): 111-119.
- [59] Liang J, Gao C, Zhu Y, et al. Natural brain penetration enhancer-modified albumin nanoparticles for glioma targeting delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(36): 30201-30213.
- [60] Gao C, Liang J, Zhu Y, et al. Menthol-modified casein nanoparticles loading 10-hydroxycamptothecin for glioma targeting therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 843-857.
- [61] 范雯, 曾建伟, 陈发兴, 等. 中药复方苁蓉精纳米微粉制剂的制备及其活性成分分析 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2654-2657.
- [62] Qu C, Li QP, Su ZR, et al. Nano-Honokiol ameliorates the cognitive deficits in TgCRND8 mice of Alzheimer's disease *via* inhibiting neuropathology and modulating gut microbiota [J]. *J Adv Res*, 2021, 35: 231-243.
- [63] 徐浩伦, 应雪, 王亚华, 等. 白藜芦醇脂质体对 C6 胶质瘤细胞的抑制作用分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18): 1-6.
- [64] 苏艳丽. 高速离心剪切超细技术制备纳米丹参的工艺及药理学研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2007.

[收稿日期]2022-11-15