

苗霖,彭艳霞,王凤,等. 甲基苯丙胺损伤神经系统双链 DNA 的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 1-8.

Miao L, Peng YX, Wang F, et al. Methamphetamine damages double-stranded DNA in the nervous system [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.001

甲基苯丙胺损伤神经系统双链 DNA 的作用研究

苗霖,彭艳霞,王凤,李怡,王浩伟,李利华,曾晓锋*,杨根梦*

(昆明医科大学法医学院,国家卫健委毒品依赖和戒治重点实验室,昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)损伤不同类型神经细胞双链 DNA 的情况。**方法** 体外实验,分别培养原代皮质神经元、HT-22 细胞、BV2 细胞、HMC3 细胞和 U-87 MG 细胞,分别给予 METH 后,观察细胞形态和用 Western blot 检测各组细胞表达 γ -H2AX 的水平。体内实验,建立 METH 腹腔注射小鼠模型,应用旷场实验进行小鼠行为学分析。HE 染色观察小鼠前额叶皮质和海马内神经细胞的形态变化,用 IF 观察两个脑区内双链 DNA 损伤情况,用 Western blot 检测两个脑区表达 γ -H2AX 的水平。**结果** 体外实验,给予 METH 后,原代皮质神经元、HT-22 细胞、BV2 细胞、HMC3 细胞和 U-87 MG 细胞形态发生明显变化,细胞突触变短或消失,胞体皱缩,间隙增宽。各组细胞表达 γ -H2AX 水平明显升高。体内实验,给予 METH 后,与生理盐水组相比,小鼠运动极其活跃,运动轨迹和路程明显增加。HE 染色结果显示前额叶皮质和海马内神经元明显水肿,嗜酸性增强,部分神经元变性改变。IF 结果显示,与生理盐水组相比,METH 组前额叶皮质和海马内神经细胞发生双链 DNA 损伤的数量明显增多,且荧光强度明显增强。Western blot 结果显示,与生理盐水组相比,METH 组前额叶皮质和海马组织表达 γ -H2AX 水平明显升高。**结论** METH 可损伤神经系统双链 DNA。METH 可诱导原代皮质神经元、HT-22 细胞、BV2 细胞、HMC3 细胞和 U-87 MG 细胞以及小鼠前额叶皮质和海马组织表达 γ -H2AX 水平明显增高。该研究可为阐明 METH 诱导神经毒性作用机制提供理论依据。

【关键词】 甲基苯丙胺;双链 DNA; γ -H2AX;神经细胞;神经毒性作用

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0001-08

Methamphetamine damages double-stranded DNA in the nervous system

MIAO Lin, PENG Yanxia, WANG Feng, LI Yi, WANG Haowei, LI Lihua, ZENG Xiaofeng*, YANG Genmeng*
(School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, NHC Key Laboratory of Drug Addiction Medicine, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective To investigate damage of double-stranded DNA by methamphetamine (METH) in various types of nerve cells. **Methods** For *in vitro* experiments, primary cortical neurons and HT-22, BV2, HMC3 and U-87 MG cells were treated with METH. Cell morphology was observed and γ -H2AX expression was detected by Western blot. For *in vivo* experiments, METH was administered to mice by intraperitoneal injection, and behavioral analysis was performed by the open field test. Morphological changes of neurons in the prefrontal cortex and hippocampus of were observed by HE staining. Double-stranded DNA damage was observed by immunofluorescence, and γ -H2AX expression was detected by western blotting. **Results** *In vitro*, after treatment with METH, the morphology of primary cortical neurons, and HT-22,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82202081, 82160325);云南省教育厅项目(2022J0195, 2022J0207);昆明医科大学大学生创新性实验计划项目(2021JXD090)。

[作者简介] 苗霖(1997—),女,硕士研究生,研究方向:毒品滥用机制。E-mail:ml_626@163.com

[通信作者] 曾晓锋(1977—),男,教授,博士,研究方向:毒品滥用机制及药物戒断干预治疗。E-mail:zx2004033@163.com

杨根梦(1992—),女,讲师,博士,研究方向:毒品滥用机制及药物戒断干预治疗。E-mail:1223984855@qq.com

* 共同通信作者

BV2, HMC3 and U-87 MG cells had obviously changed, the synapses of cells were shortened or disappeared, cell bodies had shrunk, and gaps were wider. γ -H2AX expression was significantly increased. *In vivo*, after administration of METH, compared with the saline group, the movement trajectory and distance were significantly increased in the METH group. HE staining showed that neurons in the prefrontal cortex and hippocampus were markedly edematous and eosinophilic, and some neurons had degenerated. Immunofluorescence showed that double-stranded DNA damage in neurons in the prefrontal cortex and hippocampus of the METH group was significantly increased, and the fluorescence intensity was significantly enhanced compared with the saline group. Western blot showed that γ -H2AX expression in the prefrontal cortex and hippocampus of the METH group was significantly increased compared with the saline group. **Conclusions** METH damaged double-stranded DNA in the nervous system. METH induced a significant increase in γ -H2AX expression in primary cortical neurons HT-22, BV2, HMC3 and U-87 MG cells, the prefrontal cortex, and hippocampus. This study provides a theoretical basis to elucidate the mechanism of METH-induced neurotoxicity.

[Keywords] methamphetamine; double-stranded DNA; γ -H2AX; nerve cells; neurotoxicity

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

甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)俗称“冰毒”,是成瘾性较高和毒性较大的新型合成毒品^[1]。METH 可通过多种途径作用于中枢神经系统,对神经系统造成不可逆的损害。长期滥用 METH 者会出现幻觉、焦虑、抑郁、妄想等精神症状,且会出现不同程度的认知障碍,引起学习记忆、注意力、执行力等障碍^[2]和降低认知能力^[3-4]。说明 METH 对中枢神经系统具有明显毒性损害作用。但截至目前, METH 损害神经系统的作用机制尚不清楚,且无有效的戒断治疗药物。大量研究发现,多巴胺系统功能障碍^[5]、神经细胞自噬^[6-7]、凋亡、氧化应激和血脑屏障损伤^[8]、内质网应激、小胶质细胞和星形胶质细胞的激活、神经炎症和细胞焦亡^[9]等均参与了 METH 损害神经系统的过程。研究发现在中枢神经系统中, DNA 损伤后,参与修复神经细胞 DNA 的多数蛋白质均处于沉默状态,因此,神经细胞 DNA 损伤后修复能力较弱,容易发生 DNA 损伤^[10]。DNA 损伤可导致 DNA 单链和 DNA 双链(dsDNA)断裂。其中 dsDNA 断裂是最严重的一种 DNA 损伤形式,若未能修复可致细胞死亡^[11]。dsDNA 断裂后会形成特定的分子标志物,如 γ -H2AX、53BP1 和 RAD51 等。各种因素导致 DNA 损伤后,组蛋白 2A 变异体(histone family 2A variant, H2AX)在 DNA 修复的早期即可迅速发生磷酸化并生成 γ -H2AX, γ -H2AX 是 dsDNA 损伤的特异性生物标志物^[12]。在真核生物进化过程中, γ -H2AX 高度保守,其参与多种细胞凋亡和肿瘤的发生发展^[13-14]。目前,可采用免疫荧光法、流式细胞术和免疫印迹法对 γ -H2AX 进行定量分析^[11]。研究表明,安非他明可促进线粒体功能障碍和 DNA 损伤^[15]。此外, METH 可致人源性细胞 DNA 损伤和染色体畸变^[16]。说明 METH 可损伤神

经系统 DNA,但尚不清楚是否会引起 dsDNA 的断裂。因此本研究将研究 METH 对神经细胞 dsDNA 的损伤情况,旨在为阐明 METH 诱导神经毒性作用机制提供理论依据。

本研究以原代皮质神经元、HT-22 细胞(永生化的小鼠海马神经元细胞)、BV2 细胞(小鼠小胶质细胞)、HMC3 细胞(人小胶质细胞)、U-87 MG 细胞(人星形胶质细胞)和小鼠为研究对象。上述细胞分别给予 METH 后,检测各组细胞表达 γ -H2AX 的情况。给小鼠腹腔注射 METH 后,观察小鼠前额叶皮质和海马内 dsDNA 损伤情况和表达 γ -H2AX 的水平。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级成年 C57BL/6J 雄性小鼠 20 只,体重 18~20 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2019-0004]。全部小鼠均饲养于昆明医科大学实验动物学部[SYXK(滇)K2020-0006],给予充足的水和饲料,环境温度 21~25℃,相对湿度为 50%左右,光照时间为明暗交替 12 h/12 h。动物实验经昆明医科大学动物实验伦理审查委员会审查批准(kmmu20220240),并在动物饲养和实验过程中严格遵循实验动物使用的 3R 原则,并给予人道的关怀。

1.1.2 细胞

BV2 细胞、HMC3 细胞、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

γ -H2AX (NB100-2280) 购自 Novus Biologicals

公司; dsDNA (sc-58749) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 甲基苯丙胺(纯度>99%) 购自中检所; 胎牛血清(FBS) (#2033119) 购自 Biological Industries 公司; DMEM 高糖培养基购自 Biological Industries 公司; 神经元专用培养基和 B27 购自 Gibco 公司; RIPA 裂解液(强)(P0013B) 和 BCA 蛋白定量试剂盒(P0012) 购自上海碧云天生物技术研究; 0.45 μm PVDF 膜购自 GE Healthcare Life Sciences 公司。超高灵敏度化学发光成像系统 (ChemiDoc™ MP, 美国 Bio-Rad 公司); 数字病理切片扫描仪(荧光)(KF-FL-005, 宁波江丰生物信息技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

(1) BV2 细胞、HMC3 细胞、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞培养

分别复苏冻存的 BV2 细胞、HMC3 细胞、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞, 用含 10% FBS 和 1% AP 的 DMEM 高糖培养基在培养箱(37℃、5% CO₂、95% 湿度)中培养, 细胞密度达 70%~90% 后, 通过胰酶消化进行传代培养。BV2 细胞和 HMC3 细胞给予 METH 的浓度是 0.1 mmol/L。HT-22 细胞和 U-87 MG 细胞给予 METH 的浓度是 2.0 mmol/L。上述浓度是根据我们前期的研究基础和研究结果, 以及查阅文献综合考虑^[17-18]。

(2) 原代皮质神经元的培养

取 1~2 d 的新生 C57BL/6J 小鼠 6~8 只, 浸泡在 75% 预冷乙醇中 3~5 min, 随后断头, 并将脑组织完整取出。随后剥离蛛网膜和血管, 取皮质组织置另一含双抗的 DMEM 高糖培养皿中。加入 0.25% 胰酶吹散后, 放入培养箱进行消化孵育 10~15 min。取等量 DMEM 高糖完全培养基中止消化。随后 1000 r/min 离心 10 min, 制备单细胞悬浮液。用 DMEM 高糖完全培养基培养 4~6 h 后, 换成神经元专用培养基(含 15% FBS 和 2% B27)。原代皮质神经元给予 METH 的浓度是 0.1 mmol/L。上述浓度的选择是根据我们前期的研究基础和研究结果决定的^[19-20]。

1.3.2 动物实验

20 只小鼠随机分成生理盐水组和 METH 组, 每组 10 只。给药剂量为生理盐水组 10 mL/kg, METH 组 2 mg/kg, 每天 2 次, 间隔 12 h, 连续给药 7 d, 给药前后检测小鼠旷场的行为学变化。给药结束后麻

醉小鼠, 分离出小鼠前额叶皮质和海马组织, 做好标记后保存于-80℃ 冰箱备用。其中 3 只用 4% 多聚甲醛灌注并取全脑固定, 用于石蜡包埋做切片。

1.3.3 免疫荧光

石蜡切片脱蜡、脱水和抗原修复后, 用 10% 山羊血清室温封闭 40 min, 加入一抗 dsDNA (1:200), 放入湿盒中, 4℃ 孵育过夜。用 PBS 漂洗, 5 min×3 次。根据一抗的种属加入相应的二抗(1:200), 室温湿盒中孵育 1 h。用 PBS 漂洗, 5 min×3 次。滴加抗荧光衰减封片剂(含 DAPI), 倒置荧光显微镜下观察、采集图像。

1.3.4 Western blot

收集各组细胞、前额叶皮质和海马组织后, 加入蛋白裂解液在冰上裂解 30 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min。取上清液进行蛋白浓度的测定。将上清液与 5×SDS 上样缓冲液混匀, 随后进行蛋白变性。蛋白上样量为 25 μg , 用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后, 进行转膜, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。用 TBST 洗膜 10 min×3 次后, 孵一抗 β -actin (1:1000)、 γ -H2AX (1:1000) 4℃ 过夜。用 TBST 洗膜 10 min×3 次, 加相应的二抗(1:5000), 室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 10 min×3 次。用凝胶成像系统采集图像, 用 Image J 软件进行蛋白灰度值计算。

1.3.5 旷场行为学分析

应用旷场实验(open field test, OFT) 进行小鼠运动路程和轨迹分析。每天将小鼠放入小鼠旷场箱中适应 1 h, 让其自由活动, 连续适应 3 d 后, 每组小鼠在给药前 1 d, 进行旷场行为学测试, 每次 15 min, 采用视频监控和上海欣软 Super Maze 系列动物行为分析软件跟踪记录小鼠活动的轨迹、速度和行为变化, 作为给药前行为学数据(Pre)。给药 7 d 后, 再进行旷场行为学测试, 作为给药后行为学数据(Post)。本研究对给予生理盐水和 METH 后的轨迹和路程进行统计分析。

1.3.6 HE 染色

石蜡切片脱蜡、脱水(二甲苯 10 min×2 次, 无水乙醇 10 min×2 次, 95% 无水乙醇 5 min, 90% 无水乙醇 5 min, 80% 无水乙醇 5 min, 70% 无水乙醇 5 min) 后用蒸馏水漂洗 1 min。随后进行苏木素染细胞核和伊红染细胞质, 脱水封片, 晾干, 中性树胶封片, 最后采集图像分析。

1.4 统计学方法

用 SPSS 17.0 统计学软件进行实验数据的统计

学分析,采用 GraphPad Prism 5 进行实验数据统计分析制图,Adobe Illustrator CC 用于编排和组合图片。所有实验数据均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用独立样本 *t* 检验进行组间比较, $\alpha=0.05$ 为检验标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

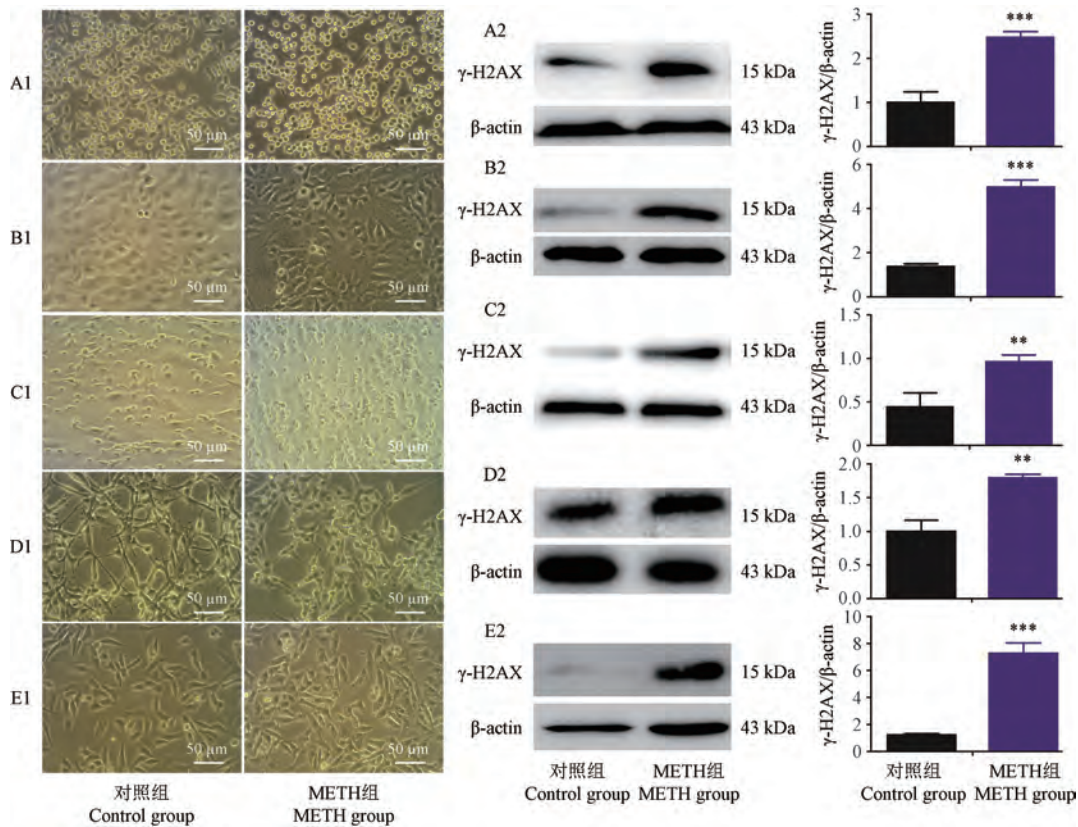
2.1 METH 损伤神经细胞 dsDNA 的情况

用 0.1 mmol/L METH 分别处理 BV2 细胞、HMC3 细胞和皮质原代神经元以及用 2.0 mmol/L METH 分别处理 U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞 24 h 后,观察细胞形态。与对照组相比,所有细胞胞体皱缩,突触变短,细胞间隙增宽,部分细胞呈“漂浮”

和“球形”状态,如图 1 中 A1~E1 所示。用 Western blot 检测 γ -H2AX 的情况,结果如图 1 所示。与对照组相比,METH 组 BV2 细胞、HMC3 细胞、原代皮质神经元、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞表达 γ -H2AX 水平显著升高($P<0.001$)。说明 METH 可明显损伤 BV2 细胞、HMC3 细胞、原代皮质神经元、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞 dsDNA。

2.2 METH 对小鼠行为学的影响

应用旷场分析 METH 对小鼠行为活动轨迹的影响。行为学分析结果如图 2 所示,与生理盐水组相比,METH 可增强小鼠的运动轨迹,小鼠运动极其活跃,活动轨迹致密复杂。说明 METH 可兴奋小鼠神经系统,对神经细胞可能具有毒性损伤作用。



注:A1~E1 分别为 BV2 细胞、HMC3 细胞、原代皮质神经元、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞的电镜图。A2~E2 分别为 BV2 细胞、HMC3 细胞、原代皮质神经元、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞 γ -H2AX 的相对表达水平。与对照组相比,给予 METH 后,BV2 细胞、HMC3 细胞、原代皮质神经元、U-87 MG 细胞和 HT-22 细胞表达 γ -H2AX 水平明显升高,说明 METH 可损伤上述细胞的 dsDNA。与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 METH 对不同类型神经细胞形态的影响和诱导 γ -H2AX 表达的情况($n=3$)

Note. A1~E1 are the electron micrographs of BV2 cells, HMC3 cells, primary cortical neurons, U-87 MG cells and HT-22 cells. A2~E2 are the relative expression levels of γ -H2AX in BV2 cells, HMC3 cells, primary cortical neurons, U-87 MG cells and HT-22 cells. Compared with the control group, the levels of γ -H2AX expressed by BV2 cells, HMC3 cells, primary cortical neurons, U-87 MG cells and HT-22 cells were significantly increased after administration of METH, indicating that METH could damage the dsDNA of the above cells. Compared with control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

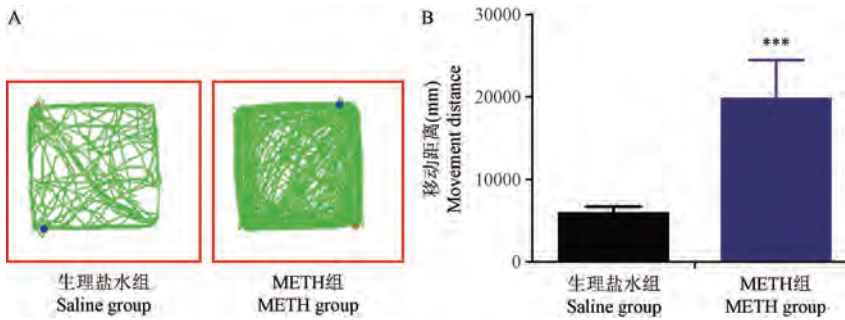
Figure 1 Effect of METH on morphology of different types of nerve cells and induction of γ -H2AX expression

2.3 METH 对小鼠前额叶皮质和海马神经细胞形态的影响

应用 HE 染色观察 METH 对小鼠前额叶皮质和海马神经细胞形态的影响。

前额叶皮质的 HE 染色结果如图 3A、3B 所示。

与生理盐水组相比, METH 组皮质内神经细胞明显水肿, 嗜酸性增强, 部分神经细胞变性坏死。海马的 HE 染色结果如图 3C、3D 所示。与生理盐水组相比, METH 组海马神经细胞明显水肿, 嗜酸性增强, 周围神经纤维增生。



注: A: 小鼠运动轨迹图; B: 小鼠运动总路程。与生理盐水组相比, METH 可增强小鼠的运动轨迹和运动路程, 说明 METH 可兴奋小鼠神经系统, 对神经细胞可能具有毒性损伤作用。与生理盐水组相比, *** $P<0.001$ 。

图 2 METH 对小鼠运动轨迹、路程的影响 ($n=3$)

Note. A, Movement track of the mice. B, Total distance travelled by the mice. METH enhanced the locomotor trajectory and distance travelled in mice compared to the saline group. This indicates that METH can excite the nervous system of mice and may have a toxic effect on nerve cells. Compared with the saline group, *** $P<0.001$.

Figure 2 The effect of METH on the movement track and distance of mice

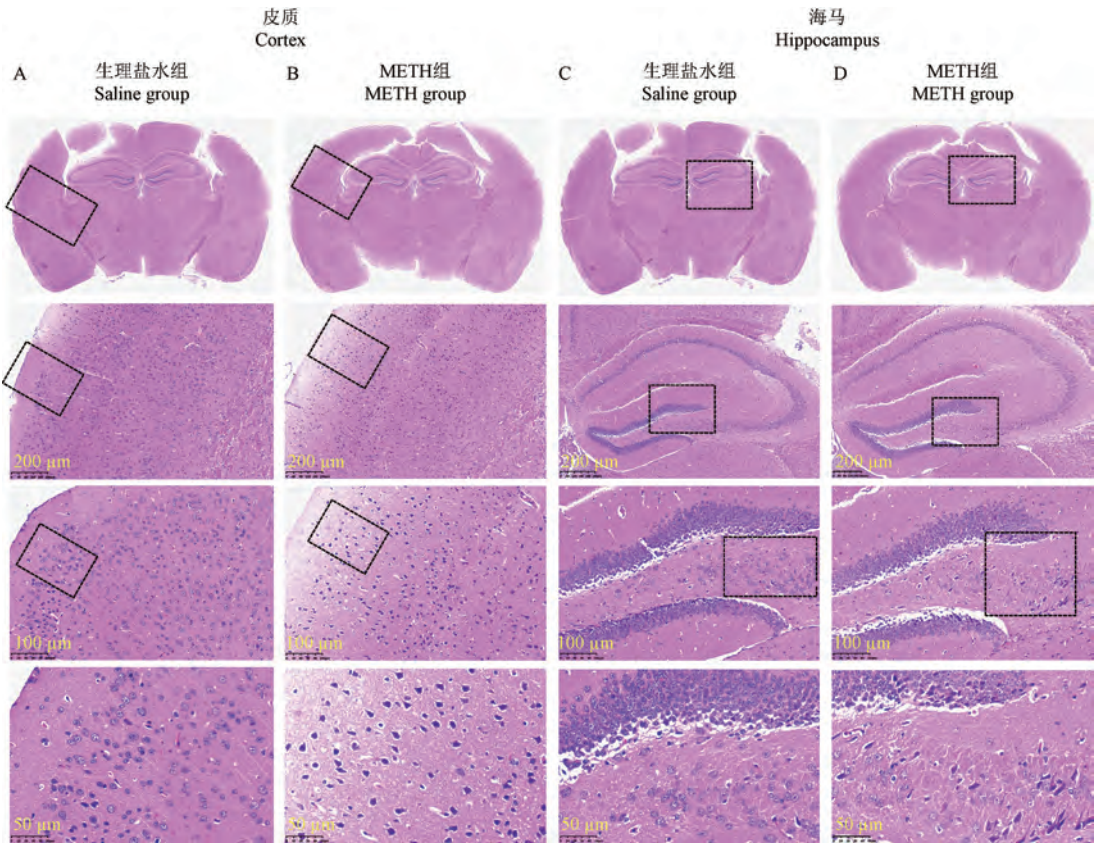


图 3 METH 对小鼠皮质和海马神经细胞形态的影响

Figure 3 Effect of METH on morphology of neurons in prefrontal cortex and hippocampus of mice

2.4 METH 对小鼠前额叶皮质和海马内 dsDNA 的影响

用 IF 观察 METH 损伤小鼠前额叶皮质和海马内神经细胞 dsDNA 的情况,结果如图 4 所示。与生理盐水组相比, METH 组皮质和海马组织内表达 dsDNA 的神经细胞数量明显增多,且荧光强度明显增强。说明 METH 可诱导 dsDNA 损伤(蓝色是 DAPI,绿色是 dsDNA)。

2.5 METH 诱导小鼠前额叶皮质和海马表达 γ -H2AX 的情况

用 Western blot 分别检测小鼠前额叶皮质和海马组织中 γ -H2AX 的表达情况。前额叶皮质和海马表达 γ -H2AX 的结果分别如图 5A、5B 所示,与生理盐水组相比,前额叶皮质和海马组织表达 γ -H2AX 的水平均显著升高($P<0.01$)。说明 METH 可损伤前额叶皮质和海马内的 dsDNA。

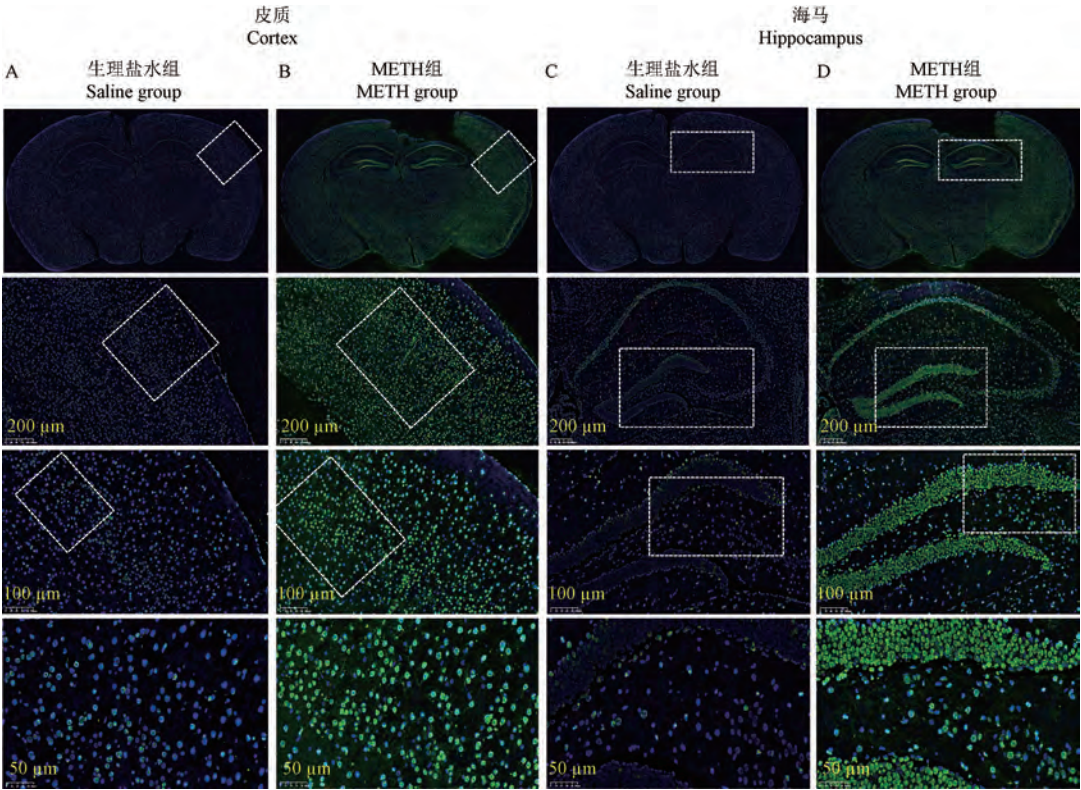
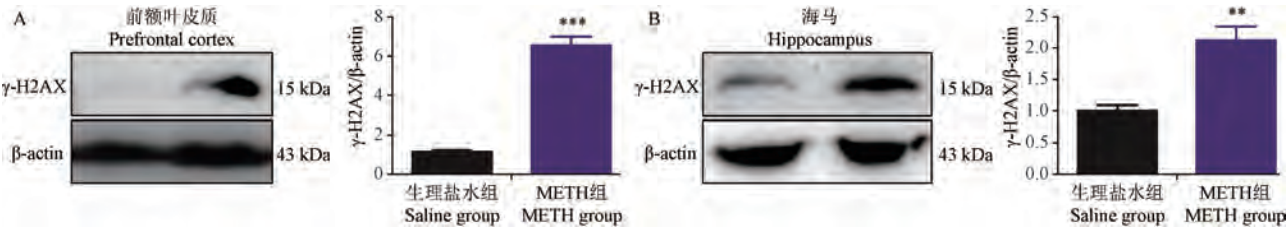


图 4 METH 对小鼠前额叶皮质和海马内 dsDNA 的影响
Figure 4 Effect of METH on dsDNA in prefrontal cortex and hippocampus



注:用 Western blot 分别检测小鼠前额叶皮质和海马组织中 γ -H2AX 的表达情况。A:前额叶皮质表达 γ -H2AX 的情况;B:海马表达 γ -H2AX 的情况。与生理盐水组相比,前额叶皮质和海马组织表达 γ -H2AX 的水平均显著升高,说明 METH 可损伤前额叶皮质和海马内的 dsDNA。与生理盐水组相比, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图 5 METH 诱导小鼠前额叶皮质和海马表达 γ -H2AX 的情况

Note. The expression of γ -H2AX in mouse prefrontal cortex and hippocampus tissues was detected by Western blot. A, Expression of γ -H2AX in prefrontal cortex. B, Expression of γ -H2AX in hippocampus. The levels of γ -H2AX expression in both prefrontal cortex and hippocampus tissues were significantly higher compared to the saline group. This indicates that METH can damage dsDNA in the prefrontal cortex and hippocampus. Compared with the saline group, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

Figure 5 METH-induced expression of γ -H2AX in mouse prefrontal cortex and hippocampus

3 讨论

γ -H2AX 是 DNA 损伤的特异性标志物, DNA 双链发生断裂就意味着 γ -H2AX 会随之形成。在 DNA 损伤时, DNA 双链断裂后的第一反应使组蛋白 H2AX 第 139 位丝氨酸(ser)迅速发生磷酸化, 并生成 γ -H2AX^[21]。一旦组织细胞发生 DNA 双链断裂, γ -H2AX 随即形成, 损伤部位就会有大量 γ -H2AX 焦点团聚集^[22]。此外, DNA 双链断裂时, 组蛋白 H2AX 除会迅速磷酸化形成 γ -H2AX 外, 组蛋白 H2AX 还会募集 DNA 修复蛋白和 DNA 损伤反应蛋白对损伤的 DNA 进行修复^[23]。一般 γ -H2AX 是定位于 DNA 双链断裂处, 其在执行一系列细胞损伤反应的同时, 也会对细胞周期进行调控^[24]。因此, γ -H2AX 在 DNA 损伤修复的众多研究中成为热门的焦点之一。本研究主要探讨 METH 对神经细胞 dsDNA 损伤的情况。主要观察给予 METH 后, 不同类型的神经细胞表达 γ -H2AX 的情况, 旨在阐明 METH 损伤神经细胞 dsDNA 的情况, 为研究 METH 神经毒性作用机制提供理论依据。

目前, 检测 γ -H2AX 可用于定量分析 DSBs 和评估 DNA 修复效率。目前可应用免疫印迹技术、流式细胞技术和免疫荧光技术对 γ -H2AX 进行定量检测。本研究主要应用 Western blot 检测 γ -H2AX, 应用 IF 检测 dsDNA 的损伤情况。本研究发现, 与对照组相比, 给予 METH 后, 原代皮质神经元、HT-22 细胞、BV2 细胞和 HMC3 细胞形态发生明显变化, 说明 METH 对神经细胞具有一定的毒性作用。与对照组相比, 各组神经细胞表达 γ -H2AX 的水平明显升高。说明 METH 可损伤神经细胞 dsDNA。我们进一步在体内进行相关实验的验证。应用生理盐水作为对照, 腹腔注射 METH 后, 应用旷场进行小鼠行为学分析。我们发现, 给予 METH 后, 小鼠运动极其活跃, 运动轨迹和路程明显增多。说明 METH 对小鼠神经系统具有兴奋作用。用 HE 染色分别观察前额叶皮质和海马内神经细胞形态变化情况, 发现 METH 可诱导神经细胞水肿, 部分神经细胞变性, 嗜酸性增强。分离小鼠前额叶皮质和海马, 应用 Western blot 检测两个脑区内 γ -H2AX 的表达水平。与生理盐水组相比, METH 组前额叶皮质和海马内 γ -H2AX 的表达水平均明显升高, 说明 METH 可损伤前额叶皮质和海马内 dsDNA。此外, 我们应用 IF 观察 dsDNA 损伤情况。与生理盐水组

相比, 前额叶皮质和海马内 dsDNA 损伤细胞数量明显增多, 荧光强度明显增强。说明 METH 组前额叶皮质和海马内神经细胞双链 DNA 发生明显损伤。

有研究表明, METH 作用 24 h 可浓度梯度降低 HepG2 细胞和 TR146 细胞活性, 同时可浓度依赖性损伤 HepG2 细胞和 TR146 细胞 DNA。长期滥用 METH 者患癌症和不孕症均与 DNA 损伤有关。也说明滥用 METH 对遗传物质具有损害作用^[16]。此外, 安非他明(amphetamine, AMPH)可促进线粒体功能障碍和 DNA 损伤。该过程与 AMPH 激活 γ -H2AX 和抑制 Akt, 以及诱导氧化应激和激活 caspase-3 密切相关。AMPH 可浓度依赖性升高 γ -H2AX 的表达水平^[15]。上述研究均表明滥用毒品可损伤 DNA。我们的研究也表明 METH 可损伤神经细胞 dsDNA, 但具体作用机制尚不清楚, 值得进一步探究。

总之, METH 损伤神经细胞 dsDNA 可能参与了 METH 诱导的神经毒性作用, 但具体作用机制尚不清楚。在毒品问题全球化的影响下, 目前迫切需要阐明毒品滥用的毒性作用和成瘾机制, 并积极开发新的治疗药物, 这将是毒品滥用研究领域今后研究的重点和难点。

参考文献:

- [1] Leikin JB. Methamphetamine: history, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine. Foreword [J]. Dis Mon, 2012, 58(2): 37.
- [2] Basedow LA, Kuitunen-Paul S, Wiedmann MF, et al. Verbal learning impairment in adolescents with methamphetamine use disorder: a cross-sectional study [J]. BMC Psychiatry, 2021, 21(1): 166.
- [3] 沈雯雯, 刘悦, 张建兵, 等. 海洛因依赖和甲基苯丙胺依赖患者的认知损伤特征 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2020, 26(1): 4-8.
- [4] 苏乐乐, 田甜, 赤艳, 等. 甲基苯丙胺依赖所致认知障碍的治疗进展 [J]. 中国药物滥用防治杂志, 2022, 28(2): 146-150.
- [5] Guo ML, Buch S. Neuroinflammation & pre-mature aging in the context of chronic HIV infection and drug abuse: role of dysregulated autophagy [J]. Brain Res, 2019, 1724: 146446.
- [6] Yang G, Zeng X, Li J, et al. Protective effect of gastrodin against methamphetamine-induced autophagy in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. Neurosci Lett, 2019, 707: 134287.
- [7] Li J, Wang W, Tong P, et al. Autophagy induction by HIV-tat and methamphetamine in primary midbrain neuronal cells of tree

- shrews via the mTOR signaling and ATG5/ATG7 pathway [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 921.
- [8] Huang J, Zhang R, Wang S, et al. Methamphetamine and HIV-tat protein synergistically induce oxidative stress and blood-brain barrier damage via transient receptor potential melastatin 2 channel [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 619436.
- [9] Liu Y, Wen D, Gao J, et al. Methamphetamine induces GSDME-dependent cell death in hippocampal neuronal cells through the endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 162: 73–83.
- [10] Zhuang J, Li F, Liu X, et al. Lithium chloride protects retinal neurocytes from nutrient deprivation by promoting DNA non-homologous end-joining [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(3): 650–654.
- [11] 刘敏, 赵苒. γ H2AX 检测在 DNA 双链断裂研究中的应用 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(6): 742–746.
- [12] Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks [J]. *In Vivo*, 2008, 22(3): 305–309.
- [13] Zhang YJ, Lu CR, Cao Y, et al. Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells *in vitro* via caspase-3/Mst1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(4): 551–557.
- [14] Nagelkerke A, Span PN. Staining against phospho-H2AX (γ -H2AX) as a marker for DNA damage and genomic instability in cancer tissues and cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 899: 1–10.
- [15] Chen PI, Cao A, Miyagawa K, et al. Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(2): e90427.
- [16] Ropek N, Al-Serori H, Mišák M, et al. Methamphetamine (“crystal meth”) causes induction of DNA damage and chromosomal aberrations in human derived cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 128: 1–7.
- [17] Yang G, Li J, Leung CK, et al. Methamphetamine and HIV-1 Tat proteins synergistically induce microglial autophagy via activation of the Nrf2/NQO1/HO-1 signal pathway [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 220: 109256.
- [18] Du SH, Qiao DF, Chen CX, et al. Toll-like receptor 4 mediates methamphetamine-induced neuroinflammation through caspase-11 signaling pathway in astrocytes [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 409.
- [19] Shen B, Zhang D, Zeng X, et al. Cannabidiol inhibits methamphetamine-induced dopamine release via modulation of the DRD1-MeCP2-BDNF-TrkB signaling pathway [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2022, 239(5): 1521–1537.
- [20] Shen B, Zhang R, Yang G, et al. Cannabidiol prevents methamphetamine-induced neurotoxicity by modulating dopamine receptor D1-mediated calcium-dependent phosphorylation of methyl-CpG-binding protein 2 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 972828.
- [21] Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, et al. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin [J]. *Adv Space Res*, 2009, 43(8): 1171–1178.
- [22] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5858–5868.
- [23] Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(17): 5678–5694.
- [24] Huen MS, Chen J. Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(2): 101–108.

[收稿日期] 2022-09-29

张奕星,姜之炎,刘安琪,等. 大鼠腺样体肥大实验动物模型建立的探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 9-16.
Zhang YX, Jiang ZY, Liu AQ, et al. Experimental animal model of adenoid hypertrophy [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 9-16.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.002

大鼠腺样体肥大实验动物模型建立的探讨

张奕星¹, 姜之炎^{2*}, 刘安琪¹, 王淑敏¹, 孙程辉¹

(1.上海中医药大学,上海 200000;2.上海中医药大学附属龙华医院 儿科,上海 200030)

【摘要】 目的 通过复合过敏性鼻炎和慢性咽炎动物模型建立模拟腺样体肥大大鼠模型,并评价模拟模型的可行性。**方法** 通过卵白蛋白腹腔注射基础致敏及滴鼻强化致敏制造过敏性鼻炎大鼠模型,同时予氨水进行大鼠咽喉部喷雾制造慢性咽炎模型,复合成模拟腺样体肥大大鼠模型。造模结束后通过动物行为学评分评估模型动物症状表现;将鼻、咽黏膜及鼻咽淋巴结组织 HE 染色后观察其组织病理形态学改变;造模结束取大鼠全血检测嗜酸性粒细胞百分比,ELISA 法检测大鼠血清及粘膜组织 IL-4、IgE 水平。**结果** 两组模型组动物行为学评分、嗜酸性粒细胞百分比、血清及组织 IL-4、IgE 水平均较空白对照组上调($P<0.01$);与模型 A 组对比,模型 B 组嗜酸性粒细胞百分比、血清及组织 IgE 水平上调更加明显($P<0.01$);两组模型组鼻、咽黏膜及鼻咽部淋巴结都出现不同程度的疾病相关组织病理改变。**结论** 模拟腺样体肥大大鼠模型在症状表现及病理改变上与腺样体肥大类似,可以通过复合过敏性鼻炎和慢性咽炎动物模型模拟腺样体肥大动物模型,但仍需进一步探索完善。

【关键词】 腺样体肥大;过敏性鼻炎;慢性咽炎;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0009-08

Experimental animal model of adenoid hypertrophy

ZHANG Yixing¹, JIANG Zhiyan^{2*}, LIU Anqi¹, WANG Shumin¹, SUN Chenghui¹

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China. 2. Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Department of Paediatrics, Shanghai 200030)

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of an animal model of simulated adenoid hypertrophy by combining animal models of allergic rhinitis and chronic pharyngitis. **Methods** A rat model of allergic rhinitis was established by basal sensitization through intraperitoneal OVA injection and nasal enhanced sensitization. A model of chronic pharyngitis was established simultaneously by a throat spray of ammonia, both models were combined into a rat model of simulated adenoid hypertrophy. The symptom performance of model animals was assessed by the animal behavioral score after modeling. Pathomorphological changes of nasal and pharyngeal mucosae and nasopharyngeal lymph nodes were observed by HE staining. The percentage of eosinophils was assess in rat whole blood. IL-4 and IgE levels in rat serum and mucosal tissue were measured by ELISA. **Results** The behavior score, eosinophil percentage, and IL-4 and IgE levels in serum and tissue were increased compared with the control group ($P<0.01$). Compared with model group A, the eosinophil percentage and serum IgE level were increased in model group B ($P<0.01$). In the model groups, nasal and

【基金项目】国家自然科学基金项目(82174433);上海市进一步加快中医药传承创新发展三年行动计划项目(ZY(2021-2023)-0206-01);上海市市级医院新兴前沿技术联合公关项目(SHDC12021102);上海市中医药三年行动计划项目(ZY(2021-2023)-0209-05)。

【作者简介】张奕星(1988—),女,主治医师,在读博士研究生,研究方向:中医药防治儿童鼻病。E-mail:ybjzyx@163.com

【通信作者】姜之炎(1960—),女,教授,主任医师,研究方向:中医药治疗儿童常见病、多发病,徐氏儿科传承。E-mail:lhjzycm@163.com

pharyngeal mucosae and nasopharyngeal lymph nodes showed different degrees of disease-related histopathological changes.

Conclusions The rat model had symptom manifestations and pathological changes similar to adenoid hypertrophy. This animal model of simulated adenoid hypertrophy can be used as a combined animal model of allergic rhinitis and chronic pharyngitis, but requires further exploration and improvement.

[Keywords] adenoid hypertrophy; allergic rhinitis; chronic pharyngitis; animal model

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

腺样体位于鼻咽顶壁与后壁交界处,既是鼻咽部具有防御作用的一团淋巴组织,也是人体重要免疫器官扁桃体组织的一部分,具有体液免疫和细胞免疫的双重作用^[1],正常儿童 2~6 岁时会出现腺样体生理性肥大,学龄期后逐渐缩小,但当外界病原体入侵机体,刺激腺样体淋巴组织病理性增生,则称为腺样体肥大(adenoid hypertrophy, AH)^[2]。有研究表明在随机代表性样本中儿童和青少年 AH 的临床患病率为 34.46%,在样本中高达 70%,且男童发病率高于女童^[3-4]。肿大的腺样体阻塞气道,造成鼻塞、打鼾、张口呼吸、睡眠呼吸困难等临床症状,久之导致听力下降、睡眠呼吸障碍和颌面畸形,影响儿童正常生长发育、智力发育,甚至会诱发心血管系统早期的病理性改变^[5-6]。另一方面, AH 的堵塞不通,导致分泌物或各类变应原、病原体长期滞留鼻咽腔、咽鼓管,容易并发儿童慢性鼻窦炎、过敏性鼻炎、分泌性中耳炎等疾病。儿童 AH 目前治疗方案以鼻用糖皮质激素、抗白三烯、抗组胺类药物及手术治疗为主。由于手术可能损害小儿鼻咽部的局部免疫功能,且少数患儿手术后可能出现寰枢关节半脱位等风险^[7],多数家长更偏向选择内科治疗,故寻求更加有效、安全的药物治疗方法是儿科临床急需解决的问题,而中医药治疗儿童 AH 重在消除痰、瘀等病理产物,调整患儿肺脾两虚的体质状态,凭借其良好的临床疗效及安全性也越来越受到患儿及家长的认可。

儿童 AH 的发病机制并不明确,药物疗效及药物作用机制均难以评价,需要大量实验医学方面的验证。动物模型是实验医学开展的基础,但查阅文献,目前并无可行的用于评价药物疗效的 AH 动物模型报道,主要原因在于常见的实验动物鼠类缺乏腺样体或者扁桃体组织,而存在腺样体组织的大型哺乳动物由于形体等诸多限制又难以开展广泛的动物实验研究,且目前尚无公认的造成动物腺样体或类似组织出现与人类 AH 相似的病理表现的造模方式,这些都限制了对儿童 AH 病理机制及药物治疗方案的进一步探索。

由于实验动物本身组织结构难以改变,故本课题组提出“模拟模型”的想法,希望建立在临床表现及组织病理改变上与 AH 相类似的可行的模拟动物模型。

1 过敏性鼻炎联合慢性咽炎动物模型模拟 AH 动物模型的理论依据

1.1 临床表现的一致性

儿童 AH 的主要临床表现有两方面:一是鼻塞、打鼾等气道通气障碍;二是由于堵塞造成分泌物或各类变应原、病原体长期滞留引起的症状^[8],如流涕、慢性咳嗽等,均与局部慢性炎症相关^[5]。有研究发现 AH 与小儿耳鼻喉科众多疾病均有密切联系,如过敏性鼻炎(allergic rhinitis, AR)、急慢性鼻窦炎(acute and chronic rhino-sinusitis, ARS/CRS)、分泌性中耳炎、儿童阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)等^[9],其中以 AR 的发病率最高,国外有学者甚至认为 AH 与 AR 互为因果, AH 患儿即使没有 AR 临床表现,也有 AR 的病理特征或其他变态反应^[10]。慢性咽炎(chronic pharyngitis, CP)则是以清嗓样咳嗽为主要临床表现,是慢性咳嗽常见病因之一,虽无流行病学研究证实 AH 和 CP 的伴发情况,但两者均归属于上气道综合征范畴,病位均处于咽喉部,均有慢性咳嗽的临床表现,均与局部慢性炎症相关,故能认为两者有密切联系。

1.2 组织病理的一致性

现代医学对儿童 AH 发病机制尚未明确阐述,目前研究主要集中在免疫反应和过敏反应两方面。腺样体属于粘膜相关性免疫淋巴组织,属于咽扁桃体的一部分,口咽淋巴组织的集合被称为沃尔德耶淋巴环(Waldeyer ring, WR),包括了扁桃体、腺样体及口咽部淋巴组织。由于鼠类无扁桃体及腺样体,有学者对大鼠鼻咽部淋巴组织进行研究,提出 WR 等效淋巴组织(WR equivalent lymphoid tissue, WRE)的概念^[11],研究表明该组织由不同的 T 细胞和 B 细胞组成,在组织学上可以被认为是一

种具有免疫活性的淋巴器官和粘膜相关淋巴组织,与人类扁桃体的相似,而免疫学检查结果显示大鼠 WRE 更像人类咽扁桃体而不是腭扁桃体。而 Cleary 等^[12]利用链球菌小鼠鼻内感染作链球菌性咽炎的模型,同样基于小鼠的鼻相关淋巴组织(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)与人类扁桃体类似的特点,NALT 是鼠类在外鼻孔底部下方和硬腭上方的两个淋巴组织叶,研究证实了 A 组链球菌是优先定植或入侵 NALT,再次验证了 NALT 在结构和功能上均与人类扁桃体相似。从病理过程而言,当外界病原体侵袭机体时,B 淋巴细胞受到感应而进行复制,继而侵入循环,累及全身淋巴组织及具有淋巴细胞的组织和器官,从而刺激 T 细胞增殖。腺样体、扁桃体或其他部位淋巴结均为淋巴器组织,当机体受炎症侵袭时,同时受累或先后受累是可预测的病理过程,在试验动物缺乏某些淋巴组织的情况下,原则上可以用机体其他淋巴组织代替。如 Qu 等^[13]就用腹部淋巴结制备树突状细胞,用于研究树突状细胞对气道炎症和免疫调节的影响。基于 WRE(或 NALT)在组织病理和免疫功能上与咽扁桃体的相似性,课题组提出以大鼠鼻咽部淋巴组织模拟大鼠腺样体的设想。

1.3 中医理论的一致性

古代中医文献中无“腺样体肥大”相关病名记载,但根据其主要临床表现及常见并发症可归属于“鼻塞”“窠囊”“鼾眠”“痰核”等疾病中。许多医家认为儿童 AH 形成与“痰”“瘀”密切相关^[14-15],故本病病机及治疗可参照古籍对“痰核”“窠囊”等疾病的描述。元代朱丹溪《丹溪心法·卷二·痰十三》中云:“凡人身结核不红、不痛、不做脓,皆痰注也”,故无论是肥大的腺样体、扁桃体,或是肿大的机体淋巴结,都可称之为“痰核”;喻嘉言《寓意草》中也有相关描述:“至于窠囊之痰,……生长则易,剥落则难,……窠囊之来,始于痰聚胃口,呕时数动胃气,胃气动,则半从上出于喉,半从内入于络,……痰入既久,则阻碍气道,而气之奔入者,复结一囊也”,脾作为生痰之源,故中医认为此类疾病病机关键均在于脾运失健,痰浊互结。另《类经·二十一卷·四十五》注言:“顽颡,即颈中之喉颡。当咽喉之上,悬雍之后……颡前有窍,息通于鼻”,由此可见“顽颡”解剖位置近鼻咽部腺样体处,是口、鼻、咽、喉贯通之地,经络相连,均属上焦肺系。故从中医理论而言,鼻咽部淋巴结和腺样体均属于“痰

核”,病机均与“脾虚痰阻”相关,在解剖位置上也是一致的。

综上,我们认为可以尝试通过复合 AR 和 CP 动物模型模拟 AH 大鼠模型。

2 材料和方法

2.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 18 只,4~5 周龄,体重 120~140 g,由浙江维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(浙)2019-0001]提供,适应性喂养 1 周,饲养于屏障环境,房间每 12 h/12 h 明暗交替,室温保持在 20~26℃,相对湿度为 40%~70%,自由进食和饮水。实验动物饲养及观察于上海中医药大学实验动物中心[SYXK(沪)2020-0009]进行,操作符合上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会的相关审批(PZSHUTCM210709003),动物实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例,实验动物饲养和实验过程中按实验动物 3R 原则给予人道关怀。

2.2 主要试剂与仪器

卵白蛋白(OVA, Sigma 公司, A5503-5G);氢氧化铝粉末(南京化学试剂股份有限公司, C0151520323);氨水(南京化学试剂股份有限公司, C0700110123);注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋(舒泰 50,法国维克有限公司,2020 外兽药证字 06 号);ELISA 试剂盒 IL-4(美国 R&D systems 公司, R4000);ELISA 试剂盒 IgE(美国 Abcam 公司, ab157736);实验所需其他溶液如多聚甲醛、PBS 等均于上海中医药大学附属龙华医院中心实验室配制。

实验所需仪器及设备如多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司, Synergy2 型)、病理切片机(上海徕卡仪器有限公司, RM2016 型)、全自动血细胞分析仪(日本 Celltac α , MEK-6450)等同样由上海中医药大学附属龙华医院中心实验室提供。

2.3 实验方法

2.3.1 分组

适应性喂养 1 周后,采用随机数字表将 18 只 SD 大鼠随机分成空白对照组、模型 A 组及模型 B 组,每组各 6 只。由于本次实验为探索性造模实验,且为同时建立 2 种模型的“复合性动物模型”,参阅文献^[16-18]发现 AR 造模方法有给药时间及剂量的差异,故分模型 A、B 组,以探索最适剂量。

2.3.2 造模

建立 AR 大鼠模型同时建立 CP 大鼠模型:(1) AR 大鼠模型:模型 A 组以 OVA 0.3 mg 作抗原,氢氧化铝粉末 30 mg 作佐剂,加入 1 mL NS 中形成混悬液,隔日 1 次腹腔注射进行基础致敏,共 8 次,第 16 天起大鼠取头低位,用微量加样器予每侧鼻腔滴 5% OVA 溶液 50 μ L 作为激发,每日 1 次,连续 7 d;模型 B 组则以 OVA 1 mg+氢氧化铝粉末 10 mg+1 mL NS 混悬液作为基础致敏,在第 1、8、15 天进行腹腔注射,第 16~22 天,每天 1 次,每侧鼻腔滴 10 mg/mL 浓度的 OVA 溶液 25 μ L 作为激发;空白对照组大鼠以模型 A 组同时段同等量 NS 腹腔注射及鼻腔滴注。(2) CP 大鼠模型:固定大鼠,模型 A、B 组均用喷雾器将 5% 氨水喷入大鼠咽腔,每天 2 次,每次 2 揿(约 200 μ L),刺激时间间隔 8 h,连续 22 d;空白对照组则以等量 NS 咽腔喷雾。

2.3.3 动物行为学观察

最后一次激发致敏及喉腔喷雾结束后 1 h 内,进行大鼠行为学观察评分。各指标采用叠加量化计分法,鼻痒:抓口鼻 1~5 次计 1 分,抓口鼻 6~10 次计 2 分,抓口鼻 11 次以上计 3 分;喷嚏或咳嗽:1~3 个计 1 分,4~10 个计 2 分,11 个以上计 3 分;清涕或口腔分泌物:流至前鼻孔或仅在口周计 1 分,超出前鼻孔或超出口周计 2 分,涕流满面计 3 分,总分超过 5 分表示造模成功。

2.3.4 组织病理学检查

造模结束后采用舒泰 50 按说明书配制后以 0.1 mL/100 g 体重腹腔注射麻醉大鼠,采血致死后在大鼠鼻背正中缝处裂开鼻腔,剖析出鼻、咽黏膜组织,剖开整个上颌,寻找并分离鼻咽部淋巴组织,在清洁 PBS 轻轻摇动,洗去血液,一部分迅速置于 4% 多聚甲醛中固定,另一部分置于 -80℃ 冰箱保存。固定后的鼻、咽黏膜组织及淋巴组织,常规石蜡包埋,切片,经 HE 染色后,200 倍显微镜观察病

理组织形态学改变。

2.3.5 EOS 水平检测

造模结束并麻醉大鼠后取大鼠腹主动脉血,5 mL 左右 4℃、3000 r/min 离心后取血清,-80℃ 冰箱保存;抗凝管接 1 mL 左右并迅速置于全自动血细胞分析仪测全血细胞计数。

2.3.6 IL-4、IgE 水平检测

取鼻咽粘膜组织,复温后研磨匀浆后取上清液,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清及组织上清液中 IL-4、IgE 水平。操作严格按试剂盒说明书进行。

2.4 统计学方法

本研究采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行统计学处理,数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。资料正态分布且方差齐时,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用 LSD 法;资料偏态分布或方差不齐时,多组比较采用秩和检验(Kruskal-Wallis 法),用中位数(M)、25 百分位数(P25)和 75 百分位数(P75)表达,组间两两比较用 Nemenyi 法。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠行为学评分

统计各组大鼠每小时抓鼻、咳嗽或喷嚏的次数,结果不符合正态分布,故采用秩和检验。与空白对照组动物相比,模型 A 组与模型 B 组动物抓鼻、喷嚏等行为次数明显增多,差异具有统计学意义($P<0.05$),两模型组相比,模型 B 组大鼠每小时抓鼻次数更多($P<0.05$),但两模型组咳嗽或喷嚏次数相当,差异无统计学意义($P=1.000$),两模型组口鼻溢液更明显,根据行为学评分结果可知,模型 A 组与模型 B 组动物行为学评分均较空白对照组增高,且差异均有统计学意义($P<0.01$),但模型 A 组与模型 B 组相比无统计学差异($P=0.459$)。见表 1。

表 1 各组动物行为学评分比较

Table 1 Comparison of animal behavioral scores in each group

组别 Groups	抓鼻 (times/h) Number of nose scratches per hour	咳嗽或喷嚏 (times/h) Number of coughs or sneezing per hour	行为学评分 Behavioral score
空白对照组 Control group	0.00(0.00,1.25)	0	1.00 $\pm$ 0.63
模型 A 组 Model group A	8.75(8.00,11.50) *	3.00(2.00,3.75) **	6.33 $\pm$ 1.03 **
模型 B 组 Model group B	16.50(16.00,19.25) ** #	3.00(2.25,3.75) **	6.67 $\pm$ 0.52 **

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型 A 组比较, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model group A, # $P<0.05$.

3.2 大鼠全血 EOS%计数水平

经统计发现组间比较有差异,模型 A 组 EOS%较空白对照组上调($P<0.05$),但模型 B 组较空白组上调更加明显($P<0.01$),且模型 B 组与模型 A 组相比,差异同样具有统计学意义($P<0.01$),见表 2。

3.3 大鼠鼻、咽黏膜及鼻咽部淋巴结组织病理改变

空白对照组鼻粘膜组织结构正常,黏膜表明纤毛致密、完整,黏膜固有层中含有小的混合性腺体、浆细胞及肥大细胞等,间质无水肿变性;模型 A 组纤毛数量减少,部分上皮细胞脱落,结构界限模糊,间质水肿,黏膜内可见嗜酸性粒细胞、中性粒细胞及淋巴细胞浸润;模型 B 组与模型 A 组类似,纤毛破坏严重,上皮细胞变性,部分胞质溶解、边缘不

清,黏膜内出现明显的小血管扩张和间质水肿现象,炎性细胞浸润明显。

空白对照组咽黏膜固有层完整,可见少量浆细胞、淋巴细胞浸润,未见明显病理性损伤;模型 A 组黏膜固有层破坏,少量黏膜脱落,黏膜组织可见炎性细胞浸润,黏膜上皮细胞增生,腺体可见充血肥大,黏膜下可见少许血管扩张;模型 B 组咽部损伤严重,广泛黏膜坏死,黏膜下层高度水肿,结构紊乱,同样有炎性细胞浸润,腺体间质可见出血。

空白对照组淋巴结组织结构正常,淋巴细胞排列紧密;模型 A 组及模型 B 组见淋巴小结体积增大,数量增多,小结内生发中心不明显,淋巴细胞不均匀。

总体而言,空白对照组鼻、咽黏膜及淋巴结结构基本正常,两组模型组均有不同程度病理改变,但模型 B 组更加明显。见图 1。

3.4 大鼠血清及鼻咽黏膜组织 IL-4、IgE 水平

统计显示,模型 A 组与模型 B 组血清及组织 IL-4、IgE 水平均较空白对照组均显著上调($P<0.01$);两组模型组之间对比,血清 IL-4 水平,模型 A 组较模型 B 组高,差异有统计学意义($P<0.05$),组织 IL-4 水平两组之间无统计学差异($P>0.05$),血清及组织 IgE 水平模型 B 组较模型 A 组高($P<0.01$)。见表 3。

表 2 各组动物 EOS%水平比较

Table 2 Comparison of EOS% levels in each group			
组别 Groups	嗜酸性粒细胞百分比(%) EOS%	F	P
空白对照组 Control group	1.23±0.57	40.232	0.000
模型 A 组 Model group A	3.82±0.43 *		
模型 B 组 Model group B	10.05±2.95 ** ##		

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组 A 比较, ## $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with model group A, ## $P<0.01$.

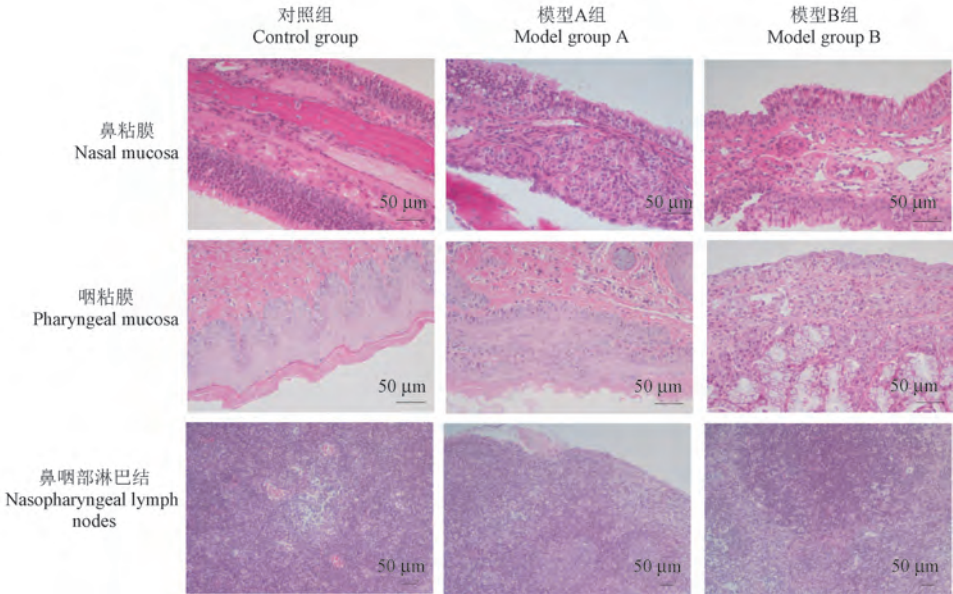


图 1 HE 染色后大鼠鼻、咽黏膜及鼻咽部淋巴结组织病理改变

Figure 1 The histopathological changes of nasal mucosa, pharyngeal mucosa and nasopharyngeal lymph nodes by HE staining

表 3 各组动物血清及组织 IL-4、IgE 水平
Table 3 Serum and mucosal tissue IL-4 and IgE levels in each group

组别 Groups	血清 IL-4 (pg/mL) IL-4 levels of serum	血清 IgE (μg/mL) IgE levels of serum	组织 IL-4 (pg/mL) IL-4 levels of tissues	组织 IgE (μg/mL) IgE levels of tissues
空白对照组 Control group	15. 897±3. 133	1. 091±0. 141	37. 042±11. 637	2. 103±0. 141
模型 A 组 Model group A	42. 877±4. 581 **	1. 579±0. 092 **	117. 112±8. 709 **	2. 591±0. 092 **
模型 B 组 Model group B	39. 610±5. 210 *** [#]	2. 021±0. 124 *** ^{##}	118. 941±12. 277 **	3. 033±0. 124 *** ^{##}

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与模型 A 组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group A, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

4 讨论

AH 是儿童常见呼吸道疾病之一,近年来发病率更是逐年攀升,并与儿童反复上呼吸道感染、鼻窦炎、中耳炎等耳鼻咽喉科疾病相关。目前 AH 的发病机制并不明确,但多数学者认为与免疫功能紊乱,诱导炎症细胞激活,局部炎症从而引起病理性肥大相关,故在药物治疗上多选用鼻用激素局部抗炎,或使用白三烯受体拮抗剂抑制其引发的炎症反应^[19],对于中重度 AH,则建议进行腺样体切除手术,以期迅速消除临床症状。中医药治疗儿童 AH 以其良好的临床疗效也越来越受到关注,中医文献中无“腺样体肥大”相关病名记载,只能根据其主要临床表现及常见并发症归属于“鼻塞”“窠囊”“鼾眠”“乳蛾”“痰核”“颌颞不开”等疾病中,虽目前尚无统一辨证分型,但多从“痰、瘀”论治^[20-21]。无论中、西医,寻求有效、安全的 AH 药物治疗方法都是是儿科临床急需解决的问题,对于本病无论是临床研究还是实验室研究均需进一步开展。

4.1 AH 动物模型研究现状

动物实验是医学科学从“经验科学”转化到“实验医学”过程中的重要手段和途径,实验动物模型对于某样疾病基本规律和机理的阐明,对于其诊断、治疗、药物研发所起的作用不可取代^[22],只有经过严格、系统的动物实验才能把医学置于真正的科学基础上。通过对 AH 研究进展的回顾,发现目前鲜有关于 AH 动物模型报道。主要原因在于实验动物本身条件限制,腺样体作为 WR 组成之一,鼠类却缺乏 WR,故不能在大鼠、小鼠或豚鼠咽喉部直接找到腺样体组织^[12],但鼠类淋巴组织丰富,是进行慢性炎症及免疫性炎症实验及抗炎药物筛选和评价最适宜的实验动物;一些大型的哺乳动物如猪、狗有类似 WR 扁桃体组织,但由于形体等诸多限制,同样不适合开展广泛的 AH 动物实验。另一原因在

于造模方式,如赵婷婷等^[23]对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 动物模型进行综述,而 OSAHS 是 AH 的最严重表现,本病的造模主要依靠物理方式达到“梗阻”表现,如硅胶阻塞^[24]、灼烧外鼻孔^[25]等引起鼻阻塞-口呼吸症状,或在动物上气道特定位点注射凝胶、胶原和安装计算机控制活塞等方法,人为造成上气道狭窄或闭合从而模拟人类 OSAHS 患者的气道情况,此类模型一方面存在阻塞精确度难以控制、创伤性等缺点,重要的是不能模拟疾病发生时的病理状态,如炎症、渗出、变态反应等,对研究药物对疾病的治疗作用没有意义,同时这类模型同样多采用犬、猪、猴等大型动物。因此目前缺乏公认的腺样体肥大或扁桃体肥大相关的可行的动物模型,其严重症状 OSAHS 的动物模型尚属于探索阶段,没有能够进行病理和药理研究的此类动物模型,限制了对儿童 AH 病理机制、治疗方案的探索,同时为新药的研发带来困难。

4.2 AH 动物模型的建立

基于 AR 和 CP 在临床表现上与 AH 有诸多交叉,且 AH 患儿多数伴有 AR 或 CP,加之 AH 在病理特点是免疫介导的过敏炎症反应,与 AR 及 CP 病理机制相一致。就实验大鼠而言,WRE 作为一种有免疫活性的淋巴器官,其组织病理上和人类扁桃体相似,免疫学检查上类似人类腺样体^[11],因此,鼻咽淋巴结组织在实验大鼠腺样体缺乏的情况下可以作为腺样体的代替组织。而在中医理论中,“凡人身结核不红、不痛、不做脓,皆痰注也”,即肿大的扁桃体、腺样体或淋巴结,均属于“痰核”,源于脾虚不能运化水湿,水湿聚而成痰,痰气凝聚于鼻咽而成“痰核”,痰核阻塞气道,气机不畅而出现咳嗽、张口呼吸、夜眠打鼾等一系列临床表现,故从中医理论而言,鼻咽部淋巴结和腺样体均属于“痰核”,病机均与“脾虚痰阻”相关,在解剖位置上也是一致的。

故通过联合 AR 大鼠模型和 CP 大鼠模型建立在临床表现及组织病理改变上与 AH 相类似的动物模型在理论上是可行的。

4.3 AH 动物模型的评价

由于本次实验选择的实验动物大鼠缺乏腺样体组织,故无法直接通过腺样体组织病理结构改变验证模型是否成功,故课题组通过动物行为学观察证明模型动物有疾病相关症状,通过组织病理学检查证明模型动物存在 AH 相关病理性改变,通过血清及组织炎症指标、变态反应性指标水平的变化从发病机制方面作为造模是否有效的佐证。

从最终结果来看,两组模型组均同时出现较明显的 AR 和 CP 的临床表现和组织病理性改变,说明 AR 和 CP 的动物模型是成功的,且在同一动物身上同时建立两种不同疾病的模型也是可行的。特别是在组织病理上,模型组大鼠鼻、咽黏膜出现明显纤毛或黏膜固有层破坏,间质水肿及炎性细胞浸润,而大鼠的鼻咽淋巴结病理结果显示模型组存在淋巴结组织结构改变,而大鼠鼻咽淋巴结作为 WRE 的一部分,在病理上与腺样体最为接近,组织病理改变,可以作为造模成功的重要依据之一。

从病理过程而言,AH 的产生、发展与慢性炎症刺激及变态反应密不可分,有学者通过对腺样体上细菌的培养,发现其与鼻腔外侧壁细菌相同,证实腺样体可能是细菌隐藏的场所,也有研究证实腺样体组织内有含量较高的白三烯受体^[26]。因此炎症性指标及变应性指标的改变可以证实 AH 模型大鼠发生的病理过程^[27]。IgE 在变态反应性疾病发病机制中的作用是公认的,当人体接触过敏原后,激活从而 B 淋巴细胞,产生特异性 IgE 并依附于肥大细胞和嗜酸性粒细胞(eosinophil,EOS)表面,当在次接触同种过敏原,过敏原快速与细胞表面 IgE 结合,使 IgE 产生桥联,破坏靶细胞结构并脱颗粒释放 Th2 细胞因子、组胺及白三烯炎症介质,从而产生一系列过敏性症状^[28]。EOS 是一类人体固有免疫细胞,与变应性炎症严重程度有关,是过敏性疾病发生、发展及迁延不愈的重要原因,并常与呼吸道上皮脱落、基底膜增厚、黏液细胞增生和间质水肿等慢性炎症病理变化相伴^[29]。IL-4 作为 Th2 淋巴细胞的特征性细胞因子,有促进 Th2 生成功能,参与机体体液免疫,其又是 Ig 转换因子,诱导 Th2 淋巴细胞分化,能将活化信号传达给 B 细胞,使 B 细胞由生成 IgM 切换为生成 IgE,故 IL-4 是促进 IgE 合成的最主

要细胞因子,而 IgE 型过敏反应是机体再次接触过敏原时,Th2 细胞功能失调,产生大量 IL-4,进而释放炎性介质所致^[30],故 IL-4 是参与气道过敏性炎症的发生、发展的重要因子,目前市场上已有一种针对 IL-4 α 受体的治疗慢性鼻窦炎的单克隆抗体^[31],也说明 IL-4 水平与鼻病之间存在重要关联。因此 EOS、IgE、IL-4 可以作为评估 AH 变态性炎症程度的指标。从造模结果可以看出两组模型动物 EOS、血清及鼻咽黏膜组织的 IL-4 和 IgE 水平均升高,证实模型大鼠存在炎症反应及变应性反应变化,且模型 B 组的变应性反应相关指标,如 EOS%、IgE 变化更为显著,推测与 AR 模型不同的给药剂量及时间有关。

综上,本研究的“模拟模型”在症状表现、病理改变及病理变化上都与 AH 类似,在目前缺乏 AH 动物模型的情况下,可以尝试通过复合 AR 和 CP 动物模型模拟 AH 动物模型。本研究是对此类模型的初探,尤其局限性,仍需后期大量实验进行给药时间、剂量或联合其他疾病如慢性鼻窦炎等动物模型的探索和验证。

参考文献:

- [1] Nicholas L. Anatomy, head and neck, nasopharynx [EB/OL]. [2022 - 08 - 08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557635/>.
- [2] Zachary G, Nagendra G. Adenoid hypertrophy [EB/OL]. [2022 - 05 - 08] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536984/>.
- [3] Pereira L, Monyror J, Almeida FT, et al. Prevalence of adenoid hypertrophy: a systematic review and meta-analysis [J]. Sleep Med Rev, 2018, 38: 101-112.
- [4] Gerhardsson H, Stalfors J, Odhagen E, et al. Pediatric adenoid surgery in Sweden 2004-2013: incidence, indications and concomitant surgical procedures [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2016, 87: 61-66.
- [5] Shen L, Lin Z, Lin X, et al. Risk factors associated with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome in Chinese children: a single center retrospective case-control study [J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203695.
- [6] 郭向东,王彦华,姚卫杰,等.学龄期睡眠呼吸障碍儿童的神经行为功能分析[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,32(15):1158-1162.
- [7] Pagella F, Lizzio R, Pusateri A, et al. Adenoidectomy: Anatomical variables as predictive factors of intraoperative adenoid residues [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2021, 140: 110493.
- [8] 李晓艳.调节性T细胞在儿童腺样体肥大发病中的作用及其与过敏性鼻炎的关系[D].上海:上海交通大学,2016.

- [9] 刘燕, 魏萍, 寇巍, 等. 儿童腺样体肥大与耳鼻咽喉科常见疾病关系的研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2019, 33(4): 149-154.
- [10] Marazzato M, Zicari AM, Aleandri M, et al. 16S metagenomics reveals dysbiosis of nasal core microbiota in children with chronic nasal inflammation: role of adenoid hypertrophy and allergic rhinitis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 458.
- [11] Koornstra PJ, Duijvestijn AM, Vlek LFM, et al. Immunohistology of nasopharyngeal (waldeyer's ring equivalent) lymphoid tissue in the rat [J]. Acta Oto Laryngol, 1993, 113(5): 660-667.
- [12] Cleary PP, Zhang Y, Park HS. Nasal associated lymphoid tissue & M cells, a window to persistent streptococcal infections [J]. Indian J Med Res, 2004, 119: 57-60.
- [13] Qu SY, Ou-Yang HF, He YL, et al. Der p2 recombinant bacille Calmette-Guérin targets dendritic cells to inhibit allergic airway inflammation in a mouse model of asthma [J]. Respiration, 2013, 85(1): 49-58.
- [14] 王剑锋, 张士卿. 张士卿教授以痰瘀互结理论治疗小儿腺样体肥大经验 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(4): 460-462.
- [15] 顾静雯, 施晓燕, 庄承, 等. 姜之炎教授“运脾治鼻”法治疗小儿腺样体肥大临床经验 [J]. 中医药导报, 2018, 24(9): 125-126.
- [16] 刘书芹, 李桂华, 赵娜, 等. 黄连解毒汤对变应性鼻炎大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及黏膜杯状细胞的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(1): 140-145.
- [17] 刘宝, 黄翔明, 王丹丹, 等. 变应性鼻炎证结合模型的构建与评价 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 4952-4956.
- [18] Wang JC, Huang Y, Zhang RX, et al. miR-338-3p inhibits autophagy in a rat model of allergic rhinitis after PM_{2.5} exposure through AKT/mTOR signaling by targeting UBE2Q1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 554: 1-6.
- [19] 黎润球, 何锦添, 叶贝华. 孟鲁司特钠联合糠酸莫米松对轻度腺样体肥大患儿 TGF- β 1、IL-17 及 Th17/Treg 的影响 [J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(4): 434-439.
- [20] 姜之炎, 刘俊俊, 石李, 等. 运脾化痰通窍方联合鼻部按摩治疗儿童腺样体肥大的临床疗效及免疫调节作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(1): 42-46.
- [21] 李伟伟, 史正刚. 张士卿治疗儿童腺样体肥大临床经验 [J]. 中医临床杂志, 2018, 30(12): 2238-2240.
- [22] 张红亚. 实验动物在医学科研设计中的应用 [J]. 国际外科学杂志, 2020, 47(1): 71-72.
- [23] 赵婷婷, 贺红, 陈雄. 颅颌面发育相关的阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征动物模型研究进展 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(2): 341-344.
- [24] Harvold EP, Tomer BS, Vargervik K, et al. Primate experiments on oral respiration [J]. Am J Orthod, 1981, 79(4): 359-372.
- [25] Uchima Koecklin KH, Kato C, Funaki Y, et al. Effect of unilateral nasal obstruction on tongue protrusion forces in growing rats [J]. J Appl Physiol (1985), 2015, 118(9): 1128-1135.
- [26] Bernstein JM, Dryja D, Murphy TF. Molecular typing of paired bacterial isolates from the adenoid and lateral wall of the nose in children undergoing adenoidectomy: implications in acute rhinosinusitis [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2001, 125(6): 593-597.
- [27] Goldbart AD, Goldman JL, Li RC, et al. Differential expression of cysteinyl leukotriene receptors 1 and 2 in tonsils of children with obstructive sleep apnea syndrome or recurrent infection [J]. Chest, 2004, 126(1): 13-18.
- [28] 蒲玉铃. 揞针对过敏性鼻炎模型大鼠血清 IgE、IL-4、IL-2 的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [29] 刘瑾, 祝戎飞. 嗜酸性粒细胞与过敏性鼻炎 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2021, 15(6): 707-708.
- [30] Branchett WJ, Stölting H, Oliver RA, et al. A T cell-myeloid IL-10 axis regulates pathogenic IFN- γ -dependent immunity in a mouse model of type 2-low asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 145(2): 666-678.
- [31] 梁旭, 史丽. 慢性鼻窦炎生物靶向药物治疗的研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2022, 36(3): 30-35.

[收稿日期] 2022-08-15

张格第,刘庚鑫,罗富里,等. 基于网络药理学研究肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 17-25.

Zhang GD, Liu GX, Luo FL, et al. Mechanism of Shenshuai Recipe in treating chronic kidney disease-related myocardial injury based on network pharmacology [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 17-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.003

基于网络药理学研究肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的作用机制

张格第¹,刘庚鑫¹,罗富里²,晏子友^{2*}

(1.江西中医药大学,南昌 330000;2.江西中医药大学附属医院肾内科,南昌 330000)

【摘要】 目的 采用网络药理学和分子对接的研究方法,预测肾衰方慢性肾病 (chronic kidney disease,CKD) 心肌损伤的作用机制。**方法** 利用 TCMSP 数据库、Herb 本草组鉴数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 和 SWISS Target prediction 数据库筛选活性成分靶点信息,然后通过 Uniprot 数据库筛选出人类靶点和规范基因名;使用 Cytoscape 3.7.2 软件作药物-有效成分-靶点网络图;选用 GeneCards 数据库收集疾病相关靶点;利用 Venny 2.1 建立“肾衰方”抗 CKD 心肌损伤的基因靶点数据库;利用 String 数据库构建主要成分靶点互作网络并筛选关键靶点;然后导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑分析和构建 PPI 网络图,最后用 DAVID 平台进行 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)通路富集分析($P<0.05$)和 Gene Ontology (GO)生物学功能注释。**结果** 经过筛选,肾衰方活性化合物为 252 个;肾衰方与 CKD 心肌损伤共同靶点 649 个,其中 AKT1、TNF、MAPK3、VEGFA 可能是肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的重要靶点;进行 GO 分析,得到 Biological process (BP) 1485 条目,Celler component (CC) 176 条目, Molecular function (MF) 386 条目,其中富集基因数量最多的条目为 plasma membrane、cytosol、cytoplasm,分别分布了 313、304、276 个基因;进行 KEGG 分析,肾衰方治疗 CKD 心肌损伤参与的通路可能有 HIF-1 α 通路、Lipid and atherosclerosis 通路、AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications 通路、PI3K-AKT 通路、Insulin resistance 通路等。**结论** 肾衰方可能通过参与改善胰岛素抵抗,改善脂质代谢、抗动脉粥样硬化,调节炎症因子和血管内皮生长因子等的表达等多重机制发挥心肾保护作用,其中 PI3K/AKT 和 MAPK 可能是重要的调节通路。

【关键词】 网络药理学;分子对接;肾衰方;CKD;心肌损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0017-09

Mechanism of Shenshuai Recipe in treating chronic kidney disease-related myocardial injury based on network pharmacology

ZHANG Ged¹, LIU Gengxin¹, LUO Fuli², YAN Ziyou^{2*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000, China.

2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330000)

【Abstract】 Objective To predict the mechanism of Shenshuai Prescription (SSR) in chronic kidney disease (CKD)-related myocardial injury using network pharmacology and molecular docking method. **Methods** We used the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and Herb herbal medicine

[基金项目] 国家自然科学基金(81960843)。

[作者简介] 张格第(1990—),男,主治医师,博士,研究方向:中医内科学,经方医学。E-mail:zhanggedi1990@163.com

[通信作者] 晏子友(1963—),男,教授,主任医师,博士生导师,医学博士,研究方向:中医肾病的临床和实验。
E-mail:13970025368@163.com

identification database (<http://herb.ac.cn/>), and the SwissTargetPrediction database to screen target information of active ingredients. We then used the UniProt database to screen for human targets and standard gene names. A drug active ingredient target network diagram was constructed using Cytoscape 3.7.2 software, and the GeneCards database was used to collect disease-related targets. The “Shenshuai Recipe” against CKD myocardial injury gene target database was established using Venny 2.1, and the STRING database was used to build the main component target interaction network and screen key targets. Cytoscape 3.7.2 software was imported for topology analysis and a protein-protein interaction network diagram was constructed. Finally, the DAVID platform was used for Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and Gene Ontology (GO) biological function annotation. **Results** After screening, there were 252 active compounds in SSR and 649 common targets of SSR and CKD myocardial injury, among which AKT Serine/Threonine Kinase 1 (AKT1), Tumor Necrosis Factor (TNF), Mitogen-Activated Protein Kinase 3 (MAPK3), and Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) may be important targets of SSR in treating CKD myocardial injury. GO analysis identified 1485 Biological process items, 176 Cell component items, and 386 Molecular function items, of which plasma membrane, cytosol, and cytoplasm had the largest number of enriched genes, and 313, 304, 276 genes were distributed respectively. KEGG analysis indicated that HIF-1 α , Lipid and atherosclerosis, AGE-RAGE signaling path in diagnostic complexes, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT, and insulin resistance pathways might be involved in the mechanisms of SSR in treating CKD myocardial injury. **Conclusions** SSR might play a role in cardiorenal protection by participating in multiple mechanisms, including improving insulin resistance, improving lipid metabolism, anti-atherosclerosis, and regulating the expression of inflammatory factors and vascular endothelial growth factor, with the PI3K/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways being potentially important signal regulation pathways.

【Keywords】 network pharmacology; molecule docking; Shenshuai Recipe; chronic kidney disease; myocardial injury

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

CKD 心肌损伤是患者罹患 CKD 之后而引发的心肌损害,近年来,随着高血压^[1]、糖尿病^[2]、高脂血症^[3]等慢性病发病率的不断攀升,CKD 的发病率也在不断的上升^[4],随之而来的 CKD 心肌损伤的发病率也不断增高,鉴于心脏疾病是 CKD 患者的主要死因之一^[5],并且目前临床中虽然有新药涌现,但是仍缺乏大型、可靠的循证医学研究^[6],为我们研究中医药干预 CKD 心肌损伤提供了客观需求。

肾衰方是晏子友教授在国医大师皮持衡教授指导下参与研制的,江西中医药大学附属医院肾内科院内制剂,经过多年的临床实践^[7-11],证实肾衰方及其拆方具有降低肌酐和尿素氮、改善钙磷代谢、降低血管低度炎症、抗动脉粥样硬化、保护心脏等作用,因此该方具有明显的心肾保护作用,但是具体分析其研究成果,仍大多停留在临床观察的阶段,对其作用机制未有更加深入的研究。

网络药理学是将药物和疾病的成分-药物靶点-疾病靶点结合在一起的研究方法,能够通过靶点结合、通路富集和分子对接等方式,预测中药复方的作用机制,是一种全新的研究方法,有着十分重要的意义^[12],因此,我们采用网络药理学的方

法,探究肾衰方治疗 CKD 损伤的作用机制,为下一步的研究工作提供方向。

1 材料与方法

1.1 肾衰方活性成分收集

在中药药理数据库(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)和 Herb 本草组鉴数据库(<http://herb.ac.cn/>)以“黄芪”“生地黄”“党参”“山茱萸”“山药”“丹参”“泽泻”“土茯苓”“白花蛇舌草”“大黄”“淫羊藿”“六月雪”检索其所有成分,在检索结果中设定化合物筛选条件:类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ,口服生物利用率(oral bioavailability, OB) ≥ 30 ,去重后,导入 Excel 表格建立肾衰方活性组分易吸收化合物库,通过查阅文献补充并完善肾衰方组分易吸收化合物库。

1.2 肾衰方成分靶点预测及药物-成分-靶点网络图构建

利用 TCMSP 数据库和 SWISS Target prediction 数据库搜索纳入研究的活性成分的相关靶点信息,筛选去重后通过 Uniprot 数据库筛选出人类靶点和规范基因名,使用 Cytoscape 3.7.2 软件作药物-有效成分-靶点网络图。

1.3 疾病相关靶点的获取

以 chronic kidney disease、cardiomyopathy、cardiorenal syndrome 为检索词,分别从 GeneCards 数据库收集疾病相关靶点,建立 CKD 心肌损伤相关靶点数据库。

1.4 药物-疾病共同靶点的筛选与相互作用网络图构建

运用 Venny 2.1 对“肾衰方”预测靶点(1.2)与 CKD 心肌损伤相关靶点(1.3)进行交集并建立“肾衰方”抗慢性肾病心肌损伤的基因靶点数据库;将共同的基因靶点导入 STRING,物种选择 Homo sapiens;获取靶点相互作用网络,导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行拓扑分析和 PPI (Protein-Protein Interaction)网络图的构建,并依据节点的 Degree 值调节网络中节点的属性。

1.5 基因通路与生物学功能的分析

将“肾衰方”抗 CKD 心肌损伤作用靶点上传到 DAVID 平台进行 KEGG 通路富集分析($P<0.05$)和 Go 生物学功能注释,筛选出前 20 名 KEGG 通路和前 10 名 GO 生物学功能进行可视化。

2 结果

2.1 肾衰方活性成分的筛选结果

表 1 肾衰方中 Degree 值排名前十的化合物及 OB%、DL 值

Table 1 Top ten compounds with degree values and OB%, DL values in Shenshuai Recipe			
活性成分 Active ingredient	化合物来源 Source of compound	OB%	DL
槲皮素 Quercetin	黄芪,土茯苓,白花蛇舌草,淫羊藿 Astragalus, smilax glabra, hedyotis diffusa, epimedium	46.43	0.28
山萘酚 Kaempferol	黄芪,淫羊藿 Astragalus, epimedium	41.88	0.24
木樨草素 Luteolin	党参,丹参,淫羊藿 Codonopsis pilosula, salvia miltiorrhiza, epimedium	36.16	0.25
7-O-甲基异丙醇胺 7-O-methylisomucronulatol	黄芪 Astragalus	74.69	0.30
脱水淫羊藿素 Anhydroicaritin	淫羊藿 Epimedium	45.41	0.44
7-甲氧基-2-甲基异黄酮 7-Methoxy-2-methyl Isoflavone	党参 Codonopsis pilosula	42.56	0.2
谷甾醇 Sitosterol	山茱萸,淫羊藿,泽泻,土茯苓 Cornus officinalis, epimedium, alisma orientalis, smilax glabra	36.91	0.75
β-谷甾醇 β-sitosterol	山茱萸,土茯苓,白花蛇舌草,大黄 Cornus officinalis, smilax glabra, hedyotis diffusa, Chinese rhubarb	36.91	0.75
芒柄花黄素 Formononetin	黄芪 Astragalus	69.67	0.21

注:排名第二的 diincarvilone A 未能在 TCMSp 中筛出,未发现 OB%、DL 值,故未在表中列出。
Note. The second-ranked diincarvilone A failed to screen out in TCMSp, and no OB% or DL values were found, so it is not listed in the table.

基于数据库筛选最终各药材的潜在活性化合物,检索得到黄芪 20 个化合物,生地黄 34 个化合物,党参 21 个化合物,山茱萸 20 个化合物,山药 16 个化合物,丹参 59 个化合物,泽泻 10 个化合物,土茯苓 15 个化合物,白花蛇舌草 6 个化合物,淫羊藿 23 个化合物,大黄 16 个化合物,六月雪 12 个化合物,以下是筛出排名前十的化合物及 OB%、DL 值(表 1)。

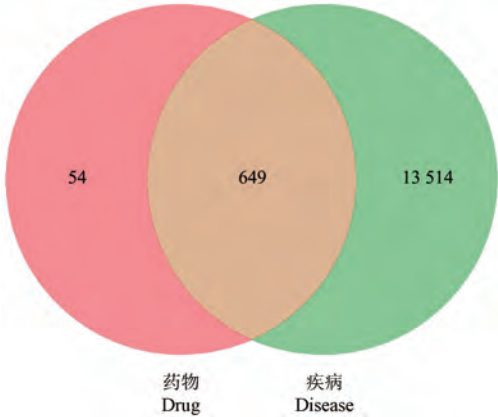


图 1 肾衰方治疗慢性肾病心肌损伤的韦恩图
Figure 1 Wayne diagram of Shenshuai Recipe for the treatment of myocardial injury in chronic kidney disease

2.2 肾衰方预测靶点及疾病的收集

见图 1,肾衰方中的活性成分从 TCMSP 数据库和 SWISS 数据库收集成分靶点,去除重复项后共收集到总成分预测靶点 703 个;在 GeneCards 数据库中收集到疾病相关基因靶点共 14 163 个;肾衰方与 CKD 心肌损伤共同靶点 649 个。

2.3 肾衰方治疗慢性肾病心肌损伤的药物成分靶点网络

将复方中活性成分与疾病的 649 个交集靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件,将“中药、有效成分、靶点”关系进行可视化,根据 Degree 大小调节节点的大小并排序,Degree 越高节点越大,共包括 879 个节点和 4375 条边(图 2)。

2.4 肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的 PPI 网络图构建

将肾衰方预测靶点与 CKD 心肌损伤相关靶点输入 Venny 进行对比并取交集,归纳总结出肾衰方预测靶点中有明确抗慢性肾病心肌损伤作用的靶点共 649 个;将结果导入 STRING 数据库进行蛋白互作分析,再将分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 绘制 PPI 蛋白互作网络,其中 647 个节点,29 830 条映射

关系,将网络中靶点的大小按照其在网络中网络度的大小来排列,药物分子拥有的靶点数越多其网络度越大,可以得出有 111 个蛋白度值高于 150,其中 AKT1、GAPDH、TP53、ALB、TNF、IL6、MYC、EGFR、VEGFA、SRC、MAPK3、JUN 等靶点在靶点互作分析中网络度较高,表明这些蛋白在网络图中贡献度高,在 PPI 网络中扮演着重要的角色。同时将重点靶点进行可视化(图 3、图 4)。

2.5 肾衰方抗 CKD 心肌损伤作用靶点的基因通路与生物学功能分析

对肾衰方抗 CKD 心肌损伤的 769 个潜在靶点进行 GO 基因本体论分析和 KEGG 靶点富集通路注释分析($P<0.05$)。GO 分析:将上述 649 交集靶点进行 GO 分析,发现共富集到 1485 条 BP 条目,176 条 CC 条目,386 条 MF 条目。其中富集基因数量最多的条目为 plasma membrane、cytosol、cytoplasm 分别分布了 313、304、276 个基因(图 5)。

KEGG 分析,将上述 649 个交集靶点进行 KEGG 分析,共富集通路 204 条(图 6)。其中根据显著性程度排名前五的通路分别为: pathways in cancer、prostate cancer、lipid and atherosclerosis、AGE-

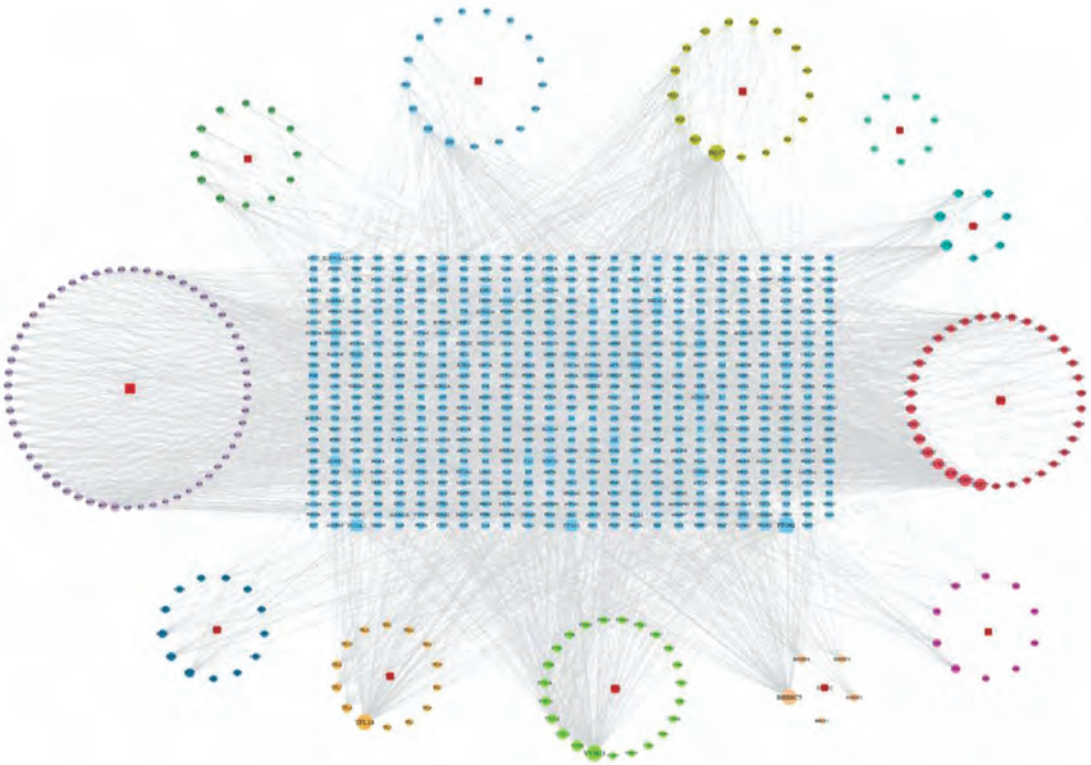


图 2 肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的“药物-成分-靶点”网络

Figure 2 The “drug-component-target” network of Shenshuai Recipe for the treatment of CKD myocardial injury

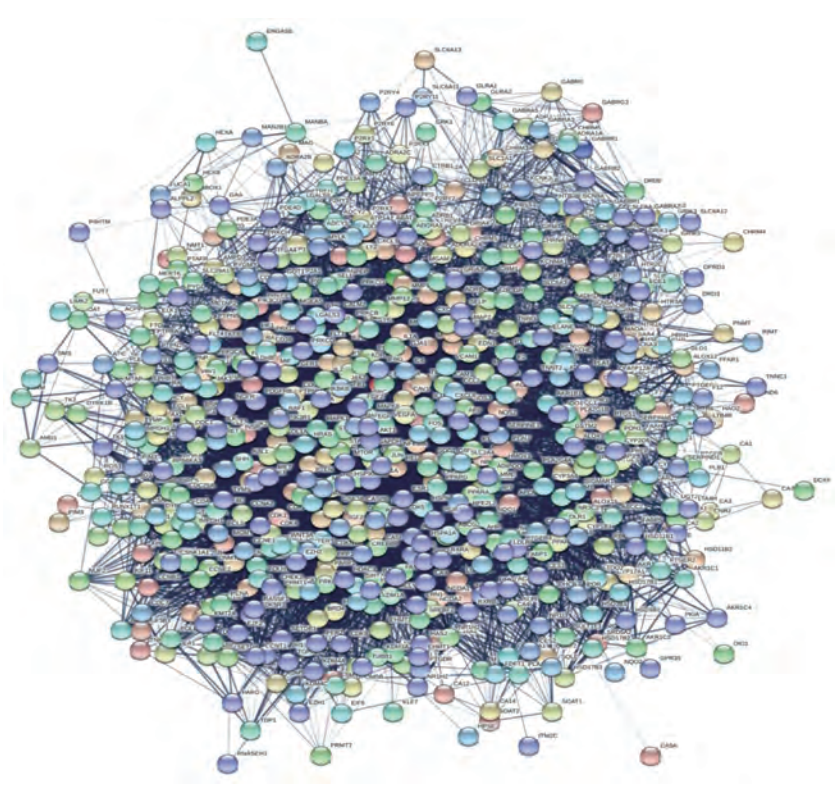


图 3 交集治疗靶点的 PPI 蛋白互作网络

Figure 3 PPI protein interaction network that intersects therapeutic targets

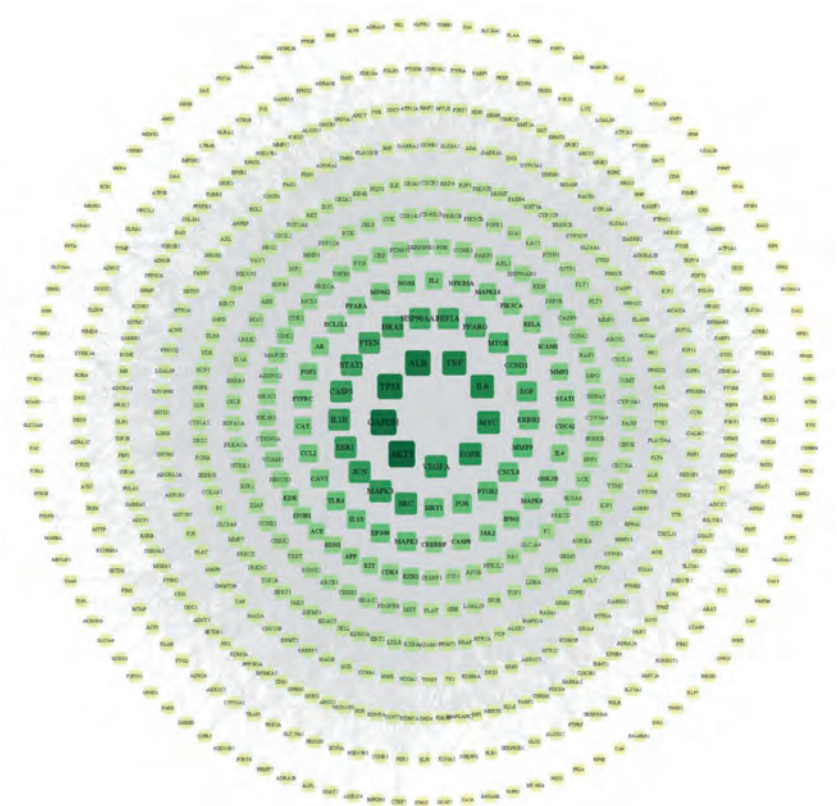


图 4 交集治疗靶点的 PPI 蛋白互作网络可视化分析

Figure 4 Visual analysis of the PPI protein interaction network of intersecting therapeutic targets

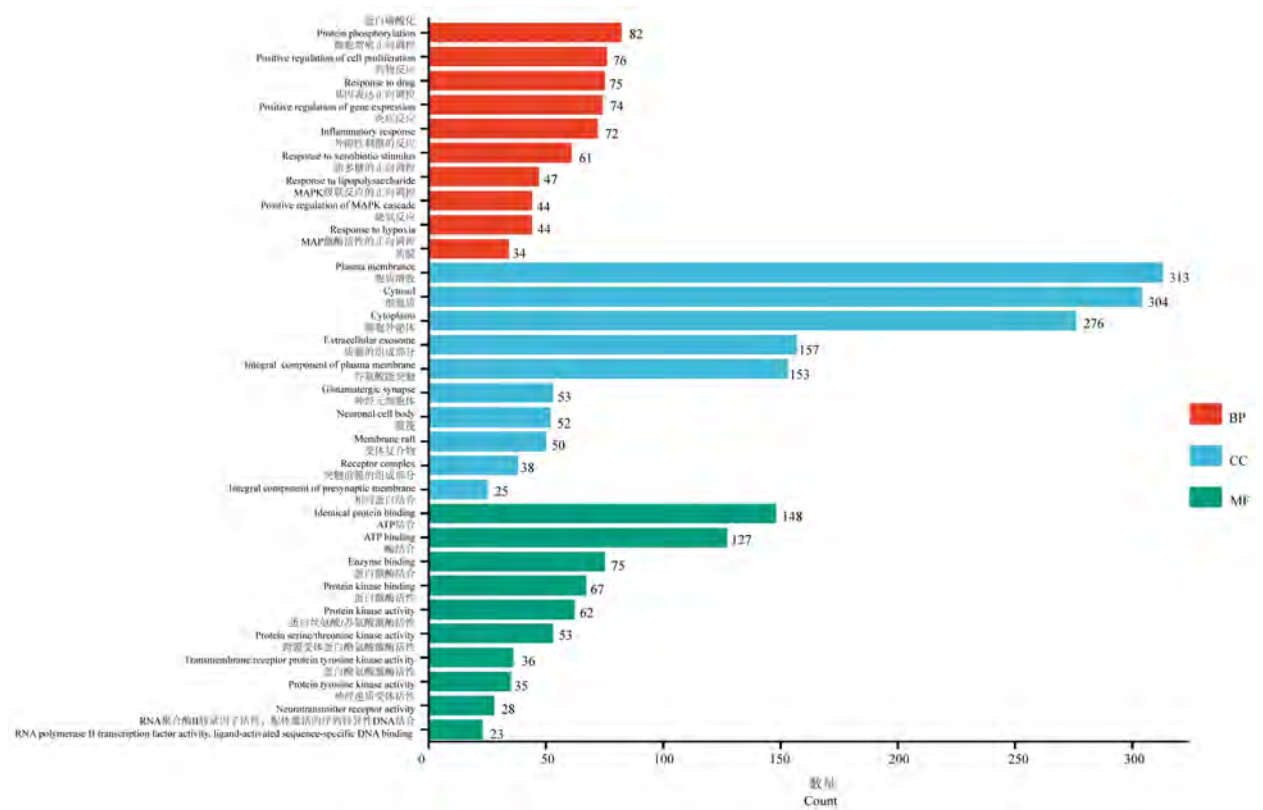


图 5 肾衰方治疗 CKD 心肌损伤交集治疗靶点的 GO 分析

Figure 5 GO analysis of the intersection treatment targets of CKD myocardial injury in the treatment of Shenshuai Recipe

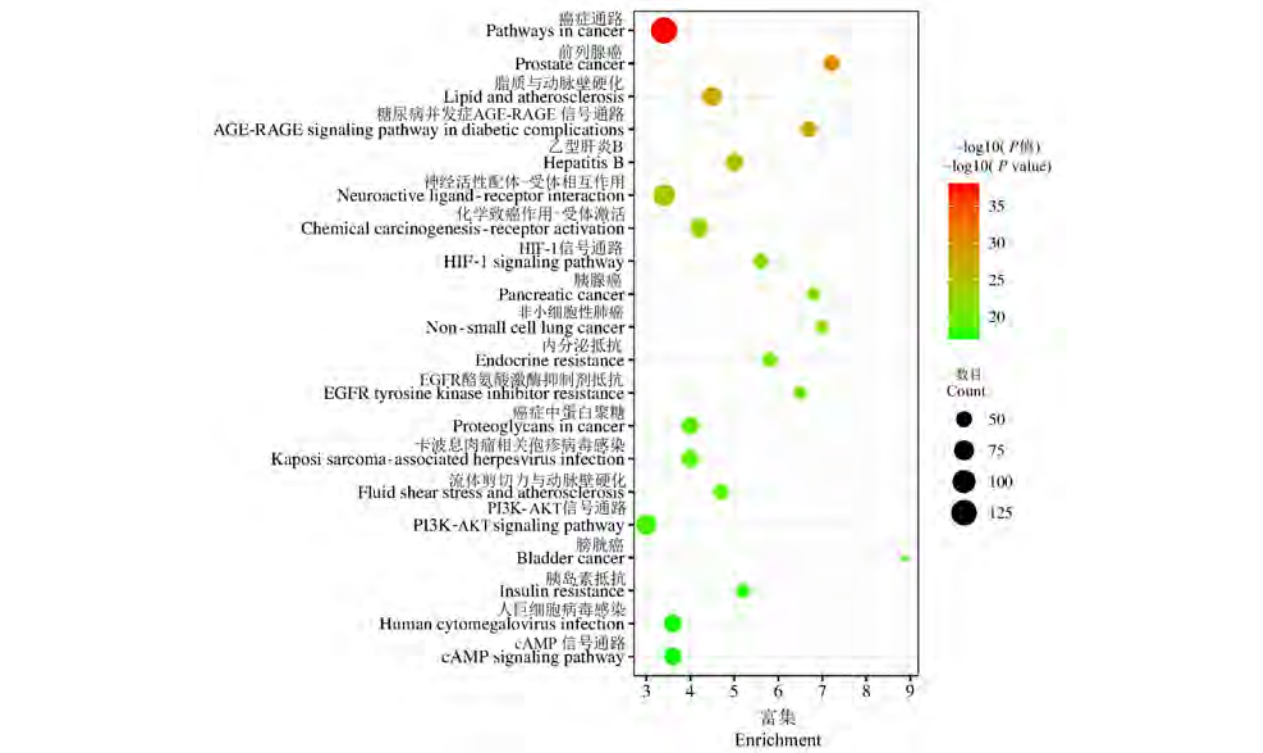


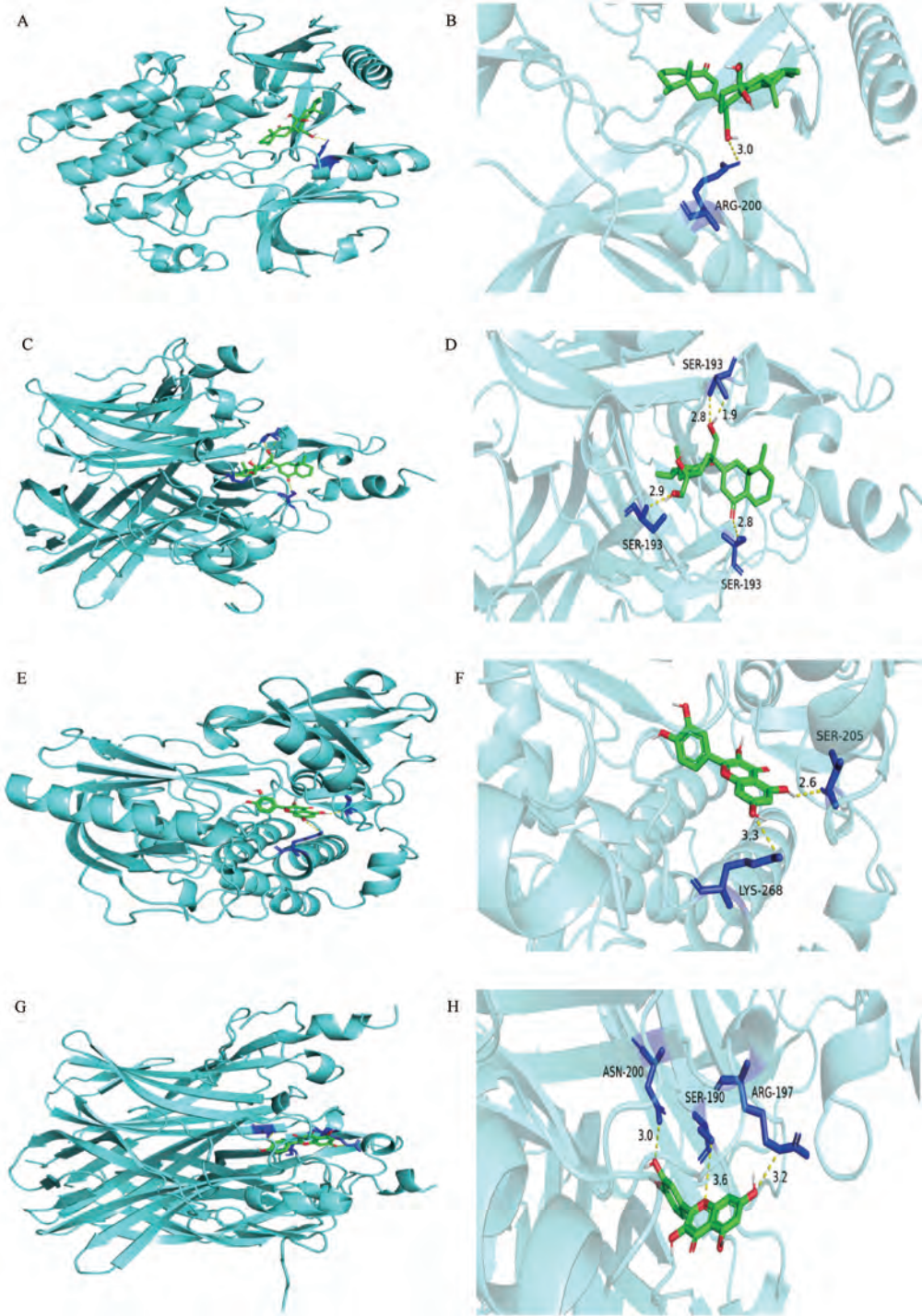
图 6 肾衰方治疗 CKD 心肌损伤交集治疗靶点的 KEGG 通路富集分析

Figure 6 KEGG pathway enrichment analysis of intersecting therapeutic targets for the treatment of CKD myocardial injury by Shenshuai Recipe

RAGE signaling pathway in diabetic complications、hepatitis B. 需进一步分析与目标疾病的相关,进而分析上述通路中可能潜在的治疗靶点。

2.6 分子对接结果

表 2 是结合能表,图 7 是分子对接图。肾衰方的大部分成分都能很好地与关键基因结合,就涉及



注:A/B;Diincarvilone A 与 AKT1 整体和局部对接图;C/D;Diincarvilone A 与 TNF 整体和部分对接图;E、F:Quercetin 与 AKT1 整体和部分对接图;G、H:Quercetin 与 TNF 整体对接图。

图 7 分子对接图

Note. A/B, Overall and partial docking diagram of diincarvilone A and AKT1. C/D, Overall and partial docking diagram of diincarvilone A and TNF. E/F, Overall and partial docking diagram of quercetin and AKT1. G/H, Overall docking diagram of quercetin and TNF.

Figure 7 Molecular docking diagram

表 2 肾衰方的关键成分与靶基因分子的结合能
Table 2 The binding energy of the key components of the Shenshuai Recipe and the target gene molecules

化合物名称 Compound name	结合能 Binding energy	
	AKT1	TNF
槲皮素 Quercetin	-10.0	-8.0
Diincarvilone A	-9.7	-8.4

CKD 心肌损伤基因和化合物而言, 其中的 quercetin、diincarvilone A 结合性能最好, 他们能够与 AKT1、TNF 基因能与活性成分很好地对接。

3 讨论

本文借助了网络药理学和分子对接的方法, 来探究肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的潜在机制, 为下一步的研究进行前期准备工作。

我们发现 AKT1、GAPDH、TP53、ALB、TNF、IL6、MYC、EGFR、VEGFA、SRC、MAPK3、JUN 等是肾衰方发挥治疗作用的重要靶点, 其中 AKT1、TNF、MAPK3、VEGFA 可能是肾衰方发挥抗 CKD 心肌损伤的关键靶点。AKT 又称蛋白激酶 B, 是 PI3K-AKT 信号途径的重要组成部分, 有研究表明, AKT1 在糖尿病心脏病^[13]、心力衰竭^[14]和心肌梗死^[15]中发挥着重要的作用; TNF 也在心血管疾病^[16]和心肌疾病^[17]中发挥着重要作用; Braile 等^[18]认为控制血管生成和 VEGF-A 可以提高心脏病患者的生活质量和寿命; 也有研究表明, 激活 MAPK3^[19]可以减轻缺血再灌注损伤; 由此可见, AKT1、TNF、MAPK3、VEGFA 可能是肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的重要靶点。

根据 KEGG 富集通路结果, 可知肾衰方治疗 CKD 心肌损伤参与的通路可能有 HIF-1 α 通路、lipid and atherosclerosis 通路、AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications 通路、PI3K-AKT 通路、insulin resistance 通路等。有研究表明, 促进 HIF-1 α 通路的表达可以减轻心脏缺血再灌注损伤^[20]; 调脂药已成为现代心血管疾病治疗的基石, 现代医学中多款指南将他汀列为 CVD 治疗的不可或缺的药物^[21], 这里就不再对 lipid and atherosclerosis 通路展开讨论; 有研究表明, AGE-RAGE signaling pathway 在糖尿病肾病发挥着重要作用, 其可以调控 VEGF 的表达, 诱导或抑制新生血管, 同时高表达的 AGEs/RAGE 可以促进肾纤维化^[22-23]; Chen 等^[24]发现, 激活 PI3K-AKT 通路可以减少心肌细胞的缺血再灌注损伤, Qin 等^[25]等发现

激活 PI3K-AKT 通路可以减轻心脏的纤维化; Saotome 等^[26]发现 2 型糖尿病患者的 心衰死亡风险与胰岛素抵抗有关; 这些研究表明上述通路在心脏疾病中发挥着重要作用, 可能是肾衰方发挥心肾保护作用的潜在机制。结合关键靶点和富集通论的分析, 我们认为 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路可能是肾衰方发挥心脏保护作用的重要信号通路, 相关研究证实, PI3K/AKT^[24-25]和 MAPK^[19] 信号通路确实可以发挥出相应作用。

4 结论

综上, 肾衰方可能通过参与改善胰岛素抵抗, 改善脂质代谢、抗动脉粥样硬化, 调节炎性因子和血管内皮生长因子等的表达等多重机制发挥心肾保护作用, 其中 PI3K/AKT 和 MAPK 可能是重要的调节通路, 我们将完善细胞实验和动物实验, 做进一步验证。

参考文献:

[1] 冯静, 张贤春. 复方天麻蜜环糖肽片对原发高血压大鼠 T 淋巴细胞亚群、早期肾损伤及 AT1 R/Smad3 蛋白作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 38-45.

[2] 刁元元, 李玉梅, 李晓文, 等. 黄芪抗糖尿病并发症的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 123-128.

[3] 赵抒沛, 刘谦, 朱婷钰, 等. 中医特色疗法治疗高脂血症的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2022, 17(9): 1904-1908.

[4] 段虹飞, 张冬燕, 孙俊, 等. 慢性肾脏病患者的用药现状调查及分析 [J]. 实用药物与临床, 2022, 25(8): 714-717.

[5] Ravid JD, Kamel MH, Chitalia VC. Uraemic solutes as therapeutic targets in CKD-associated cardiovascular disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2021, 17(6): 402-416.

[6] 李倩, 吴海波, 刘佳, 等. 沙库巴曲缬沙坦在心肾功能不全患者中的应用进展 [J]. 中国医药科学, 2021, 11(9): 40-43.

[7] 晏子友, 胡良伟, 沈山峰, 等. 肾衰方对维持性血液透析的临床疗效分析 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6): 14-17.

[8] 万鸿宏. 肾衰方对 CKD3-4 期合并动脉粥样硬化患者脂联素及微炎症影响的研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.

[9] 晏子友, 杨芸琪, 沈山峰, 等. 肾衰方及其拆方对肾间质纤维化 VEGF、VEGFR2、 α -SMA 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 10-15, 260.

[10] 沈山峰. 肾衰方治疗 CKD3-4 期合并心脏损害的临床研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2019.

[11] 沈山峰, 罗富里, 黄伟, 等. 肾衰方及其拆方对肾间质纤维化 Wnt4、 β -catenin 蛋白表达的影响 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34(24): 4050-4055.

[12] 李清韵, 谢慧, 李宇思, 等. 基于网络药理学和分子对接技

- 术研究柴胡-黄芩药对治疗鼻窦炎的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 44-54.
- [13] Ren BC, Zhang YF, Liu SS, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12355-12367.
- [14] Riehle C, Weatherford ET, Wende AR, et al. Insulin receptor substrates differentially exacerbate insulin-mediated left ventricular remodeling [J]. JCI Insight, 2020, 5(6): e134920.
- [15] Zhang J, Huang L, Shi X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Aging, 2020, 12(23): 24270-24287.
- [16] Lim YJ, Sidor NA, Tonial NC, et al. Uremic toxins in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease: mechanisms and therapeutic targets [J]. Toxins, 2021, 13(2): 142.
- [17] Hanna A, Frangogiannis NG. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2020, 34(6): 849-863.
- [18] Braile M, Marcella S, Cristinziano L, et al. VEGF-A in cardiomyocytes and heart diseases [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5294.
- [19] Wang H, Pang W, Xu X, et al. Cryptotanshinone attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis in myocardium by upregulating MAPK3 [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(3): 370-377.
- [20] Geng B, Wang X, Park KH, et al. UCHL1 protects against ischemic heart injury via activating HIF-1 α signal pathway [J]. Redox Biol, 2022, 52: 102295.
- [21] Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA guideline on the management of blood cholesterol: a report of the American college of cardiology/american heart association task force on clinical practice guidelines [J]. Circulation, 2019, 139(25): e1082-e1143.
- [22] 姜婷, 滕士超, 安晓飞, 等. 中医药干预 AGEs-RAGE 信号通路改善糖尿病肾病的机制研究概述 [J]. 环球中医药, 2022, 15(1): 173-178.
- [23] 于嘉祥, 张瀚文, 杨宇峰, 等. 基于 AGEs-RAGE 信号通路研究中药复方益糖康改善大鼠骨骼肌胰岛素抵抗的作用机制 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 25-30, 260.
- [24] Chen E, Chen C, Niu Z, et al. Poly (I: C) preconditioning protects the heart against myocardial ischemia/reperfusion injury through TLR3/PI3K/Akt-dependent pathway [J]. Sig Transduct Target Ther, 2020, 5: 216.
- [25] Qin W, Cao L, Massey IY. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(11): 4045-4059.
- [26] Saotome M, Ikoma T, Hasan P, et al. Cardiac insulin resistance in heart failure: the role of mitochondrial dynamics [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3552.

[收稿日期] 2022-10-24

程金来,周子玉,刘丽,等.小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较[J].中国比较医学杂志,2023,33(7):26-33,40.
Cheng JL, Zhou ZY, Liu L, et al. Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 26-33, 40.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.004

小鼠急性酒精性肝损伤造模方法的比较

程金来,周子玉,刘丽,宋丽霞,洪坤,谭余庆*,杨米一*

(中国中医科学院中药研究所,北京 100013)

【摘要】 目的 模拟人类饮酒习惯,参考现有的利用酒精灌胃建立酒精性肝损伤模型的报道,探究影响模型成功的关键因素并优化小鼠酒精性肝损伤模型的构建方法。**方法** 将 150 只 SPF 级 ICR 小鼠分为三个实验组讨论造模的周期和频率,造模剂的种类和用量及造模剂给予的时间间隔对实验动物的生化和生理指标所产生的影响差异。三组实验分别对小鼠进行不同剂量、不同频率、不同间隔时间的 60%乙醇和 53°白酒灌胃,最后计算各组小鼠的死亡率,检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的活性及肝组织匀浆样本中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、甘油三酯(TG)的含量,并进一步对小鼠肝进行 HE 染色及油红染色。**结果** 1 d 造模组死亡率为 20%,两次不同剂量白酒造模组死亡率为 40%,4 h、6 h、8 h、12 h 白酒间隔造模组死亡率依次为 40%、20%、10%、0%;对血清样本中 ALT 和 AST 的含量及肝组织匀浆中 MDA、GSH、TG 的含量、病理学检测指标等方面进行比较发现,缩短灌胃时间间隔及增加灌胃剂量会加剧小鼠肝受损情况。**结论** 在建立酒精性肝损伤的小鼠模型时,酒精灌胃的剂量、周期和频率会影响模型的成功率,比较而言,20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量,间隔 6 h 灌胃 53°白酒的方法更适合用于酒精性肝损伤动物模型的构建。

【关键词】 小鼠;酒精性肝损伤;动物模型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0026-08

Comparison and optimization of acute alcoholic liver injury model in mice

CHENG Jinlai, ZHOU Ziyu, LIU Li, SONG Lixia, HONG Kun, TAN Yuqing*, YANG Miyi*
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100013, China)

【Abstract】 Objective To investigate the factors affecting the establishment of a mouse model of alcoholic liver injury. **Methods** A total of 150 specific-pathogen-free male ICR mice were divided into three groups to study the possible influences of different experimental conditions, including modeling period, frequency, type, and dosage of modeling agent, and time interval between doses. Mice in the three groups received 60% ethanol and alcohol with 53% volume ratio by gavage at different doses, frequencies, and time intervals and the mortality rates were calculated. We also detected alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) serum levels and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and triglyceride (TG) levels in liver tissue homogenate. Liver pathology was examined in tissue sections. **Results** The mortality rates in the 1-day modeling and double-dose liquor modeling groups were 20% and 40%, respectively, and the mortality rates in the 4, 6, 8, and 12 h interval dosing groups were 40%, 20%, 10%, and 0%, respectively. Pathological indicators, including ALT, AST, MDA, GSH, TG, and tissue pathology worsened in line with shortening of

【基金项目】中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ13-YQ-056)。
【作者简介】程金来(1993—),男,硕士,研究方向:肝癌。E-mail:479484528@qq.com
【通信作者】杨米一(1989—),女,博士,助理研究员,研究方向:中药新药。E-mail:myyang@icmm.ac.cn
谭余庆(1960—),男,博士,研究员,研究方向:中药药理。E-mail:yqtan@icmm.ac.cn * 共同通信作者

the gavage interval and increased gavage dose. **Conclusions** The alcohol dose, length of the modeling period, and frequency of dosing affect the establishment of an alcoholic liver injury model in mice. We suggest that dosing mice with alcohol with 53% volume ratio twice a day at 20 mL/kg body weight or 10 mL/kg body weight at 6 h intervals can successfully cause liver damage.

【Keywords】 mice; alcoholic liver injury; animal model

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

酒精性肝病(alcohol liver disease, ALD)是指由于饮酒而导致的肝代谢损伤的疾病。随着现阶段生活水平的提高,酒精性肝病的发病率逐年提高^[1]。这种疾病早期表现为脂肪肝,如果不及时干预,进一步发展会成为肝炎、肝纤维化及肝硬化等严重疾病^[2]。2011 年的世界卫生组织的报告指出饮酒导致每年约有 260 万人死亡,死亡原因多与 ALD 有关^[3]。动物实验是探究疾病治疗的重要手段,而稳定、可靠、可重复的动物模型是开展实验工作的必然前提。目前报道的比较成熟的酒精性肝损伤的造模方法有酒精灌胃法和酒精腹腔注射法两种^[4]。较于酒精注射的造模方法,酒精灌胃法具有易复制、稳定性好、死亡率低的优点,且接近于人类由于饮酒所导致的肝损伤的行为习惯。急性酒精肝损伤的动物模型成模与否的判断标准为肝或血液中某些生化指标的相对改变或出现肝组织的病理性改变^[5]。但是,目前基于小鼠的急性肝损伤模型建立的方法还存在争议,不仅缺乏统一的造模方式且缺少不同造模方法间的横向比较。本研究拟从小鼠的存活情况、肝损伤的生化指标、病理学改变等相关参数来讨论不同条件下的酒精灌胃法所诱导的酒精性肝损伤小鼠模型的差异,为后续肝保护药物的开发奠定稳定、可信的动物模型基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级 ICR 雄性小鼠 150 只(体重 14~16 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011、SCXK(京)2021-0006]。饲养于中国中医科学院中药研究所动物中心[SYXK(京)2019-0003],SPF 级屏障环境中(温度:22~24℃,湿度 50%~60%;饲料为钴 60 辐照实验鼠维持饲料;饮水为纯净水)。本研究获得中国中医科学院中药研究所动物实验伦理委员会批准(2021B120),实验符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

甘油三酯(triacylglycerol, TG)测定试剂盒(南京

建成生物工程研究所,批号:A110-1-1);丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A003-1);还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A006-2-1);谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C009-2-1);谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C010-1-1);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝,批号:PC0020);无水乙醇(天津市津东天正精细化学试剂厂,批号:20210110);53°白酒(北京红星股份有限公司,批号:01-01-8);4%多聚甲醛(索莱宝,批号:P1110);0.9%生理盐水(石家庄四药有限公司,批号:1908013202)。恒温水浴锅(北京柏莱斯特科技发展有限公司, BW-2 T);酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司, Multiskan FC 型);高速低温离心机(湖南可成仪器设备有限公司, H1-16KR)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计

为了探究小鼠急性酒精性肝损伤成模的关键因素和条件,我们从造模的周期和频率、造模剂的种类和用量以及造模剂给予的时间间隔三个方面进行了讨论并开展了相关的实验(即本文所指的实验一、实验二及实验三),以探究不同造模条件下实验动物酒精性肝损伤相关指标表达的差异,从而寻找最佳的小鼠酒精性肝损伤的造模方法。

(1)造模周期和频率的比较研究(实验一)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、1 d 造模组、3 d 造模组、7 d 低剂量造模组、7 d 高剂量造模组。其中空白组连续 7 d 按照 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水;1 d 造模组前 6 d 以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水,第 7 天以 15 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 60%的乙醇两次;3 d 造模组前 3 d 以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水,第 4 天后以 15 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 60%的乙醇两次;7 d 低剂量造模组连续 7 d 按照

10 mL/kg 的剂量灌胃 60% 的乙醇;7 d 高剂量造模组连续 7 d 按照 15 mL/kg 的剂量灌胃 60% 的乙醇。

(2) 造模剂及造模剂量的比较研究(实验二)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、一次白酒造模组、两次不同剂量白酒造模组、两次不同剂量乙醇造模组、两次等剂量乙醇造模组。其中空白组造模当天以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水;一次白酒造模组以 10 mL/kg 的剂量灌胃 53°白酒;两次不同剂量白酒造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 53°白酒;两次不同剂量乙醇造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 60% 的乙醇;两次等剂量乙醇造模组以 20 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 60% 的乙醇两次。

(3) 造模剂给予方式的比较研究(实验三)

适应性喂养 3 d 后,将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组每组 10 只,分为空白组、4 h 间隔造模组、6 h 间隔造模组、8 h 间隔造模组、12 h 间隔造模组。其中空白组于造模当天以 15 mL/kg 的剂量灌胃蒸馏水 1 次;4 h 间隔造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 4 h 灌胃 53°白酒两次;6 h 间隔造模组分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 6 h 灌胃 53°白酒两次;8 h 间隔造模组以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 8 小时灌胃 53°白酒两次;12 h 间隔造模组以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 12 h 灌胃 53°白酒两次。

1.3.2 样品采集

上述对应的实验操作结束后,实验动物禁食(自由饮水)12 h,称体重后进行眼球取血,静置 1 h 以上,随后 3000 r/min 离心 10 min 取上清。取血后迅速取其肝,置于预冷的生理盐水中漂洗数次,称定肝总质量,取肝左叶中部浸于 4% 多聚甲醛中,用于制备组织切片。另外,精密称取肝组织块 200 mg,精密量取 9 倍于质量的预冷生理盐水(约 1.8 mL),将组织块剪碎后与生理盐水同时放入匀浆器中,将匀浆器置于冰上反复研磨至充分破碎从而获得质量浓度为 100 mg/mL 的肝匀浆。将制备好的肝匀浆以 3500 r/min 于 4℃ 离心 15 min,取上清液,置于 1.5 mL 离心管中,样品于 -20℃ 冰箱中冷冻保存,以备后续使用。

1.3.3 指标检测

(1) 肝组织匀浆中蛋白含量的测定

根据 BCA 蛋白浓度说明书测定肝组织匀浆中的蛋白含量。

(2) 肝组织脂质代谢指标检测

根据 TG 试剂盒说明书检测各组小鼠 100 mg/mL 肝匀浆中甘油三酯的含量。

(3) 肝组织脂质过氧化指标检测

分别根据 MDA 和 GSH 试剂盒说明书检测各组小鼠 100 mg/mL 肝匀浆中 MDA 和 GSH 的含量。

(4) 小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量检测

分别根据 ALT 和 AST 试剂盒说明书检测各组小鼠血清中酶的活性。

(5) 肝组织病理检查

常规 HE 染色:肝经 4% 多聚甲醛固定后,采用石蜡包埋,然后切片、脱蜡、水化,使用苏木精-伊红染色,最后使用光学显微镜和成像系统观察肝组织的病理变化。

冰冻切片油红 O 染色:将经 4% 甲醛固定的小鼠肝组织于液氮环境中制冰冻切片,厚 10 μ m,将切片置于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,并放入 10% 的甲醛固定液中,固定 10 min;用蒸馏水稍洗,待切片干燥,将切片置于油红工作液中浸染 8~10 min;用 60% 乙醇分色;用蒸馏水稍洗;苏木素淡染细胞核 30 s;自来水泛蓝;用滤纸把周围水分吸干,甘油明胶封片;在光学显微镜下观察各组肝组织中脂滴含量的变化。运用 Image Pro Plus 6.0 软件进行分析,并计算其 Per Area 值,Per Area 值=阳性区域面积(红色区域)/总面积,值越大表示阳性区域越大。

1.4 统计学方法

用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,最终数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以单因素方差分析进行组间差异比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物死亡情况

动物死亡率是评价建模方法的重要指标因素之一,理想的建模方法应具有成模率高,死亡率低的特点。经尸体解剖可排除本研究中由于灌胃不当而引起的死亡,从而推测动物的死亡的主要原因是其酒精的敏感性,三组实验所对应的死亡率如表 1 所示。实验一表明,短时间内大剂量灌胃乙醇的造模方式具有一定的可行性;实验二表明使用 53°白酒作为造模剂相对于体积分数 60% 的乙醇可以减少动物的死亡率,并且大剂量的造模剂的使用会增加实验动物的死亡率;实验三表明延长两次造模剂的灌胃时间间隔可以降低动物的死亡率,这一现

象可能是由于较长的时间间隔使酒精代谢分解相对充分,降低了酒精累积对脏器的损伤。

2.2 小鼠肝组织中 TG 的含量

实验一的结果显示单日内以 15 mL/kg 的剂量连续给予造模剂两次会提高肝组织中 TG 的浓度,但是以 15 mL/kg 或者 10 mL/kg 的剂量进行 7 d 造模时,实验动物肝组织中 TG 的浓度显著下降,这可能是由于长期大剂量灌胃酒精导致实验动物进食量减少、体重降低所致;实验二的结果显示短时间内以 53°白酒按照 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量依次进行灌胃造模时,肝组织中 TG 的含量相对于等剂量酒精刺激时显著增加,这可能是由于第一次大剂量的酒精刺激使得实验动物肝损伤明显,随后的第二次刺激又巩固了这一效果,从而导致更显著的

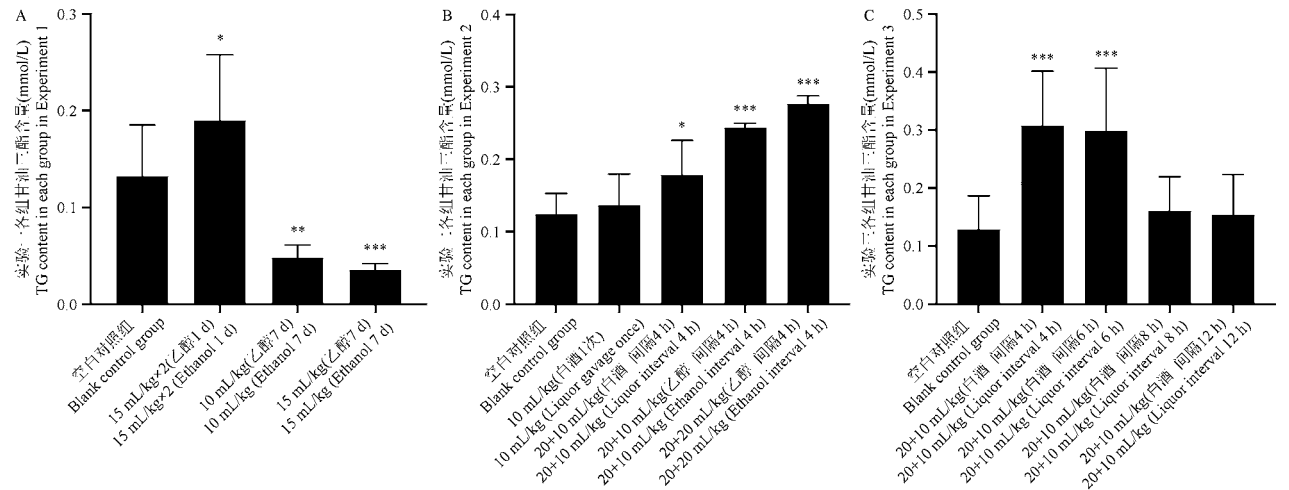
酒精刺激;实验三的结果显示间隔更短时间的造模剂刺激会加剧小鼠酒精性肝损伤的程度(图 1)。

2.3 小鼠肝组织中 GSH 的含量

实验一的结果显示短时间内以 15 mL/kg 的剂量连续给予造模剂两次对肝组织中 GSH 的浓度影响不大,但是以 15 mL/kg 或者 10 mL/kg 的剂量连续 7 d 酒精灌胃造模时,实验动物肝组织中的 GSH 的浓度含量显著下降;实验二的结果提示 1 次灌胃剂量为 10 mL/kg 及 1 d 之内以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量灌胃 53°白酒两次时,实验动物肝组织的 GSH 相对于空白组均有明显下降,并且两次灌胃造模的方式小鼠肝组织中 GSH 的含量相对更低;此外,实验三的结果显示两次灌胃造模的时间间隔越短小鼠肝组织中 GSH 的含量越低(图 2)。

表 1 实验动物死亡率
Table 1 Mortality of experimental animals

实验一 Experiment 1		实验二 Experiment 2		实验三 Experiment 3	
组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate	组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate	组别 Groups	死亡率 (%) Mortality rate
空白对照组 Blank control group	0	空白对照组 Blank control group	0	空白对照组 Blank control group	0
1 d 造模组 Modeling group-1 day	20	一次白酒造模组 Modeling group-liquor gavage once	0	4 h 间隔造模组 Modeling group-4 h interval	40
3 d 造模组 Modeling group-3 day	100	两次不同剂量白酒造模组 Modeling group-double different doses of liquor	40	6 h 间隔造模组 Modeling group-6 h interval	20
7 d 低剂量造模组 Low dose modeling group-7 days	40	两次不同剂量乙醇造模组 Modeling group-double different doses of ethanol	60	8 h 间隔造模组 Modeling group-8 h interval	10
7 d 高剂量造模组 High dose modeling group-7 days	50	两次等剂量乙醇造模组 Modeling group-double equal doses of ethanol	60	12 h 间隔造模组 Modeling group-12 h interval	0



注:与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 1 小鼠肝组织中 TG 的含量

Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 Concentrations of TG in liver tissue of different experiments

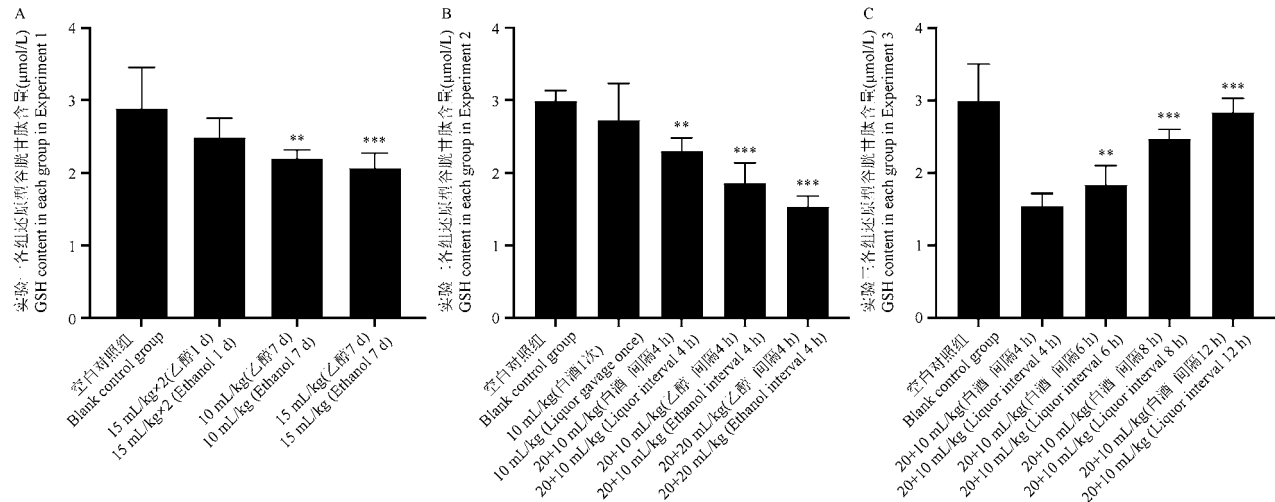
2.4 小鼠肝组织中 MDA 的含量

实验一的结果显示 1 d 内以 15 mL/kg 的剂量连续给予 60% 的乙醇两次及以 10 mL/kg 的剂量使用 60% 的乙醇造模 7 d 时,均会增加肝组织中 MDA 的含量,但与空白组相比无显著性差异;实验二的结果提示以 53° 白酒作为造模剂时,一次性灌胃剂量为 10 mL/kg 及 1 d 之内以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量灌胃两次时,实验动物肝组织中的 MDA 含量相对于空白组均有升高,数据具有统计学差异;此外,实验三的结果显示以 53° 白酒作为造模剂时,按照 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量依次灌胃造模

时,灌胃时间间隔为 4 h、6 h、8 h 时均会导致肝组织中 MDA 含量升高,且相比较于空白组具有统计学差异,但当两次造模时间间隔为 12 h 时,MDA 含量的升高不显著(图 3)。

2.5 小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性

实验一中,与空白对照组相比其他各实验组血清 ALT 和 AST 的活性均有明显升高($P<0.05$),证明小鼠肝受到一定程度的损伤;实验二的结果显示,实验组相对于空白组的 ALT 和 AST 的活性也有明显增高($P<0.05$),在相同灌胃剂量和灌胃间隔时间下,60% 乙醇相较于 53° 白酒对肝损伤更为明显;

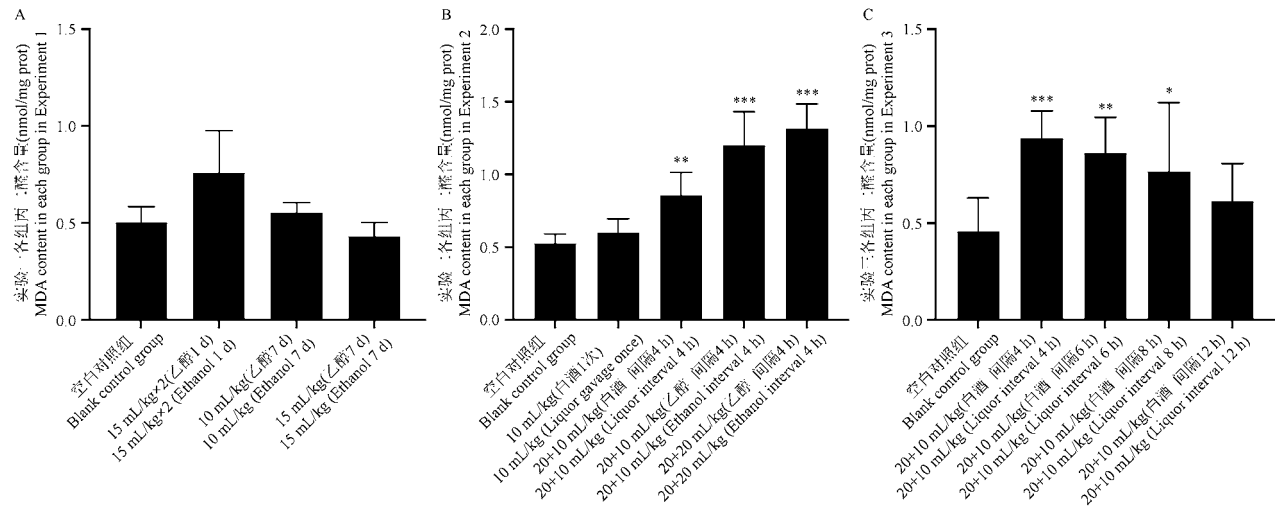


注:与空白对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 2 小鼠肝组织中 GSH 的含量

Note. Compared with the blank control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 Concentrations of GSH in liver tissue of different experiments



注:与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 小鼠肝组织中 MDA 的含量

Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

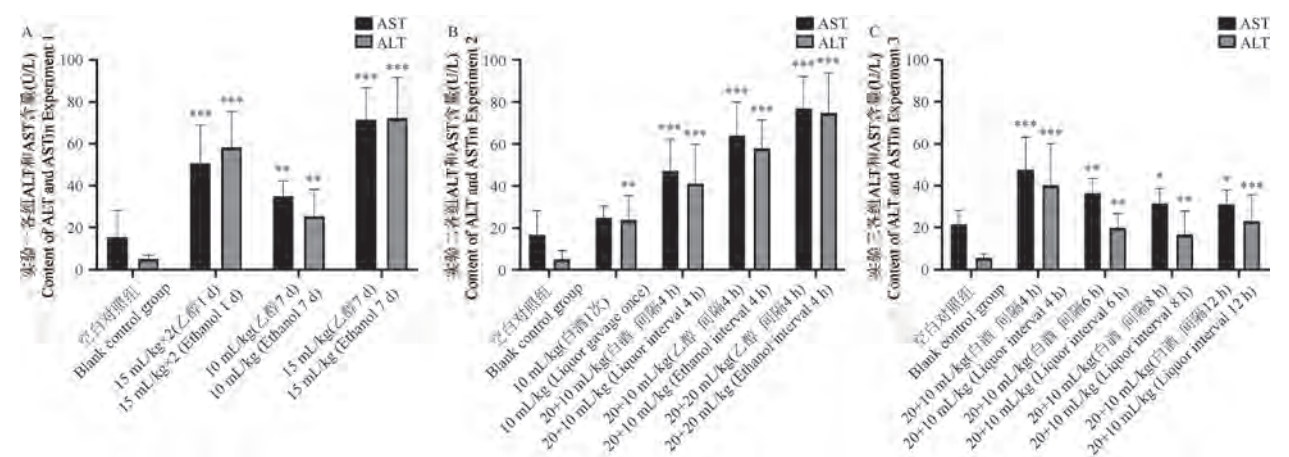
Figure 3 Concentrations of MDA in liver tissue of different experiments

实验三的结果显示,与空白对照组相比,其他各实验组 ALT 和 AST 的值均有明显增加($P<0.05$),等量 53°白酒灌胃时,灌胃间隔时间越短 ALT 和 AST 的值越高,其对肝损伤也越大。对比肝功能特征指标血清 ALT、AST 活性的变化程度,可发现较大的白酒灌胃量和较短的灌胃间隔所诱导的肝损伤可能更严重,但也更易导致实验动物死亡(图 4)。

2.6 小鼠肝 HE 染色组织学观察

酒精性肝损伤动物模型具有血脂代谢紊乱、肝内脂肪蓄积的特点,病理组织学检查可见弥漫性的

肝细胞脂肪变性,细胞内可见大小不等的脂肪滴,图 5 所示的即为不同实验条件下 HE 染色的结果。对于实验一,1 d 造模组的病理变化变化最为明显,主要表现为含脂肪滴的肝细胞明显增多,超过总面积的 1/2。肝内隐约可见不规则的嗜酸性团块状物质沉积(Mallory-Denk 小体,Mallory-Denk 小体是位于变形肝细胞浆内,核旁的均质嗜酸性包涵体,电镜下由缠绕在一起的细胞角蛋白中间丝构成,为酒精性肝炎的特征性病变之一)。7 d 造模组高剂量和低剂量肝细胞无脂肪滴的增多的现象。



注:与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 4 小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量
Note. Compared with the blank control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

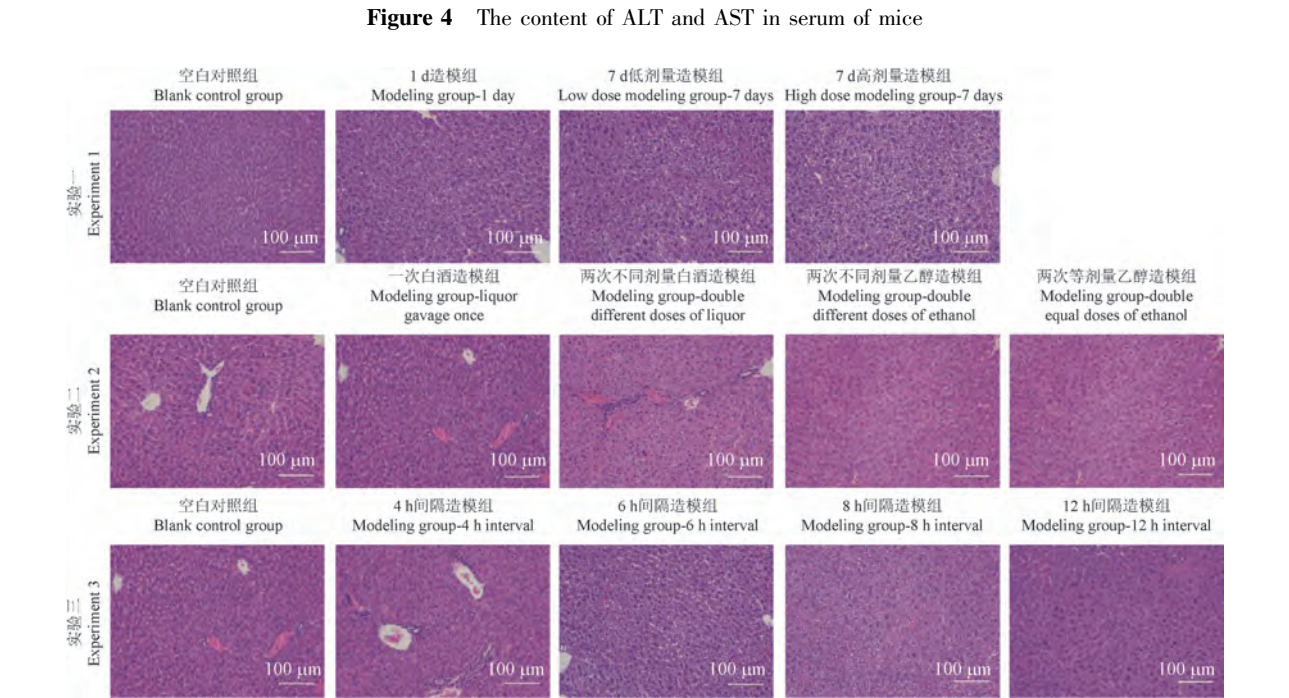


图 5 小鼠肝组织病理切片
Figure 5 Hepatocytes adipose degeneration

在实验二中,一次白酒造模组相比于空白组其 HE 染色无明显差异,两次不同剂量白酒造模组与正常组相比,其含脂肪滴的肝细胞明显增多,超过总面积的 1/2,且肝内隐约可见 Mallory-Denk 小体的沉积。

在实验三中,相较于空白组,12 h 间隔造模组的肝组织再病理学观察上无明显变化,4 h、6 h 及 8 h 间隔造模组可见含脂肪滴的肝细胞均增多,并伴有 Mallory-Denk 小体的沉积,在 200 倍视野下可

见其清楚的变化情况,各组中脂肪滴含量由多到少的排序依次为 4 h 间隔造模组、6 h 间隔造模组、8 h 间隔造模组。

2.7 小鼠肝油红染色组织学观察

油红染色可以特异性地将肝内的甘油三酯进行染色,肝脂肪堆积后可以观察到明显的红色(图 6)。在实验一中,相较于空白组,7 d 造模高剂量组和低剂量组均无明显变化,1 d 造模组阳性表达明显上升($P<0.001$),统计差异见图 7A。实验二中,

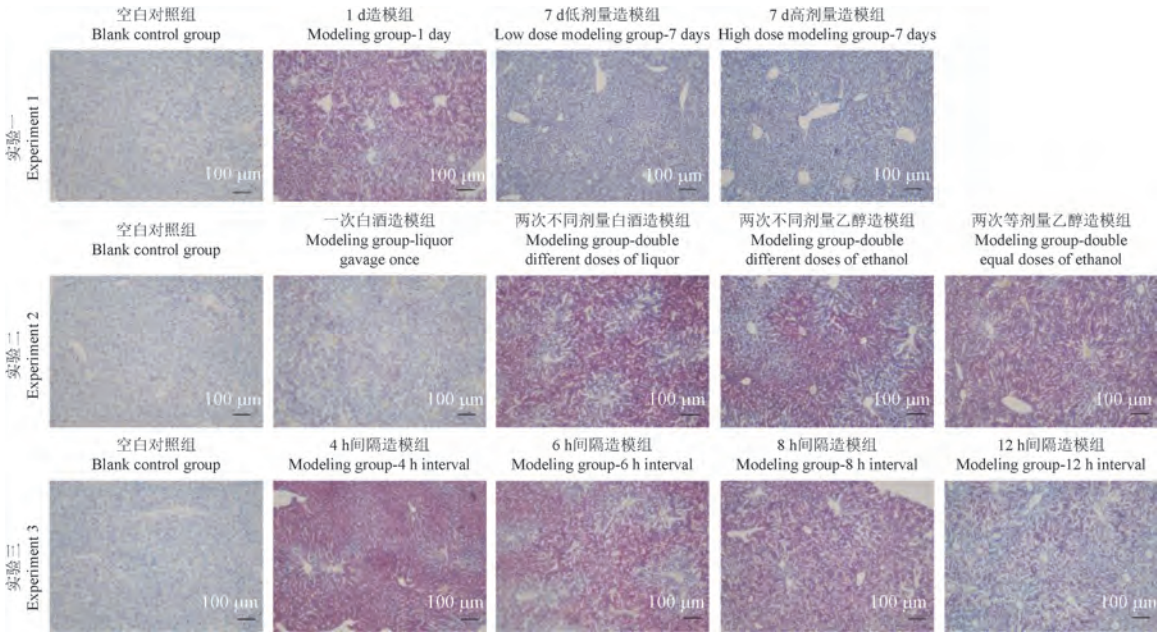
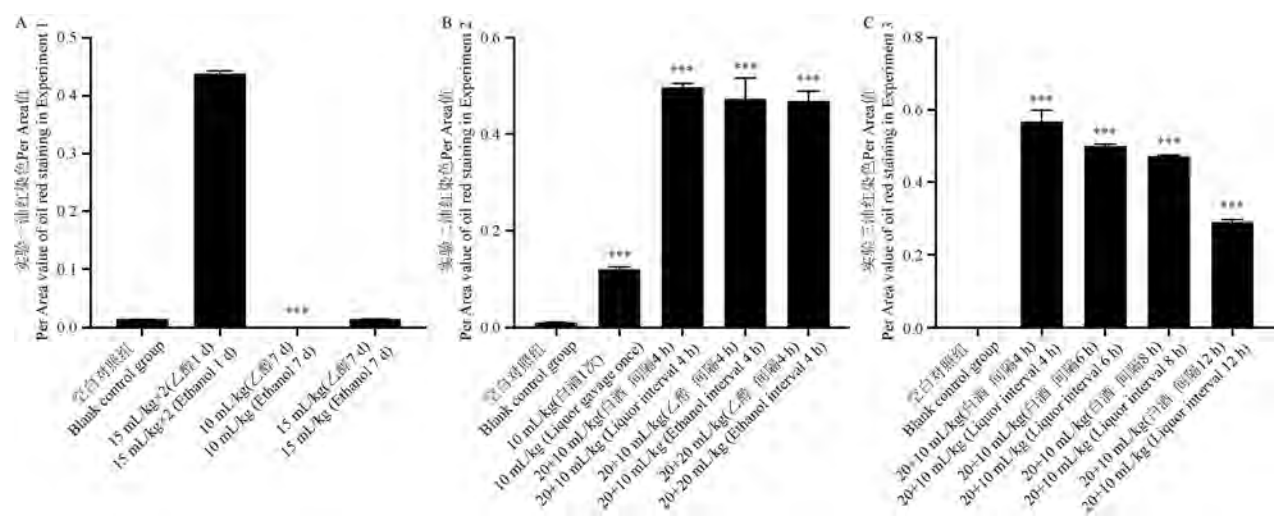


图 6 小鼠肝组织油红染色

Figure 6 Oil red staining of mice liver tissue



注:与空白对照组比较,*** $P<0.001$ 。

图 7 小鼠肝组织油红染色单位面积值

Figure 7 Per Area value of oil red staining of mice liver tissue

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

相较于空白组,一次白酒造模组阳性表达有所上升,但低于两次不同剂量白酒造模组。两次不同剂量白酒造模组阳性表达明显上升($P<0.001$),趋势见图 7B。在实验三中,与空白组相比,其余各组阳性表达均有上升,且都有显著差异($P<0.001$),其表达趋势为 4 h 间隔造模组>6 h 间隔造模组>8 h 间隔造模组>12 h 间隔造模组(图 7C)。

3 讨论

酒精在体内代谢转化的主要场所是肝,其主要是通过微粒体乙醇氧化体系和乙醇脱氢酶乙醇氧化体系进行物质转换的。酒精过量摄入而导致 ALD 的机制较为复杂,目前尚不完全清楚,可能与酒精及其代谢产物对肝的毒性作用、氧化应激和脂质过氧化等作用有关。

酒精在肝内代谢时可产生大量自由基,过量的自由基可引起肝细胞膜脂质生成过氧化产物及其代谢产物 MDA,体内自由基和 MDA 的积累会造成 GSH 的耗竭。此外,乙醇的氧化会使肝细胞质中 NADH/NAD⁺ 的比值升高,使细胞内的三羧酸循环受到抑制,导致甘油三酯的分解减少,从而导致血清和肝中的甘油三酯的含量增加。甘油三酯在肝细胞内聚集,会进一步诱发细胞脂肪变性,从而导致肝受损引发 ALD^[6-9]。目前常用 ALT 和 AST 水平来评估肝损伤的情况,因其分布于肝细胞浆中,当肝细胞受损后会导致大量 ALT 和 AST 释放入血,使这两种酶在血液中的活性增加,可利用相关的试剂盒进行检测^[10-12]。

尽管国内外研究者已建立了多种酒精性肝病模型用于相关药物的研发,上述模型包括酒精灌胃模型、慢性酒精喂养模型和慢性酒精喂养模型+单次酒精灌胃模型,还有一些不常用的建模方法模型,如酒水饮料模型、酒精加辅剂模型和胃内喂养模型等^[13]。但是这些模型的成功率和肝损伤程度参差不齐,目前尚未建立一种标准的评价小鼠酒精性肝损伤模型的方法。笔者在查阅文献时发现国内研究者大多采用酒精灌胃的方式来建立酒精性肝损伤模型,这显然是有利于降低实验成本和方便实验的一种建模思路,因此本文对该种建模方式开展了进一步的研究,从而探究酒精灌胃法制备酒精性肝损伤动物模型的关键影响因素。

本研究从造模剂的种类、造模周期、造模剂用量及造模间隔时间等方面开展了考察和实验工作。

相关实验结果显示,较长时间造模周期下的酒精不耐受性的累积作用会导致实验动物体重减少不利于实验动物肝脂肪的堆积和模型的成功,而短时间内的连续造模操作不仅缩短了造模周期且更易引发实验动物肝病及相关生化指标改变的发生。基于实验一条件下小鼠的死亡率及相关生化指标的结果,笔者获得了以 60% 乙醇为造模剂,按照 15 mL/kg 的剂量,间隔 12 h 连续灌胃两次的初步造模方案,该方案可以实现快速造模的目的;为了降低实验动物的死亡率并获得更为显著的肝损伤效果的模型动物,笔者进一步开展了基于造模剂种类和造模剂用量的对比实验(实验二),发现灌胃大剂量的造模剂比低剂量的造模剂更易引起动物肝损伤的发生,且相较于使用 60% 乙醇灌胃的方式,使用同等剂量的 53° 白酒可以降低实验动物的死亡率;上述探究,使笔者对造模间隔时间与实验动物死亡率和肝损伤程度的关系产生了好奇,因而在实验三中设置了不同的灌胃时间间隔来优化造模方法,过短的造模间隔会导致死亡率升高,而当造模间隔时间大于 6 h 后,肝损伤程度会减弱,因此以 53° 白酒作为造模剂,分别以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量按照 6 h 的间隔进行灌胃,可以在较低死亡率的情况下获得具有明显肝损伤特征的小鼠。

综上,通过本研究的比较,我们获得了一种简便、稳定、可靠的小鼠酒精性肝损伤模型的制备方案,就是以 53° 的白酒作为造模剂,以 20 mL/kg 和 10 mL/kg 的剂量间隔 6 h 依次对小鼠进行灌胃。使用上述方法造模后,生化指标的改变反映了造模剂对肝的明确损伤,证明了急性酒精性肝损伤小鼠模型的成功建立。本研究所涉及的造模方法操作简单,动物饲养成本低,造模时间短,可为后续研究酒精性肝病的发病机制和护肝药物的保护作用提供一种较理想的造模方案。

参考文献:

- [1] 张鸿,袁乐媛,王炳元. 酒精性肝病与代谢综合征[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 826-829.
- [2] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 药品评价, 2007, 4(2): 74-76.
- [3] Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151-171.
- [4] 林晓晖,黄玲,王一铮,等. 小鼠急性酒精性肝损伤模型的制备及观察[J]. 北方药学, 2014, 11(6): 67-69.

(下转第 40 页)

赵长城,丁华明,鹿伦山,等. SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层中 IMPDH2 的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 34-40.

Zhao CC, Ding HM, Lu LS, et al. IMPDH2 expression in the temporal cortex in a rhesus macaque with chronic SHIV KU-1 infection [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 34-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.005

SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层中 IMPDH2 的表达

赵长城¹,丁华明¹,鹿伦山¹,张 千¹,杨 静¹,董 颖¹,薛群山¹,庄 柯^{2*}

(1.中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)感染病院,合肥 230022;
2.武汉大学动物实验中心/ABSL-III 实验室,武汉 430071)

【摘要】 目的 探讨 HIV 对大脑颞叶皮层神经元中次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 II (inosine monophosphate dehydrogenase 2, IMPDH2) 蛋白表达的影响。**方法** 应用 MoCA 分数和磁共振成像手段评估 HIV 感染者轻度认知障碍情况。利用中国恒河猴 SHIV KU-1 神经艾滋病模型,HE 染色观察猴颞叶皮层细胞结构的变化;采用免疫组化方法和 Western blot 方法检测 IMPDH2 在猴颞叶皮层神经元内的表达;以及借助在线数据库预测 IMPDH2 相关信号通路的关键信号分子。**结果** HIV 感染者颞叶皮质较健康对照萎缩。与健康对照相比,SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层神经元中 IMPDH2 蛋白表达显著降低 ($P<0.0001$)。HNRNPA1 等 8 个基因与 IMPDH2 有潜在的相互作用。**结论** IMPDH2 在 HIV 患者颞叶皮层神经元中的表达下调,其可能参与了 HIV 相关神经认知障碍发生。

【关键词】 HIV 相关神经认知障碍;IMPDH2;颞叶皮层;SHIV KU-1 感染;恒河猴

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0034-07

IMPDH2 expression in the temporal cortex in a rhesus macaque with chronic SHIV KU-1 infection

ZHAO Changcheng¹, DING Huaming¹, LU Lunshan¹, ZHANG Qian¹, YANG Jing¹, DONG Ying¹,
XUE Qunshan¹, ZHUANG Ke^{2*}

(1. Infectious Disease Hospital, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230022, China.
2. Center for Animal Experiment, Wuhan University, Wuhan 430071)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of HIV infection on inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2) expression in the cerebral temporal cortex. **Methods** Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scores and magnetic resonance imaging were used to assess mild cognitive impairment in HIV-infected patients. In addition, the histologic structure of the temporal cortex in a rhesus macaque with chronic simian-human immunodeficiency virus (SHIV) KU-1 infection was examined using hematoxylin and eosin staining. Moreover, IMPDH2 protein expression levels in paired healthy and infected temporal cortex were examined using immunohistochemistry and Western blot. Finally, putative genes associated with IMPDH2 expression were investigated using protein-protein interaction network analysis. **Results** HIV-positive individuals had a thinner temporal cortex compared with healthy controls. In addition, the numbers of neurons in the temporal cortex were decreased and IMPDH2 protein levels were significantly lower in the infected monkey compared

[基金项目] 全国公共卫生临床联盟课题 (GWLM202007); 深圳市第三人民医院开放性课题 (#13)。

[作者简介] 赵长城 (1974—), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向: 艾滋病致病机制。E-mail: zccand@163.com

[通信作者] 庄柯 (1973—), 女, 博士, 研究方向: 艾滋病致病机制和动物模型。E-mail: zhuangk@whu.edu.cn

with healthy controls. Eight genes interacting with the IMPDH2 gene were identified. **Conclusions** Downregulation of IMPDH2 protein in the temporal cortex might be involved in the pathogenesis of HIV-related neurocognitive disease.

【**Keywords**】 HIV-associated neurocognitive disorder; IMPDH2; temporal cortex; SHIV KU-1 infection; rhesus macaque

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

HIV (human immunodeficiency virus) 相关神经认知障碍 (HIV-associated neurocognitive disorder, HAND) 是一种影响 HIV 感染者的神经综合征,主要表现为认知功能的障碍、运动能力的障碍及行为的改变等。目前,关于 HAND 的发病机制众说纷纭,对其神经损伤机制及早期诊断标志物的探索是该领域亟待解决的重大问题之一。众所周知,大脑颞叶皮层具有复杂的认知功能,人类多种认知障碍均与颞叶功能不足有关。神经影像学研究证实,HIV 感染者的颞叶皮层会萎缩^[1-2]。

次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 II (inosine monophosphate dehydrogenase 2, IMPDH2) 基因编码嘌呤核苷酸合成的关键限速酶蛋白。最近的一项研究,应用比较蛋白质组学技术鉴定了 HIV 感染者脑组织的差异蛋白表达谱,其中 IMPDH2 在 HIV⁺ 颞叶组织的表达显著下调^[3],但迄今仍缺乏直接证据。而且,研究证实,阿尔茨海默病小鼠表现出的认知能力下降和学习障碍,与 IMPDH2 蛋白的功能和表达改变存在关联^[4-5]。由此推测 IMPDH2 参与 HAND 的发病机制。本研究借助 SHIV KU-1 感染中国恒河猴模型,模拟研究 IMPDH2 在 HIV 患者颞叶皮层神经元内的表达变化,以期 HAND 发病机制提供新的参考,为后续寻找早期诊断标志物和新药开发提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究对象

本研究受试者包括 36 名伴 ($n=10$) 或不伴 ($n=26$) 认知障碍的 HIV 阳性受试者和 18 名年龄和性别匹配的 HIV 阴性对照,均来自安徽省立医院感染病院。对受试者伴或不伴认知障碍的判定依据蒙特利尔认知评估 (montreal cognitive assessment, MoCA) 量表测试,包括执行/视空间、命名、记忆、注意、语言、抽象和定向力等,总分为 30 分。MoCA ≥ 24 判为认知障碍患者。本研究的内容得到了中国科学技术大学生物医学伦理委员会的批准 (2021-N (H)-236)。

1.1.2 实验动物

4~5 岁、清洁级中国恒河猴 2 只,雌性,体重 5~6 kg,均购自湖北天勤生物科技有限公司 [SCXK (鄂)2021-0010],饲养于武汉大学实验动物中心 [SYXK (鄂)2019-0013]。普通环境条件为 12 h/12 h 昼夜周期,温度 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 45%~60%。每天饲喂特制猴饲料 3 次,中间 1 次给予适量水果。实验前经体检无异常,经血清学间接免疫荧光抗体检查法检查排除猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猴逆转录 D 型病毒 (SRV-1, 2, 5) 和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒 (STLV-1) 的感染。在本研究中所涉及的动物实验均经过中国科学技术大学动物实验中心动物管理和使用委员会的批准 (2021-N (A)-349)。实验过程严格遵循 3R 原则和实验动物福利伦理要求。

1.1.3 病毒株

实验毒株为 SHIV KU-1,由美国国立卫生研究院惠赠,在武汉大学 ABSL-III 实验室扩增和滴定^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗 IMPDH2 多克隆抗体 (abclonal, A15626); 兔抗 GAPDH 单克隆抗体 (cell signaling, 118); 生物素标记山羊抗兔 IgG 二抗 (ZF-0311, 北京中杉金桥生物公司); SABC 试剂 (北京索莱宝, SA1022); DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司, AR1022); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (PG111)、快速封闭液 (PS108P)、ECL 曝光液 (SQ201) 购自上海雅酶生物公司; RIPA 裂解液 (P0013C) 和 BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (P0010S) 购自上海碧云天生物公司。Achieva 3.0 T 磁共振系统 (Philips, 比利时); 蛋白电泳及转膜系统、凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 检查

使用磁共振系统行脑部常规 MRI 数据采集。包括扫描 T1 (T1 weighted image, T1WI)、T2 加权图像 (T2 weighted image, T2WI)、弥散加权成像 (diffusion weighted imaging, DWI) 和液体衰减反转恢复序列 (fluid-attenuated inversion recovery,

FLAIR)。每位受试者在检查前被告知本次检查的目的、过程和注意事项,签订知情同意书。

1.3.2 SHIV KU-1 动物感染

感染时,将一次性 5 mL 注射器针管轻轻插入实验猴阴道内,缓慢注入 3.15×10^8 TCID₅₀ SHIV KU-1 病毒液,让针管在阴道内停留 5 min,后轻轻拔出。接种后 1 周采集该猴静脉血,测定病毒载量以确定感染是否成功。每周攻毒 1 次,但由于持续攻毒多次后仍不能建立病毒感染,随之改用相同剂量的病毒液进行静脉感染。在成功感染的最初 2~3 周,检测到病毒载量均为 $10^7\sim10^8$ copies/mL^[7]。

1.3.3 颞叶皮层 HE 染色病理观察

切取实验猴颞叶皮层组织块约 0.5 cm³,在 4% 中性甲醛溶液中室温固定过夜。依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡、包埋等步骤。切片厚度为 4 μm/张。粘片、脱蜡、水化,苏木精中浸染 5 min,1% 盐酸乙醇分化 3 s,0.5% 氨水返蓝,滴加 0.5% 伊红数滴复染 10 s,脱水、透明、封片。

1.3.4 免疫组化染色检测 IMPDH2 蛋白表达

颞叶皮层组织切片常规脱蜡、水洗后放入柠檬酸缓冲液,微波热修复 20 min,室温冷却;滴加 3% 过氧化氢,37℃ 孵育 10 min,PBS 浸泡 2 次×5 min;滴加 10% 山羊血清,封闭 30 min;一抗(浓度 1:100) 4℃ 孵育过夜;PBS 漂洗 3 次×5 min,滴加生物素标记山羊抗兔 IgG(工作浓度为 1:400)室温孵育 1 h;PBS 漂洗 3 次×5 min,滴加 SABC 试剂数滴,37℃ 孵育 15 min,PBS 漂洗 3 次×5 min,DAB 显色试剂盒显色 2 min;再用苏木精复染;常规脱水、透明,中性树胶封片。镜下观察。

1.3.5 Western blot 检测 IMPDH2 蛋白表达

切取颞叶皮层组织约 0.5 cm³,置于 RIPA 裂解

液中,在冰浴中匀浆,4℃、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 Loading Buffer,煮沸 10 min。上样 30 μg 蛋白样品,经 12% SDS-PAGE 电泳分离,电流 200 mA、恒流湿法转膜 1.5 h,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别加入一抗(浓度均为 1:1000),4℃ 过夜。次日,TBST 漂洗 3 次×5 min。把膜条放入二抗(浓度 1:2000),室温孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次×5 min。膜上滴加 ECL 发光液,曝片。Image Pro Plus 6.0 软件分析各目的条带 OD 值。

1.3.6 预测 IMPDH2 表达相关基因

采用器官特异性的蛋白相互作用数据库 iid (<http://iid.ophid.utoronto.ca/SearchPPIs/protein/>),结合蛋白相互作用数据库 string(<https://string-db.org>),分析已证实的和可以预测的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)的生物数据库和网络资源。

1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行分析。各组间指标差异性比较用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异具有显著性差异。

2 结果

2.1 认知功能比较

健康对照组和 HIV 感染者的 MoCA 评分分别为(28.3±1.4)和(25.8±2.6),差异有统计学意义(*P*<0.05),表明 HIV 感染对认知功能产生了影响。依据 MoCA 的评分,把 HIV 感染者分为伴认知障碍组和无认知障碍组,具体的统计信息和临床信息见表 1。

表 1 伴/不伴认知障碍的 HIV 感染者的人口统计信息和临床信息

Table 1 Demographic and clinical information of HIV-infected patients with or without cognitive impairment

项目 Items	HIV 感染者 HIV-infected patients		健康对照 (<i>n</i> = 40) Healthy control
	伴认知障碍 (<i>n</i> = 32) With cognitive impairment	无认知障碍 (<i>n</i> = 56) Without cognitive impairment	
年龄(岁) Age (years)	48. 5±9. 8	36. 9±10. 2	41. 8±14. 7
性别(男/女) Gender (male/female)	28/4	50/6	36/4
最低 CD4 细胞计数(cells/mm ³) Minimum CD4 cell counts	92. 7±113. 6	335. 4±131. 4	753±93
治疗时长(月) Treatment duration (months)	18. 3±26. 9	4. 1±8. 7	N/A
MoCA 评分(分) MoCA (scores)	20. 3±3. 5	27. 7±1. 6	28. 3±1. 4

2.2 HIV 感染者颞叶皮层功能性 MRI 检查

根据 MoCA 量表的评分,将 HIV 感染者分为不伴认知障碍组和伴认知障碍组。MRI 平扫及增强扫描示:与健康对照(图 1A)相比,伴认知障碍的 HIV-1 感染者颞叶皮层普遍变薄,且右颞叶见多发斑片状、团片状稍长 T1 信号,边界欠清,DWI 序列呈高信号,ADC 图呈低信号。占位效应明显,双侧侧脑室前角受压变窄(图 1C);而不伴认知障碍的 HIV-1 感染者脑实质未见明显异常强化(图 1B)。结果表明,大脑颞叶皮层结构和功能慢性损伤参与了 HIV 感染者认知功能下降的发病过程。

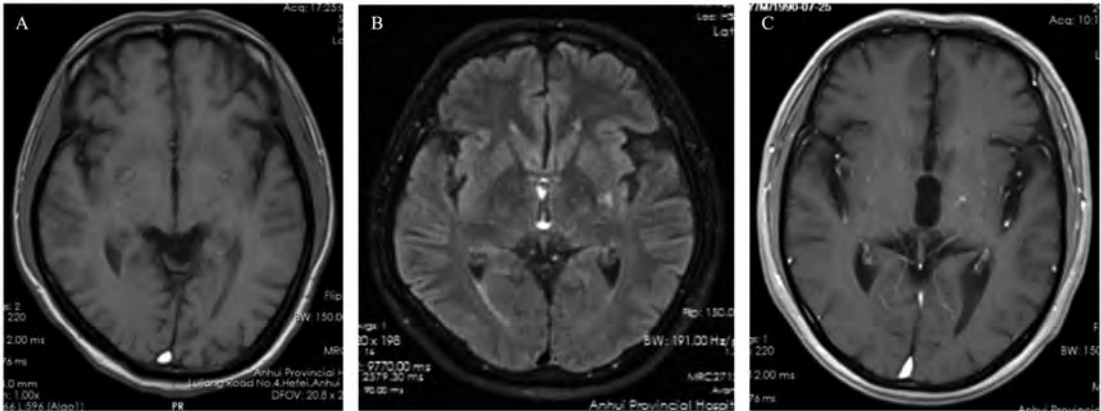
2.3 SHIV KU-1 感染中国恒河猴神经艾滋病临床症状

利用 SHIV KU-1 毒株感染健康中国恒河猴模拟 HIV 感染所致的神经认知障碍。实验猴的病程进展较慢,于感染后 72 周执行安乐死。该猴在疾病后期表现出典型的神经艾滋病症状,表现为精神萎

靡、嗜睡、食欲减退和站立困难、头部倾斜、共济失调、左半身控制能力丧失等运动和行为方面的功能障碍,以及反应迟钝、表情淡漠、意识障碍等临床特征。

2.4 HE 染色检测 SHIV KU-1 感染中国恒河猴颞叶皮层病理学改变

HE 染色显示,健康对照猴神经细胞排列紧密有序,胞体较大,突起丰富,细胞呈圆形、椭圆形或锥形,核浆比值大,细胞核为圆形或椭圆形,着色均匀为浅蓝紫色,核仁明显数量众多(图 2A、2C)。而 SHIV KU-1 感染猴脑组织表现为艾滋病合并化脓性脑膜炎,镜下可见多核巨细胞和单个核细胞的聚集。感染猴颞叶皮层神经元数量丢失,细胞排列无序,极性消失和胶质增生等病理改变;残留锥体神经元树突、轴突萎缩,胞体缩小,胞浆染色加深,尼氏体减少;神经细胞轮廓与周围组织分解欠清晰(图 2B、2D)。



注:A:健康对照;B:未伴认知障碍的 HIV-1 感染者;C:伴认知障碍的 HIV-1 感染者。
Figure 1 HIV 感染者大脑颞叶皮层 MRI 检查结果
Note. A, Healthy control. B, HIV without cognitive impairment. C, HIV-associated cognitive impairment.

Figure 1 MRI findings of temporal cortex in HIV-infected patients

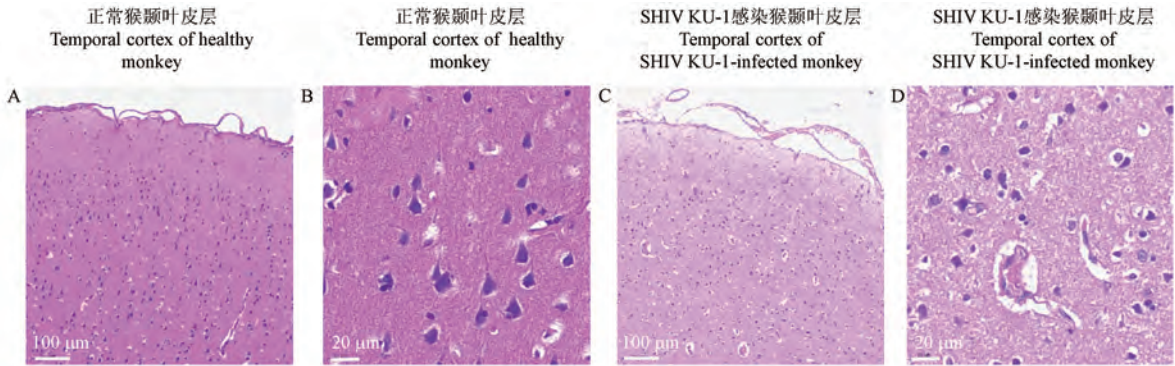
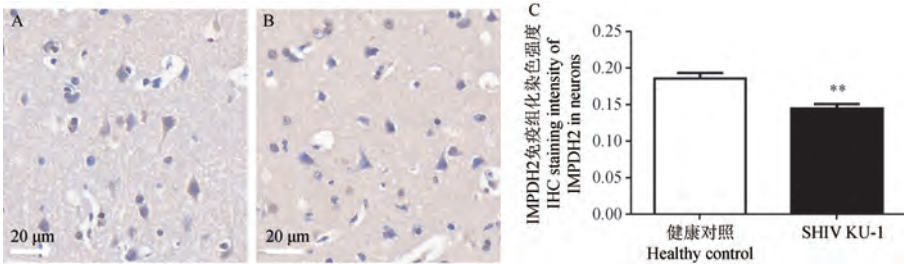


图 2 正常猴颞叶皮层与 SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层组织(HE 染色)

Figure 2 Pathological changes in cerebral temporal lobe of SHIV KU-1-infected-rhesus macaque (HE staining)

2.5 IHC 检测颞叶组织神经元内 IMPDH2 蛋白表达

IHC 检测结果显示:IMPDH2 蛋白在颞叶组织神经元中表达,绝大部分表达在胞质和胞膜,少部分表达在胞核。与正常猴颞叶皮层 (0.1864 ± 0.0068) 相比,IMPDH2 蛋白在 SHIV KU-1 感染猴颞叶组织神经元 (0.1447 ± 0.0066) 中呈现显著低表达 ($P=0.0061$) (图 3)。

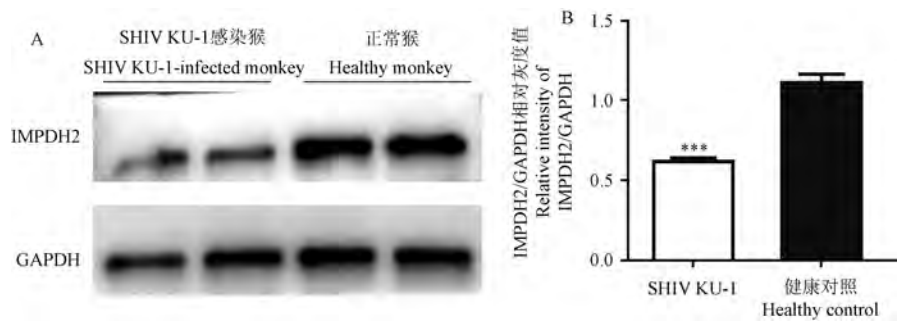


注:A;正常猴颞叶皮层;B;SHIV KU-1 感染猴颞叶皮层;C:免疫组化染色强度。与健康对照组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 免疫组化检测 IMPDH2 蛋白在 SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层神经元的表达

Note. A, Temporal cortex of healthy monkey. B, Temporal cortex of SHIV KU-1-infected monkey. C, Bar chart of IHC staining intensity of IMPDH2 for neurons. Compared with the healthy control group, ** $P<0.01$.

Figure 3 Immunohistochemical staining against IMPDH2 of SHIV KU-1-infected rhesus macaque temporal cortex neurons



注:A;SHIV KU-1 感染猴与正常猴大脑颞叶组织中的 IMPDH2 表达,GAPDH 为内参;B:IMPDH2/GAPDH 相对灰度值,与健康对照组相比, *** $P<0.001$ 。

图 4 SHIV KU-1 感染恒河猴大脑颞叶组织中的 IMPDH2 表达

Note. A, IMPDH2 expression in the cerebral temporal lobe of SHIV KU-1-infected monkey and healthy monkey, and GAPDH was the protein loading control. B, Relative densitometric bar graphs of ratio IMPDH2/GAPDH, compared with the healthy control group, *** $P<0.001$.

Figure 4 IMPDH2 expression in the cerebral temporal lobe of SHIV KU-1-infected rhesus macaque

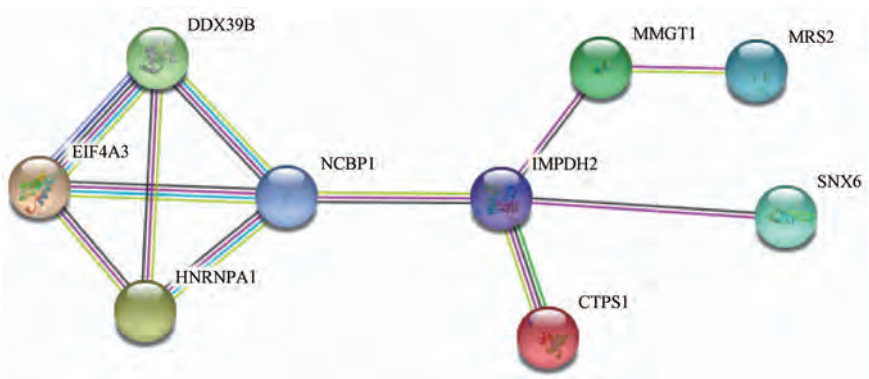


图 5 预测 IMPDH2 在脑组织中的关键信号分子

Figure 5 Prediction of key signaling molecules of IMPDH2 in brain

HNRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)、MMGT1 (membrane magnesium transporter 1)、MRS2 (magnesium transporter MRS2 homolog)、SNX6 (sorting nexin-6)、CTPS1 (CTP synthase 1)、NCBP1 (nuclear cap-binding protein subunit 1)、EIF4A3 (eukaryotic initiation factor 4A-III) 和 DDX39B (spliceosome RNA helicase DDX39B) 等基因在 IMPDH2 表达相关调控中起重要作用。

3 讨论

脑萎缩是 HIV 感染者,尤其是 HIV 相关痴呆症患者中常见的神经影像学 and 病理学表现^[8]。很多学者使用 MRI 手段研究了 HIV 感染者大脑特定区域脑容量的变化^[9-10]。本文 MRI 结果与上述结果一致。随着感染的持续和病程的进展,脑萎缩的 HIV 感染者神经认知发生改变^[11-12]。已知恒河猴颞叶结构与人颞叶结构相似^[13],故 SIV/SHIV 感染恒河猴常被用于研究神经艾滋病的动物模型^[14-15],其神经损伤的病理特征与 HIV 相关的神经病变相似。本文中 SHIV KU-1 感染猴在疾病晚期表现出明显中枢神经系统疾病症状,其颞叶皮层区神经元的数量显著减少且排列无序。本研究结果为 HIV 相关神经艾滋病中的神经损伤机制提供了类比借鉴。

IMPDH 是鸟嘌呤核苷酸从头合成中的限速酶。IMPDH2 是 IMPDH 的主要亚型之一。蛋白质组水平的变化可能是潜在的生物学标志物和治疗靶点。既往研究表明 IMPDH2 在泌尿系统肿瘤(如肾癌、膀胱癌、前列腺癌等)中过度表达,具有作为肿瘤标志物与生物靶向目标的潜在价值。近年来,IMPDH2 作为神经认知疾病和神经认知障碍的候选基因引起了人们的关注^[16-17]。本研究采用免疫组化方法和 Western blot 方法证实,中国恒河猴 SHIV KU-1 神经艾滋病模型颞叶皮层神经元中 IMPDH2 表达下降,提示与 HAND 的病理改变和临床症状的出现有关。因此,调控脑内 IMPDH2 的表达或许是一种预防和治疗 HAND 的有效策略。

基于生物信息学分析,本研究筛选出与 IMPDH2 基因存在互作关系的基因 8 个。其中 HNRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1,核不均一性核糖核蛋白 A1) 是一种多功能蛋白,并通过结合核转运蛋白 $\beta 2$ (Kap $\beta 2$) 来进行核质运输。研究发现, HNRNPA1 通过促使神经元的

RNA 代谢紊乱,导致几种神经退行性疾病发生^[18-19]。机制上其 C 端结构域在 D262 (D262V/D262N) 处发生的自然突变导致 hnRNP A1 纤维的积累,与额颞叶变性有关^[20]。结合图 5 提示, IMPDH2-NCBP1-HNRNPA1 通路可能在 HAND 发病机制中扮演着重要角色。

参考文献:

- [1] Hassanzadeh-Behbahani S, Shattuck KF, Bronshteyn M, et al. Low CD4 nadir linked to widespread cortical thinning in adults living with HIV [J]. *Neuroimage Clin*, 2020, 25: 102155.
- [2] Küper M, Rabe K, Esser S, et al. Structural gray and white matter changes in patients with HIV [J]. *J Neurol*, 2011, 258 (6): 1066-1075.
- [3] Doke M, Ramasamy T, Sundar V, et al. Proteomics profiling with SWATH-MS quantitative analysis of changes in the human brain with HIV infection reveals a differential impact on the frontal and temporal lobes [J]. *Brain Sci*, 2021, 11 (11): 1438.
- [4] Neuner SM, Wilmott LA, Hoffmann BR, et al. Hippocampal proteomics defines pathways associated with memory decline and resilience in normal aging and Alzheimer's disease mouse models [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 322: 288-298.
- [5] Puthiyedth N, Riveros C, Berretta R, et al. Identification of differentially expressed genes through integrated study of Alzheimer's disease affected brain regions [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152342.
- [6] 桑明, 代明, 周立, 等. 恒河猴外周血单核巨噬细胞体外培养方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 18-24.
- [7] Xiao Q, Li J, Yu Q, et al. Distinct compartmentalization in the CNS of SHIVKU-1-infected Chinese Rhesus macaque is associated with severe neuropathology [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2015, 70(5): e168-e171.
- [8] Gelbard HA, Dzenko KA, DiLoreto D, et al. Neurotoxic effects of tumor necrosis factor alpha in primary human neuronal cultures are mediated by activation of the glutamate AMPA receptor subtype: implications for AIDS neuropathogenesis [J]. *Dev Neurosci*, 1993, 15(6): 417-422.
- [9] Aylward EH, Henderer JD, McArthur JC, et al. Reduced basal Ganglia volume in HIV-1-associated dementia: results from quantitative neuroimaging [J]. *Neurology*, 1993, 43 (10): 2099-2104.
- [10] Johann-Liang R, Lin K, Cervia J, et al. Neuroimaging findings in children perinatally infected with the human immunodeficiency virus [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 1998, 17(8): 753-754.
- [11] Arruda WO, Bordignon KC, Milano JB, et al. Creutzfeldt-Jakob disease, Heidenhain variant: case report with MRI (DWI) findings [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2004, 62(2A): 347-352.
- [12] Nakamoto BK, Jahanshad N, McMurtray A, et al.

Cerebrovascular risk factors and brain microstructural abnormalities on diffusion tensor images in HIV-infected individuals [J]. J Neurovirol, 2012, 18(4): 303-312.

[13] Furl N, Hadj-Bouziane F, Liu N, et al. Dynamic and static facial expressions decoded from motion-sensitive areas in the macaque monkey [J]. J Neurosci, 2012, 32(45): 15952-15962.

[14] Liu D, Liu J, Xu T, et al. Longitudinal trajectories of brain volume in combined antiretroviral therapy treated and untreated Simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques [J]. AIDS, 2021, 35(15): 2433-2443.

[15] 刘克剑, 丛喆, 金光, 等. 表现神经症状的 SIVmac251 感染猴大脑基底节病毒 gp120 序列变异分析 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(2): 37-42, 101.

[16] Liao LX, Song XM, Wang LC, et al. Highly selective inhibition of IMPDH2 provides the basis of antineuroinflammation therapy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(29): E5986

-E5994.

[17] Zech M, Jech R, Boesch S, et al. Monogenic variants in dystonia: an exome-wide sequencing study [J]. Lancet Neurol, 2020, 19(11): 908-918.

[18] Levengood JD, Tolbert BS. Idiosyncrasies of hnRNP A1-RNA recognition; can binding mode influence function [J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 86: 150-161.

[19] King OD, Gitler AD, Shorter J. The tip of the iceberg: rna-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease [J]. Brain Res, 2012, 1462: 61-80.

[20] Kim HJ, Kim NC, Wang YD, et al. Mutations in prion-like domains in hnRNP A2B1 and hnRNP A1 cause multisystem proteinopathy and ALS [J]. Nature, 2013, 495(7442): 467-473.

[收稿日期]2022-06-20

(上接第 33 页)

[5] 曲相如, 孙景春, 卢秀花, 等. 实验性肝损伤动物模型的制备和评价 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(10): 1477-1479.

[6] 李龙辉, 李龙江, 汤为学, 等. 甘利欣作用前后体外酒精性脂肪肝细胞模型甘油三酯水平变化及其可能作用机制 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(2): 179-182.

[7] Kanuri G, Weber S, Volynets V, et al. Cinnamon extract protects against acute alcohol-induced liver steatosis in mice [J]. J Nutr, 2009, 139(3): 482-487.

[8] 吕超, 石清兰, 覃倩, 等. 小鼠实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 107-113.

[9] Rua RM, Ojeda ML, Nogales F, et al. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol [J]. Life Sci, 2014, 94(2): 158-163.

[10] 赵稳兴, 杨举伦, 胡秀英. 小鼠酒精性肝损伤模型的建立及五味子提取物对其作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5): 274-277, 254.

[11] 王睿林, 李晓娟, 白云峰, 等. 黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 34-37, 87.

[12] 肖娟, 张瑞芬, 黄菲, 等. 两种不同的酒精摄入方式诱导的小鼠酒精性肝损伤模型比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 11-17.

[13] 杨柳, 王文地, 马允, 等. 急性酒精性肝损伤模型的考察及验证 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(3): 391-396.

[收稿日期]2022-08-09

李红艳,梅显运,杨慧雅,等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 41-47.

Li HY, Mei XY, Yang HY, et al. Protective effect of nardosinone on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 41-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.006

基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的保护作用

李红艳^{1,2*}, 梅显运¹, 杨慧雅¹, 李艺康¹, 冯 佩¹, 孙芳云^{1,2}

(1. 西藏民族大学医学院藏药检测技术教育部工程研究中心, 陕西 咸阳 712082;
2. 西藏民族大学医学院西藏自治区高原疾病分子遗传机制与干预研究重点实验室, 陕西 咸阳 712082)

【摘要】 目的 探讨甘松新酮(nardosinone, Nar)通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对低氧诱导 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及机制。**方法** 采用氯化钴(CoCl₂)制备心肌细胞低氧损伤模型, CCK-8 试剂盒检测细胞活性; Hoechst 33342 进行细胞染色, 激光共聚焦显微镜下观察细胞凋亡现象; 网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 相关信号通路; Western blot 检测凋亡、自噬和 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达。**结果** PI3K/Akt/mTOR 通路是 Nar 治疗 IHD 关键信号通路之一; 与对照组比, CoCl₂ (400 μmol/L) 组细胞活性降低, 细胞核碎片增多, 凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达升高, Bcl-2/Bax 比降低, PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平降低; P62 表达降低, LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达升高($P<0.05$)。与 CoCl₂ 组比, Nar (50 μmol/L) 预处理显著增加了细胞活性、减少细胞核凋亡碎片, 降低 Cleaved-Caspase-3 表达, 升高 Bcl-2/Bax 比值, 增加了 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平及 P62 表达, 降低 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达($P<0.05$)。PI3K 特异性抑制剂 LY294002 预作用后抵消了 Nar 对 CoCl₂ 引起的以上凋亡、PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白和 P62 蛋白的影响, 但没有抵消对 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达的影响。**结论** Nar 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制了 CoCl₂ 诱导的 H9c2 心肌细胞低氧凋亡, 但可能通过其他途径缓解了过度自噬对细胞造成的损伤。

【关键词】 甘松新酮; 心肌细胞; 低氧损伤; 凋亡; 自噬; PI3K/Akt/mTOR 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0041-07

Protective effect of nardosinone on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway

LI Hongyan^{1,2*}, MEI Xianyun¹, YANG Huiya¹, LI Yikang¹, FENG Pei¹, SUN Fangyun^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Tibetan Medicine Detection Technology, Ministry of Education, School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China. 2. Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude Disease of Tibet Autonomous Region, School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of Nardosinone (Nar) in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Methods** Cobalt chloride (CoCl₂) was used to establish a hypoxic injury model in H9c2 cardiomyocytes. Cell proliferation was assessed by CCK-8 assays. Hoechst 33342 was applied to counterstain cells, and laser scanning confocal microscopy was used to observe apoptosis. The potential signaling pathway of Nar in treating IHD was predicted by network pharmacology. Western blot was used to detect expression of apoptosis-, autophagy-, and PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins. **Results** The PI3K/Akt/

[基金项目] 2022 年西藏民族大学科研项目 (22MDY012); 西藏高原相关疾病分子机制与干预研究重点实验室开放项目 (KF2022001); 2021 年国家民委高等教育教学改革研究项目 (21076); 西藏民族大学教学改革与研究项目 (2021475)。

[作者简介] 李红艳 (1978—), 副教授, 研究生导师, 研究方向: 低氧对心血管影响及藏药干预。E-mail: lhy516@163.com

mTOR pathway is major signaling pathway in Nar treatment of IHD. Compared with the control group, CoCl_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) decreased cell proliferation, the Bcl-2/Bax ratio, PI3K, Akt and mTOR protein phosphorylation levels, and P62 protein expression, while increasing nuclear apoptotic fragmentation, the LC3II/LC3I ratio, and Cleaved-Caspase-3 and Beclin-1 protein expression ($P < 0.05$). Compared with the CoCl_2 group, Nar (50 $\mu\text{mol/L}$) pretreatment significantly increased cell proliferation, alleviated nuclear apoptotic fragmentation, decreased Cleaved-Caspase-3 protein expression, increased the Bcl-2/Bax ratio, and increased PI3K, Akt and mTOR phosphorylation levels and P62 protein expression. The LC3II/LC3I ratio and the Beclin-1 protein expression were also decreased ($P < 0.05$). Pretreatment with PI3K specific inhibitor LY294002 offset the effects of Nar on CoCl_2 -induced apoptosis, PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins, and P62 protein expression, but had no effect on the LC3II/LC3I ratio or Beclin-1 expression. **Conclusions** Nar inhibited CoCl_2 -induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway, but probably alleviated the damage caused by excessive autophagy in cells through other pathways.

[Keywords] nardosinone; cardiomyocytes; hypoxic injury; apoptosis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR pathway

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

缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 是世界上导致死亡和残疾的主要原因,其临床症状主要表现为心肌梗死、心力衰竭和心功能不全等。研究发现,心肌缺氧缺血常伴随细胞异常凋亡或坏死,从而导致心功能障碍^[1]。自噬既是细胞内一种高度保守的降解过程,也是不同条件下调节细胞存活或死亡的一把双刃剑^[2],在 IHD 发病过程中有着重要作用^[3-4]。目前,IHD 治疗包括药物治疗、抗血小板治疗和手术等方法,其中中药治疗 IHD 越来越得到人们的认可。

甘松新酮 (nardosinone, Nar) 是中药甘松的有效成分^[5],有抗心律失常、降血压、中枢抑制、促神经生长、抗肿瘤、抗癫痫和预防炎症性骨丢失等作用^[6-8],在心肌细胞低氧损伤中有抗凋亡作用^[9],但具体机制尚不清楚。网络药理学是一种快速、有效预测药物疾病靶点和相关信号通路的方法。因此,本研究首先利用网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 相关信号通路,结果表明,PI3K/Akt/mTOR 是 Nar 治疗 IHD 关键通路之一。已知,PI3K/Akt/mTOR 通路在调节细胞增殖、凋亡和自噬等生理活动中发挥着重要作用^[10],激活该通路可抑制心肌缺血损伤中的自噬和凋亡现象^[11]。其次,以 CoCl_2 诱导 H9c2 心肌细胞低氧损伤为模型,基于 PI3K/Akt/mTOR 通路探讨 Nar 对心肌细胞凋亡影响及与自噬的关系,以为 IHD 治疗靶点药物筛选提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

H9c2 心肌细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基 (货号 SH30022.01) 和青链霉素

混合液 (货号 SV30010) 购自 Hyclone 公司;胎牛血清 (货号 04-001-1ACS) 购自 Biological Industries 公司;氯化钴 (CoCl_2 , 货号 232696) 购自 Sigma;甘松新酮 (货号 23720-80-1) 购自成都植标化纯生物技术有限公司;LY294002 (货号 S1105) 购自 Selleckchem 公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (货号 JC-PD002) 购自西安晶彩生物科技有限公司;PVDF 膜 (货号 IPVH00010) 购自 Millipore 公司;RIPA 裂解液 (货号 P0013B) 和 PMSF (货号 ST505) 购自碧云天生物技术有限公司;抗体 Cleaved-Caspase-3 (ab214430)、Bax (ab32503)、Bcl-2 (ab182858)、 β -actin (ab8226)、mTOR (ab134903)、p-mTOR (ab109268)、Akt (ab8805)、p-Akt (ab38449)、p-PI3K (ab278545)、LC3B (ab192890)、Beclin-1 (ab207612) 和 P62 (ab109012) 购自 Abcam 公司;PI3K (20584-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

CO_2 培养箱、全波长荧光酶标仪和低温冷冻高速离心机 (Thermo Fisher);激光共聚焦显微镜 (Leica);蛋白电泳仪、蛋白转膜仪和蛋白凝胶成像系统 (Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK-8 法检测细胞活性

将 H9c2 细胞以每孔含 100 μL DMEM 完全培养基,密度为 2×10^3 /孔接种到 96 孔培养板中,37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养 48 h。分别以 0、50、100、200、400、800 和 1000 $\mu\text{mol/L}$ 浓度 CoCl_2 (溶于双蒸水中) 干预细胞 24 h (每孔设 6 个复孔),根据 CCK-8 试剂盒测细胞活性。选择 CoCl_2 半数致死浓度 (LD_{50}) 构建细胞低氧损伤模型。同时,为了观察 Nar 对 CoCl_2 诱导细胞活性损伤影响,细胞接种 24 h

后,以终浓度分别为 0、25、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar(溶解在 DMSO 中)或 1/1000 DMSO 培养 24 h,再以 CoCl_2 (LD_{50}) 继续培养 24 h,根据 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。

1.3.2 Hoechst 33342 染色

细胞接种于 24 孔板进行爬片,分为对照组(Control 组)、Nar 组、 CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组 4 组。24 h 后,Nar+ CoCl_2 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar 预处理,其余各组用 DMSO 补足等体积。24 h 后, CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组分别加入 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 进行干预,Control 组用双蒸水补足等体积,培养箱中继续培养 24 h。随后按照 Hoechst 33342 说明书染色,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 Nar 治疗 IHD 潜在靶点的网络学分析

(1) Nar 靶点预测

通过 TCSP (https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php)、SwissTargetPrediction (http://www.swisstargetprediction.ch/)、PharmMapper (http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/) 和 BATMANTCM (http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/) 数据库,以“Nardosinone”为关键词预测 Nar 作用靶点。

(2) IHD 靶点的预测

通过 Genecards (https://www.genecards.org/)、PharmKB (https://www.pharmgkb.org/)、OMIM (https://omim.org/)、TTD (http://db.idrblab.net/ttd/) 和 Drugbank (https://go.drugbank.com/) 数据库,以“Ischemic Heart Disease”为关键词预测疾病靶点。将 Nar 靶点和 IHD 靶点分别选择“Homo Sapiens”物种,利用 UniProt (https://www.uniprot.org/) 数据库进行 ID Mapping,统一转换为 Gene symbol。以 Venny 2.1 (https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) 软件绘制 Nar 和 IHD 靶点交集图。

(3) Nar 治疗 IHD 信号通路分析

通过 Metascape (https://metascape.org/) 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析。在微生信 (http://www.bioinformatics.com.Cn/) 网将 KEGG 通路富集结果绘成气泡图。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达

细胞分组:Control 组、Nar 组、 CoCl_2 组和 Nar+ CoCl_2 组或 Control 组、 CoCl_2 组、Nar+ CoCl_2 组、LY294002+ CoCl_2 组和 LY294002+Nar+ CoCl_2 组。以 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测蛋白

浓度。加上样缓冲液水浴煮沸进行蛋白变性。随后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。一抗 Cleaved-Caspase-3、Bax、Bcl-2、 β -actin、mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt、p-PI3K、PI3K、LC3B、Beclin-1 和 P62 分别 4℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜,方法同上。二抗室温孵育 2 h。显影后,采用凝胶成像系统扫描图像。使用 Image Lab 软件对灰度值进行分析。

1.4 统计学方法

以 GraphPad Prism 8.0 软件作图。每组数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 t 检验用于两组间比较,单因素方差分析用于多组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

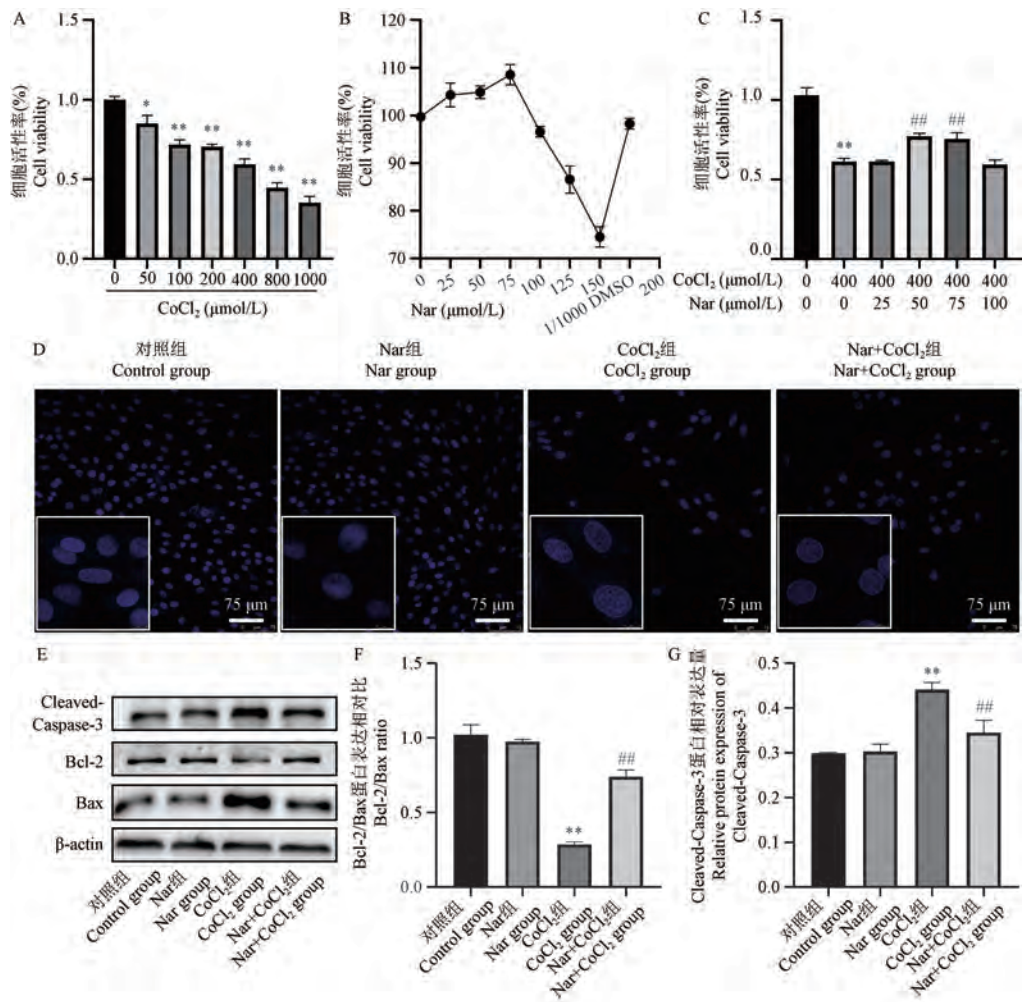
2.1 Nar 对心肌细胞低氧损伤的影响

用不同浓度 CoCl_2 处理 H9c2 细胞 24 h,细胞活性呈浓度依赖性下降(图 1A, $P < 0.01$),选 CoCl_2 (400 $\mu\text{mol/L}$) (使细胞活性降至 60% 左右)作为后续细胞低氧损伤造模用。由图 1B 可见,Nar 安全浓度在 0~75 $\mu\text{mol/L}$ 之间 ($P < 0.01$)。细胞以不同浓度 Nar 预处理 24 h,再以 CoCl_2 继续培养 24 h,结果发现,50 $\mu\text{mol/L}$ 和 75 $\mu\text{mol/L}$ 的 Nar 可显著改善 CoCl_2 对细胞活性的影响(图 1C, $P < 0.01$),但二者差异不大,故选 Nar (50 $\mu\text{mol/L}$) 进行后续研究。

为了进一步了解 Nar 对 CoCl_2 低氧损伤的影响,Hoechst 33342 细胞染色发现(图 1D):对照组和 Nar 组细胞核轮廓正常,呈椭圆形或圆形,凋亡亮点较少。而 CoCl_2 组细胞凋亡数增加,染色质浓缩,核出现多个碎片,表现为亮点增多。Nar 预作用细胞核形态明显改善,凋亡数量减少。Western blot 结果表明,与对照组相比, CoCl_2 组凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3 表达升高,Bcl-2/Bax 比降低,而 Nar 预处理显著逆转了 CoCl_2 诱导的 Cleaved-Caspase-3 表达升高和 Bcl-2/Bax 比降低,表明,Nar 对 CoCl_2 诱导的细胞凋亡有抑制作用。

2.2 Nar 与 IHD 潜在靶点的信号通路分析

通过 TCSP、SwissTargetPrediction、PharmMapper 和 BATMANTCM 数据库获得 Nar 相关靶点,将结果去重,利用 UniProt 进行格式转换,最终得到 Nar 相关靶点 300 个(图 2)。在 Genecards、PharmKB、OMIM、TTD 和 Drugbank 数据库筛选出 IHD 相关靶



注：A~C：CCK-8 检测细胞活性；D：Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡现象；E~G：Western blot 检测凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达。与对照组相比，**P*<0.05，***P*<0.01；与 CoCl₂ 组相比，##*P*<0.01。

图 1 Nar 对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的影响

Note. A~C, Cell viability was detected by CCK-8. D, Hoechst 33342 staining was used to detect apoptosis. E~G, Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins Cleaved-Caspase-3, Bcl-2 and Bax. Compared with Control group, **P*<0.05, ***P*<0.01. Compared with CoCl₂ group, ##*P*<0.01.

Figure 1 Effect of Nar on hypoxic injury in H9c2 cardiomyocytes

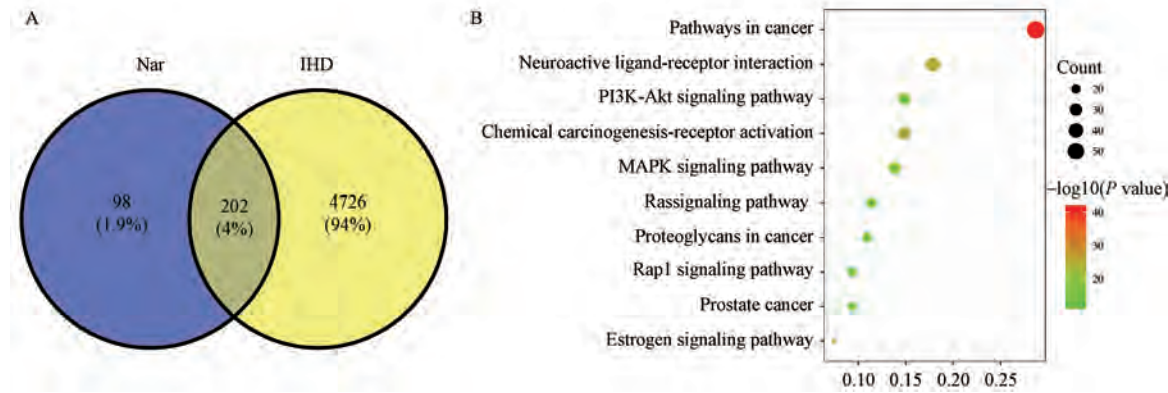


图 2 Nar 治疗 IHD 的潜在靶点信号通路分析

Figure 2 Signaling pathway analysis of potential targets of Nar treating for IHD

点共 4928 个。Nar 与 IHD 交集靶点有 202 个(图 2A)。通过 Metascape 数据库对交集靶点进行 KEGG 富集分析,共获得 207 条信号通路。以微生物网绘制排名前十的信号通路 KEGG 富集气泡图(图 2B),其中 PI3K/Akt/mTOR 通路是 Nar 治疗 IHD 重要凋亡相关通路。

2.3 Nar 影响心肌细胞低氧损伤与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系

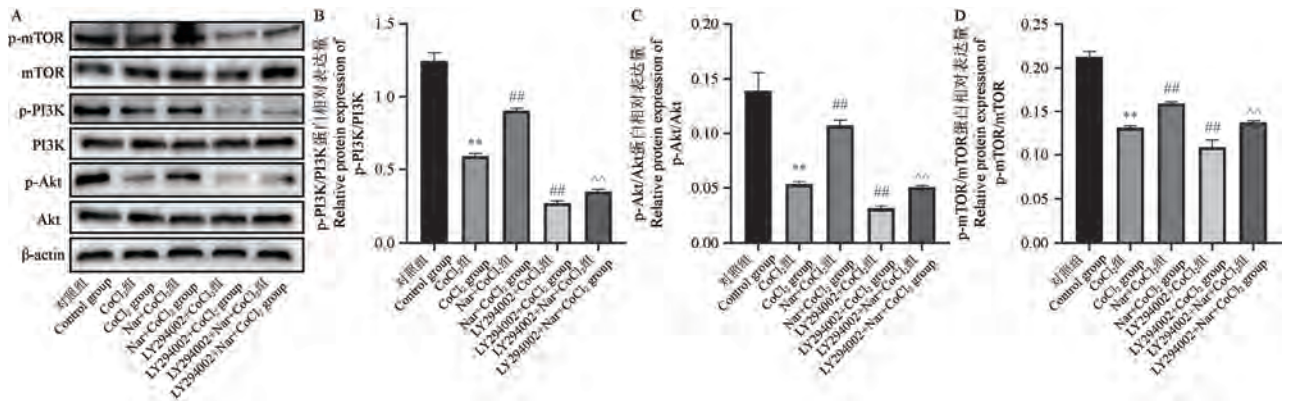
为了验证 Nar 治疗 IHD 与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,在细胞水平上检测该通路相关蛋白表达。结果如图 3,与对照组比,CoCl₂ 使 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平显著降低,Nar 预作用增加了 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平,而以 PI3K 抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路后,Nar 作用显著被抵消。结果表明,Nar 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信

号通路影响 CoCl₂ 诱导细胞低氧损伤。
2.4 Nar 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路影响低氧诱导的细胞凋亡

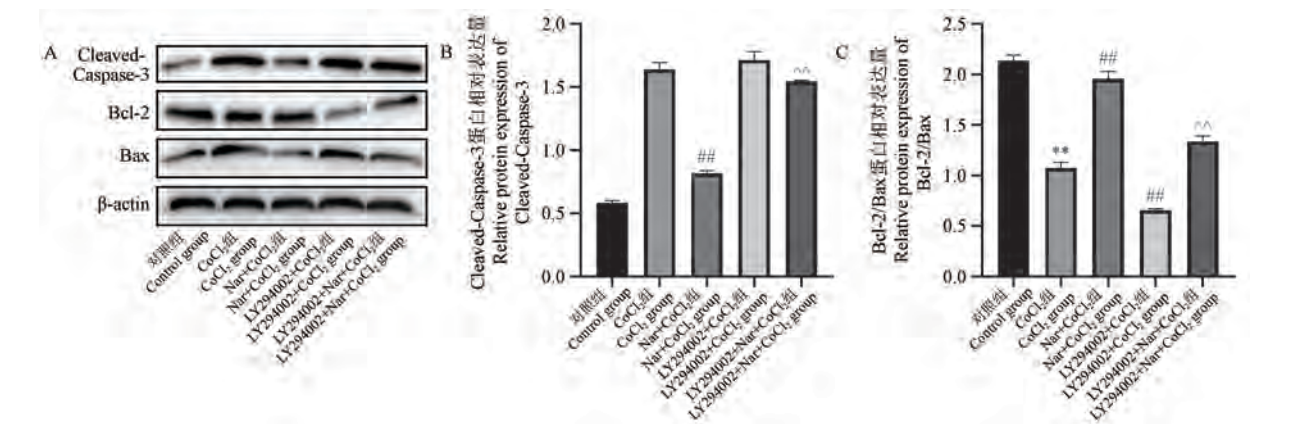
为了进一步探索 Nar 在心肌细胞低氧凋亡中的作用与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,以 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路,检测凋亡蛋白 Cleaved-Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 表达。结果,LY294002 预作用抵消了 Nar 对 CoCl₂ 引起的 Cleaved-Caspase-3 表达升高和 Bcl-2/Bax 比降低的影响(图 4)。结果表明,Nar 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制心肌细胞低氧诱导的凋亡。

2.5 Nar 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路影响细胞低氧损伤与自噬的关系

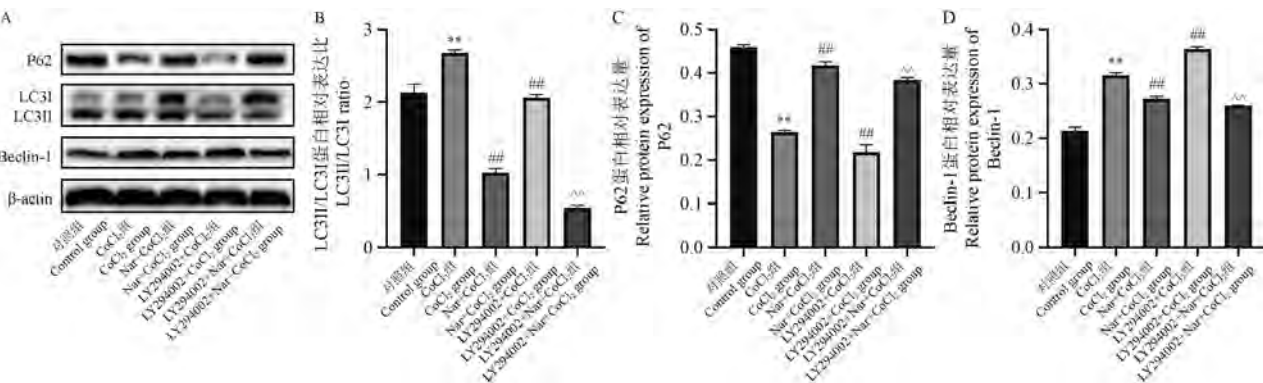
既往研究表明,Nar 对 CoCl₂ 诱导心肌细胞过度自噬有抑制作用^[9]。结果见图 5,为了深入探讨 Nar



注:与对照组相比,** $P<0.01$;与 CoCl₂ 组相比,### $P<0.01$;与 Nar+CoCl₂ 组相比,~ $P<0.01$ 。
Figure 3 Nar 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl₂ group, ### $P<0.01$. Compared with Nar+CoCl₂ group, ~ $P<0.01$.
Figure 3 Effects of Nar on the PI3K/Akt/ mTOR signalling pathway



注:与对照组相比,** $P<0.01$;与 CoCl₂ 组相比,### $P<0.01$;与 Nar+CoCl₂ 组相比,~ $P<0.01$ 。
图 4 Nar 对 CoCl₂ 诱导下 H9c2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响
Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl₂ group, ### $P<0.01$. Compared with Nar+CoCl₂ group, ~ $P<0.01$.
Figure 4 Effects of Nar on apoptosis-related proteins in H9c2 cells induced by CoCl₂



注:与对照组相比, ** $P<0.01$;与 CoCl_2 组相比, ### $P<0.01$;与 $\text{Nar}+\text{CoCl}_2$ 组相比, ~ $P<0.01$ 。
图 5 Nar 对 CoCl_2 诱导下 H9c2 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Note. Compared with Control group, ** $P<0.01$. Compared with CoCl_2 group, ### $P<0.01$. Compared with $\text{Nar}+\text{CoCl}_2$ group, ~ $P<0.01$.

Figure 5 Effects of Nar on autophagy-related proteins in H9c2 cells induced by CoCl_2

对心肌细胞低氧损伤激活自噬的影响与 PI3K/Akt/mTOR 通路的关系,以 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路,检测自噬相关蛋白 LC3B、Beclin-1 和 P62 表达。与对照组比, CoCl_2 组 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 蛋白表达显著升高, P62 表达降低, Nar 预作用降低 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 蛋白表达, 增加 P62 表达。LY294002 预作用虽然逆转了 Nar 对 CoCl_2 引起 P62 表达降低的影响, 但没有逆转对 LC3II/LC3I 比值和 Beclin-1 表达的影响。表明, Nar 可抑制 CoCl_2 引起的过度自噬, 但不是完全通过 PI3K/Akt/mTOR 通路实现的, 具体机制还需要进一步研究。

3 讨论

IHD 发病率逐年上升, 尤其在老年人群中。诱发 IHD 危险因素很多, 包括高血压、糖尿病、高胆固醇血症、吸烟、过度饮酒和肥胖等^[12-13]。 CoCl_2 是目前模拟细胞低氧损伤常用化学药物之一。本研究发现, CoCl_2 导致 H9c2 心肌细胞生长抑制、核内出现明显凋亡碎片, Nar 预处理改善了细胞生长, 减少凋亡现象, 表明 Nar 对低氧损伤条件下细胞凋亡有抑制作用, 与既往研究结果一致^[9]。

当细胞缺血缺氧时, 线粒体作为快速传感器, 在自由基等作用下膜通透性增加, 线粒体内细胞色素 C 释放到细胞质中, 致使促凋亡蛋白释放和下游 Caspase 家族级联激活^[14-15]。这些蛋白水平的增加构成心肌缺血损伤的基础^[16]。本研究中, 低氧引起心肌细胞中促凋亡蛋白 Bax 上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调, Bcl-2/Bax 比降低, Cleaved-Caspase-3 蛋白表达升高, Nar 预处理有效改善了这些蛋白表达水平,

进一步说明 Nar 在心肌细胞低氧损伤中有抗凋亡作用。

为了进一步分析 Nar 对心肌细胞低氧损伤影响的机制, 首先利用网络药理学预测 Nar 治疗 IHD 的可能信号通路, 结果显示 PI3K/Akt/mTOR 是最显著富集通路之一。已有研究表明, 激活该通路可以抑制心肌缺血损伤中的凋亡和自噬过程^[11]。因此, 本研究又通过体外实验验证了网络药理学结论, 结果表明, 低氧引起细胞内 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平显著降低, Nar 预处理逆转了这一过程。但当 PI3K 抑制剂 LY294002 特异性阻断 PI3K/Akt 通路后, Nar 对 PI3K、Akt 和 mTOR 磷酸化水平的影响较低氧组明显减轻, 表明 Nar 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路缓解了心肌细胞低氧损伤, 这与 Qin 等^[17]研究结果一致。LY294002 特异性阻断 PI3K/Akt 通路后抵消了 Nar 对低氧条件下 Cleaved-Caspase-3 表达和 Bcl-2/Bax 比值的影响。表明, Nar 是通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制低氧引起细胞凋亡的。

自噬是细胞的一种生存机制, 负责去除错误折叠或错误组装的蛋白质, 并清除受损细胞器和消除细胞内病原体等^[18]。研究表明, 心肌早期缺血后自噬被激活, 以缺血预处理的方式对心脏起保护作用^[19-20]。而慢性或过度缺氧缺血激活自噬会导致细胞凋亡^[21], 引发心功能障碍, 如急性缺血性心脏损伤和心力衰竭中自噬被过度激活^[22]。本研究中, CoCl_2 激活了自噬, 引起自噬相关蛋白 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达升高, P62 表达降低, Nar 预处理后逆转了这些蛋白的表达水平。而阻断 PI3K/

Akt 通路后只抵消了 Nar 对 CoCl_2 引起的 P62 表达的影响,没有抵消对 LC3II/LC3I 比和 Beclin-1 表达的影响。说明,Nar 对 CoCl_2 引起的自噬可能是通过其他途径抑制的,而不是通过 PI3K/Akt/mTOR 通路,有待进一步研究。

综上,Nar 对 CoCl_2 诱导心肌细胞低氧损伤有保护作用,通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制凋亡实现的。凋亡的发生可能与 CoCl_2 诱导的过度自噬有关,Nar 对过度自噬起抑制作用,但 Nar 调控自噬的具体机制还不清楚。另外,本研究仅通过体外实验验证了网络药理学结果,后续还需进行体内实验验证。

参考文献:

- [1] Narula J, Pandey P, Arbustini E, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(14): 8144-8149.
- [2] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124-131.
- [3] Cadenas S, Aragonés J, Landázuri MO. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease [J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(2): 219-228.
- [4] Loos B, Genade S, Ellis B, et al. At the core of survival: autophagy delays the onset of both apoptotic and necrotic cell death in a model of ischemic cell injury [J]. Exp Cell Res, 2011, 317(10): 1437-1453.
- [5] 刘国林,刘勇,石晋丽,等. 甘松新酮的稳定性研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 360-363.
- [6] 钱薇,邹丽,王秀秀,等. 甘松新酮对 SD 大鼠心室肌细胞钠离子通道电流的影响 [J]. 当代医药论丛, 2019, 17(16): 2-5.
- [7] 简鹏,李庆海,范立华. 甘松新酮对快速性心律失常大鼠心肌细胞抑制作用的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(22): 2240-2242.
- [8] Niu C, Xiao F, Yuan K, et al. Nardosinone suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and attenuates lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 626.
- [9] 李红艳,赵思涵,梅显运,等. 甘松新酮对 H9c2 心肌细胞低氧损伤的作用及其机制 [J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2021, 53(2): 51-58.
- [10] Liu Z, Wang F, Zhou ZW, et al. Alisertib induces G_2/M arrest,

apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt/mTOR- and p38 MAPK-mediated pathways in human glioblastoma cells [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 845-873.

- [11] Zhang J, Wang C, Yu S, et al. Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. Sci Rep, 2014, 4: 7317.
- [12] GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Lancet, 2016, 388(10053): 1459-1544.
- [13] Charlson FJ, Moran AE, Freedman G, et al. The contribution of major depression to the global burden of ischemic heart disease: a comparative risk assessment [J]. BMC Med, 2013, 11:250.
- [14] Ullrich V, Schildknecht S. Sensing hypoxia by mitochondria: a unifying hypothesis involving S-nitrosation [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(2): 325-338.
- [15] Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, et al. Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis [J]. FEBS J, 2016, 283(14): 2690-2700.
- [16] Zheng C, Wu Z, Tian L, et al. Long noncoding RNA AK12348 is involved in the regulation of myocardial ischaemia-reperfusion injury by targeting PARP and Caspase-3 [J]. Heart Lung Circ, 2018, 27(5): e51-e58.
- [17] Qin L, Fan SX, Jia RB, et al. Ginsenoside Rg1 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Pharmazie, 2018, 73(6): 349-355.
- [18] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. J Pathol, 2010, 221(1): 3-12.
- [19] Yan WJ, Dong HL, Xiong LZ. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(5): 636-643.
- [20] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. Circ Res, 2007, 100(6): 914-922.
- [21] Marín-García J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2016, 21(2): 123-136.
- [22] Costa R, Morrison A, Wang J, et al. Activated protein C modulates cardiac metabolism and augments autophagy in the ischemic heart [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(9): 1736-1744.

[收稿日期] 2022-10-20

陈文培,杨威,戴锦龙,等. 2,4-二硝基氯苯诱导 BN 大鼠慢性特应性皮炎模型的建立和验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 48-54.

Chen WP, Yang W, Dai JL, et al. Establishment and evaluation of a chronic atopic dermatitis model induced by 2, 4-dinitrochlorobenzene in Brown Norway rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 48-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.007

2,4-二硝基氯苯诱导 BN 大鼠慢性特应性皮炎模型的建立和验证

陈文培^{1,2}, 杨威^{1,2}, 戴锦龙², 郭健敏^{1,2*}

(1.广州湾区生物医药研究院,广州 510990;2.广东莱恩医药研究院有限公司,广东省药物非临床评价研究企业重点实验室,广东省创新药物评价与研究工程技术研究中心,广州 510990)

【摘要】 目的 建立 2,4-二硝基氯苯诱发的 Brown Norway (BN) 大鼠特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 模型,并评估验证其在药效试验中的应用。**方法** BN 大鼠随机分为对照组、模型组、他克莫司组。分别于 1、3、7、9、12、14、16、19、21、23 和 25 d 对模型组和他克莫司组 BN 大鼠双耳涂布 0.5% 2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 溶液,每耳 40 μ L。对照组在相同时间给予等容积的基质溶液。他克莫司组在造模期间给予他克莫司软膏涂抹右耳,连续 25 d。试验期间对耳部皮肤进行炎症评分和耳厚度测定;造模 26 d 后取耳片进行称重;部分耳片组织行苏木素-伊红染色和甲基胺蓝染色,剩余耳片匀浆测定 IgE 含量。**结果** 模型组自造模 9 d 起耳厚度明显增加,12 d 出现明显的耳组织炎症症状,16~25 d 处于高峰阶段;造模 26 d,模型组耳重量明显增加,IgE 含量明显升高,耳组织呈表皮增厚、表皮内和真皮层炎细胞浸润、肥大细胞浸润等病理改变。他克莫司软膏明显改善上述指标。**结论** DNCB 诱导 BN 大鼠发展出稳定的 AD 样症状,适用于药物药效作用评价。

【关键词】 特应性皮炎;BN 大鼠;2,4 二硝基氯苯;IgE;肥大细胞

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

Establishment and evaluation of a chronic atopic dermatitis model induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in Brown Norway rats

CHEN Wenpei^{1,2}, YANG Wei^{1,2}, DAI Jinlong², GUO Jianmin^{1,2*}

(1. Guangzhou Bay Area Institute of Biomedicine, Guangzhou 510990, China. 2. Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Drug Non-Clinical Evaluation and Research, Guangdong Engineering Research Center for Innovative Drug Evaluation and Research, Guangzhou 510990)

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a chronic model of atopic dermatitis (AD) induced by 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) in Brown Norway rats. **Methods** Brown Norway rats were randomly divided into negative, model, and tacrolimus groups. The ear skin of rats in model and tacrolimus groups were challenged by 0.5% DNCB at days 1, 3, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23 and 25. Rats in the control group were administered a substrate solution at the same volume at the same time points. Rats in the tacrolimus group were transdermally administered tacrolimus ointment for 25

[基金项目] 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室 (2018B030323024); 广东省重点领域研发计划“新药创制”重点专项 (2019B020202002); 广州市基础与应用基础研究项目 (202102020984)。

[作者简介] 陈文培 (1990—), 女, 博士研究生, 研究方向: 皮肤药理学。E-mail: chenwp317@126.com

[通信作者] 郭健敏 (1987—), 女, 高级工程师, 研究方向: 药物药理毒理学。E-mail: guojianmin@lewin.com.cn

consecutive days. The inflammation score of ear skin and the thickness of ear tissue were evaluated. Ear tissues were collected and weighted after 26 days of modeling. Histopathological examination and toluidine blue staining of ear tissue were also performed. The IgE level in ear tissue was detected. **Results** The ear thickness in model rats was significantly increased after 9 days of challenge by DNCB, while whereas inflammation score was remarkably improved after 12 days and reached a peak at 16~25 days. The weight of ear tissue and the IgE level in the ear were increased at day 26 of challenge. Pathological changes, such as epidermal thickening, inflammatory cell infiltration, and mast cell infiltration, occurred in the model group. Tacrolimus significantly reversed these changes. **Conclusions** Brown Norway rats challenged by DNCB develop stable AD-like symptoms, which are appropriate for pharmacological evaluation.

[Keywords] atopic dermatitis; Brown Norway rat; 2,4-dinitrochlorobenzene; IgE; mast cell

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

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种自身免疫相关的慢性瘙痒炎症性皮肤病,可伴随疼痛、红斑状丘疹、干皮症、湿疹等症状和临床表现^[1]。AD在成人中发病率为10%,而在发达地区儿童的患病率更是高达20%^[2-3];而半数以上的患者最终会发展为其他特应性疾病,如哮喘、过敏性鼻炎等^[4]。目前AD尚无治愈手段,临床以外用药为主,包括糖皮质激素、钙调神经磷酸酶抑制剂、抗组胺药等治疗用药,以及抗生素、抗菌药等对症抗感染用药^[5];近年来,Janus 激酶抑制剂、磷酸二酯酶抑制剂-4 抑制剂、生物制品表现出较好的潜力^[6-7]。理想的动物模型是AD病理机制研究和药物药效评价的良好载体。常用的AD动物模型有转基因小鼠模型(如白介素4转基因小鼠)、自发小鼠模型(如Nc/Nga小鼠)、半抗原(卵清蛋白、2,4-二硝基甲苯、2,4-二硝基氯苯(2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB)等)诱发的小鼠模型^[8-10]。Brown Norway (BN)大鼠为近交系大鼠,具有较高的致敏性,近年来常被用于过敏^[11]、哮喘^[12]等免疫性疾病研究。应用大鼠模型考察经皮制剂的抗皮炎药效作用,在给药准确性、操作方面优于小鼠模型。本研究以BN大鼠为研究对象,建立DNCB诱发AD模型,对模型的表现指征、因子和病理改变等进行检测,并采用他克莫司软膏考察模型的适用性,为AD治疗药物开发提供合适的模型工具。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级BN大鼠共20只,雌性,8~10周龄,体重130~160 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],实验环境为广东莱恩医药研究院有限公司屏障环境动物房[SYXK(粤)2022-0146]。动物自由摄食、饮水,动物房环

境温度控制在20~26℃,相对湿度40%~70%,最小换气次数15 times/h,12 h/12 h光照/黑暗交替。本试验设计实施经广东莱恩医药研究院有限公司实验动物伦理研究委员会审核通过(IA-PD2021010-01)。按照实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

0.1%他克莫司软膏(Astellas Pharma Inc.,批号057040);2,4-二硝基氯苯(DNCB,西亚化学科技(山东)有限公司,批号WJ6J6);丙酮(广州化学试剂厂,批号2021020109);橄榄油(佳格投资(中国)有限公司,批号2021BZ20191212);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号21022101);IgE ELISA试剂盒(Reagent Genie Ireland Ltd.,批号R1074G064);肥大细胞染色液(甲苯胺蓝法)(北京雷根生物技术有限公司,批号0607A21)。

电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);螺旋测微仪(三丰精密量仪(上海)有限公司);VMR型麻醉机(Midmark Corporation);酶标分析仪(BioTek Instruments, Inc.);生物显微镜(Leica Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与造模

将BN大鼠按体重随机分为3组,分别为对照组、模型组、他克莫司组。对照组4例动物,模型组和他克莫司组8例动物。分组当天记为D0。模型组和他克莫司组动物于D1、D3、D7、D9、D12、D14、D16、D19、D21、D23和D25,双耳均匀涂抹0.5% DNCB溶液(丙酮:橄榄油=3:1)40 μL;对照组动物双耳均匀涂抹丙酮-橄榄油溶剂40 μL。造模期间大鼠佩戴伊丽莎白圈。

1.3.2 给药

首次造模当天开始,对他克莫司组动物右耳经皮涂抹他克莫司软膏每耳30 mg,每天1次,连续给

药 25 d。给药 6 h 后以生理盐水轻轻拭擦除去药物。每天给药后至除药前,大鼠佩戴伊丽莎白圈。对照组和模型组大鼠双耳、他克莫司组左耳不做处理。

1.3.3 耳部炎症症状评分

每次造模约 6 h 后,对造模耳进行炎症症状评分。评分由干燥/脱屑,出血/红疹,溃烂/表皮脱落,水肿症状综合评定。每个症状评分标准如下:无症状计 0 分,轻度(症状存在,需仔细辨别观察方可看到)计 1 分,中度(症状可立即看到)计 2 分,重度(症状非常明显)计 3 分。最终评分为 4 种症状评分之和,总分值为 0~12 分。

1.3.4 耳厚度测量

首次造模前、每次造模约 6 h 后,测量耳厚度。

1.3.5 耳重量测定

末次造模次日,对动物实施异氟烷吸入麻醉后腹主动脉放血安乐死,裁取对照组双耳、模型组和他克莫司组右耳近似部位约 8 mm 的圆片,进行称重。

1.3.6 耳组织 IgE 测定

取部分耳圆片,以 9 倍磷酸盐缓冲液进行匀浆,2000 r/min 下离心 10 min,取上清液。以酶联免疫吸附法测定 IgE 含量。

1.3.7 耳组织病理学检查

取部分耳圆片组织置于 10%福尔马林中固定,经常规脱水、石蜡包埋、切片后,常规苏木素-伊红染色和甲苯胺蓝染色后,光学显微镜下观察皮肤组织增厚、基底细胞变性坏死、炎细胞和肥大细胞浸润等病理改变。病理改变程度根据下述级别进行判定:正常,未观察到组织学改变或组织结构基本正常;轻微,病理损伤范围零星可见,不构成区域性;轻度,灶性、多灶性或散在分布的损伤,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 1/3~1 个视野;中度,损伤在组织中占主导地位,灶性、多灶性或散在分

布的损伤,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 1~3 个视野;重度,损伤在组织中占绝对优势,灶性、多灶性或散在分布的损伤,这些损伤范围在 100 倍镜下可见 3 个视野以上。

1.4 统计学方法

数据采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。对数据先采用 F-test 进行组间方差齐性分析,方差齐同时,组间比较采用 Student-T 检验,组间方差不齐时,采用校正的 Student-T 检验进行统计分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠耳部炎症症状观察和评分

造模 12 d 后,模型组大鼠右耳和左耳耳部皮肤出现红肿、脱屑、出血等炎症症状,症状评分值显著提高($P<0.01$),16 d 分值达到最高,直至 25 d 均维持在高水平,见图 1。给药 12~25 d,与模型组相比,他克莫司组大鼠给药右耳耳部炎症症状评分值显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),非给药左耳耳部炎症症状评分值亦明显降低($P<0.05$)。

2.2 大鼠耳厚度变化

与对照组相比,造模 1 d 开始,模型组动物左耳和右耳逐渐增厚;造模 9~25 d,模型组大鼠左耳和右耳呈显著性增厚($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见图 2。给药 9~25 d,他克莫司组大鼠给药右耳增厚程度明显低于模型组右耳($P<0.05$),非给药左耳增厚程度呈现低于模型组左耳的作用及趋势。

2.3 大鼠耳重量变化

与对照组相比,模型组大鼠左耳和右耳片重量均明显增加($P<0.05$);与模型组相比,他克莫司组大鼠给药右耳重量显著减小($P<0.01$),非给药左耳重量亦显著减小($P<0.05$),见表 1。

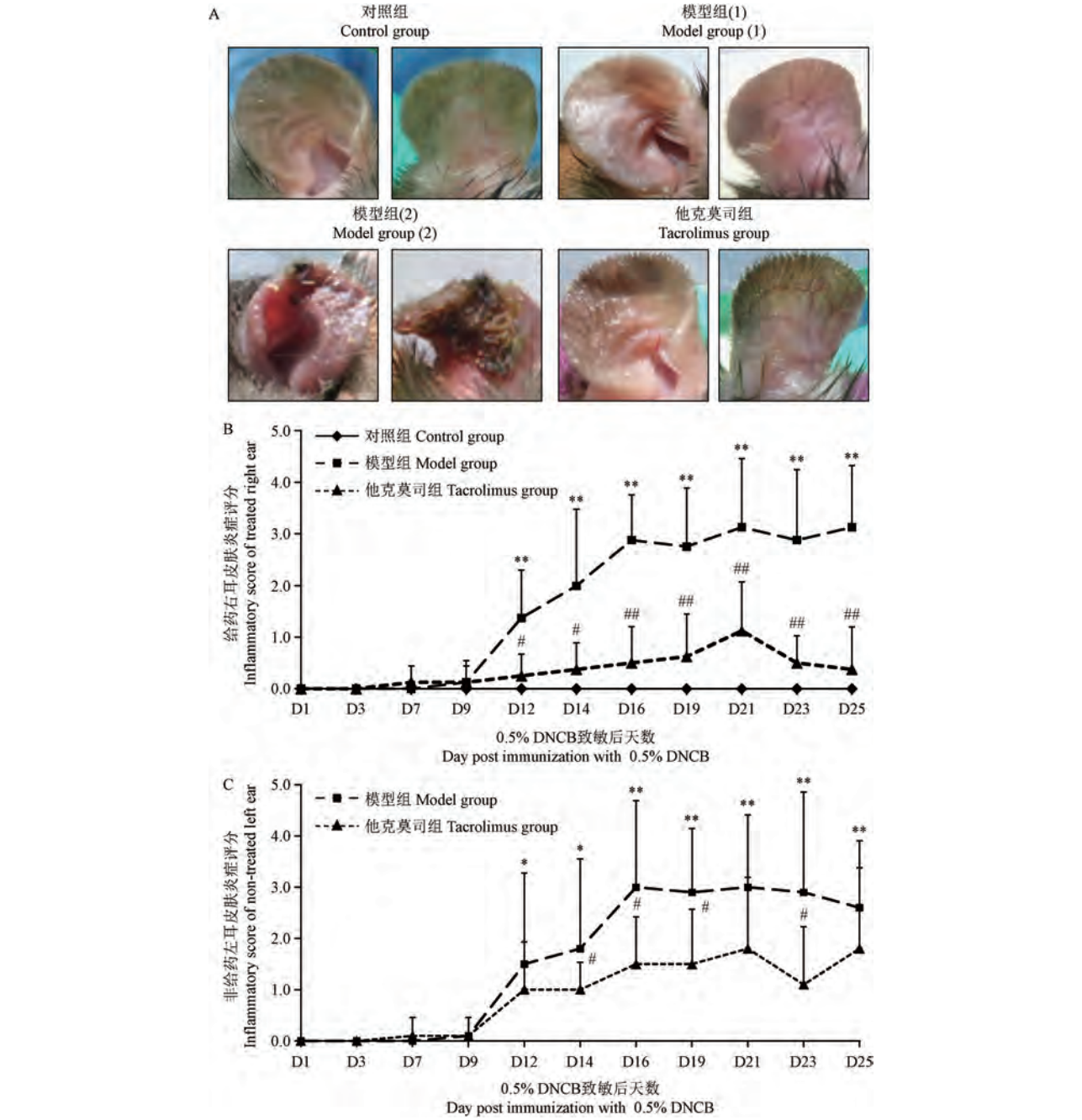
2.4 大鼠耳组织 IgE 变化

与对照组(58.33 ± 11.49 ng/g 组织)相比,模型

表 1 DNCB 诱导 BN 大鼠耳重量变化($n=8$)
Table 1 Ear weight in rats induced by DNCB

组别 Groups	给药右耳重量(g) Treated right ear weight	非给药左耳重量(g) Non-treated left ear weight
对照组 Control group	0.0275±0.0027	/
模型组 Model group	0.0350±0.0063 [*]	0.0336±0.0058 [*]
他克莫司组 Tacrolimus group	0.0261±0.0018 ^{##}	0.0276±0.0034 [#]

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.



注:A:造模第 25 天耳部图;B:大鼠右耳组织炎症评分;C:大鼠左耳组织炎症评分。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组同侧耳相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 1 DNCB 诱导大鼠耳组织炎症反应评分($n=8$)

Note. A, Ear image after 25 d after stimulation with DNCB. B, Inflammatory score of right ear in rats. C, Inflammatory score of left ear in rats. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the same side of model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

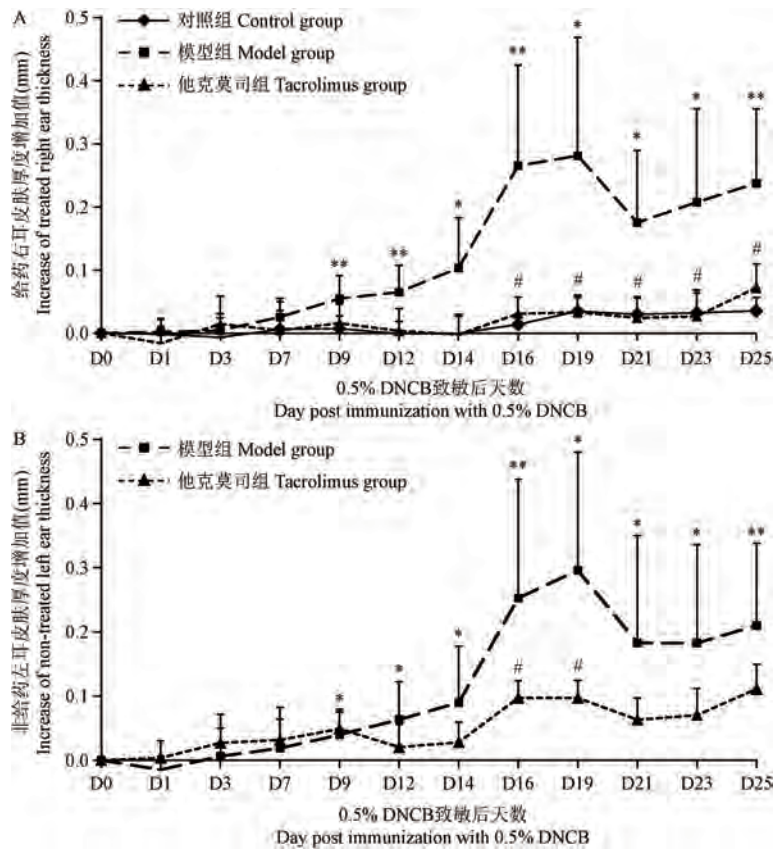
Figure 1 Inflammatory reaction of ear in rats induced by DNCB

组大鼠右耳 IgE 含量明显增加(113.07 ± 64.43 ng/g 组织, $P<0.05$);与模型组右耳相比,他克莫司组大鼠给药右耳 IgE 含量明显减少(49.33 ± 20.99 ng/g 组织, $P<0.05$)。

2.5 大鼠耳部组织病理学改变

组织病理学结果见图 3 和表 2。对照组耳部皮

肤各层结构清晰完整,表皮无增厚,真皮层散在性个别肥大细胞(箭头指示);模型组右耳组织皮肤角化过度 and/或不全、颗粒层增厚、基底细胞变性坏死、细胞内水肿,伴随真皮层大量的炎细胞浸润,肥大细胞明显浸润;他克莫司组右耳皮肤各层结构完整,表皮无增厚,真皮层散在性个别肥大细胞。



注:A:大鼠右耳组织增厚图;B:大鼠左耳组织增厚图。与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组同侧耳相比, # $P<0.05$ 。

图2 DNCB 诱导大鼠耳组织增厚($n=8$)

Note. A, Increased thickness of right ear in rats. B, Increased thickness of left ear in rats. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the same side of model group, # $P<0.05$.

Figure 2 Increased thickness of ear in rats induced by DNCB

表2 大鼠耳部皮肤病理学改变

Table 2 Pathological changes of ear in rats

组别 Groups	病变程度 Lesion degree	表皮增厚 Epidermal thickening	基底细胞变性坏死 Basal cell necrosis	炎细胞浸润 Inflammatory cell infiltration	肥大细胞浸润 Mast cell infiltration
对照组 Control group	-	8	8	8	0
	±	0	0	0	8
	+	0	0	0	0
	++	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0
模型组 Model group	-	0	0	0	0
	±	0	0	0	1
	+	4	1	2	7
	++	4	7	6	0
	+++	0	0	0	0
他克莫司组 Tacrolimus group	-	8	8	8	0
	±	0	0	0	8
	+	0	0	0	0
	++	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0

注:-、±、+、++、+++分别表示正常、轻微、轻度、中度和重度。

Note. -, ±, +, ++, +++ were represented as normal, slight, mild, moderate and sever degree, respectively.

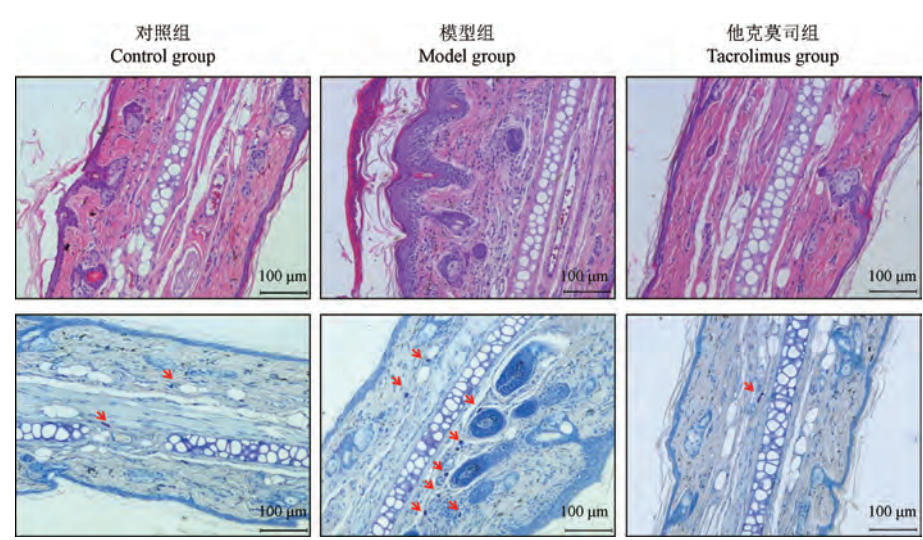


图 3 大鼠耳组织病理学变化(HE 染色, 甲基胺蓝染色)

Figure 3 Pathological changes of ears in rats (HE staining, toluidine blue staining)

3 讨论

AD 是一种遗传性的慢性、复发性、炎性皮肤病,发病机理目前尚未完全阐明,多数认为 AD 是 Th1/Th2 细胞亚群失衡导致的免疫性疾病。AD 的发生发展经历三个阶段^[13]:前期时,未破损皮肤表皮屏障缺陷,微生物多样性降低;急性期时,IgE 介导的效应与 Th2 型炎症并行,加剧表皮屏障功能障碍,皮肤出现瘙痒、红疹、水疱,甚至溃烂、结痂等表现;在向慢性 AD 转化时,优势 Th1 型细胞分泌 IFN- γ 、IL-1 等抑制 Th2 型炎症反应,形成瘙痒/抓挠的恶性循环,从而导致皮肤增厚。有研究表明,BN 大鼠对 Th2 优势的实验性自身免疫性疾病,如氯化汞、青霉素诱导的自身免疫性疾病易感。BN 大鼠经青霉素刺激后,Th2 细胞特征因子 IL-4、IL-6、IL-10 明显升高和 Th1 细胞特征因子 IFN- γ 、IL-1 升高^[14]。由此可推测,BN 大鼠具有 AD 发病的免疫学基础。

DNCB 为常用的化学半抗原性致敏原,常被用于制备免疫性模型。对于 AD 模型,众多研究采用的是经小鼠背部涂抹 DNCB 致敏后再于耳部涂抹 DNCB 激发,经皮给药部位为致敏背部,实际操作中会存在以下问题:(1)毛发是小动物皮肤疾病模型建立和炎症评分的障碍,尤其对于慢性皮肤疾病模型,目前的脱毛剂如脱毛膏、硫化钠溶液等脱毛效果不佳且维持时间短;(2)背部皮肤致敏导致破损后,容易受到饲养微环境的影响,需考虑采用玉米芯等少尘少屑的垫料,尽量减少环境对皮肤炎症反应的影响;(3)皮肤疾病药物多采用局部给药途径,毛发影响了药量准确性。基于上述问题,本研究以

DNCB 为诱导剂,考察对 BN 大鼠耳部涂抹刺激诱导产生皮肤 AD 样反应的可行性。

本研究在造模期间,通过对皮肤炎症症状进行评分,并且测量耳部相近部位的厚度,综合评估模型的发展;于末期时,通过耳肿胀和组织病理学检查,评估模型的病变程度。模型组大鼠耳部皮肤自造模 12 d 起出现明显的干燥、脱屑、红疹、溃烂、水肿等炎症反应,造模 16 d 时,炎症反应达到峰值。模型组大鼠造模耳于造模后 9 d 起明显增厚,于造模后 16 d 厚度达到最大。模型组大鼠耳组织炎症反应和耳厚度在造模 16~25 d 均维持在高水平。末期,模型组耳肿胀明显,耳部组织皮肤出现表皮增厚、基底细胞变性坏死、细胞内水肿,伴随真皮层大量的炎细胞浸润等 AD 样病理学改变。此外,模型组大鼠 IgE 水平明显升高,且皮肤组织增厚和炎细胞浸润程度与 IgE 水平呈现正相关性。上述研究结果显示,DNCB 能诱导 BN 大鼠出现 AD 样反应。

他克莫司软膏临床应用于成人及儿童 AD,均有较明显的疗效^[15-16]。本研究以他克莫司软膏评估所建立的 AD 模型用于药效研究的适用性。本研究表明,他克莫司干预后大鼠造模耳组织炎症反应、耳厚度、耳重量、IgE 水平、耳组织结构基本改善至恢复正常水平。本研究他克莫司组动物同时造模和给药,药物效应与已有文献报道相当^[17-18],表明他克莫司能明显改善 DNCB 诱导的 BN 大鼠 AD 样改变。该结果也表明 DNCB 诱导 BN 大鼠 AD 模型适用于评价 AD 治疗性药物的疗效,于造模后 16~25 d 内进行评价较为稳定。

目前常用的制备 AD 模型的方法是对小鼠应用

0.5%~1%的 DNCB 经背部皮肤大面积致敏后经耳激发。小鼠激发耳皮肤炎症症状以及耳厚度随着激发次数增多而逐渐加重(评分 8 分以上,耳增厚 0.2~0.6 mm,耳重量增加约 5 倍);耳部皮肤呈现角化过度伴角化不全,上皮层明显增厚,真皮层嗜酸性粒细胞、淋巴细胞、肥大细胞等炎细胞浸润;血清 IgE 显著增加^[19-21]。该模型倾向于发展为中重度 AD 样改变。本研究 BN 大鼠应用 0.5% DNCB 经耳部皮肤致敏和激发,耳部皮肤呈现角化过度和不全、颗粒层增厚、伴随真皮层大量的炎细胞浸润和肥大细胞明显浸润,与小鼠模型病理改变类型相似;耳皮肤炎症症状以及耳厚度也是随着激发次数增多而逐渐加重(评分约 3 分,耳增厚约 0.3 mm);组织 IgE 明显增加。本研究大鼠模型更倾向于发展中等程度 AD 样改变。此外,本模型在建模和药物评价中具有以下优势:改善动物的整体情况,能减少动物出现非造模直接因素,如垫料粉尘导致的皮肤损伤感染,降低动物的疼痛级别,满足 3R 原则中的“优化”原则;采用大鼠模型考察经皮给药制剂药效作用时,直接对造模耳给药,不仅避免毛发的干扰,而且给药后短时间内能使用伊丽莎白圈辅助防止大鼠抓挠给药部位,均能保证给药剂量的相对准确性。综上所述,DNCB 能诱导 BN 大鼠出现 AD 样改变,该模型适用于评价中等程度 AD 治疗药物的药效作用,尤其是经皮给药制剂。

参考文献:

- [1] 苏峰,鲁胜男,李庆,等. 新型特应性皮炎治疗药物的临床研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(5): 937-943.
- [2] Silverberg JI, Barbarot S, Gadkari A, et al. Atopic dermatitis in the pediatric population: a cross-sectional, international epidemiologic study[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2021, 126(4): 417-428.
- [3] Laughter MR, Maymone MBC, Mashayekhi S, et al. The global burden of atopic dermatitis: lessons from the Global Burden of Disease Study 1990-2017[J]. Br J Dermatol, 2021, 184(2): 304-309.
- [4] 曾路婷,黄义杰,孙广臣. 特应性皮炎动物模型与免疫学机制及中药治疗的研究进展[J]. 中南药学, 2019, 17(5): 696-700.
- [5] 周淑英,弓月,张晨曦,等. 特应性皮炎临床合理用药[J]. 人民军医, 2021, 64(5): 468-470.
- [6] Zhang L, Du D, Wang L, et al. Efficacy and safety of topical Janus kinase and phosphodiesterase inhibitor-4 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis: a network meta-analysis[J]. J Dermatol, 2021, 48(12): 1877-1883.
- [7] 冯佩英. 生物制剂治疗特应性皮炎和特应性共病的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2022, 43(1): 1-9.
- [8] 郭亚南,文海泉. DNCB 致敏/激发 Nc/Nga 小鼠特应性皮炎模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(5): 12-14, 84.
- [9] Hwang DH, Koh PO, Kang C, et al. Rosa *davurica* Pall. improves DNCB-induced atopic dermatitis in mice and regulated TNF- α /IFN- γ -induced skin inflammatory responses in HaCaT cells[J]. Phytomedicine, 2021, 91: 153708.
- [10] Yamanishi Y, Mogi K, Takahashi K, et al. Skin-infiltrating basophils promote atopic dermatitis-like inflammation via IL-4 production in mice[J]. Allergy, 2020, 75(10): 2613-2622.
- [11] 陈如程,李娜,樊柏林,等. BN 大鼠致敏动物模型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 14-17.
- [12] 楚慧伦,孔德明,丁子桐,等. Brown-Norway 大鼠咳嗽变异性哮喘模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 63-66.
- [13] Fania L, Moretta G, Antonelli F, et al. Multiple roles for cytokines in atopic dermatitis: from pathogenic mediators to endotype-specific biomarkers to therapeutic targets[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2684.
- [14] Huang Y, Lin Z, Huo Y, et al. Procainamide-induced autoimmunity: relationship to T-helper 2-type T-cell activation[J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(6): 647-662.
- [15] 魏明辉,余碧娥,陈连军,等. 他克莫司软膏治疗儿童与成人特应性皮炎的随机双盲对照临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(1): 11-14.
- [16] 凌诗琪,宗文凯. 他克莫司软膏在皮肤科的主要临床应用[J]. 中国皮肤性病杂志, 2018, 32(8): 950-954.
- [17] 刘丹,焦泽龙,赵梓纲,等. 他克莫司对慢性湿疹小鼠的治疗作用[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(2): 157-160.
- [18] Kumar P, Sharma DK, Ashawat MS. Topical creams of piperine loaded lipid nanocarriers for management of atopic dermatitis: development, characterization, and *in vivo* investigation using BALB/c mice model[J]. J Liposome Res, 2022, 32(1): 62-73.
- [19] 王欣欣,李思佳,关洪全,等. DNCB 对 BALB/c 小鼠特应性皮炎的诱导作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(3): 439-443, 669.
- [20] Kim KM, Kim SY, Mony TJ, et al. *Moringa concanensis* L. alleviates DNCB-induced atopic dermatitis-like symptoms by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β in BALB/c mice[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(10): 1217.
- [21] Jiang X, Lan Y, Wei B, et al. External application of NF- κ B inhibitor DHMEQ suppresses development of atopic dermatitis-like lesions induced with DNCB/OX in BALB/c mice[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2017, 39(3): 157-164.

[收稿日期]2022-10-01

邓玉,魏丕喜,任双双,等. miR-486-5p 靶向调节 PTEN 对子宫内膜癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 55-66.

Deng Y, Wei PX, Ren SS, et al. Influence of miR-486-5p on the malignant behavior of endometrial cancer cells by targeting PTEN [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 55-66.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.008

miR-486-5p 靶向调节 PTEN 对子宫内膜癌细胞恶性生物学行为的影响

邓 玉¹,魏丕喜¹,任双双¹,吕桂雪²,魏雯雯^{2*}

(1.山东第一医科大学附属人民医院病理科,济南 271199;2.济南市第二妇幼保健院妇产科,济南 271100)

【摘要】 目的 探究 miR-486-5p 对子宫内膜癌 (EC) 细胞恶性生物学行为的影响及对 PTEN 的靶向调节作用。**方法** qRT-PCR 检测 EC 组织和细胞中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平,分析 EC 组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达与患者临床特征的相关性。双荧光素酶报告基因实验验证 miR-486-5p 与 PTEN 的靶向关系。Ishikawa 细胞分为 NC 组、NC inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor+si-NC 组、miR-486-5p inhibitor+si-PTEN 组,Western blot 检测细胞中 PTEN 蛋白及 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达,CCK-8 检测细胞活力,集落形成实验检测细胞集落形成能力,流式细胞术检测细胞凋亡情况,划痕愈合实验、Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力。**结果** EC 组织和细胞中 miR-486-5p 高表达,而 PTEN mRNA 低表达 ($P<0.05$)。EC 组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达均与患者肿瘤大小、分化程度、国际妇产科联盟 (FIGO) 分期、淋巴结转移有关 ($P<0.05$)。经验证,Ishikawa 细胞中 miR-486-5p 可能负靶向调节 PTEN 表达。与 NC 组、NC inhibitor 组比较,miR-486-5p inhibitor 组 Ishikawa 细胞的 48 h、72 h 细胞活力、划痕愈合率及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值降低 ($P<0.05$),集落形成数、迁移细胞数和侵袭细胞数减少 ($P<0.05$),凋亡率升高 ($P<0.05$);与 miR-486-5p inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较,miR-486-5p inhibitor+si-PTEN 组 Ishikawa 细胞的 48 h、72 h 细胞活力、划痕愈合率及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值升高 ($P<0.05$),集落形成数、迁移细胞数和侵袭细胞数增加 ($P<0.05$),凋亡率降低 ($P<0.05$)。**结论** 抑制 miR-486-5p 可能通过负靶向调节 PTEN 抑制 PI3K/AKT 通路活化,进而抑制 EC 细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导其凋亡。

【关键词】 miR-486-5p;PTEN;PI3K/AKT 通路;增殖;凋亡;迁移;侵袭;子宫内膜癌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0055-12

Influence of miR-486-5p on the malignant behavior of endometrial cancer cells by targeting PTEN

DENG Yu¹, WEI Pixi¹, REN Shuangshuang¹, LYU Guixue², WEI Wenwen^{2*}

(1. Department of Pathology, People's Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 271199, China.
2. Jinan Second Maternal and Child Health Hospital, Obstetrics and Gynecology, Jinan 271100)

【基金项目】山东省医药卫生科技发展计划项目 (202105010536)。

【作者简介】邓玉 (1973—),女,副主任医师,研究方向:妇科病理。E-mail: lwsyydy@163.com

【通信作者】魏雯雯 (1985—),女,硕士,副主任医师,研究方向:妇产科。E-mail: weiwenwen1029@163.com

[Abstract] Objective To explore the influence of *miR-486-5p* on the malignant behavior of endometrial cancer (EC) cells and its targeted regulation of *PTEN*. **Methods** The expression *miR-486-5p* and *PTEN* mRNA in EC tissues and cells was detected by qRT-PCR. The correlation between *miR-486-5p* and *PTEN* mRNA expression in EC tissues and the clinical characteristics of patients were analyzed. A dual luciferase reporter assay was performed to verify the relationship between *miR-486-5p* and *PTEN*. Ishikawa cells were separated into NC, NC inhibitor, *miR-486-5p* inhibitor, *miR-486-5p* inhibitor+si-NC, and *miR-486-5p* inhibitor+si-*PTEN* groups. Western blot was performed to detect expression of *PTEN* and PI3K/AKT pathway-related proteins in cells. CCK-8 assays were performed to assess cell viability. Colony formation assays were used to examine the ability of cells to form colonies. Flow cytometry was performed to assess apoptosis, Scratch healing and transwell assays were applied to assess cell migration and invasion. **Results** The *miR-486-5p* was highly expressed in EC tissues and cells, while *PTEN* mRNA was expressed at a low level ($P<0.05$). *miR-486-5p* and *PTEN* mRNA expression in EC tissues was related to the tumor size, differentiation degree, International Federation of Gynecology and Obstetrics stage, and lymph node metastasis ($P<0.05$). *miR-486-5p* in Ishikawa cells might negatively target and regulate *PTEN* expression. Compared with NC and NC inhibitor groups, cell viability at 48 and 72 h, scratch healing rate, and ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT of Ishikawa cells in the *miR-486-5p* inhibitor group were decreased ($P<0.05$), the number of colonies formed and the numbers of migrating and invasive cells were decreased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was increased ($P<0.05$). Compared with *miR-486-5p* inhibitor and *miR-486-5p* inhibitor+si-NC groups, cell viability at 48 and 72 h, scratch healing rate, and ratios of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT of Ishikawa cells in the *miR-486-5p* inhibitor+si-*PTEN* group were increased ($P<0.05$), the number of colonies formed and the numbers of migrating and invasive cells were increased ($P<0.05$), and the apoptosis rate was decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Inhibition of *miR-486-5p* may suppress activation of the PI3K/AKT pathway by negatively targeting *PTEN*, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of EC cells and inducing their apoptosis.

[Keywords] *miR-486-5p*; *PTEN*; PI3K/AKT pathway; proliferation; apoptosis; migration; invasion; endometrial cancer

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

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是最常见的妇科恶性肿瘤之一,占女性生殖道恶性肿瘤的25%左右,近年来发病率仍居高不下,且呈年轻化趋势,给女性的生命健康安全带来极大威胁^[1]。虽然部分EC患者的病灶局限于子宫内,肿瘤生长和转移速度相对较慢,5年生存率可达70%左右,但是对于一些类型特殊、恶性程度高且易复发转移的患者,常规治疗效果尚不理想,预后较差^[2]。因此,探究EC细胞增殖和转移相关分子调控机制并寻找高效的分子靶标,对有效治疗EC和改善其预后具有一定实用价值。研究指出,子宫内膜样EC约占新诊断病例的85%,且PTEN失活是其主要驱动因素^[3]。此外,研究发现EC组织中PTEN呈低表达,且PTEN mRNA的3'非编码区可与miR-19特异性结合,进而调控PI3K/AKT通路影响EC细胞的迁移和侵袭^[4]。生物信息学分析显示,PTEN mRNA的3'非编码区与miR-1297、miR-26b-5p、miR-486-5p等多个miRNA存在结合位点。且研究显示,miR-486-5p在宫颈癌患者的血清和组织中显著过表达,miR-486-5p可通过抑制PTEN表达和激活致癌通路

PI3K/AKT来刺激宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭^[5]。但miR-486-5p在EC中的生物学功能及对PTEN的靶向调节作用尚不明确。因此,本研究通过观察miR-486-5p对EC细胞恶性生物学行为的影响以及PTEN在此过程中的作用,旨在阐明miR-486-5p在EC中的作用及其可能的机制,从而为EC发病机制研究及分子靶向治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织标本

收集2020年10月~2021年10月手术切除治疗(术前均未进行任何形式抗肿瘤治疗)的60例EC患者的EC组织和对应的癌旁组织标本(距离肿瘤边缘>3 cm),患者年龄40~70岁,中位年龄53岁。所有组织标本均经病理检查证实,且标本收集获得患者或其家属知情同意,同时得到了山东第一医科大学附属人民医院医学伦理委员会的批准(IACUC-ZY-LL20210618)。另外,收集整理所有EC患者临床病例资料,其中年龄≥53岁31例、<53岁

29 例,肿瘤大小 ≥ 5 cm 19 例、 < 5 cm 41 例,肿瘤高/中分化 36 例、低分化 24 例,国际妇产科联盟(international federation of gynecology and obstetrics, FIGO)分期 I ~ II 期 39 例、III ~ IV 期 21 例,绝经 33 例;淋巴结转移 19 例,宫颈受累 20 例,人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)感染 39 例。

1.1.2 细胞

人正常子宫内膜上皮细胞(原代细胞,XY-XB-3191)及人 EC 细胞 KLE (XY-XB-2964)、Ishikawa (XY-XB-2285)、HEC-1B (XY-XB-1702)、RL95-2 (XY-XB-3056)来源于美国 ATCC 细胞库,人 EC 细胞 JEC (WN-14957)来源于中国武汉华纳细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

miR-486-5p 模拟物(miR-486-5p mimic)和阴性对照(NC mimic)、miR-486-5p 抑制物(miR-486-5p inhibitor)和阴性对照(NC inhibitor)、PTEN 小干扰 RNA (si-PTEN)和阴性对照 (si-NC)由上海吉玛基因公司合成;萤火虫-海肾双荧光素酶报告基因活性化学发光法定量检测试剂盒(YIJI20144.1,上海一基实业有限公司);cDNA 第一链合成试剂盒(C-8020,上海彩佑实业有限公司);miScript SYBR Green PCR 试剂盒(218076,德国 QIAGEN 公司);SYBR Green qPCR Master Mix (HY-K0501A,美国 MCE 公司);CCK-8 试剂(CK04,日本同仁化学公司);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(WK304,北京百奥莱博公司);Matrigel 基质胶(354234,美国 Corning 公司);兔抗人 PTEN (ab170941)、PI3K (ab191606)、p-PI3K (phospho Y607, ab182651)、AKT (ab179463)、p-AKT (phospho S472 + S473 + S474, ab192623)、GAPDH (ab181602)抗体及 HRP 标记的山羊抗兔 IgG H&L(ab6721)(英国 Abcam 公司)。qRT-PCR 仪(CFX96 Touch)、酶标仪(680)(美国 Bio-Rad 公司);生物显微镜(CX33,日本 Olympus 公司);凝胶成像分析仪(Tanon 3500,上海天能公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

人正常子宫内膜上皮细胞(原代细胞)及人 EC 细胞 KLE、Ishikawa、HEC-1B、RL95-2、JEC 添加含 10%胎牛血清(FBS)和双抗的 DMEM 培养基,随后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合度达到 80%左右时消化传代,并选取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.2 qRT-PCR 检测组织和细胞中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平

TRIzol 试剂提取组织标本和细胞中总 RNA,进行其纯度和浓度检测后参照 cDNA 第一链合成试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,接下来以 cDNA 为模板,配制 qRT-PCR 反应体系,并于 qRT-PCR 仪上进行扩增,获取循环阈值(Ct)。qRT-PCR 反应体系 20 μ L:cDNA 2 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物(各基因引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,设计依据为引物长度 18~25 bp、扩增产物长度 100~300 bp、退火温度 60℃左右、GC 含量 45%~65%,具体序列见表 1,由上海吉玛制药技术有限公司合成)各 1 μ L,SYBR Green Mix 8 μ L,无菌 ddH₂O 8 μ L。扩增程序:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,40 个循环。miR-486-5p 以 U6 为内参基因,PTEN 以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法(其中 Δ Ct=目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值,- $\Delta\Delta$ Ct=对照组 Δ Ct 平均值-各样品 Δ Ct 值)计算 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平。

1.3.3 双荧光素酶报告基因实验

生物信息学(TargetScanHuman 和 starbase 在线网站)预测 miR-486-5p 与 PTEN mRNA 3'非编码区的潜在结合位点。由上海吉玛制药技术有限公司合成含 PTEN 3' UTR 序列片段的野生型(WT-PTEN)和含 PTEN 3' UTR 突变片段的突变型(MUT-PTEN)报告基因质粒。将 WT-PTEN 和 MUT-PTEN 报告基因质粒分别和 miR-486-5p mimic 或 NC

表 1 qRT-PCR 所用基因引物序列
Table 1 Gene primer sequence for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	
miR-486-5p	F: TGTACTGAGCTGCCCCGAG	R: CTCAACTGCTGTCGTGGAGTC
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACAT	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
PTEN	F: ATTCCCAGTCAGAGGCGCTAT	R: GAACTTGTCTTCCCGTCGTGT
GAPDH	F: CCTGCCGTCTAGAAAAACCTG	R: AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT

mimic 共转染 Ishikawa 细胞,转染 24 h 后,参照萤火虫-海肾双荧光素酶报告基因活性化学发光法定量检测试剂盒制造商的说明测定细胞相对荧光素酶活性。

1.3.4 细胞分组与转染

Ishikawa 细胞分为 NC 组、NC inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor + si-NC 组、miR-486-5p inhibitor + si-PTEN 组。其中 NC 组细胞不进行任何处理; NC inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor 组细胞使用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂在细胞融合度达 70% 以上时转染 NC inhibitor 或 miR-486-5p inhibitor; miR-486-5p inhibitor + si-NC 组、miR-486-5p inhibitor + si-PTEN 组细胞使用 Lipofectamine™ 3000 转染试剂将 miR-486-5p inhibitor 与 si-NC 或 si-PTEN 共转染。每组设置 6 个复孔,培养 48 h 后,收集各组细胞,qRT-PCR 检测细胞中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平(具体检测步骤参照 1.3.2),Western blot 检测细胞中 PTEN 蛋白表达水平。

1.3.5 Western blot 检测细胞中 PTEN 蛋白及 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达

收集转染后的各组 Ishikawa 细胞,添加细胞裂解液于冰上裂解 30 min,离心分离上清液(即细胞中总蛋白),BCA 法定量蛋白浓度。每泳道上样 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 90 min 后加入一抗(兔抗人 PTEN、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、GAPDH 抗体,分别以 1:2000、1:1000、1:800、1:1000、1:10 000、1:10 000 稀释)4℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次后加入二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG H&L,以 1:5000 稀释)室温孵育 60 min,PBS 洗涤后化学发光试剂显色,凝胶成像分析系统扫描图像,分析各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参蛋白。

1.3.6 CCK-8 检测细胞活力

转染后的各组 Ishikawa 细胞制备成 2×10^4 /mL 细胞悬液,以每孔 100 μ L 添加到 96 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h 后每孔添加 10 μ L CCK-8 试剂,再继续培养 2 h,弃去培养上清液后每孔加入 150 μ L DMSO 溶液,并于摇床上低速振荡 15 min,最后采用酶标仪测定各孔细胞在 450 nm 波长处的吸光度(OD₄₅₀)值,以此表示细胞活力。

1.3.7 集落形成实验检测细胞集落形成能力

转染后的各组 Ishikawa 细胞制备成 400/mL 细胞悬液,以每孔 2 mL 接种到 6 孔板中,静置培养 2 周后,当出现肉眼可见的克隆时,终止培养,甲醇固定、结晶紫染色,洗去染色液,在显微镜下计数细胞个数 ≥ 50 个的单克隆集落,即集落形成数。

1.3.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况

收集转染后的各组 Ishikawa 细胞,用 PBS 重悬细胞制备成 5×10^4 /mL 的细胞悬液,取 2 mL 细胞悬液转移至新的 EP 管中,离心后弃去上清液,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,再依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L PI 染色液室温避光孵育 10 min,最后于流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.9 划痕愈合实验检测细胞迁移能力

转染后的各组 Ishikawa 细胞使用无血清培养基重悬(2.5×10^4 /mL)后接种到 6 孔板(每孔 2 mL)中,当细胞融合度达到 85% 以上时,使用无菌的 200 μ L 枪头垂直于底部均匀划出一道划痕,PBS 洗涤 3 次后使用显微镜观察划痕并拍照(0 h 划痕宽度),继续培养 48 h 后再次观察细胞划痕情况并拍照(48 h 划痕宽度),根据 0 h、48 h 划痕宽度(Image J 软件测量)计算划痕愈合率(表示细胞迁移能力),划痕愈合率(%) = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.3.10 Transwell 实验检测细胞迁移、侵袭能力

转染后的各组 Ishikawa 细胞使用无血清培养基重悬(5×10^5 /mL)后添加 200 μ L 细胞悬液到 Transwell 上室(细胞侵袭能力检测时 Transwell 上室提前包被有 Matrigel 胶),添加 600 μ L 含 10% FBS 的完全培养基到下室,培养 48 h 后取出 Transwell 小室,PBS 洗涤后擦除上室滤膜表面细胞,甲醛固定、0.1%结晶紫染色后使用显微镜观察穿膜细胞的染色情况,并随机选择 6 个视野进行拍照和计数,即迁移或侵袭细胞数,结果取平均值,以此表示细胞迁移或侵袭能力。

1.4 统计学方法

采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件统计分析本实验数据。计量数据均符合正态分布,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较采用 t 检验(两组间)、单因素方差分析(One-way ANOVA)(多组间)或 SNK- q 检验(任意两两组间);计数资料以例数(百分比),即 $[n(\%)]$ 表示,组间差异比较采用卡方(χ^2)检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EC 组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平及其与患者临床特征的相关性

qRT-PCR 检测结果显示,与癌旁组织比较,EC 组织中 miR-486-5p 表达水平上调 ($P<0.05$),而 PTEN mRNA 表达水平下调 ($P<0.05$),见表 2。见表 3 所示,分别以 EC 组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平平均值为界限,区分 miR-486-5p 高表达

表 2 EC 组织和癌旁组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=60$)

Table 2 miR-486-5p and PTEN mRNA expression levels in EC tissues and adjacent tissues

组织 Tissues	miR-486-5p	PTEN mRNA
癌旁组织 Paracancerous tissues	1.01±0.13	0.99±0.11
EC 组织 EC tissues	1.54±0.17	0.48±0.09
<i>t</i>	19.183	27.795
<i>P</i>	<0.001	<0.001

表 3 EC 组织中 miR-486-5p、PTEN mRNA 表达水平与患者临床特征的相关性 (%)

Table 3 Correlation between miR-486-5p, PTEN mRNA expression levels in EC tissues and clinical characteristics of patients

临床特征 Clinical characteristics	<i>n</i>	miR-486-5p		χ^2	<i>P</i>	PTEN mRNA		χ^2	<i>P</i>
		高表达 High expression (<i>n</i> = 32)	低表达 Low expression (<i>n</i> = 28)			高表达 High expression (<i>n</i> = 27)	低表达 Low expression (<i>n</i> = 33)		
年龄(年) Age(year)				0.076	0.782			2.347	0.126
≥53	31	16(51.61)	15(48.39)			11(35.48)	20(64.52)		
<53	29	16(55.17)	13(44.83)			16(55.17)	13(44.83)		
更年期 Menopause				1.829	0.176			0.197	0.657
No	27	17(62.96)	10(37.04)			13(48.15)	14(51.85)		
Yes	33	15(45.45)	18(54.55)			14(42.42)	19(57.58)		
肿瘤大小(cm) Tumor size(cm)				4.627	0.031			9.586	0.002
<5	41	18(43.90)	23(56.10)			24(58.54)	17(41.46)		
≥5	19	14(73.68)	5(26.32)			3(15.79)	16(84.21)		
分化程度 Differentiation degree				4.922	0.027			6.465	0.011
高/中 High/ middle	36	15(41.67)	21(58.33)			21(58.33)	15(41.67)		
低 Low	24	17(70.83)	7(29.17)			6(25.00)	18(75.00)		
FIGO 分期 FIGO stage				6.782	0.009			8.792	0.003
I ~ II	39	16(41.03)	23(58.97)			23(58.97)	16(41.03)		
III ~ IV	21	16(76.19)	5(23.81)			4(19.05)	17(80.95)		
淋巴结转移 Lymph node metastasis				7.329	0.007			3.922	0.048
无 No	41	17(41.46)	24(58.54)			22(53.66)	19(46.34)		
有 Yes	19	15(78.95)	4(21.05)			5(26.32)	14(73.68)		
子宫颈受累 Cervical involvement				3.348	0.067			1.212	0.271
无 No	40	18(45.00)	22(55.00)			20(50.00)	20(50.00)		
有 Yes	20	14(70.00)	6(30.00)			7(35.00)	13(65.00)		
HPV 感染 HPV infection				0.424	0.515			3.730	0.053
无 No	21	10(47.62)	11(52.38)			13(64.71)	8(38.10)		
有 Yes	39	22(56.41)	17(43.59)			14(58.82)	25(64.10)		

(≥ 1.54) 和低表达 (< 1.54)、*PTEN* mRNA 高表达 (≥ 0.48) 和低表达 (< 0.48), 进一步卡方检验分析显示, EC 组织中 *miR-486-5p*、*PTEN* mRNA 表达均与患者肿瘤大小、分化程度、FIGO 分期、淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 而与年龄、绝经状态、宫颈受累、HPV 感染无关 ($P > 0.05$)。

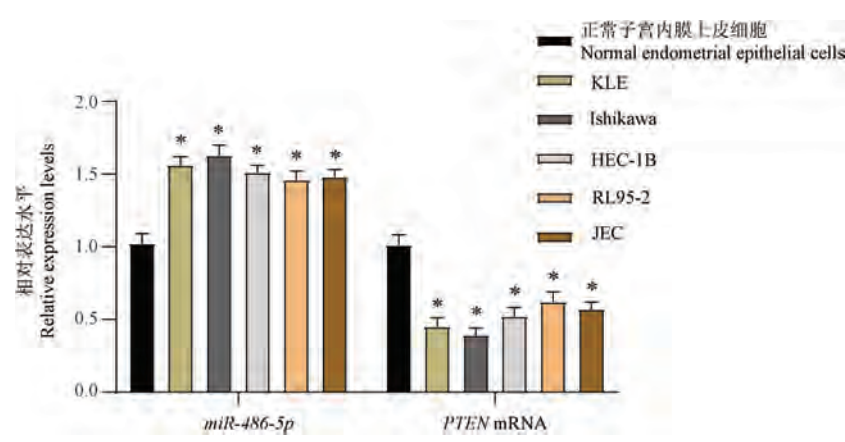
2.2 EC 细胞中 *miR-486-5p*、*PTEN* mRNA 表达水平

qRT-PCR 检测结果显示, 与人正常子宫内膜上皮细胞比较, 人 EC 细胞 (KLE、Ishikawa、HEC-1B、RL95-2、JEC) 中 *miR-486-5p* 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 *PTEN* mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 其中 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p* 表达水平最高, 见图

1。因此, 后续实验中选用 Ishikawa 细胞。

2.3 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p* 与 *PTEN* 的靶向关系

TargetScanHuman (https://www.targetscan.org/vert_72/) 和 starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 在线网站预测发现, *miR-486-5p* 在 *PTEN* mRNA 的 3' 非编码区上存在靶向结合位点, 见图 2A、2B。进一步通过双荧光素酶报告基因实验验证, 结果显示, 与 WT-*PTEN* 和 NC mimic 共转染 Ishikawa 细胞比较, WT-*PTEN* 和 *miR-486-5p* mimic 共转染 Ishikawa 细胞的相对荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$); 而与 MUT-*PTEN* 和 NC mimic 共转染 Ishikawa 细胞比较, MUT-*PTEN* 和 *miR-486-5p*

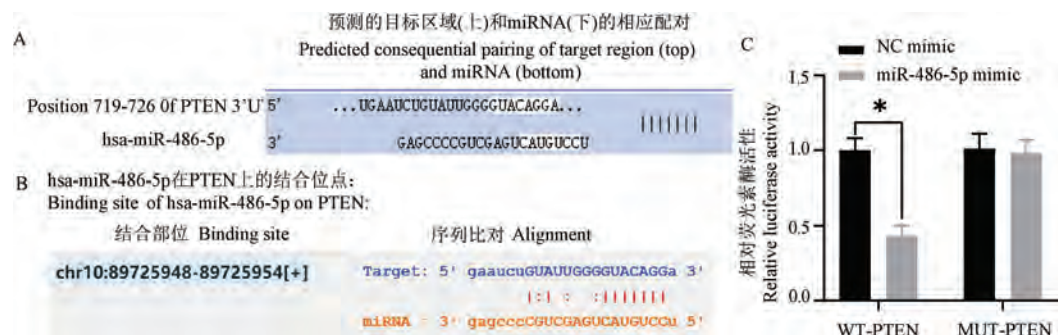


注: 与正常子宫内膜上皮细胞比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 EC 细胞和正常子宫内膜上皮细胞中 *miR-486-5p*、*PTEN* mRNA 表达水平 ($n = 6$)

Note. Compared with normal endometrial epithelial cells, * $P < 0.05$.

Figure 1 *miR-486-5p* and *PTEN* mRNA expression levels in EC cells and normal endometrial epithelial cells



注: A、B: TargetScanHuman, starbase 在线网站预测 *miR-486-5p* 与 *PTEN* 的潜在结合位点; C: 双荧光素酶报告基因实验验证 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p* 与 *PTEN* 的靶向关系 ($n = 6$)。与 NC mimic 组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 *miR-486-5p* 与 *PTEN* 的靶向关系

Note. A/B, Potential binding sites of *miR-486-5p* and *PTEN* were predicted by targetscanhuman and Starbase online websites. C, Dual luciferase reporter gene experiment verified the targeting relationship between *miR-486-5p* and *PTEN* in Ishikawa cells ($n = 6$). Compared with NC mimic group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Targeting relationship between *miR-486-5p* and *PTEN*

mimic 共转染 Ishikawa 细胞的相对荧光素酶活性无显著差异 ($P>0.05$), 见图 2C。此外, 构建 *miR-486-5p* 低表达的 Ishikawa 细胞并在此基础上抑制 *PTEN* 表达进行回复实验, qRT-PCR 和 Western blot 检测结果显示, 与 NC 组、NC inhibitor 组比较, *miR-486-5p* inhibitor 组 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p* 表达水平降低 ($P<0.05$), 而 *PTEN* mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P<0.05$); 与 *miR-486-5p* inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组比较, *miR-486-5p* inhibitor+si-PTEN 组细胞中 *miR-486-5p* 表达水平无显著差异 ($P>0.05$), *PTEN* mRNA 和蛋白表达水平降低 ($P<0.05$); NC 组与 NC inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor 组与 *miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p*、*PTEN* mRNA 和蛋白表达水平均无显著差异 ($P>0.05$), 见图 3。以上结果表明, Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p* 可能负靶向调节 *PTEN* 表达。

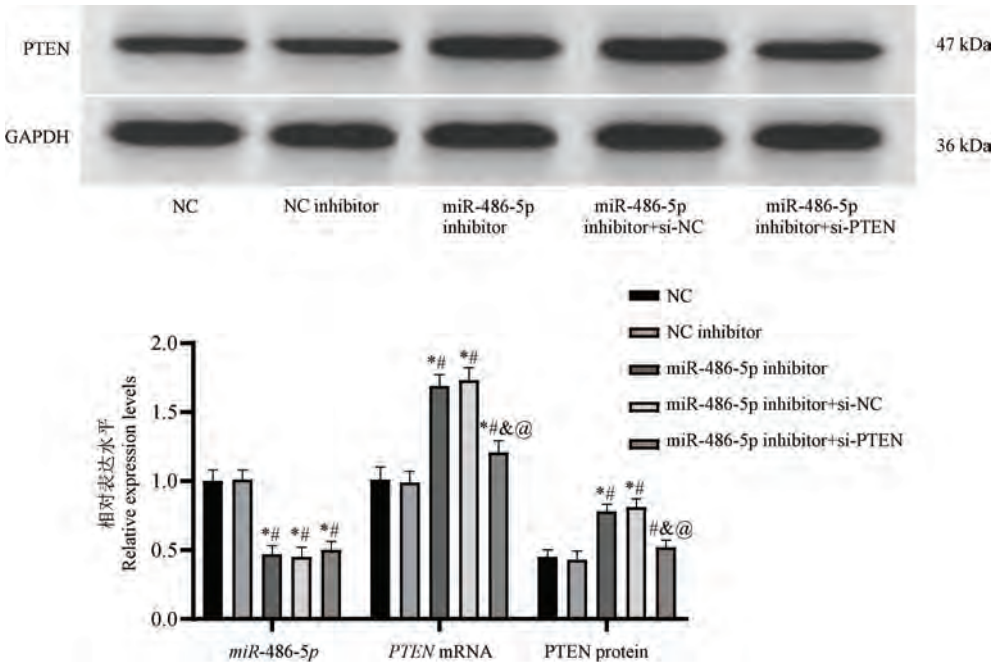
2.4 各组 Ishikawa 细胞增殖、凋亡情况

与 NC 组、NC inhibitor 组比较, *miR-486-5p* inhibitor 组 Ishikawa 细胞的 48 h、72 h 细胞活力降低

($P<0.05$), 集落形成数减少 ($P<0.05$), 凋亡率升高 ($P<0.05$); 与 *miR-486-5p* inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组比较, *miR-486-5p* inhibitor+si-PTEN 组 Ishikawa 细胞的 48 h、72 h 细胞活力升高 ($P<0.05$), 集落形成数增多 ($P<0.05$), 凋亡率降低 ($P<0.05$); NC 组与 NC inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor 组与 *miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组 Ishikawa 细胞的细胞活力、集落形成数和凋亡率无显著差异 ($P>0.05$), 见图 4~图 6。

2.5 各组 Ishikawa 细胞迁移、侵袭情况

与 NC 组、NC inhibitor 组比较, *miR-486-5p* inhibitor 组 Ishikawa 细胞划痕愈合率降低 ($P<0.05$), 迁移细胞数和侵袭细胞数减少 ($P<0.05$); 与 *miR-486-5p* inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组比较, *miR-486-5p* inhibitor+si-PTEN 组 Ishikawa 细胞划痕愈合率升高 ($P<0.05$), 迁移细胞数和侵袭细胞数增加 ($P<0.05$); NC 组与 NC inhibitor 组、*miR-486-5p* inhibitor 组与 *miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组划痕愈合率、迁移细胞数和侵袭细胞数无显著差异 ($P>0.05$), 见图 7、图 8。

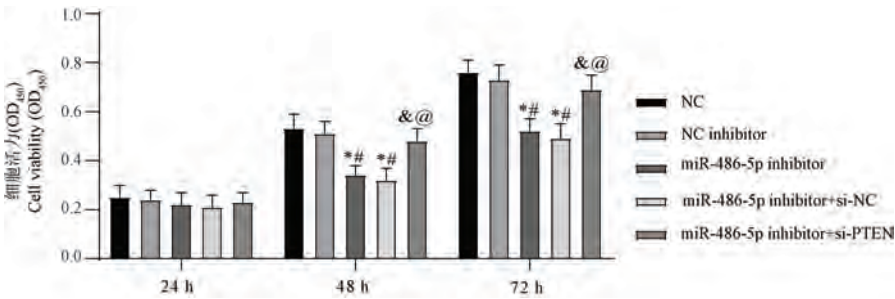


注:A:Western blot 检测 Ishikawa 细胞中 PTEN 蛋白表达;B:定量分析 *miR-486-5p*、*PTEN* mRNA 和蛋白表达水平 ($n=6$)。与 NC 组比较, $^*P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, $^{\#}P<0.05$;与 *miR-486-5p* inhibitor 组比较, $^{\&}P<0.05$;与 *miR-486-5p* inhibitor+si-NC 组比较, $^{\textcircled{a}}P<0.05$ 。

图 3 抑制 *miR-486-5p* 或 *PTEN* 表达对 Ishikawa 细胞中 *miR-486-5p*、*PTEN* 表达的影响

Note. A, PTEN protein expression in Ishikawa cells detected by Western blot. B, Quantitative analysis of *miR-486-5p*, *PTEN* mRNA and protein expression levels ($n=6$). Compared with NC group, $^*P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, $^{\#}P<0.05$. Compared with *miR-486-5p* inhibitor group, $^{\&}P<0.05$. Compared with *miR-486-5p* inhibitor+si-NC group, $^{\textcircled{a}}P<0.05$.

Figure 3 Effect of inhibiting *miR-486-5p* or *PTEN* expression on *miR-486-5p* and *PTEN* expression in Ishikawa cells

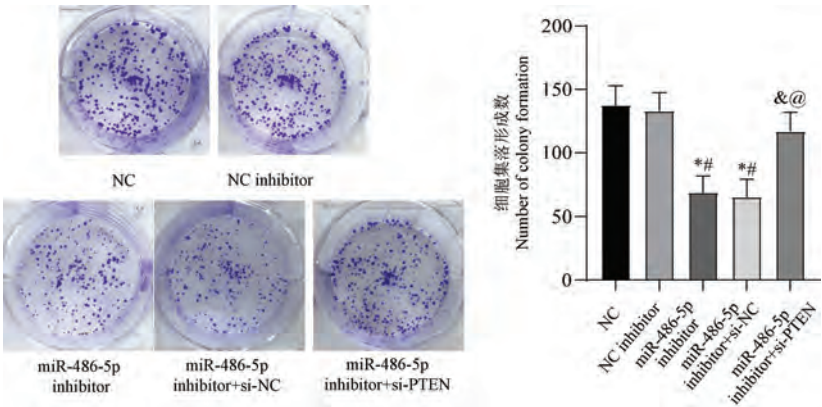


注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, # $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, & $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, @ $P<0.05$ 。

图 4 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞活力的影响 ($n=6$)

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, # $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, & $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor + si-NC group, @ $P<0.05$.

Figure 4 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on Ishikawa cell viability

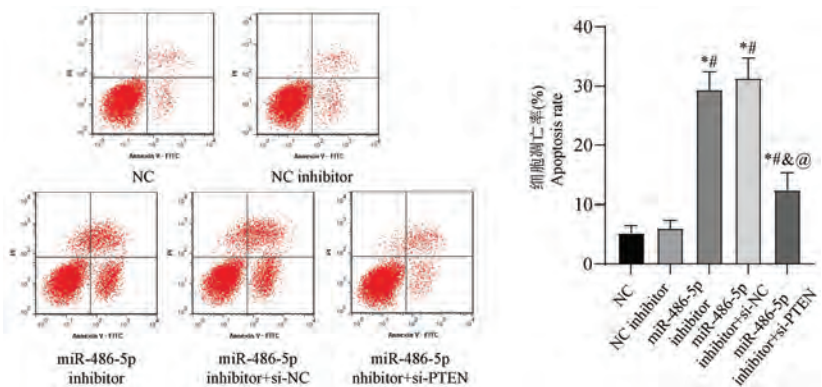


注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, # $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, & $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, @ $P<0.05$ 。

图 5 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞集落形成能力的影响 (集落形成实验, $n=6$)

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, # $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, & $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor + si-NC group, @ $P<0.05$.

Figure 5 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on colony forming ability of Ishikawa cells (Colony forming test, $n=6$)

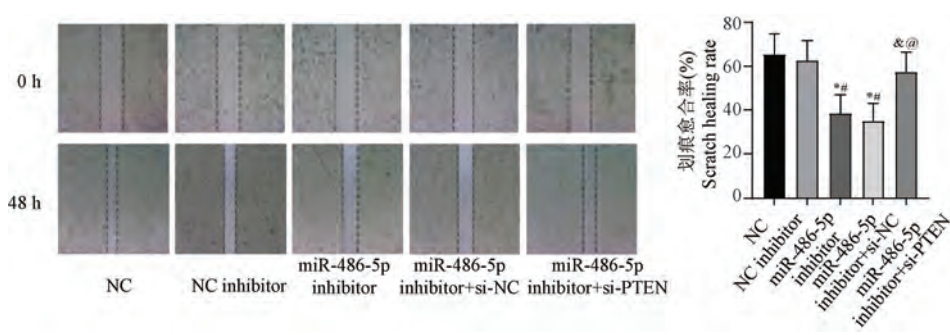


注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, # $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, & $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, @ $P<0.05$ 。

图 6 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞凋亡的影响 (流式细胞术, $n=6$)

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, # $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, & $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor + si-NC group, @ $P<0.05$.

Figure 6 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on Ishikawa cells apoptosis (Flow cytometry, $n=6$)

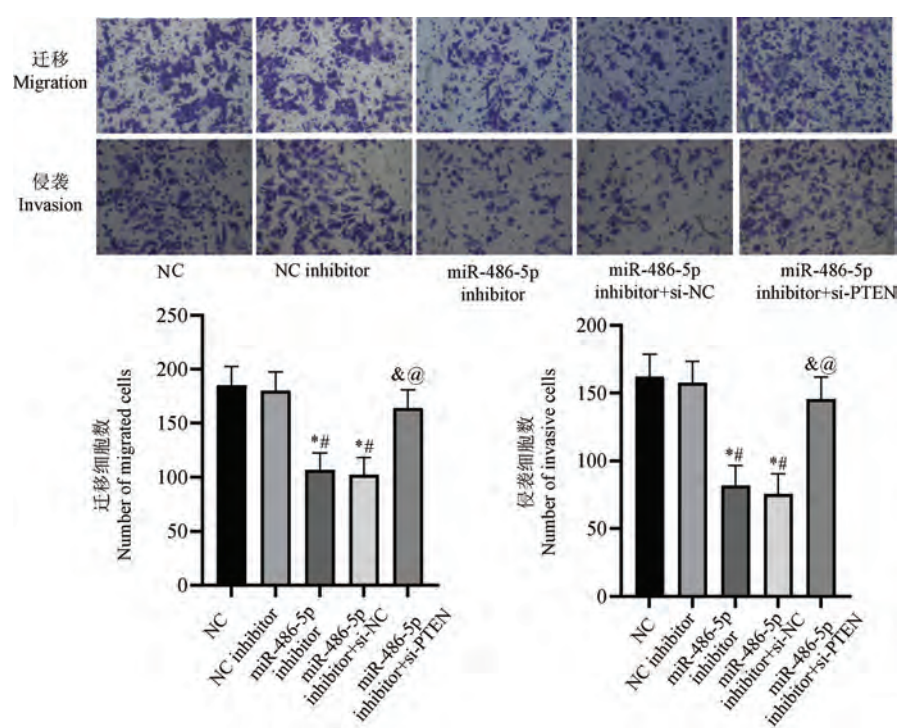


注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, [#] $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, [&] $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, [@] $P<0.05$ 。

图 7 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞迁移的影响(划痕愈合实验, $n=6$)

Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, [#] $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, [&] $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor+si-NC group, [@] $P<0.05$.

Figure 7 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on Ishikawa cell migration (Scratch healing experiment, $n=6$)



注:与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, [#] $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, [&] $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, [@] $P<0.05$ 。

图 8 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞迁移、侵袭的影响(Transwell 实验, $n=6$)

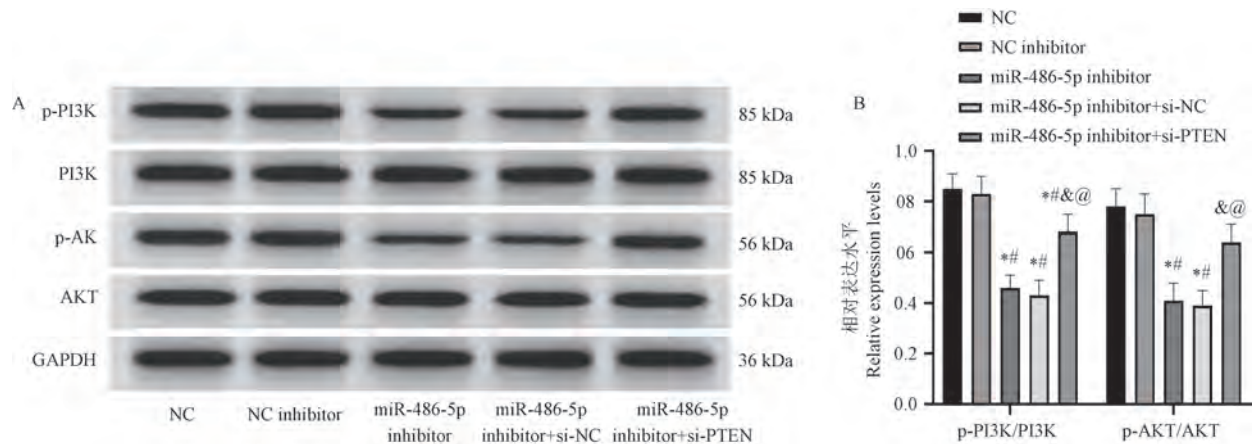
Note. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, [#] $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, [&] $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor+si-NC group, [@] $P<0.05$.

Figure 8 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on migration and invasion of Ishikawa cells (Transwell test, $n=6$)

2.6 各组 Ishikawa 细胞中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达情况

与 NC 组、NC inhibitor 组比较, miR-486-5p inhibitor 组 Ishikawa 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值降低 ($P<0.05$);与 miR-486-5p inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, miR-486-5p

inhibitor+si-PTEN 组 Ishikawa 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值升高 ($P<0.05$); NC 组与 NC inhibitor 组、miR-486-5p inhibitor 组与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组 Ishikawa 细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值无显著差异 ($P>0.05$),详细结果见图 9。



注:A:Western blot 检测 Ishikawa 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 蛋白表达;B:定量分析 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT($n=6$)。与 NC 组比较, * $P<0.05$;与 NC inhibitor 组比较, # $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor 组比较, & $P<0.05$;与 miR-486-5p inhibitor+si-NC 组比较, @ $P<0.05$ 。

图 9 抑制 miR-486-5p 或 PTEN 表达对 Ishikawa 细胞中 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响

Note. A, p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT protein expression in Ishikawa cells detected by Western blot. B, Quantitative analysis of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT ($n=6$). Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with NC inhibitor group, # $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor group, & $P<0.05$. Compared with miR-486-5p inhibitor +si-NC group, @ $P<0.05$.

Figure 9 Effect of inhibiting miR-486-5p or PTEN expression on PI3K/AKT pathway related protein expression in Ishikawa cells

3 讨论

PTEN 是一种普遍表达的肿瘤抑制因子,通常在人类散发性癌症中失活,其功能的部分丧失可对肿瘤发生和进展产生巨大影响,且 *PTEN* 基因主要在胶质母细胞瘤、EC 和前列腺癌等几种肿瘤类型中显示点突变^[6]。李宇恒等^[7]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在人子宫内膜腺癌细胞中成功敲除 *PTEN*,并发现 *PTEN* 敲除的细胞自噬水平受到抑制,细胞活性增强。本研究发现,*PTEN* mRNA 在 EC 组织和细胞中呈低表达,与代丽丽等^[4]研究结果一致,且 EC 组织中 *PTEN* mRNA 表达均与患者肿瘤大小、分化程度、FIGO 分期、淋巴结转移表现出一定相关性,表明 *PTEN* 可能作为抑癌基因在 EC 中发挥作用。多项研究已经证实,*PTEN* 可被 miRNA 靶向调节参与调控肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭等多个恶性生物学行为^[8-10]。基于此,笔者推测 *PTEN* 可受某些 miRNA 调节影响 EC 细胞增殖和转移等过程。

miRNA 是由 21~24 个核苷酸组成的非编码小 RNA 分子,已被证明对 EC 的发生发展至关重要^[11-12]。TargetScanHuman 和 starbase 在线网站预测发现 *miR-486-5p* 在 *PTEN* mRNA 的 3' 非编码区上存在靶向结合位点。此外,研究显示,*miR-486-5p* 通过靶向 *PTEN* 在非小细胞肺癌中发挥癌基因的作用^[13]。

下调 *miR-486-5p* 通过上调 *PTEN* 水平显著增强 5-Fu 在胰腺癌细胞 PANC-1 中的抗肿瘤作用^[14]。因此,本研究探究了 *miR-486-5p* 在 EC 中的表达和作用机制,结果显示,*miR-486-5p* 在 EC 组织和细胞中呈高表达,且 EC 组织中 *miR-486-5p* 表达均与患者肿瘤大小、分化程度、FIGO 分期、淋巴结转移有关,提示 *miR-486-5p* 亦可能作为癌基因影响 EC 细胞恶性生物学行为,并参与病情进展。Kong 等^[15]研究表明 *miR-486-5p* 在胰腺癌中发挥致癌作用。但 Wei 等^[16]研究发现 *miR-486-5p* 是胃癌中的肿瘤抑制因子,其可抑制胃癌细胞周期过程和迁移并促进细胞凋亡。以上研究表明,*miR-486-5p* 是发挥癌基因还是抑癌基因作用,可能与肿瘤异质性有关。此外,赵竞等^[17]研究指出 EC 组织中 *miR-486-5p* 表达下降,并与浸润深度、组织类型及预后密切相关,本研究结果与其并不一致,这可能与所选病例个体差异、地区、样本量小等因素有关,有待后续通过大样本、多中心研究进一步验证。进一步通过转染 *miR-486-5p* inhibitor 抑制 *miR-486-5p* 表达发现,*miR-486-5p* 表达水平降低后,Ishikawa 细胞的细胞活力、划痕愈合率降低,集落形成数、迁移细胞数和侵袭细胞数减少,但凋亡率升高,提示抑制 *miR-486-5p* 表达可降低 EC 细胞增殖、迁移和侵袭能力,同时促进细胞凋亡。

在本研究中,经双荧光素酶报告基因实验、

qRT-PCR 和 Western blot 验证显示, miR-486-5p mimic 可降低转染 WT-PTEN 的 Ishikawa 细胞相对荧光素酶活性,而对转染 MUT-PTEN 的 Ishikawa 细胞相对荧光素酶活性无显著影响;Ishikawa 细胞中 miR-486-5p 表达水平降低的同时,PTEN mRNA 和蛋白表达水平升高,且抑制 PTEN 表达对 miR-486-5p 表达水平无显著影响。以上结果表明,Ishikawa 细胞中 miR-486-5p 可能负靶向调节 PTEN 表达。此外,抑制 miR-486-5p 表达的基础上抑制 PTEN 表达进行回复实验观察 Ishikawa 细胞的恶性生物学行为变化情况,结果显示,抑制 PTEN 表达可部分减弱抑制 miR-486-5p 表达对 EC 细胞增殖、迁移和侵袭能力的降低作用和对细胞凋亡的促进作用。进一步表明,抑制 miR-486-5p 可能通过负靶向调节 PTEN 抑制 EC 细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导其凋亡。PI3K/AKT 通路是 PTEN 的下游通路,主要受 PTEN 负调控,在 EC 中发挥肿瘤促进作用^[4,18-20]。本研究结果显示,抑制 miR-486-5p 表达后,Ishikawa 细胞中 PI3K、AKT 磷酸化蛋白水平降低,且抑制 miR-486-5p 表达的基础上抑制 PTEN 表达后,Ishikawa 细胞中 PI3K、AKT 磷酸化蛋白水平升高,提示抑制 miR-486-5p 通过负靶向调节 PTEN 抑制 EC 细胞增殖、迁移和侵袭并诱导其凋亡,亦可能与 PI3K/AKT 通路活化受抑制有关。

综上所述,抑制 miR-486-5p 可能通过负靶向调节 PTEN 抑制 PI3K/AKT 通路活化,进而抑制 EC 细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导其凋亡。本研究首次证明了 miR-486-5p 在 EC 中的生物学功能及可能的作用机制,为 EC 靶向治疗提供了新的分子靶标。但是本研究提供的证据可能还尚不够充分,后续仍需大样本、多中心的临床研究及多个 EC 细胞系、miR-486-5p 和 PTEN 的多个方向干预进行更全面的验证,同时在动物模型中验证 EC 细胞的增殖及转移行为变化。

参考文献:

- [1] Makker V, Mackay H, Ray-Coquard I, et al. Endometrial cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 88.
- [2] Crosbie EJ, Kiston SJ, Mcalpine JN, et al. Endometrial cancer [J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428.
- [3] Bell DW, Ellenson LH. Molecular genetics of endometrial carcinoma [J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14: 339-367.
- [4] 代丽丽,陈丽娜,蔡丽娜,等. miR-19 通过靶向 PTEN 调节 PI3K-Akt 通路促进子宫内膜癌 KLE 细胞的侵袭和迁移 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(11): 1107-1112.

- [5] Li C, Zheng X, Li W, et al. Serum miR-486-5p as a diagnostic marker in cervical cancer: with investigation of potential mechanisms [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 61.
- [6] Álvarez-García V, Tawil Y, Wise HM, et al. Mechanisms of PTEN loss in cancer: it's all about diversity [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 66-79.
- [7] 李宇恒,邓诚思,关爱伟,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术建立 PTEN 敲除的人子宫内膜腺癌细胞模型及其功能研究 [J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(7): 582-585.
- [8] Aboushousha T, El-Nahas EI, El-Hindawi A, et al. Implication of miRNA-153 on PTEN expression in prostatic adenocarcinoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(22): 6834-6843.
- [9] Wu W, Chen L, Chen C, et al. miRNA-425-5p enhances diffuse large B cell lymphoma growth by targeting PTEN [J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(11): 4905-4913.
- [10] Sato K, Miyamoto M, Takano M, et al. microRNA-21 expression in cancer cells is an independent biomarker of progression-free survival of endometrioid endometrial carcinoma [J]. Virchows Arch, 2021, 479(5): 883-891.
- [11] Ghazala RA, El-Attar EA, Abouzeid ZS. Circulating miRNA 27a and miRNA150-5p; a noninvasive approach to endometrial carcinoma [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(5): 4351-4360.
- [12] Fang Q, Sang L, Du S. Long noncoding RNA LINC00261 regulates endometrial carcinoma progression by modulating miRNA/FOXO1 expression [J]. Cell Biochem Funct, 2018, 36(6): 323-330.
- [13] Gao ZJ, Yuan WD, Yuan JQ, et al. miR-486-5p functions as an oncogene by targeting PTEN in non-small cell lung cancer [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(5): 700-705.
- [14] Wang W, Liu B, Sun S, et al. Downregulation of miR-486-5p enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on pancreatic cancer cells [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 1649-1659.
- [15] Kong Y, Li Y, Luo Y, et al. circNFIB1 inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via the miR-486-5p/PIK3R1/VEGF-C axis in pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 82.
- [16] Wei W, Liu C, Yao R, et al. miR-486-5p suppresses gastric cancer cell growth and migration through downregulation of fibroblast growth factor 9 [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(5): 771.
- [17] 赵竞,韩秀青. 微小 RNA-486-5p 在子宫内膜癌诊治中的临床价值研究 [J]. 中国性科学, 2022, 31(6): 78-82.
- [18] Liu Y, Cai X, Cai Y, et al. lncRNA OIP₅-AS1 suppresses cell proliferation and invasion of endometrial cancer by regulating PTEN/AKT via sponging miR-200c-3p [J]. J Immunol Res, 2021, 2021: 4861749.
- [19] Zhuang L, Qu H, Cong J, et al. miR-181c affects estrogen-dependent endometrial carcinoma cell growth by targeting PTEN [J]. Endocr J, 2019, 66(6): 523-533.

[20] Wang C, Su K, Zhang Y, et al. IR-A/IGF-1R-mediated signals promote epithelial-mesenchymal transition of endometrial carcinoma cells by activating PI3K/AKT and ERK pathways [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(3): 295–306.

[收稿日期]2022-11-07

抗凋亡蛋白 BCL-XL 作为胃癌治疗靶点的可行性研究

我国是胃癌的高发大国,其中进展期胃癌具有治疗效果差、治疗方案少且复发率高的特点。因此寻找新的治疗靶点有助于改善进展期胃癌患者的预后。凋亡逃逸是肿瘤细胞的主要标志之一,通过靶向促存活 BCL2 家族蛋白直接诱导细胞凋亡是一种很有前途的癌症治疗策略。因此,了解支持癌细胞存活的分子机制可以为潜在的靶向治疗提供分子基础。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所肿瘤课题组的研究人员首先报道了 BCL2L1 基因和其编码的促存活蛋白 BCL-XL 在胃癌中的作用以及 BCL-XL 靶向药物作用于胃癌的可行性。结果显示,部分胃癌细胞系的存活依赖于 BCL-XL 且 BCL-XL 抑制剂 A1155463、A1331852 药物活性显著高 ABT-263,说明 ABT-263 不是 BCL-XL 的最佳抑制剂;基于 VHL 的 PROTAC-BCL-XL DT2216 在胃癌细胞中具有药物活性且 DT2216 通过蛋白酶体途径以时间和剂量依赖的方式降解 BCL-XL 诱导胃癌细胞凋亡;BCL-XL 蛋白水平可以有效预测胃癌细胞对 BCL-XL 抑制剂的药物敏感性;BCL2L1 基因拷贝数变异不能可靠地预测 BCL-XL 的表达。

综上,该研究发现 BCL-XL 有可能是胃癌治疗的潜在靶点,尤其是在 BCL-XL 高表达的胃癌亚群中。同时该研究发现选择性 BCL-XL 抑制剂和基于 VHL 的 PROTAC BCL-XL 都能有效地杀死依赖于 BCL-XL 的胃癌细胞。此外,该研究发现 BCL2L1 拷贝数变异(CNV)不能可靠地预测 BCL-XL 的表达,但是 BCL-XL 蛋白水平可以作为预测胃癌细胞对 BCL-XL 抑制剂敏感性的有效的生物标志物。综上所述,该研究证明了 BCL-XL 是特定胃癌亚群的潜在药物靶点。

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):245–254, <http://doi.org/10.1002/ame2.12330>)。

蒋莉萍,王霞,彭心华. miR-34a-5p 通过靶向 IMP3、PD-L1 对乳腺癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 67-77.

Jiang LP, Wang X, Peng XH. Effect of miR-34a-5p on biological behavior of breast cancer cells by targeting insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 and programmed death ligand-1 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 67-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.009

miR-34a-5p 通过靶向 IMP3、PD-L1 对乳腺癌细胞生物学行为的影响

蒋莉萍^{1*}, 王霞², 彭心华³

(1.江西省吉安市妇幼保健院病理科,江西 吉安 343000;2.井冈山大学医学部,江西 吉安 343000;
3.江西省吉安市妇幼保健院检验科,江西 吉安 343000)

【摘要】 目的 探究 miR-34a-5p 通过靶向胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3(IMP3)、程序性死亡配体-1(PD-L1)表达对乳腺癌细胞生物学行为的影响。**方法** 利用 Human Protein Atlas 和 GEPIA 在线分析 TCGA 数据库和 GTEx 项目中乳腺癌及正常组织 IMP3、PD-L1 的表达水平、患者的预后生存期;qRT-PCR、Western blot 检测 160 例患者乳腺癌组织及癌旁正常组织中 miR-34a-5p、IMP3、PD-L1 mRNA 与蛋白表达;Pearson 检验分析 miR-34a-5p 分别与 IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 的相关性;免疫组化检测患者乳腺癌及正常组织 IMP3、PD-L1、白细胞分化抗原 44 变异体 6(CD44v6)的表达,分析 IMP3、PD-L1 表达水平与患者临床病理参数的关系;靶基因预测、双荧光素酶报告实验验证 miR-34a-5p 对 IMP3、PD-L1 的靶向调控作用。MCF7 细胞分为 control 组、miR-NC 组、miR-34a-5p 组、miR-NC+pcDNA-NC 组、miR-NC+IMP3 组、miR-NC+PD-L1 组、miR-34a-5p+pcDNA-NC 组、miR-34a-5p+IMP3 组和 miR-34a-5p+PD-L1 组,采用 MTT 法、克隆形成、划痕、Transwell 小室实验测定细胞增殖活力、迁移、侵袭能力;Western blot 检测 IMP3、PD-L1、CD44v6、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9、E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达水平。**结果** 生物数据库显示乳腺癌组织 IMP3、PD-L1 表达水平越高,患者生存期越短($P<0.05$);qRT-PCR、Western blot 结果显示,乳腺癌组织 miR-34a-5p 表达水平明显低于正常组织,IMP3、PD-L1 mRNA 与蛋白表达水平明显高于正常组织,miR-34a-5p 表达分别与 IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 呈明显负相关($P<0.05$);免疫组化结果显示,乳腺癌组织 IMP3、PD-L1、CD44v6 呈阳性表达,且 IMP3、PD-L1 表达越高,TNM 分期越晚,肿瘤分化程度越低、越容易发生淋巴结和远处转移($P<0.05$);双荧光素酶实验验证了 miR-34a-5p 对 IMP3、PD-L1 的靶向调控作用;与 control 组和 miR-NC 组相比,miR-34a-5p 组的细胞活力、单克隆形成数目、划痕愈合率、细胞侵袭数目、IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显降低,E-cadherin 蛋白表达明显升高,与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比,miR-NC+IMP3 组和 miR-NC+PD-L1 组细胞活力、单克隆形成数目、划痕愈合率、细胞侵袭数目、IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显升高,E-cadherin 蛋白表达明显降低,与 miR-34a-5p+pcDNA-NC 组相比,miR-34a-5p+IMP3 组和 miR-34a-5p+PD-L1 组细胞活力、单克隆形成数目、划痕愈合率、细胞侵袭数目、IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 水平升高,E-cadherin 水平降低($P<0.05$)。**结论** miR-34a-5p 能够通过靶向调控 IMP3、PD-L1 表达抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间质化(EMT)。

【关键词】 miR-34a-5p;胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3;程序性死亡配体-1;乳腺癌;增殖;侵袭

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0067-11

Effect of miR-34a-5p on biological behavior of breast cancer cells by targeting insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 and programmed death ligand-1

[基金项目] 江西省卫生健康委员会科技计划项目(20204844)。

[作者简介] 蒋莉萍(1972—),女,副主任医师,研究方向:乳腺病理、妇产科病理。E-mail:hanzeq355773@163.com

JIANG Liping^{1*}, WANG Xia², PENG Xinhua³

(1. Department of Pathology, Maternal and Child Health Hospital of Ji'an, Ji'an 343000, China. 2. Medical Science Center of Jinggangshan University, Ji'an 343000. 3. Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Ji'an, Ji'an 343000)

[Abstract] Objective To explore how miR-34a-5p regulates insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) and programmed death ligand-1 (PD-L1) expression and its influence on the biological behavior of breast cancer cells. **Methods** We analyzed IMP3 and PD-L1 expression in breast cancer and normal tissues using the Human Protein Atlas and GEPIA, and patient prognosis and survival using The Cancer Genome Atlas and GTEx project. miR-34a-5p, IMP3, and PD-L1 mRNA levels, IMP3 and PD-L1 protein levels were detected in breast cancer and adjacent normal tissues by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. Correlations between miR-34a-5p and IMP3 and PD-L1 mRNAs were analyzed by Pearson's test. Immunohistochemistry was used to detect IMP3, PD-L1, and leukocyte differentiation antigen 44 variant 6 (CD44v6) expression in breast cancer and normal tissues, and the relationships between IMP3 and PD-L1 expression and clinicopathological parameters were analyzed. Target gene prediction and dual luciferase reporter assay were used to verify the targeted regulation of miR-34a-5p on IMP3 and PD-L1. MCF7 cells were divided into control group, miR-NC group, miR-34a-5p group, miR-NC+pcDNA-NC group, miR-NC+IMP3 group, miR-NC+PD-L1 group, miR-34a-5p+pcDNA-NC group, miR-34a-5p+IMP3 group, and miR-34a-5p+PD-L1 group. Cell proliferation, migration, and invasion were determined by MTT, colony-formation, scratch, and Transwell chamber tests, respectively. Expression levels of IMP3, PD-L1, CD44v6, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, and E-cadherin were detected by Western blot. **Results** The biological databases showed that higher expression levels of IMP3 and PD-L1 in breast cancer tissues were associated with shorter survival ($P<0.05$). Expression levels of miR-34a-5p were significantly lower while expression levels of IMP3 and PD-L1 mRNAs and proteins were significantly higher in breast cancer tissues than in normal tissues. miR-34a-5p expression was negatively correlated with IMP3 and PD-L1 mRNAs, respectively ($P<0.05$). Immunohistochemistry showed positive expression of IMP3, PD-L1, and CD44v6 in breast cancer, with higher IMP3 and PD-L1 expression associated with later TNM stage, lower degree of tumor differentiation, and increased risks of lymph node and distant metastases ($P<0.05$). Dual luciferase assay verified the targeted regulation of miR-34a-5p on IMP3 and PD-L1. The cell viability, number of clones formed, scratch-healing rate, cell invasion, and expression levels of IMP3, PD-L1, CD44v6, MMP-2, and MMP-9 protein were all significantly lower and E-cadherin expression was significantly higher in the miR-34a-5p group compared with the control group and miR-NC group. The cell viability, number of clones formed, scratch-healing rate, cell invasion, and expression levels of IMP3, PD-L1, CD44v6, MMP-2, and MMP-9 proteins were all significantly increased while expression of E-cadherin protein was significantly decreased in the miR-NC+IMP3 and miR-NC+PD-L1 groups compared with the miR-NC+pcDNA-NC group. The cell viability, number of clones formed, rate of scratch healing, cell invasion, and expression levels of IMP3, PD-L1, CD44v6, MMP-2, and MMP-9 protein were all significantly increased while E-cadherin expression was significantly decreased in the miR-34a-5p+IMP3 and miR-34a-5p+PD-L1 groups compared with the miR-34a-5p+pcDNA-NC group ($P<0.05$). **Conclusions** miR-34a-5p can inhibit the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells by targeting the expression of IMP3 and PD-L1.

[Keywords] miR-34a-5p; insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3; programmed death ligand-1; breast cancer; proliferation; invasion

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

乳腺癌转移是导致患者死亡的主要原因之一,5 年生存率仅为 20%^[1]。探索乳腺癌转移、复发相关分子对于监测和筛查高危乳腺癌患者、延长生存期意义深远。胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3 (insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3,IMP3) 是一种癌胚蛋白,与肿瘤的生长、侵袭相

关。程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)也称为分化簇 274(CD274),是程序性死亡蛋白(PD-1)的配体。可抑制淋巴细胞的增殖及免疫、分泌功能,从而促进恶性肿瘤的发生和进展。研究发现 IMP3、PD-L1 在乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、肝癌等恶性组织中表达异常,且与患者不良预后有关。

关^[2-8]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种由 20~22 个核苷酸组成的非编码 RNA, 广泛参与多种生物学过程。如 Hu 等^[9]发现 miR-34a-5p 通过与结肠癌相关转录物-1 (CCAT1) 结合, 促进骨质疏松大鼠成骨细胞增殖分化, 抑制凋亡。Xu 等^[10]发现 miR-34a-5p 过表达通过靶向抑制转录因子 YY1 的表达, 抑制肝癌细胞进展。刘敏娟等^[11]发现 miR-34a-5p 靶向蛋白激酶 B1 (AKT1) 基因, 促进子宫内膜基质细胞增殖、迁移及侵袭。Maroni 等^[12]发现 miR-34a-5p 在非转移性乳腺癌中较转移性乳腺癌中升高, miR-34a-5p 降低癌细胞的侵袭能力。但 miR-34a-5p 是否通过靶向调控 IMP3、PD-L1 影响乳腺癌细胞的生物学行为鲜有报道。

因此, 本研究拟探究 miR-34a-5p 通过靶向 IMP3 和 PD-L1 表达对乳腺癌细胞增殖及侵袭过程的影响。以期临床寻找预测乳腺癌转移潜能的可信分子标记物和分子治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织标本

收集我院 2019 年 4 月到 2020 年 10 月手术切除的乳腺癌组织标本 160 例 (包括浸润性导管癌 104 例、导管原位癌 20 例、浸润性小叶癌、粘液癌各 16 例、小管癌 4 例), 含对应癌旁组织标本。标本于液氮保存。入组标准: (1) 首次确诊乳腺癌; (2) 未进行放疗、化疗等治疗; (3) 随访资料齐全。所有样本均经患者及其家属知情同意, 研究方案获得江西省吉安市妇幼保健院医学伦理委员会批准 (批件号: 41206)。

1.1.2 细胞

人乳腺癌细胞 MCF7 (武汉华尔纳生物科技有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

MTT (上海研载生物科技有限公司, 生产批号: M2485); RPMI 1640 培养液 (北京泽平科技有限责任公司, 生产批号: 31800-022); 胎牛血清 (北京缔一生物科技有限公司, 生产批号: 112082); 兔抗人 IMP3 单克隆抗体 (克隆号: ZA-0639UM)、鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体 (克隆号 ZM-0052UM)、兔抗人 PD-L1 单克隆抗体 (克隆号: ZR3) (杭州华安生物技术有限公司); MMP-2、MMP-9、E-cadherin、 β -actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 生产批号: sc-13594、sc-

374029、sc-8426、sc-301402); miR-34a-5p-mimic、mimic-nc (湖北艾普蒂生物工程有限公司); 免疫组化试剂盒、BCA 试剂盒、ECL 显影剂 (上海碧云天公司, 生产批号: P0615、P0033、P0018 S); 胰蛋白酶、青霉素/链霉素 (美国 GIBCO 公司, 生产批号: 25200-056)。

WMSC-1088 倒置生物显微镜 (上海无陌光学仪器有限公司); SE260 迷你型垂直电泳仪 (美国 Cytiva 思拓凡); BPN-150CW 二氧化碳培养箱 (上海净信实业发展有限公司); Spark 多功能酶标仪 (上海帝肯实验器材有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与分组

使用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基培养 MCF7 细胞, 于条件为 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。细胞分为 control 组 (不做转染)、miR-NC 组 (转染 mimic-nc)、miR-34a-5p 组 (转染 miR-34a-5p mimic)、miR-NC+pcDNA-NC 组 (转染 mimic-nc+pcDNA-control)、miR-NC+IMP3 组 (转染 mimic-nc+pcDNA-IMP3)、miR-NC+PD-L1 组 (转染 mimic-nc+pcDNA-PD-L1)、miR-34a-5p+pcDNA-NC 组 (转染 miR-34a-5p mimic+pcDNA-control)、miR-34a-5p+IMP3 组 (转染 miR-34a-5p mimic+pcDNA-IMP3)、miR-34a-5p+PD-L1 组 (转染 miR-34a-5p mimic+pcDNA-PD-L1), 按照分组名称进行慢病毒转染。

1.3.2 双荧光素酶实验

构建 IMP3、PD-L1 野生型、突变型荧光素酶报告载体, 两种质粒分别与 mimic-nc、miR-34a-5p-mimic 混合, 共转染至 MCF7 细胞中。转染 48 h 后, 收集各组细胞并裂解, 按试剂盒说明检测荧光素酶活性。

1.3.3 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 试剂提取组织总 RNA。将 RNA 反转录为 cDNA, SYBR Green 法扩增, 反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 循环 40 次。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 miR-34a-5p、IMP3、PD-L1 相对表达水平。引物序列: miR-34a-5p F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGC-3', R: 5'-ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAGC-3'; IMP3 F: 5'-ACGAAATATCCCGCCTCATTTAC-3', R: 5'-GCAGTTTCCGAGTCAGTGTTCA-3'; PD-L1 F: 5'-GTCAGATTTTGTCCGTCCACA-3', R: 5'-

CATGGACTTGACGTAGCTGTT-3'; U6 F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', R: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'。

1.3.4 免疫组化检测

组织常规石蜡包埋制成切片。取连续切片,二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水、抗原修复、山羊血清封闭后分别加入 IMP3、PD-L1、CD44v6 一抗,4℃ 孵育过夜,次日滴加二抗,37℃ 孵育 30 min,经 DAB 显色、复染、脱水、透明、封片后于光镜下观察拍照。

1.3.5 MTT 检测

细胞增殖:各组细胞接种于 96 孔板上,培养 24、48、72、96 h 时加入 MTT 溶液,继续培养 4 h,弃上清,加入 DMSO,于 450 nm 处检测 OD 值。

克隆形成:各组细胞接种于 6 孔板上,培养 2 周,4%多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫染色,于光镜下观察拍照计数。

1.3.6 划痕实验

各组细胞接种于 6 孔板中,观察细胞贴壁生长后用 200 μ L 枪头划痕,于光镜下观察拍照,测量划痕宽度。继续培养 24 h 后再次观察,计算细胞划痕愈合率=(0 h 宽度-24 h 宽度)/0 h 宽度 $\times$ 100%。

1.3.7 Transwell 实验

Transwell 上室膜底部涂抹 matrigel 基质胶,上室加入各组用无血清培养基制成的细胞悬液,下室加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,培养 24 h,甲醛固定,结晶紫染色,于光镜下观察拍照,统计下室细胞数量。

1.3.8 Western blot 检测

取部分乳腺癌组织制成匀浆,收集各组 MCF7 细胞沉淀,分别加入适量裂解液,提取组织总蛋白。BCA 法测定蛋白质含量,制样,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,加入封闭液封闭 2 h,分别加入 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9、E-cadherin 一抗(1:1000)4℃ 孵育过夜,二抗(1:10 000)孵育 2 h,经 ECL 显色,置于数字成像仪上收集分析图像结果。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件完成本次研究的统计分析,计量资料符合正态分布,数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间的比较采用 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-34a-5p、IMP3、PD-L1 在乳腺癌组织中的表达

Human Protein Atlas 数据库、GEPIA 数据库与 TCGA 数据库分析结果(图 1A、1B)显示,与正常组织相比,乳腺癌组织 IMP3、PD-L1 的表达明显升高;生存分析结果显示,IMP3、PD-L1 表达程度越高,患者生存期越短(图 1C, $P<0.05$),说明 IMP3、PD-L1 在乳腺癌中的表达具有研究意义。qRT-PCR 结果(图 1D)显示,160 例患者乳腺癌组织中的 miR-34a-5p 表达量明显低于癌旁正常组织,IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 表达明显高于癌旁正常组织($P<0.05$);乳腺癌组织中 miR-34a-5p 分别与 IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 呈明显负相关($P<0.05$)(图 1E)。Western blot 结果(图 1F)显示,160 例患者乳腺癌组织 IMP3、PD-L1 蛋白表达明显高于正常组织($P<0.05$)。

2.2 免疫组化染色检测乳腺癌组织 IMP3、PD-L1、CD44v6 的表达

免疫组化结果(图 2)显示,与癌旁组织相比,乳腺癌组织 IMP3、PD-L1、CD44v6 阳性表达率明显高于正常组织。

2.3 IMP3、PD-L1 的表达与乳腺癌患者临床病理参数的关系

160 例病例按照 IMP3、PD-L1 相对表达量分为高表达组(IMP3:116 例;PD-L1:124 例)、低表达组(IMP3:44 例;PD-L1:36 例)。结果(表 1)显示,IMP3、PD-L1 表达水平与年龄、绝经情况、肿瘤大小无明显相关性($P>0.05$),与 TNM 分期、淋巴结转移、远处转移及分化程度有明显的相关性($P<0.05$)。IMP3、PD-L1 表达量越高,TNM 分期越晚,肿瘤分化程度越低、越容易发生淋巴结和远处转移。

2.4 靶基因预测及双荧光素酶实验

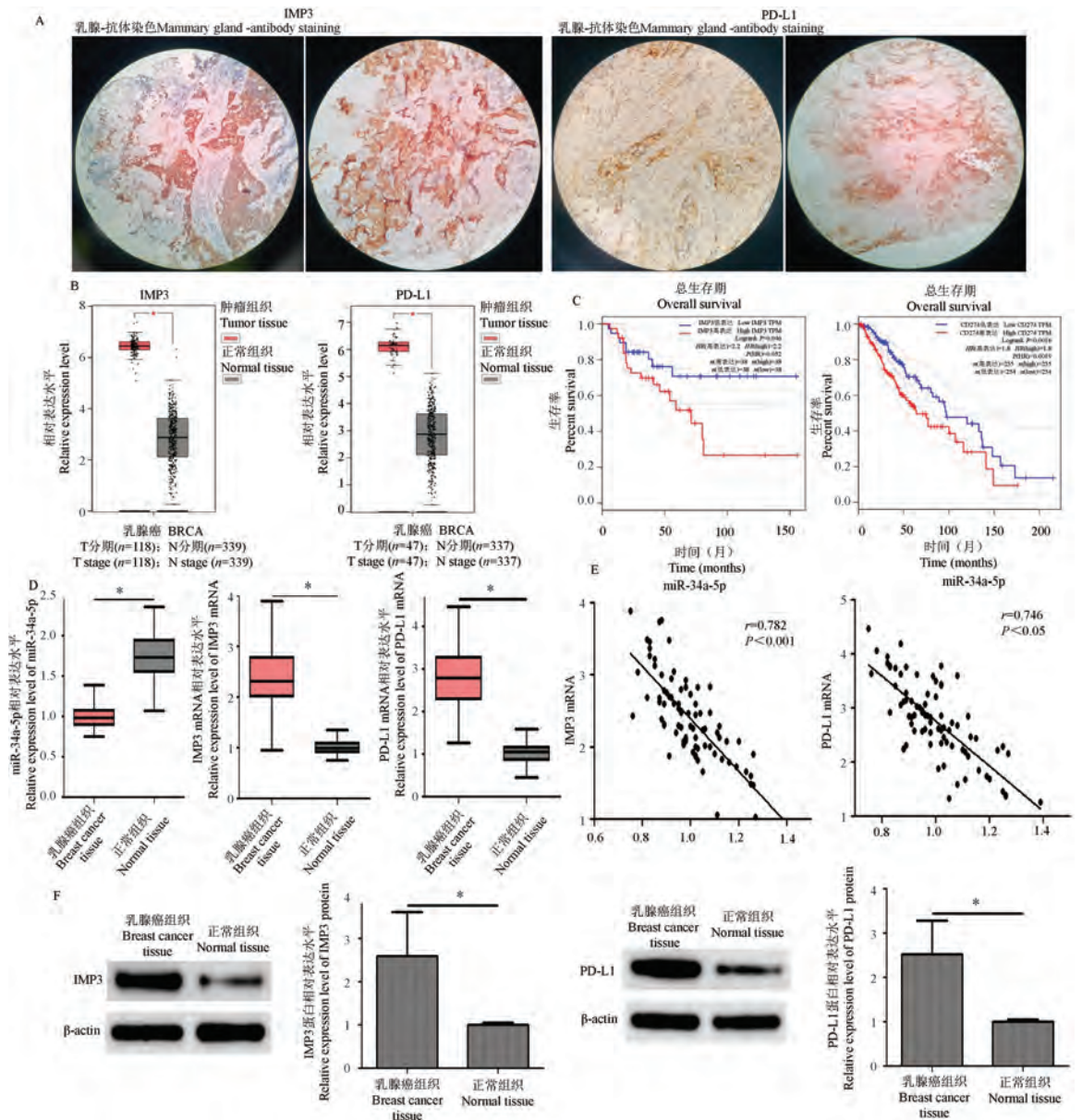
生物信息学分析预测结果(图 3A)显示,miR-34a-5p 与 IMP3、PD-L1(CD274)基因都存在结合位点。双荧光素酶检测结果(图 3B)显示,与 control 组相比,野生型 IMP3、PD-L1 荧光信号强度显著降低($P<0.05$),而突变型 IMP3、PD-L1 荧光素酶活性无显著差异($P>0.05$),说明 miR-34a-5p 可以调控带有 IMP3、PD-L1 基因片段 3' UTR 基因的表达,IMP3、PD-L1 是 miR-34a-5p 的靶基因。

2.5 各组细胞增殖能力及癌细胞单克隆形成能力的比较

克隆形成实验(图 4A)显示,与 control 组和

miR-NC 组相比,miR-34a-5p 组细胞单克隆形成数目显著减少,与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比,miR-NC+IMP3 组和 miR-NC+PD-L1 组细胞单克隆形成数目明显增加,与 miR-34a-5p+pcDNA-NC 组相比,

miR-34a-5p+IMP3 组和 miR-34a-5p+PD-L1 组细胞单克隆形成数目明显增加($P<0.05$)。MTT 结果(图 4B)显示,与 control 组和 miR-NC 组相比,miR-34a-5p 组细胞活力降低,与 miR-NC+



注:A:免疫组化检测患者正常乳腺组织和乳腺癌组织中 IMP3、PD-L1 表达;B:IMP3、PD-L1 在乳腺组织和乳腺癌组织中的表达量;C:IMP3、PD-L1 不同表达水平患者的生存期;D:qRT-PCR 检测癌及癌旁组织 miR-34a-5p、IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 相对表达水平;E:Pearson 检验分析乳腺癌组织中 miR-34a-5p 分别与 IMP3 mRNA、PD-L1 mRNA 的相关性;F:Western blot 检测癌及癌旁组织 IMP3、PD-L1 蛋白相对表达水平。与癌旁正常组织相比, * $P<0.05$ 。

图 1 miR-34a-5p、IMP3、PD-L1 在乳腺癌组织中的表达

Note. A, Immunohistochemical detection of IMP3 and PD-L1 expression in normal breast tissue and breast cancer tissue. B, Expression of IMP3 and PD-L1 in breast tissue and breast cancer tissue. C, Survival time of patients with different expression levels of IMP3 and PD-L1. D, Detection of relative expression levels of miR-34a-5p, IMP3 mRNA and PD-L1 mRNA in cancer and adjacent normal tissues by qRT-PCR. E, Correlation between miR-34a-5p, IMP3 mRNA and PD-L1 mRNA in breast cancer tissues analyzed by Pearson test. F, Detection of relative expression of IMP3 and PD-L1 proteins in cancer and adjacent normal tissues by Western blot. Compared with the normal tissues adjacent to the cancer, * $P<0.05$.

Figure 1 Expression of miR-34a-5p, IMP3 and PD-L1 in breast cancer

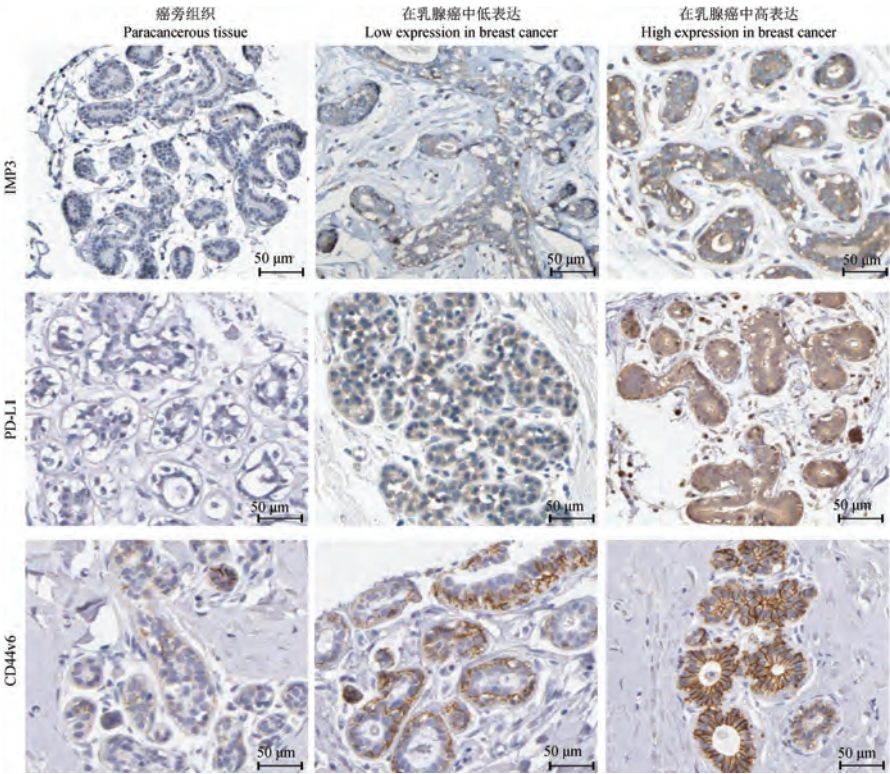
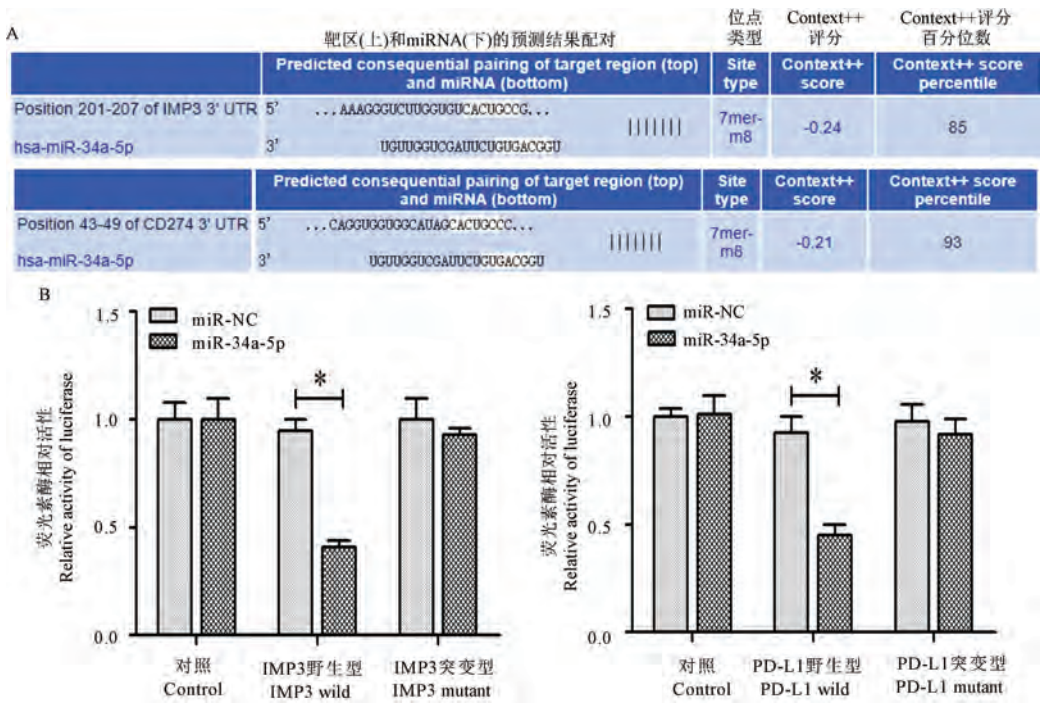


图 2 免疫组化分析 IMP3、PD-L1、CD44v6 在癌及癌旁组织中的表达

Figure 2 Immunohistochemical analysis of the expression of IMP3, PD-L1 and CD44v6 in breast cancer and paracancerous normal tissues

表 1 乳腺癌组织中 IMP3、PD-L1 表达水平与患者临床病理参数相关性分析

Table 1 Correlation analysis of IMP3, PD-L1 expression levels and clinicopathological parameters in breast cancer tissues							
参数 Parameters	例数 Cases	IMP3 表达 IMP3 expression		P	PD-L1 表达 PD-L1 expression		P
		低 (44) Low (44)	高 (116) High (116)		低 (36) Low (36)	高 (124) High (124)	
年龄(岁) Age(years)				0.386			0.164
<50	64	20(31.25)	44(68.75)		18(28.13)	46(71.87)	
≥50	96	24(25.00)	72(75.00)		18(18.75)	78(81.25)	
绝经 Menopause	92	30(32.61)	62(67.39)	0.092	22(23.91)	70(76.09)	0.619
肿瘤大小(cm) Tumor size				0.750			0.139
<5	76	20(26.32)	56(73.68)		21(27.63)	55(72.37)	
≥5	84	24(28.58)	60(71.42)		15(17.86)	69(82.14)	
TNM 分期 TNM staging				0.000			0.003
I ~ II	72	30(41.67)	42(58.33)		24(33.33)	48(66.67)	
III ~ IV	88	14(15.91)	74(84.09)		12(13.64)	76(86.36)	
淋巴结转移 Lymph node metastasis	98	18(18.37)	80(81.63)	0.001	10(27.78)	88(70.97)	0.000
远处转移 Distant metastasis	92	16(17.39)	76(82.61)	0.001	12(33.33)	80(64.52)	0.001
分化程度 Degree of differentiation				0.003			0.001
I ~ II	94	34(36.17)	60(63.83)		30(31.91)	64(68.09)	
III	66	10(15.15)	56(84.85)		6(9.09)	60(90.91)	

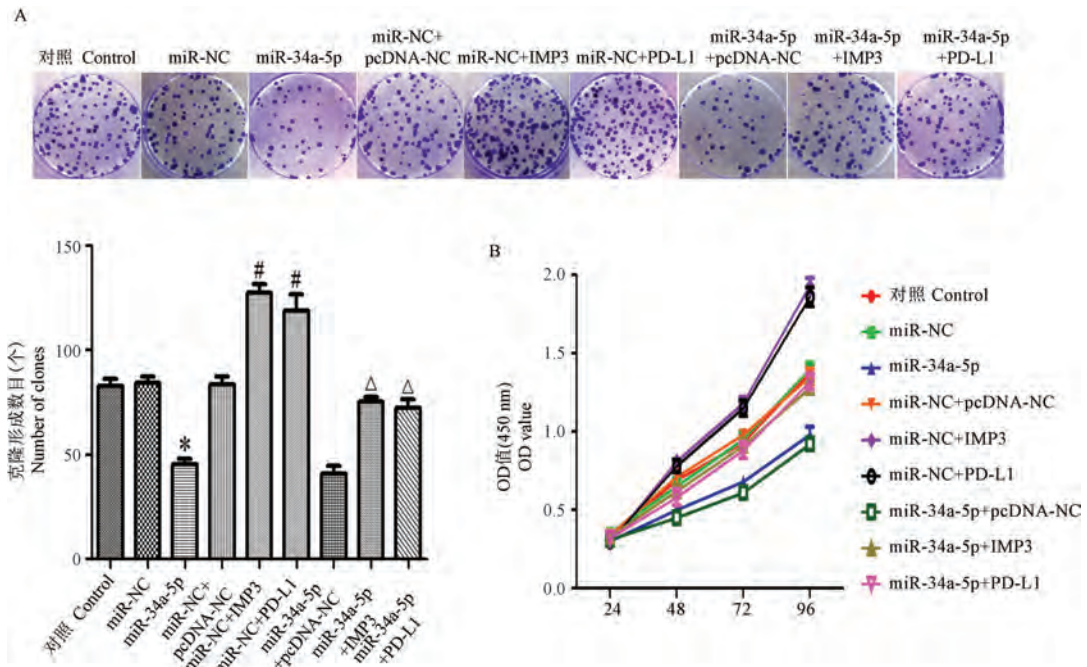


注:A:miR-34a-5p 靶向调控 IMP3、PD-L1 基因;B:双荧光素酶实验;与 miR-NC 组相比, * $P<0.05$ 。

图 3 靶基因预测及双荧光素酶实验

Note. A, Targeted regulation of IMP3 and PD-L1 genes by miR-34a-5p. B, Double luciferase experiment. Compared with miR-NC group, * $P<0.05$.

Figure 3 Target gene prediction and double luciferase experiment



注:A:MTT 法检测各组细胞增殖能力;B:癌细胞单克隆形成数目。与 control 组和 miR-NC 组相比, * $P<0.05$;与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比, # $P<0.05$;与 miR-34a-5p+pcDNA-NC 组相比, Δ $P<0.05$ 。

图 4 各组细胞增殖能力及癌细胞克隆形成能力的比较

Note. A, Ability of cell proliferation in each group was detected by MTT method. B, Number of monoclonal formation of cancer cells. Compared with control group and miR-NC group, * $P<0.05$. Compared with miR-NC+pcDNA-NC group, # $P<0.05$. Compared with miR-34a-5p+pcDNA-NC group, Δ $P<0.05$.

Figure 4 Comparison of the ability of cell proliferation and clone formation of cancer cells in different groups

pcDNA-NC 组相比, miR-NC + IMP3 组和 miR-NC + PD-L1 组的细胞活力明显增强, 与 miR-34a-5p + pcDNA-NC 组相比, miR-34a-5p + IMP3 组和 miR-34a-5p + PD-L1 组的细胞活力明显增强 ($P < 0.05$)。

2.6 各组细胞迁移能力比较

与 control 组和 miR-NC 组相比, miR-34a-5p 组细胞划痕愈合率明显降低, 与 miR-NC + pcDNA-NC 组相比, miR-NC + IMP3 组和 miR-NC + PD-L1 组细胞划痕愈合率明显增加, 与 miR-34a-5p + pcDNA-NC 组相比, miR-34a-5p + IMP3 组和 miR-34a-5p + PD-L1 组细胞划痕愈合率明显增加 (图 5, $P < 0.05$)。

2.7 各组细胞侵袭能力比较

与 control 组和 miR-NC 组相比, miR-34a-5p 组细胞侵袭数目明显减少, 与 miR-NC + pcDNA-NC 组相比, miR-NC + IMP3 组和 miR-NC + PD-L1 组细胞侵袭数目明显增加, 与 miR-34a-5p + pcDNA-NC 组相比, miR-34a-5p + IMP3 组和 miR-34a-5p + PD-L1 组细胞侵袭数目明显增加 (图 6, $P < 0.05$)。

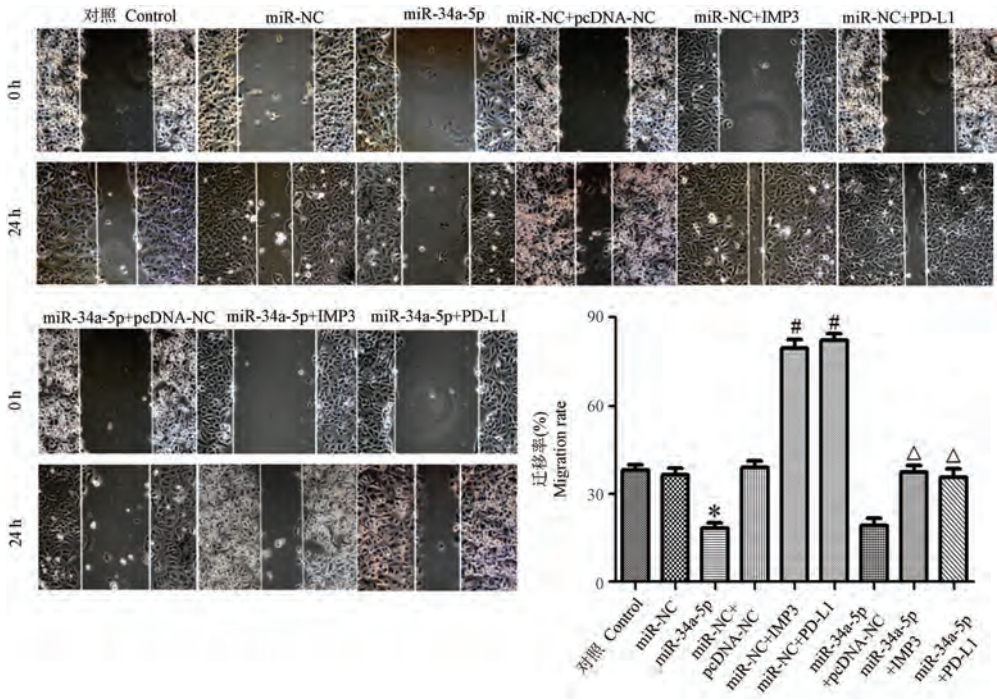
2.8 各组细胞 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9、E-cadherin 蛋白表达水平比较

与 control 组和 miR-NC 组相比, miR-34a-5p 组

细胞中 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 表达水平明显降低, E-cadherin 表达水平明显升高, 与 miR-NC + pcDNA-NC 组相比, miR-NC + IMP3 组和 miR-NC + PD-L1 组细胞中 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 表达水平明显升高, E-cadherin 表达水平明显下降, 与 miR-34a-5p + pcDNA-NC 组相比, miR-34a-5p + IMP3 组和 miR-34a-5p + PD-L1 组细胞中 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 表达水平升高, E-cadherin 表达水平下降 (图 7, $P < 0.05$)。

2.9 miR-34a-5p 靶向 IMP3、PD-L1 基因调控乳腺癌细胞恶性表型的作用机制

我们通过检测乳腺癌组织和癌细胞中 miR-34a-5p、IMP3、PD-L1 水平, 发现 miR-34a-5p 在乳腺癌组织和细胞中表达下调, IMP3 和 PD-L1 表达上调, 同时, miR-34a-5p 靶向调控 IMP3、PD-L1 表达, 说明 miR-34a-5p 与乳腺癌进展相关。过表达 miR-34a-5p 通过降低 IMP3、PD-L1 水平抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 能力, 而过表达 IMP3、PD-L1 能挽救上述影响。由此我们推断, 过表达 miR-34a-5p 靶向 IMP3、PD-L1 能够抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为 (图 8)。

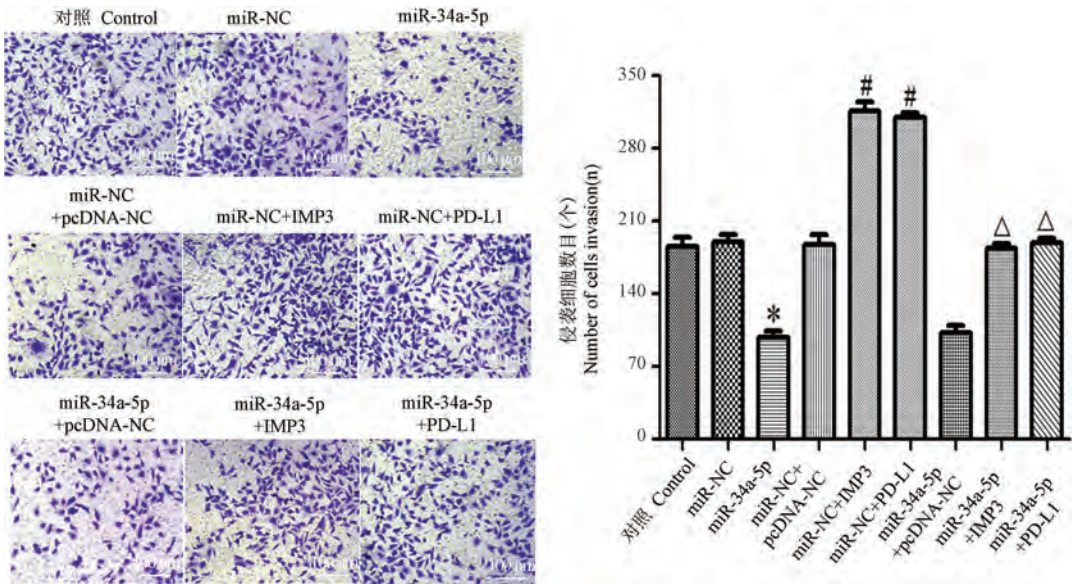


注: 与 control 组和 miR-NC 组相比, * $P < 0.05$; 与 miR-NC + pcDNA-NC 组相比, # $P < 0.05$; 与 miR-34a-5p + pcDNA-NC 组相比, Δ $P < 0.05$ 。

图 5 各组细胞迁移能力比较

Note. Compared with control group and miR-NC group, * $P < 0.05$. Compared with miR-NC + pcDNA-NC group, # $P < 0.05$. Compared with miR-34a-5p + pcDNA-NC group, Δ $P < 0.05$.

Figure 5 Comparison of cell migration ability in each group

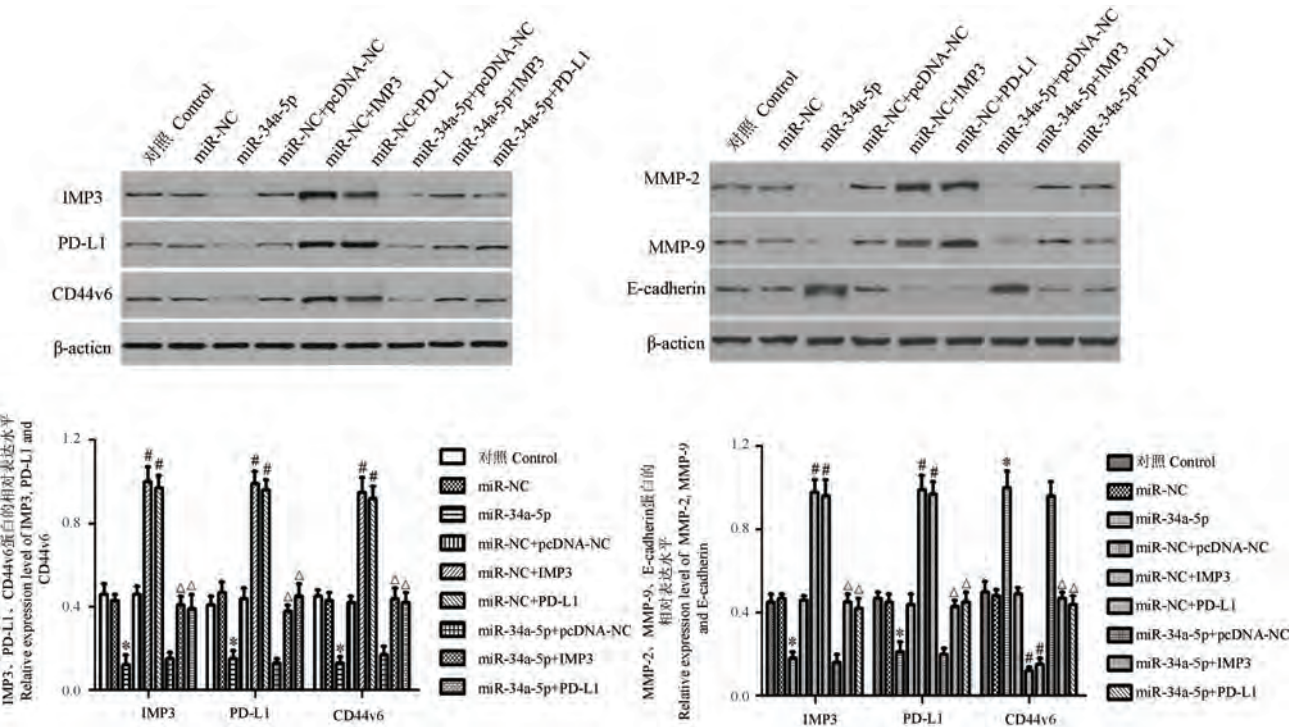


注:与 control 组和 miR-NC 组相比, * $P<0.05$;与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比, # $P<0.05$;与 miR-34a-5p+pcDNA-NC 组相比, △ $P<0.05$ 。

图 6 各组细胞侵袭能力比较

Note. Compared with control group and miR-NC group, * $P<0.05$. Compared with miR-NC+pcDNA-NC group, # $P<0.05$. Compared with miR-34a-5p+pcDNA-NC group, △ $P<0.05$.

Figure 6 Comparison of cell invasion ability in each group



注:与 control 组和 miR-NC 组相比, * $P<0.05$;与 miR-NC+pcDNA-NC 组相比, # $P<0.05$;与 miR-34a-5p+pcDNA-NC 组相比, △ $P<0.05$ 。

图 7 Western blot 检测 IMP3、PD-L1、CD44v6、MMP-2、MMP-9 和 E-cadherin 蛋白表达

Note. Compared with control group and miR-NC group, * $P<0.05$. Compared with miR-NC+pcDNA-NC group, # $P<0.05$. Compared with miR-34a-5p+pcDNA-NC group, △ $P<0.05$.

Figure 7 Detection of IMP3, PD-L1, CD44v6, MMP-2, MMP-9 and E-cadherin protein expression by Western blot

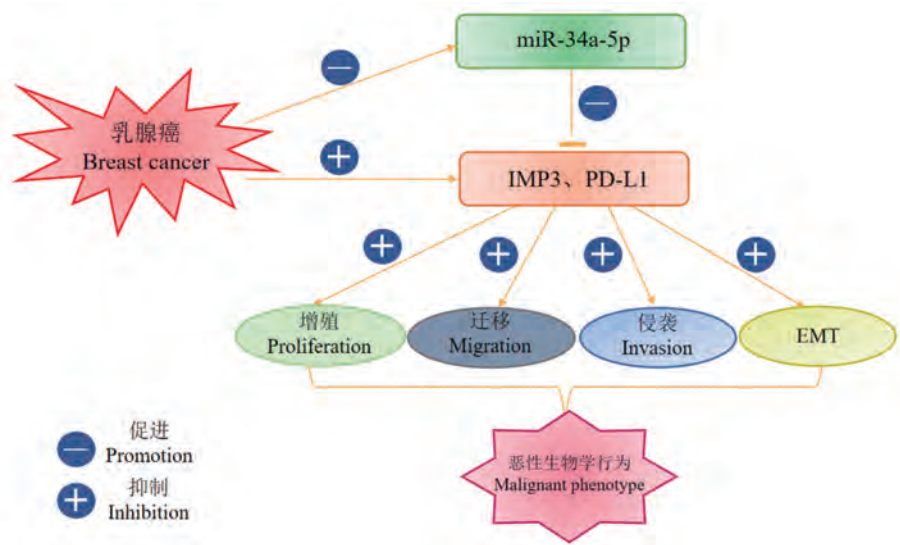


图 8 miR-34a-5p 靶向 IMP3、PD-L1 基因调控乳腺癌细胞恶性表型的作用机制

Figure 8 Mechanism of miR-34a-5p targeting IMP3 and PD-L1 genes to regulate malignant phenotype of breast cancer cells

3 讨论

miR-34a-5p 被报道在多种肿瘤组织中异常表达,参与肿瘤进展。如 Song 等^[13]发现 miR-34a-5p 负向调控 X-box 结合蛋白 1(XBP1)的表达,抑制成纤维细胞样滑膜细胞增殖,降低肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 水平,从而减轻类风湿性关节炎的炎症反应。Zheng 等^[14]发现 miR-34a-5p 通过抑制 HOX 转录反义 RNA(HOTAIR)的表达,抑制非小细胞肺癌增殖、迁移、侵袭,抑制上皮间充质转化及体内异种移植模型,为肺癌的治疗提供新的方案。Haghi 等^[15]发现 miR-34a-5p 在乳腺癌细胞中表达下调,转染 miR-34a-5p 能够诱导细胞凋亡,并抑制侵袭和迁移。Mansoori 等^[16]的研究结果显示,miR-34a 在乳腺癌患者肿瘤组织中低表达,与患者的不良预后有关。本研究中转染 miR-34a-5p 后,MCF7 细胞增殖、迁移、侵袭能力明显减弱,提示 miR-34a-5p 在乳腺癌中发挥抑癌作用,与既往研究结果一致。

IMP3 是一种癌胚蛋白,参与癌症的转移和侵袭过程,PD-L1 具有抑制淋巴细胞免疫和分泌的功能,可促进肿瘤进展。Zuo 等^[17]发现 miR-34a-5p 负向调控 PD-L1 的表达,能够降低卵巢癌的化疗敏感性。Tian 等^[18]研究表明,PD-L1 表达上调与非小细胞肺癌细胞对顺铂耐药有关,硫化砷可通过上调非小细胞肺癌细胞中 miR-34a-5p 靶向抑制 PD-L1 表达,增加非小细胞肺癌细胞对顺铂的敏感性。

Huang 等^[19]证实,上调 miR-34a 可靶向抑制 IMP3 表达,从而降低乳腺癌细胞发育成微球的能力,抑制乳腺癌细胞的肝细胞特性。在本次研究中,miR-34a-5p 靶向负调控 IMP3、PD-L1,乳腺癌组织 IMP3、PD-L1 高表达与患者生存期缩短、TNM 晚期,肿瘤分化程度低、淋巴结、远处转移相关,提示 IMP3、PD-L1 在乳腺癌中发挥促癌作用,并且与患者不良预后有关。

EMT 是肿瘤细胞突破基膜、获得侵袭和转移能力的首要条件。CD44v6 是 CD44 家族成员,CD44v6 高表达可具有淋巴细胞活性,利于肿瘤细胞向远端侵袭和转移。常徽等^[20]发现二氢杨梅素能够降低乳腺癌细胞侵袭标志蛋白 MMP-2、MMP-9,提高抑迁移蛋白 E-cadherin 的表达,可有效降低乳腺癌细胞迁移、侵袭能力。杨钢等^[21]发现下调 miR-27 的表达,可抑制 MMP-2 的表达,促进 E-cadherin 的表达,对乳腺癌细胞恶性生物学行为具有明显抑制作用。Hu 等^[22]发现 CD44v6 在侵袭性乳腺癌细胞系较低侵袭性乳腺癌细胞中显著上调,下调 CD44v6 后可以明显抑制细胞迁移和侵袭。本研究中转染 miR-34a-5p 后,乳腺癌细胞 IMP3、PD-L1、MMP-2、MMP-9、CD44v6 表达明显降低,E-cadherin 的表达明显升高,MCF7 细胞恶性生物学行为受到抑制,而过表达 IMP3、PD-L1 能挽救上述影响,结果表明,miR-34a-5p 可通过调控 IMP3、PD-L1 表达影响 MCF7 细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT。

综上所述,miR-34a-5p 能通过靶向 IMP3、PD-

L1 表达抑制乳腺癌细胞恶性生物学行为,然而 miR-34a-5p、IMP3 和 PD-L1 能否作为临床有效的预测和治疗靶标应用于乳腺癌患者尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Riggio AI, Varley KE, Welm AL. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer [J]. Br J Cancer, 2021, 124(1): 13–26.
- [2] Sjekloca N, Tomić S, Mrklič I, et al. Prognostic value of IMP3 immunohistochemical expression in triple negative breast cancer [J]. Medicine, 2020, 99(7): e19091.
- [3] Zhang Y, Zhao L, Yang S, et al. CircCDKN2B-AS1 interacts with IMP3 to stabilize hexokinase 2 mRNA and facilitate cervical squamous cell carcinoma aerobic glycolysis progression [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 281.
- [4] Mikata R, Yasui S, Kishimoto T, et al. Diagnostic value of IMP3 and p53 immunohistochemical staining in EUS-guided fine-needle aspiration for solid pancreatic tumors [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 17257.
- [5] Zhang M, Zhao S, Tan C, et al. RNA-binding protein IMP3 is a novel regulator of MEK1/ERK signaling pathway in the progression of colorectal Cancer through the stabilization of MEKK1 mRNA [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 200.
- [6] Rizzo A, Ricci AD. Biomarkers for breast cancer immunotherapy: PD-L1, TILs, and beyond [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2022, 31(6): 549–555.
- [7] Rischin D, Gil-Martin M, González-Martin A, et al. PD-1 blockade in recurrent or metastatic cervical cancer: data from cemiplimab phase I expansion cohorts and characterization of PD-L1 expression in cervical cancer [J]. Gynecol Oncol, 2020, 159(2): 322–328.
- [8] Zhang X, Huang X, Xu J, et al. NEK2 inhibition triggers anti-pancreatic cancer immunity by targeting PD-L1 [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4536.
- [9] Hu F, Jiang C, Bu G, et al. Silencing long noncoding RNA colon cancer-associated transcript-1 upregulates microRNA-34a-5p to promote proliferation and differentiation of osteoblasts in osteoporosis [J]. Cancer Gene Ther, 2021, 28(10/11): 1150–1161.
- [10] Xu XP, Peng XQ, Yin XM, et al. miR-34a-5p suppresses the invasion and metastasis of liver cancer by targeting the transcription factor YY1 to mediate MYCT1 upregulation [J].

Acta Histochem, 2020, 122(6): 151576.

- [11] 刘敏娟, 邓月秀, 马颖. miR-34a-5p 靶向 AKT1 基因对子宫内膜异位症子宫内基质细胞侵袭及自噬的调控 [J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(9): 776–782.
- [12] Maroni P, Puglisi R, Mattia G, et al. In bone metastasis miR-34a-5p absence inversely correlates with Met expression, while Met oncogene is unaffected by miR-34a-5p in non-metastatic and metastatic breast carcinomas [J]. Carcinogenesis, 2017, 38(5): 492–503.
- [13] Song AF, Kang L, Wang YF, et al. miR-34a-5p inhibits fibroblast-like synoviocytes proliferation via XBP1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(22): 11675–11682.
- [14] Zheng F, Li J, Ma C, et al. Novel regulation of miR-34a-5p and HOTAIR by the combination of berberine and gefitinib leading to inhibition of EMT in human lung cancer [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(10): 5578–5592.
- [15] Haghi M, Taha MF, Javeri A. Suppressive effect of exogenous miR-16 and miR-34a on tumorigenesis of breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13342–13353.
- [16] Mansoori B, Silvestris N, Mohammadi A, et al. miR-34a and miR-200c have an additive tumor-suppressive effect on breast cancer cells and patient prognosis [J]. Genes, 2021, 12(2): 267.
- [17] Zuo Y, Zheng W, Liu J, et al. miR-34a-5p/PD-L1 axis regulates cisplatin chemoresistance of ovarian cancer cells [J]. Neoplasma, 2020, 67(1): 93–101.
- [18] Tian W, Sun Y, Cheng Y, et al. Arsenic sulfide reverses cisplatin resistance in non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo* through targeting PD-L1 [J]. Thorac Cancer, 2021, 12(19): 2551–2563.
- [19] Huang QD, Zheng SR, Cai YJ, et al. IMP3 promotes TNBC stem cell property through miRNA-34a regulation [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9): 2688–2696.
- [20] 常徽, 陈军丽, 顾业芸, 等. 二氢杨梅素通过抑制 mTOR 信号通路抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭 [J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(18): 1624–1629.
- [21] 杨钢, 郭爽, 黎锦, 等. miR-27 调控 SOD2 对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1597–1602.
- [22] Hu S, Cao M, He Y, et al. CD44v6 targeted by miR-193b-5p in the coding region modulates the migration and invasion of breast cancer cells [J]. J Cancer, 2020, 11(1): 260–271.

[收稿日期] 2022-06-17

田璐,陈莹,张阳. 扶正抗癌汤含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 78-84.

Tian L, Chen Y, Zhang Y. Effects of serum containing Fuzheng kangai decoction on proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 78-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.010

扶正抗癌汤含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响

田璐,陈莹,张阳*

(辽宁中医药大学附属医院,沈阳 110032)

【摘要】 目的 探讨扶正抗癌汤(Fuzheng kangai decoction,FZKAD)含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、凋亡与周期进程的影响。**方法** SD 大鼠 40 只随机分为对照组及 FZKAD 低(4.725 g/kg)、中(9.45 g/kg)、高(18.9 g/kg)剂量组,灌胃给药 7 d 后制备含药血清,用于 HO-8910PM 细胞的培养。分别采用噻唑蓝(MTT)实验检测细胞增殖能力,平板克隆形成实验检测克隆形成能力,膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(FITC/PI)双染法流式细胞术检测细胞凋亡,PI 单染法流式细胞术检测细胞周期进程,Western blot 法检测蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外($P>0.05$),其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且各剂量组细胞克隆形成能力也显著降低($P<0.01$);与对照组比较,低、中、高剂量组的细胞凋亡率及 P53、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达水平增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)蛋白表达水平降低($P<0.01$);与对照组比较,低、中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞百分比增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 S 期、G₂/M 期细胞百分比及细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)、CDK6 蛋白表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用,该作用与诱导凋亡及周期进程阻滞有关。

【关键词】 扶正抗癌汤;卵巢癌;增殖;凋亡;周期进程

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

Effects of serum containing Fuzheng kangai decoction on proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells

TIAN Lu, CHEN Ying, ZHANG Yang*

(Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of serum containing Fuzheng Kangai Decoction (FZKAD) on the proliferation, apoptosis, and cell cycle progression in human ovarian carcinoma HO-8910PM cells. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were divided randomly into control and low-dose (4.725 g/kg), medium-dose (9.45 g/kg), and high-dose (18.9 g/kg) FZKAD groups. After 7 days of intragastric administration, serum containing FZKAD was prepared and used for the culture of HO-8910PM cells. Cell proliferation was detected by MTT assay, colony-formation ability was detected by clone formation assay, apoptosis was detected by flow cytometry using Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide double-staining, cell cycle progression was detected by flow cytometry using propidium iodide single-

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L201909)。

[作者简介] 田璐(1982—),女,博士,主任医师,研究方向:妇科肿瘤的诊断与治疗。E-mail:ingrid_114@163.com

[通信作者] 张阳(1973—),男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:妇科肿瘤的诊断与治疗。E-mail:zy172888@126.com

staining, and protein expression levels were detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in cell survival rates among the low-dose, medium-dose, and control groups after 24 h ($P>0.05$). However, cell survival rates in the other groups were significantly decreased after 24, 48 and 72 h ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the colony-formation abilities were also significantly decreased in each dosage group ($P<0.01$). Compared with the control group, the apoptosis rates and protein expression levels of P53 and Bax were significantly increased in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the protein expression level of Bcl-2 was decreased ($P<0.01$). The percentage of cells in G_0/G_1 stage was significantly increased in the low-dose, medium-dose, and high-dose groups compared with the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the percentages of cells in S and G_2/M stages and protein expression levels of cyclin D1 and cyclin-dependent kinases 4 and 6 were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** Serum containing FZKAD can inhibit the proliferation of human ovarian cancer HO-8910PM cells, related to the induction of apoptosis and cell cycle arrest.

[Keywords] Fuzheng kangai decoction; ovarian carcinoma; proliferation; apoptosis; cell cycle progression

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

卵巢癌为我国三大常见的妇科肿瘤之一,其死亡率居高居妇科肿瘤的首位^[1]。卵巢癌发病隐匿,早期诊断较困难,75%的患者确诊时即为晚期^[2]。手术治疗联合化疗是卵巢癌的标准治疗手段,但卵巢癌晚期患者 5 年生存率目前仍低于 30%^[3]。化疗药物除可以清除癌细胞外,对增殖较快的骨髓细胞等同样具有清除作用,毒副作用严重,且长时间使用容易产生耐药性^[4]。免疫治疗及生物治疗在卵巢癌的治疗领域具有良好的应用前景,但其价格昂贵,且广泛的使用及疗效的确认仍需时日^[5]。

目前,中医药治疗中晚期卵巢癌疗效确切,应用广泛,正逐渐得到更多人的认可^[6-7]。扶正抗癌汤(Fuzheng kangai decoction, FZKAD)为辽宁中医药大学附属医院院内制剂,本团队的前期研究工作已证实,FZKAD 可以有效抑制大鼠卵巢癌移植瘤的生长,调节免疫功能是 FZKAD 发挥抗卵巢癌作用的潜在机制^[8]。进一步的研究发现,FZKAD 含药血清可以阻碍转移生长因子 $\beta 1$ /Smad 同源物蛋白 3 信号通路的激活,调节上皮间质转化进程,进而抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的转移及侵袭^[9]。

大量研究表明,细胞凋亡受到抑制及周期进程受阻是肿瘤发生、发展的重要因素^[10-11]。因此,本研究以人卵巢癌 HO-8910PM 细胞为研究对象,在观察 FZKAD 含药血清抑制 HO-8910PM 细胞增殖作用的基础上,着重探讨其对凋亡及周期进程的影响,进一步阐明 FZKAD 治疗卵巢癌的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,清洁级,40 只,6~8 周龄,体重

200~220 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[SCXK(辽)2020-0002];实验动物在辽宁中医药大学实验动物中心饲养[SYXK(辽)2019-0004],饲养室湿度为 50%~60%,温度为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$,自由饮水和进食,12 h 光照和 12 h 黑暗交替循环。本研究经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(21000092018069),实验期间按照 3R 原则给予实验动物人道关怀。

1.1.2 细胞

人卵巢癌 HO-8910PM 细胞株,由上海美轩生物科技公司提供,并在本实验室长期传代保存。

1.2 主要试剂与仪器

扶正抗癌汤由白花蛇舌草 50 g、红人参 25 g、茯苓 20 g、竹茹 20 g、陈皮 15 g、浙贝母 15 g、枳壳 15 g、半夏 15 g、半枝莲 10 g、甘草 10 g、白术 10 g 及生姜 5 g 组成;水煎 2 次后,将药液合并,蒸发水分至其浓度为 2 g/mL,过滤去除残余药渣,分装灭菌后待用。胰蛋白酶(批号:T8802)、DMEM(批号:D0822)及胎牛血清(批号:12103C),购于美国 Mediatech 公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测试剂盒(批号:M1020)及结晶紫染液(批号:G1072),购于北京索莱宝科技有限公司;膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(批号:KGA107)及细胞周期检测试剂盒(批号:KGA512),购于江苏凯基生物科技发展有限公司;P53(批号:10442-1-AP)、B 淋巴瘤细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号:12789-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax, 批号:50599-2-AP)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1, 批号:26939-1-AP)、周期蛋白依赖性激酶 4

(cyclin dependent kinases 4, CDK4, 批号: 11026-1-AP)、CDK6 (批号: 4052-1-AP)、 β -肌动蛋白 (β -actin, 批号: 20536-1-AP) 多克隆抗体及对应的二抗 (批号: SA00001-2), 均购于武汉三鹰生物技术有限公司。

DFC259 型倒置相差显微镜, 德国 Leica 公司; 3111 型 CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; ELX808 型多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司; CytoFLEX 型流式细胞仪, 美国 Beckman 公司; DYCZ-24EN 型蛋白电泳仪, 北京六一仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备

参考文献^[9]中的方法及给药剂量制备含药血清, SD 大鼠 40 只随机分为对照组及 FZKAD 低 (4.725 g/kg)、中 (9.45 g/kg)、高 (18.9 g/kg) 剂量组, 每组 10 只; 灌胃给药, 体积均为 1 mL/100 g, 频率为每天 1 次, 共 7 d。末次给药结束后 2 h, 乙醚麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清。经 56℃ 灭活补体, 再用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后, 存放于低温冰箱中备用。

1.3.2 MTT 实验检测细胞增殖能力

HO-8910PM 细胞在 5% CO₂、37℃ 条件下, 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养, 0.25% 胰蛋白酶消化及传代, 当培养至对数生长期时用于实验。通过 MTT 实验检测细胞增殖能力, 将对数生长期的 HO-8910PM 细胞调整至密度为 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔细胞板中, 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h 后弃掉培养基。更换为分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清的 DMEM 培养基, 继续培养 24、48 及 72 h。在额定时间, 每孔加入 20 μ L 稀释好的 MTT 溶液 (5 mg/mL), 原条件再培养 4 h, 弃去培养液。加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min 后, 在 490 nm 处用酶标仪测吸光度 A, 计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.3.3 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

HO-8910PM 细胞加入 6 孔细胞培养版中 (1×10^3 /孔), 用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h, 细胞贴壁后, 弃掉培养基。加入 DMEM 培养基 (分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清), 继续培养 14 d, 甲醛固定后用结晶紫染液染色, 计数细胞克隆形成数量。细胞克隆形成能力 (%) = 药物组细胞克隆形成数量/对照组细

胞克隆形成数量 $\times 100\%$ 。

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡

人卵巢癌 HO-8910PM 细胞在 6 孔细胞板中培养, 先用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养 24 h 后, 再更换分别含 10% 对照组及 10% FZKAD 低、中、高剂量组含药血清的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h。收集细胞 (1×10^6 个), PBS 洗涤后, 用孵育缓冲液重悬, 避光静置 15 min; 再用孵育缓冲液重悬, 分别加入终浓度均为 1 μ g/mL 的 FITC-Annexin V 和 PI, 在 4℃ 下避光孵育 15 min。用流式细胞仪检测 FZKAD 含药血清对细胞凋亡的影响。

1.3.5 PI 单染法流式细胞术检测细胞周期进程

分组及处理方法同“1.3.4”, 制备单细胞悬液, 缓慢滴入 70% 冰乙醇中, 在 4℃ 下固定过夜。离心 (4500 r/min, 10 min), 用 PBS 漂洗去除残留乙醇, 收集细胞 (1×10^6) 于 EP 管中, 加入 200 μ L PI 溶液, 重悬细胞, 在 4℃ 下避光孵育 30 min。用流式细胞仪检测 FZKAD 含药血清对细胞周期进程的影响。

1.3.6 Western blot 检测蛋白表达水平

分组及处理方法同“1.3.4”, 收集细胞后, 加入适量的 RIPA 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 在 4℃ 下放置 30 min, 充分裂解。离心 (12 000 r/min, 10 min), 取上清液, 二辛可酸法测蛋白含量。计算 50~70 μ g 样品的体积, 与适量上样缓冲液混合后, 煮沸变性 10 min。采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 跑胶结束后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 (1:2000) 并在 4℃ 下孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次后, 加入二抗 (1:5000) 并在常温下孵育 1 h。TBST 再次洗膜 3 次后, ECL 发光液显色后曝光, 扫描仪扫描目的条带并用 GraphPad 软件进行灰度值分析。

1.4 统计学方法

所得数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。SNK-*q* 法用于两组数据比较, 单因素方差分析用于多组数据比较, $P < 0.05$ 提示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖的影响

2.1.1 各组细胞存活率比较

细胞过度增殖是肿瘤形成的重要原因, 本研究

通过 MTT 实验检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 24、48 及 72 h 后的存活率。结果发现,与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外($P>0.05$),其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

2. 1. 2 各组细胞克隆形成能力比较

本研究进一步通过平板克隆形成实验检测了 HO-8910PM 细胞经不同剂量的 FZKAD 含药血清处理 14 d 后的克隆形成能力。结果发现,对照组及 FZKAD 低、中、高剂量组的细胞克隆形成能力分别为 100.00%、(59.12±8.63)%、(39.89±6.58)% 和

(26.95±4.24)%,各剂量组与对照组比较均显著降低($P<0.01$)。结果见图 1。

2. 2 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞凋亡的影响

2. 2. 1 各组细胞凋亡率比较

细胞凋亡受到抑制可以导致异常增殖,本研究通过 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 的凋亡率。图 2 结果发现,对照组及 FZKAD 低、中、高剂量组的细胞凋亡率分别为(4.37±0.55)%、(17.56±2.48)%、(25.23±4.34)% 和 (41.79±5.16)%,各剂量组与对照组比较均显著增加($P<0.01$)。

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

组别 Groups	细胞存活率(%) Cell survival rate		
	24 h	48 h	72 h
对照组 Control group	100.00	100.00	100.00
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	97.01±3.56	89.57±4.74 *	83.19±5.66 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	95.69±4.13	77.08±5.82 **	60.82±7.38 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	87.93±6.37 *	62.54±3.29 **	44.76±4.70 **

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

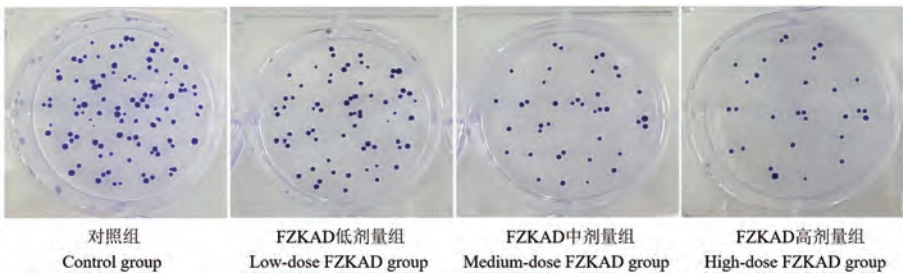


图 1 平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力

Figure 1 Cell clone formation ability of each group detected by plane clone formation experiment

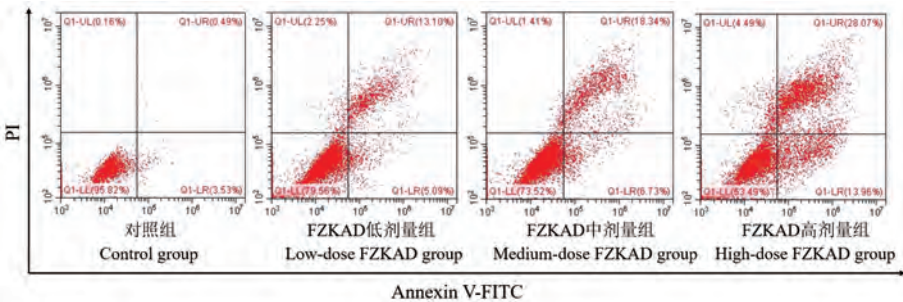


图 2 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Figure 2 Cell apoptosis rate determined by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI double staining

2.2.2 各组细胞凋亡相关蛋白表达水平比较

P53 蛋白及 Bcl-2 家族蛋白是决定细胞凋亡的经典分子,本研究通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平。结果发现, FZKAD 低、中、高剂量组 P53 及 Bax 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低,与对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 3 及表 2。

2.3 FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞周期进程的影响

2.3.1 各组细胞周期进程比较

细胞周期进程受阻可以影响凋亡,进而导致细胞异常增殖,本研究通过 PI 单染法流式细胞术检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后的周期进程。结果发现,与对照组比较, FZKAD 低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞百分比增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 S 期及 G_2/M 期细胞百分比降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表现出明显的 G_0/G_1 期阻滞作用。结果见图 4 及表 3。

2.3.2 各组细胞周期进程相关蛋白表达水平比较

通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞 48 h 后细胞周期进程相关蛋白表达水平。结果发现,与对照组比较, FZKAD 低、中、高剂量组细胞周期进程相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 表达水平均显著降低($P<0.01$),且该作用具有明显的剂量依赖性。结果见图 5 及表 4。

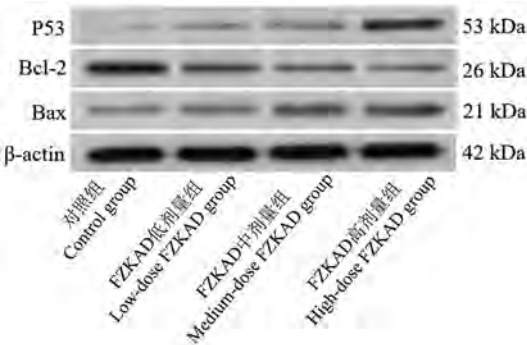


图 3 Western blot 法检测各组细胞 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平

Figure 3 Protein expression levels of P53, Bcl-2 and Bax in each group detected by Western blot

表 2 各组细胞 P53、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of P53, Bcl-2 and Bax protein expression levels in each group			
组别 Groups	P53/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
对照组 Control group	0.08±0.01	0.63±0.04	0.23±0.02
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	0.15±0.02 **	0.36±0.04 **	0.26±0.03 *
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	0.27±0.02 **	0.30±0.03 **	0.41±0.03 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	0.44±0.05 **	0.25±0.02 **	0.52±0.06 **

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

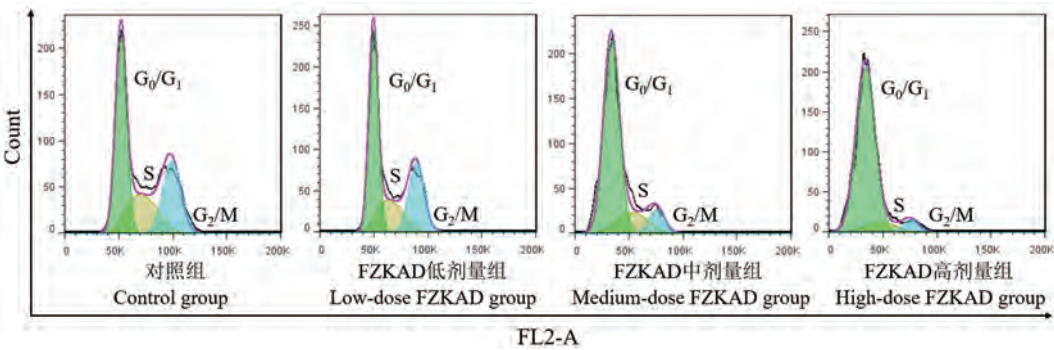


图 4 PI 单染法流式细胞术检测各组细胞周期进程

Figure 4 Cell cycle process determined by flow cytometry using PI single staining

表 3 各组细胞 G₀/G₁ 期、S 期及 G₂/M 期百分比($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Cell percentage of G₀/G₁, S and G₂/M stages in each group

组别 Groups	G ₀ /G ₁ 期 G ₀ /G ₁ stage	S 期 S stage	G ₂ /M 期 G ₂ /M stage
对照组 Control group	43.26±3.24	23.19±3.13	33.25±4.53
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	49.51±6.41 *	20.87±2.71 *	28.08±2.26 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	67.78±8.75 **	16.22±1.94 **	14.86±2.11 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	82.17±7.10 **	9.47±1.46 **	7.72±0.97 **

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

表 4 各组细胞 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Comparison of Cyclin D1, CDK4 and CDK6 protein expression levels in each group

组别 Groups	Cyclin D1/β-actin	CDK4/β-actin	CDK6/β-actin
对照组 Control group	0.78±0.08	0.64±0.05	0.92±0.08
FZKAD 低剂量组 Low-dose FZKAD group	0.59±0.06 **	0.48±0.04 **	0.71±0.08 **
FZKAD 中剂量组 Medium-dose FZKAD group	0.25±0.02 **	0.36±0.03 **	0.27±0.03 **
FZKAD 高剂量组 High-dose FZKAD group	0.10±0.02 **	0.29±0.03 **	0.09±0.01 **

注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

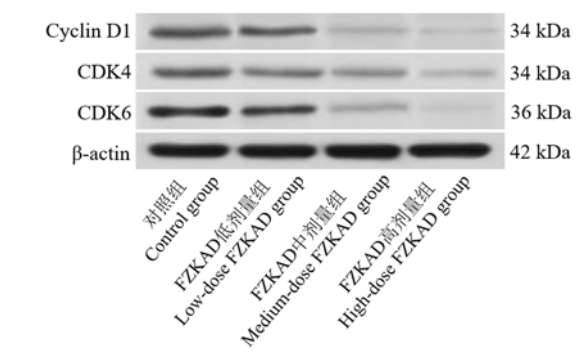


图 5 Western blot 法检测各组细胞 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平
Figure 5 Protein expression levels of Cyclin D1, CDK4 and CDK6 in each group detected by Western blot

3 讨论

FZKAD 为历代使用的中医抗癌验方,是治疗各种恶性肿瘤的有效基础方。FZKAD 具有扶正祛邪、解毒消肿、化痰散结、调补气血的功效,可以补正气以驱邪,尤其适用于正气亏损的患者,能改善抗癌效果,不良反应少,现代中医药理学研究表明扶正抗癌汤能明显提高患者的免疫力,减轻放、化疗的毒副作用,并且可以明显改善恶性肿瘤术后患者的生存质量^[8-9]。FZKAD 现已广泛应用于联合放、化疗治疗各系统恶性肿瘤的患者,临床疗效显著^[12]。本研究用 FZKAD 含药血清处理 HO-8910PM 细胞后发现,与对照组比较,除低、中剂量组处理 24 h 后的细胞存活率无显著性降低外,其余各组处理 24、48 及 72 h 后的细胞存活率均显著性降低,且各剂量组细胞克隆形成能力也显著降低,表明 FZKAD 含药血

清对 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用。
细胞凋亡是基因调控下的一种自发性有序性死亡过程,对机体各组织器官发育及内环境稳定起着十分重要的作用;同时,细胞凋亡与肿瘤的发生、发展密切相关,促进肿瘤细胞发生凋亡是抗肿瘤药物发挥作用的主要机制^[13-14]。P53 是重要的抑癌基因,可以使受损的 DNA 得以修复,避免细胞凋亡,进而影响肿瘤的发生和进展^[15]。细胞色素 C 从线粒体转移至细胞浆是内源性线粒体凋亡途径中的关键步骤,该步骤首先需要线粒体膜透化,而 Bcl-2 主要抵御线粒体膜的透化作用,进而限制细胞凋亡的发生^[16]。在凋亡刺激因子作用于肿瘤细胞后,使 Bax 活化后并与线粒体外膜连接,促进线粒体膜透化及细胞色素 C 进入细胞浆,激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶凋亡途径,最终诱导细胞凋亡的发生^[17]。P53 蛋白也能够特异的促进 Bax 的表达,降低 Bcl-2 的表达,从而影响肿瘤细胞凋亡^[18]。本研究分别通过 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术及 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清对 HO-8910PM 细胞凋亡率及 P53、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响,发现与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组的细胞凋亡率及 P53、Bax 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低,从细胞及分子水平上证实了 FZKAD 含药血清具有诱导 HO-8910PM 细胞凋亡的作用。

细胞周期主要分为 DNA 合成前期(G₁ 期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G₂ 期)及有丝分裂期(M 期),而 G₀ 期是停止分裂的一个阶段,G₀/G₁ 期、S 期及 G₂/M 期是细胞周期进程中的三个关键阶段^[19]。肿瘤是在遗传因素和环境因素共同

作用下引起的细胞失控性生长及细胞周期紊乱的一类疾病,其分子机制除与细胞凋亡过少有关外,细胞周期紊乱也是导致细胞增殖过多的主要原因^[20]。本研究通过 PI 单染法流式细胞术检测发现,与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组 G_0/G_1 期细胞百分比增加,而 S 期及 G_2/M 期细胞百分比降低,表现出明显的 G_0/G_1 期阻滞作用。细胞周期进程的精密运作依赖于各级细胞因子的调控,调控因子主要包括细胞周期蛋白(Cyclin)及周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)两类^[21]。本研究通过 Western blot 法检测了 FZKAD 含药血清对细胞周期进程相关蛋白 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 表达水平的影响,发现与对照组比较,FZKAD 低、中、高剂量组 Cyclin D1、CDK4 及 CDK6 蛋白表达水平均显著降低,进一步明确了 FZKAD 含药血清具有诱导 HO-8910PM 细胞周期进程阻滞作用。

综上,FZKAD 含药血清对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的增殖具有抑制作用,该作用与诱导凋亡及周期进程阻滞有关,但深入的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 沈丽娜,臧荣余. 卵巢癌一级预防研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(3): 224-228.

[2] Srivastava A, Gupta A, Patidar S. Review of biomarker systems as an alternative for early diagnosis of ovarian carcinoma [J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(10): 1967-1978.

[3] Voutsadakis IA. Low-grade serous ovarian carcinoma: an evolution toward targeted therapy [J]. Int J Gynecol Cancer, 2020, 30(10): 1619-1626.

[4] Li X, Ouyang Z, Li H, et al. Dendrimer-decorated nanogels: efficient nanocarriers for biodistribution *in vivo* and chemotherapy of ovarian carcinoma [J]. Bioact Mater, 2021, 6(10): 3244-3253.

[5] Lavoué V, Foucher F, Henno S, et al. Immunotherapy in epithelial ovarian carcinoma: hope and reality [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod, 2014, 43(3): 198-210.

[6] 王溢,杨春娇,温真鹏,等. 基于网络药理学研究蟾毒灵治疗卵巢癌的作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(5): 667-674.

[7] 张建丽,崔伟. 自拟益气抗癌方联合 TP 方案治疗上皮性卵巢癌疗效及对免疫指标影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(12): 876-880.

[8] 田璐,张新,张阳. 扶正抗癌汤免疫调节及抑制大鼠卵巢癌移植瘤生长的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 38-43.

[9] 田璐. 扶正抗癌汤含药血清调节 EMT 进程抑制人卵巢癌

HO-8910PM 细胞转移及侵袭作用的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 43-49.

[10] Lee JS, Sul JY, Park JB, et al. Honokiol induces apoptosis and suppresses migration and invasion of ovarian carcinoma cells via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. Int J Mol Med, 2019, 43(5): 1969-1978.

[11] Shi JY, Huang ZR, Gao HY, et al. Anticancer effects of juglone in OVCAR-3 human ovarian carcinoma are facilitated through programmed cell death, endogenous ROS production, inhibition of cell migration and invasion and cell cycle arrest [J]. J BUON, 2021, 26(3): 1188.

[12] 吴姗姗,王柏山,严峰,等. 服用扶正抗癌方前后非小细胞肺癌患者 CD8⁺T 细胞表达 NKG2D 与其细胞毒活性的相关性分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 549-554.

[13] 王迅,王李桃,张波. 土木香内酯对 C6 脑胶质瘤细胞迁移侵袭及凋亡的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 317-322.

[14] Oliveira RC, Abrantes AM, Tralhão JG, et al. The role of mouse models in colorectal cancer research-The need and the importance of the orthotopic models [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(1): 1-8.

[15] Chen D, Shen Z, Cheng X, et al. Homeobox A5 activates p53 pathway to inhibit proliferation and promote apoptosis of adrenocortical carcinoma cells by inducing Aldo-Keto reductase family 1 member B10 expression [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 1964-1975.

[16] 辛国松,张晶,李吉业,等. 石蒜碱诱导 H₂₂ 荷瘤小鼠体内肿瘤细胞凋亡的活性及机制研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(5): 571-577.

[17] 马永超,杜晓鹏,李海龙,等. 白细胞介素-6 对胰腺癌荷瘤小鼠移植瘤生长及 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响 [J]. 解剖学报, 2020, 51(2): 216-219.

[18] Yenmis G, Besli N, Yaprak Saraç E, et al. Metformin promotes apoptosis in primary breast cancer cells by downregulation of cyclin D1 and upregulation of P53 through an AMPK-alpha independent mechanism [J]. Turk J Med Sci, 2021, 51(2): 826-834.

[19] Stefanowicz-Hajduk J, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, et al. Bersaldeenin-1, 3, 5-orthoacetate induces caspase-independent cell death, DNA damage and cell cycle arrest in human cervical cancer HeLa cells [J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 54-65.

[20] Mohiuddin M, Kasahara K. Pemetrexed disodium heptahydrate induces apoptosis and cell-cycle arrest in non-small-cell lung cancer carrying an EGFR exon 19 deletion [J]. Anticancer Res, 2021, 41(6): 2963-2977.

[21] 杨涛,祁烁,张雅月,等. 基于网络药理学探索芪甲扶正方治疗非小细胞肺癌的分子机制 [J]. 中医学报, 2019, 34(11): 2417-2424.

刘义琴,朱婷婷,毛海霞,等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾纤维化过程中铁死亡相关因子的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 85-91.

Liu YQ, Zhu TT, Mao HX, et al. Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 85-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.011

腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾纤维化过程中铁死亡相关因子的变化

刘义琴^{1,2,3}, 朱婷婷^{1,2,3}, 毛海霞^{1,2,3}, 康婷^{1,2,3}, 张丽玲^{1,2,3}, 吴蔚桦^{1,2,3}, 欧三桃^{1,2,3*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000;2.四川省肾脏病临床医学研究中心, 四川 泸州 646000;
3.代谢性血管疾病四川省重点实验室, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾铁死亡相关因子的变化并探讨铁死亡参与慢性肾病进展的机制。**方法** 20 只大鼠随机分为对照组(Con)和模型组(CKD),CKD 组予以 2.5%腺嘌呤灌胃诱导,所有大鼠于 6 周末处死。留取大鼠血样检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr);HE 染色观察肾病理改变;Masson 染色观察肾小管间质纤维化情况;检测肾组织铁含量、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量;免疫组化染色观察过氧化物酶 4(GPX4)以及 4-羟基壬烯醛(4-HNE)蛋白的表达;Western blot 法检测铁死亡相关蛋白胱氨酸转运蛋白系统 X^{c-} 亚基 SLC7A11、过氧化物酶 4(GPX4)以及铁代谢相关蛋白转铁蛋白受体 1(TFR-1)、铁蛋白重链(FTH)、铁蛋白轻链(FTL)、膜铁转运蛋白(FPN)的蛋白表达情况。分析铁含量、MDA 含量、GSH 水平与肾间质纤维化的相关性。**结果** 与 Con 组相比,CKD 组大鼠血清 BUN、Scr 均明显增加($P<0.05$),HE 染色和 Masson 染色见明显肾小管扩张及间质纤维化,铁含量以及 MDA 含量明显升高($P<0.05$),GSH 含量明显降低($P<0.05$);免疫组化显示,与 Con 组相比,CKD 组 4-HNE 蛋白表达明显增加,GPX4 蛋白表达明显减少。Western blot 结果显示,与 Con 组相比,CKD 组的 SLC7A11、GPX4、TFR-1、FPN 蛋白表达明显减少,而 FTH、FTL 蛋白表达明显增加。相关性分析提示铁含量、MDA 含量与肾纤维化相对面积(%)呈正相关、GSH 含量与肾纤维化相对面积(%)呈负相关。**结论** 在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中存在铁死亡,并可能通过 GSH-GPX4 轴参与 CKD 肾纤维化进展。

【关键词】 慢性肾病;铁死亡;纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0085-07

Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease

LIU Yiqin^{1,2,3}, ZHU Tingting^{1,2,3}, MAO Haixia^{1,2,3}, KANG Ting^{1,2,3}, ZHANG Liling^{1,2,3},
WU Weihua^{1,2,3}, OU Santao^{1,2,3*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000. 3. Sichuan Key Laboratory of Metabolic Vascular Diseases, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe expression of ferroptosis-related factors in an adenine-induced chronic kidney disease model, and investigate the mechanism of ferroptosis in the pathological process of chronic kidney disease. **Methods** Twenty rats were randomly divided into a control group (Con) and model group (CKD). The CKD model was established

【基金项目】 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目基金(2021LZXNYD-J11)。

【作者简介】 刘义琴(1995—),女,硕士研究生,研究方向:肾纤维化。E-mail: lyq2587@163.com

【通信作者】 欧三桃(1976—),女,教授,硕士研究生导师,研究方向:肾纤维化。E-mail: ousantao@163.com

by 2.5% adenine gavage. All rats were sacrificed after 6 weeks. Blood samples were collected to measure serum urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr). HE staining was performed to observe renal pathological changes. Masson staining was performed to observe interstitial fibrosis of renal tubules. Iron, malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) concentrations were measured. Western blot was performed to detect the protein expression of iron ferroptosis-related proteins including systemic X^{cr} subunit SLC7A11, peroxidase 4 (GPX4), and iron metabolism-related proteins including transferrin receptor 1 (TFR-1), ferritin heavy chain (FTH), ferritin light chain (FTL), and membrane iron transporter protein (FPN). Correlations between iron, MDA and GSH levels and interstitial renal fibrosis were analyzed.

Results Compared with the Con group, serum urea nitrogen and serum creatinine were significantly increased in the CKD group ($P<0.05$). HE and Masson staining showed significant tubular dilatation and interstitial fibrosis. Iron and MDA concentrations were significantly increased ($P<0.05$), and the GSH concentration was significantly decreased ($P<0.05$). Immunohistochemistry showed that, 4-HNE protein expression was significantly increased and GPX4 protein expression was significantly decreased in the CKD group compared with the Con group. Western blot showed that SLC7A11, GPX4, TFR-1, and FPN protein expression was significantly decreased, while FTH and FTL expression was significantly increased compared with the Con group. Correlation analysis indicated that iron and MDA concentrations were positively correlated to the relative area (%) of renal fibrosis, and the GSH concentration was negatively correlated with them.

Conclusions Ferroptosis is present in the adenine-induced CKD rat model and may be involved in renal fibrosis progression in CKD via the GSH-GPX4 axis.

【Keywords】 chronic kidney disease; ferroptosis; fibrosis

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

慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)是一个全球性的公共卫生问题,影响全球 8%~16%的人口^[1]。CKD 发病机制复杂,肾小管间质纤维化是 CKD 的主要病理表现,也被认为是通向终末期肾病(end stage renal disease,ESRD)的最终共同途径^[2]。铁死亡是一种区别于细胞凋亡的细胞死亡方式,其特征是依赖铁的脂质过氧化物积累至致死水平^[3],现在被认为是参与肾疾病的关键靶点之一^[4-5]。近来的研究表明铁死亡是肾纤维化发病机制中的一个重要病理生理改变,在多柔比星诱导的肾纤维化动物模型中,观察到肾非血红素铁水平和肾前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)的 mRNA 表达增加^[6]。在单侧输尿管梗阻和缺血再灌注损伤构建的肾纤维化小鼠模型中,也观察到 GPX4 的表达下调,脂质过氧化物 4-HNE 的表达上调^[7-8]。这表明铁死亡可能在肾纤维化中发挥重要作用。但目前,对慢性肾病中铁死亡的直接研究仍非常有限,在腺嘌呤诱导的 CKD 模型中是否也发生了铁死亡尚不清楚,因此本研究旨在探讨腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型肾中是否存在铁死亡,及其是否参与肾纤维化进程及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5~6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 20 只,体重 190

~230 g,购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2018-0017],饲养于西南医科大学动物研究中心[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU20210350),并遵循实验动物的 3R 原则,所有大鼠均在相对湿度 70%,环境温度(24±2)℃,12 h/12 h 明暗交替条件下进行喂养。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471-100G, Sigma, 美国);组织铁测定试剂盒及丙二醛(MDA)测定试剂盒(A039-2-1, A003-1, 南京建成, 中国);GSH 和 GSSG 检测试剂盒(S0053, 碧云天, 中国);兔 SP 试剂盒(SP-9000, 中杉金桥, 中国);HE 染色(C0105 S, 碧云天, 中国);Masson 三色染色液(BA7049B, 贝索生物, 中国);兔单抗-xCT Antibody (SLC7A11)、兔单抗-GPX4 Antibody、兔单抗-Transferrin Receptor (CD71)、Antibody(TFR-1)、兔单抗-Ferritin Antibody (FTH)、兔单抗-Ferritin Light Chain Antibody (FTL) (T57046、T56959、T56618、T55648、T56955, Abmart, 中国);兔多抗-FPN Antibody (F13581, Affinity, 中国);兔单抗-4-HNE (ab46545, Abcam, 英国);兔单抗-GAPDH (10494-1-AP, proteintech, 中国)。光学显微镜(Nikon, 日本);自动酶标仪(BioTek 公司, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的构建与分组

20 只大鼠被随机分为对照组(Con)(n=10)和

模型组 (CKD) ($n = 10$)。所有大鼠自由进食和饮水,昼夜节律光照,适应性喂养 1 周后,CKD 组给予 2.5%腺嘌呤混悬液 250 mg/kg 灌胃,1~3 周每天灌胃 1 次,4~6 周隔天灌胃 1 次;Con 组给予等量生理盐水灌胃,灌胃期间所有大鼠予以普通饲料直至实验结束。

1.3.2 组织取材与血液留取

造模第 6 周末,2%戊巴比妥钠以 50 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,下腔静脉取血,离心取上清以检测肾功能。取双肾,一部分置于 4%的多聚甲醛中,常规石蜡包埋后切片以备病理染色及免疫组化,另一部分置于-80℃冰箱中备用。

1.3.3 大鼠肾功能检测

使用自动生化分析仪检测血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (SCr)。

1.3.4 肾组织形态学

HE 染色:石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,苏木素染色液染色 5 min,自来水冲洗 10 min,伊红染色液染色 30 s,脱水透明后中性树胶封片。

Masson 染色:石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,铁苏木素 A 液与 B 液等比例混合制备 Weigert 染色液,滴于切片上染 10 min,流水稍洗。1%盐酸酒精分化 5 s,流水冲洗 10 min,丽春红酸性品红染液染 8 min,流水稍洗,磷钼酸溶液 5 min,苯胺蓝复染 5 min。1%冰醋酸处理 1 min,脱水透明后中性树胶封片。采用 Image J 软件对胶原纤维的蓝色阳性区域进行半定量分析。

1.3.5 检测大鼠肾组织铁含量、MDA 和 GSH 含量

取肾组织,用预冷的 PBS 研磨,制备 10%的组织匀浆,离心取上清液。BCA 法测定蛋白浓度后,TBA 法检测匀浆中 MDA 含量,比色法检测组织铁含量;并按照 GSH 与 GSSG 试剂盒说明书制备匀浆,检测 GSH 含量。

1.3.6 免疫组化染色检测 GPX4 及 4-HNE 蛋白表达

石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量的封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 10 min 后倾去血清。滴加适量一抗,4℃孵育过夜,PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 10

min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 10 min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量新鲜配制的 DAB 显色液,室温孵育 1 min 苏木素复染,流水冲洗 10 min。脱水、透明、中性树胶封片。采用 Image-Pro Plus 软件,对阳性表达进行定量分析。

1.3.7 Western blot 检测肾组织 SLC7A11、GPX4、TFR-1、FTH、FTL、FPN 蛋白的表达

RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂 (PMSF) 按 1000:10 的体积配置裂解液,取适量组织加入裂解液提取蛋白,碧云天 BCA 法计算出蛋白的浓度,根据不同的分子量选择 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离后转移至 PVDF 膜上;5%脱脂牛奶封闭 1 h,含 0.05% Tween-20 的 TBST 洗涤 10 min×3 次;一抗 4℃过夜孵育;TBST 洗涤 10 min×3 次;二抗稀释液 (1:10000) 摇床上摇动,室温孵育 1 h;TBST 洗涤 10 min×3 次。ECL 化学发光液孵育膜数秒后于凝胶成像分析系统中曝光采集图像。使用 Image J 软件对蛋白条带进行分析。

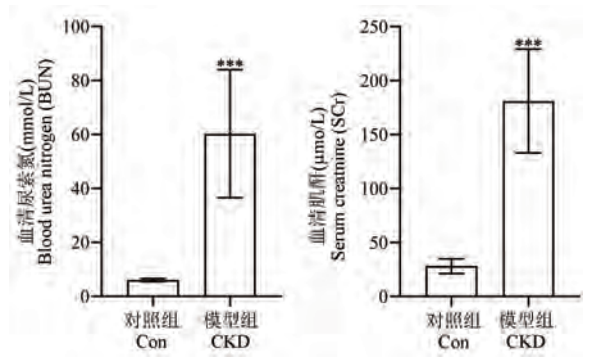
1.4 统计学方法

统计学分析使用 GraphPad Prism 9.0 软件,用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,两变量间相关性分析用 Pearson 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠肾功能情况

与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾功能指标 (BUN、SCr) 均明显升高 ($P < 0.001$)。见图 1。



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。
图 1 血尿素氮和肌酐水平
Note. Compared with the Con group, *** $P < 0.001$.
Figure 1 The level of blood urea nitrogen and serum creatinine

2.2 两组大鼠肾病理改变

HE 染色结果显示,Con 组肾小球、肾小管及肾间质结构及形态清晰,未见明显异常;CKD 组肾结构紊乱,肾小球数量明显减少、萎缩,囊腔扩张明显,肾小管可见明显扩张,管腔内可见棕黄色沉积物明显增多,管腔断裂,肾间质血管减少。Masson 染色结果显示:与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾小管间质胶原纤维沉积明显增加($P<0.001$)。见图 2。

2.3 两组大鼠肾组织铁含量和氧化应激变化情况

与 Con 组相比,CKD 组铁含量、MDA 含量明显升高,GSH 含量明显降低,且差异具有统计学意义

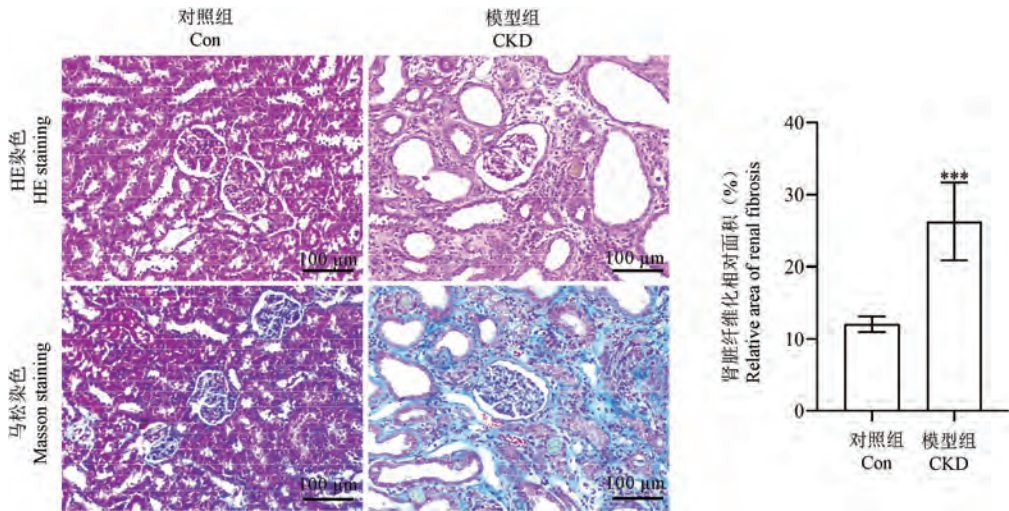
($P<0.001$)。见图 3。

2.4 两组大鼠肾组织 GPX4 和 4-HNE 免疫组化结果

免疫组化结果显示,与 Con 组相比,CKD 组 GPX4 蛋白表达明显减少($P<0.01$),而 4-HNE 表达明显增加($P<0.001$)。见图 4。

2.5 两组大鼠肾组织 SLC7A11 和 GPX4 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示,与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达均明显减少($P<0.01$)。见图 5。

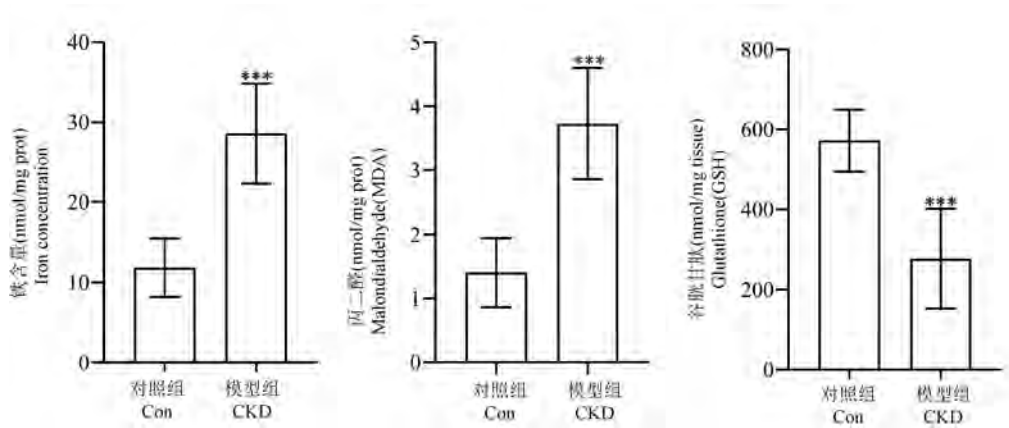


注:与对照组相比, *** $P<0.001$ 。

图 2 HE 和 Masson 染色结果

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

Figure 2 The result of HE and Masson staining

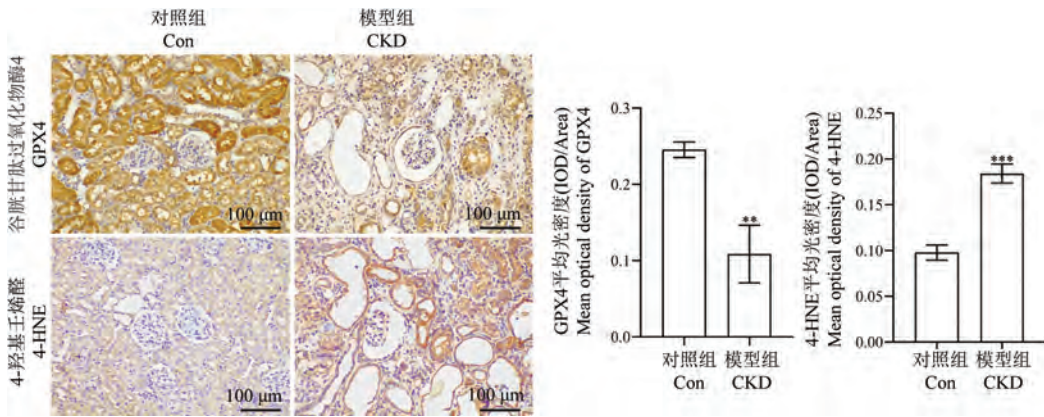


注:与对照组相比, *** $P<0.001$ 。

图 3 铁含量、MDA 和 GSH 含量

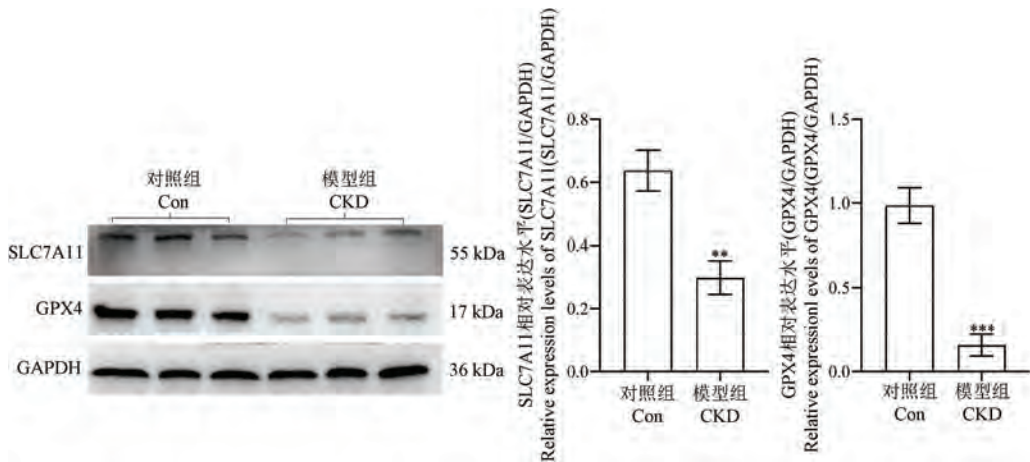
Note. Compared with the Con group, *** $P<0.001$.

Figure 3 The concentration of iron, MDA and GSH



注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 4 GPX4 和 4-HNE 免疫组化结果
Note. Compared with the Con group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Immunohistochemical results of GPX4 and 4-HNE



注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 5 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平
Note. Compared with the Con group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 The protein expression level of SLC7A11 and GPX4

2.6 两组大鼠肾组织 TFR-1、FTH、FTL、FPN Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示,与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾 TFR-1 和 FPN 蛋白表达明显减少($P<0.05$),FTH 表达明显升高($P<0.01$),FTL 的表达明显升高($P<0.05$)。见图 6。

2.7 相关性分析

相关性分析结果显示,铁含量、MDA 含量与肾纤维化相对面积(%)呈正相关、GSH 含量与肾纤维化相对面积(%)呈负相关($r=0.8357, P<0.05$; $r=0.8432, P<0.05$; $r=-0.9525, P<0.001$)。见图 7。

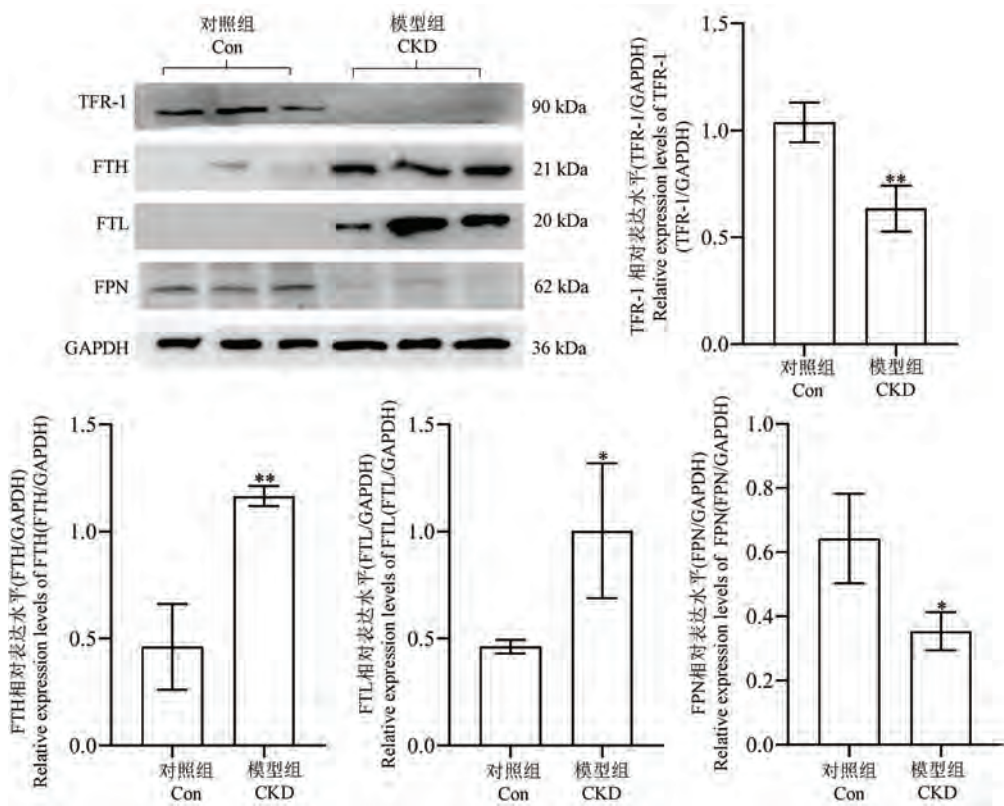
3 讨论

大多数 CKD 患者表现出不同程度的铁代谢和

脂质代谢紊乱,这为铁死亡提供了有利条件。然而,铁死亡在 CKD 中的作用仍知之甚少。本研究通过腺嘌呤灌胃建立 CKD 大鼠模型,观察 CKD 中是否存在铁死亡以及铁死亡参与 CKD 纤维化可能的机制。

现有研究已经证实,腺嘌呤灌胃诱导的 CKD 大鼠模型通过促进肾小管间质纤维化、肾小管萎缩和晶体形成,较好地模拟了人类 CKD 的进展,故而成为目前广泛采用的诱导 CKD 的造模方式^[9]。本研究中我们沿用前期模型构建方法^[10],结果显示,CKD 大鼠肾功能异常,肾结构紊乱,肾小管间质纤维沉积明显,证实成功建立了 CKD 模型。

近年来的研究发现铁死亡与不同实验动物模型中肾纤维化的发展有关,例如糖尿病肾病、高脂



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 6 铁代谢相关蛋白表达水平

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

Figure 6 The expression level of iron metabolism-related protein

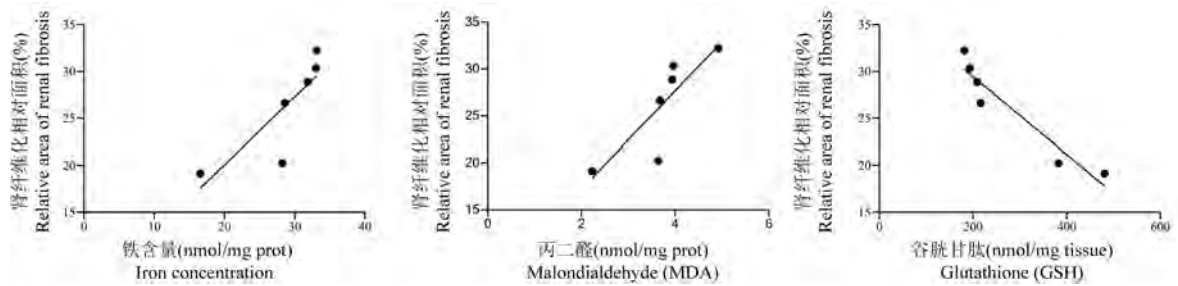


图 7 相关性分析

Figure 7 Correlation analysis

饮食引起的肾损伤、叶酸引起的肾损伤、单侧输尿管梗阻(UUO)、缺血/再灌注损伤(IRI)和5/6肾切除术引起的慢性肾病^[11]。Zhang等^[12]在5/6肾切除术诱导的CKD大鼠模型中发现,肾小管上皮细胞铁死亡会触发促纤维化介质TGF- β 、CTGF和PDGF等的分泌,这些介质随后以旁分泌方式调节间质成纤维细胞的增殖和分化。在本研究中,我们发现CKD组肾中的铁含量、MDA含量明显增加,GSH含量明显减少,且与肾间质纤维化之间存在显著相关性。进一步的免疫组化结果发现在CKD大鼠模型

中GPX4表达明显减少,而4-HNE的蛋白表达明显增加。4-HNE是脂质过氧化的终产物之一,而GPX4作为一种调节铁死亡的关键基因,在CKD大鼠小管的表达明显减少,这表明铁死亡可能参与了腺嘌呤诱导的CKD肾纤维化进展。

氨基酸代谢在铁死亡中也起着重要作用。抑制系统X^{c-}(system X^{c-}, xCT)的活性会通过抑制胱氨酸的吸收来影响GSH的合成,导致谷胱甘肽过氧化物酶活性降低,细胞抗氧化能力下降,脂质ROS积累,最终发生氧化损伤和铁死亡^[13]。为了进一步

探讨 CKD 大鼠模型中铁死亡的发生机制,我们分析了肾组织中 GSH 含量和 GPX4 的蛋白表达情况,结果发现 CKD 组 GSH 含量降低,GPX4 蛋白表达降低。SLC7A11 是 xCT 中的转运催化亚基,也是铁死亡的重要标志物^[14]。SLC7A11 过表达可显著恢复 GSH 水平并减弱脂质过氧化,从而恢复细胞活力^[15]。我们进一步在 CKD 大鼠肾组织中检测到 SLC7A11 蛋白含量显著降低。综上,提示在 CKD 大鼠中由于 xCT 受到抑制,GSH 与 GPX4 表达下调,可能导致了组织抗氧化能力减弱,最终诱发铁死亡。

CKD 中的铁代谢极其复杂,在生理条件下铁调节蛋白表达水平正常的人,不会发生肾铁蓄积^[16]。然而,在 CKD 时,铁转运蛋白降低以及铁蛋白和转运铁到细胞中的蛋白上调^[16],管状铁沉积通过芬顿反应促进超氧自由基的产生,从而导致脂质过氧化,引起细胞损伤^[17-19]。我们通过检测与铁代谢相关的蛋白质来寻找铁沉积的原因。结果发现,CKD 组中 TFR-1 和 FPN 蛋白表达降低,FTH、FTL 表达明显升高,这与 Wang 等^[20]的研究一致。可能是由于 CKD 时,FPN 表达显著下调,胞内的铁无法排出,引起铁含量增加,肾处于升高的负反馈控制水平,TFR-1 蛋白下调,细胞应激增加铁储存蛋白 FTH、FTL 的表达,以通过增加铁储存来维持铁稳态。

综上所述,在腺嘌呤诱导的 CKD 模型中存在铁沉积和脂质过氧化的铁死亡特征性表现,且可能通过 GSH-GPX4 轴参与 CKD 肾纤维化的发生发展。后续的研究可从细胞水平进一步验证,并使用 ferrostatin-1 和 liproxstatin-1 等铁死亡抑制剂进行干预,以期为 CKD 肾纤维化防治提供新靶点,抑制肾铁死亡或许是治疗 CKD 有前景的策略。

参考文献:

- [1] Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. JAMA, 2019, 322 (13): 1294-1304.
- [2] Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, et al. Mouse models of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 27-45.
- [3] Dixon S, Lemberg K, Lamprecht M, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [4] Wang J, Liu Y, Wang Y, et al. The cross-link between ferroptosis and kidney diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6654887.
- [5] Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, et al. Ferroptosis and

- necroptosis in the kidney [J]. Cell Chem Biol, 2020, 27(4): 448-462.
- [6] Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(7): 2672-2680.
- [7] Ikeda Y, Ozono I, Tajima S, et al. Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e89355.
- [8] Zhou L, Xue X, Hou Q, et al. Targeting ferroptosis attenuates interstitial inflammation and kidney fibrosis [J]. Kidney Dis (Basel), 2022, 8(1): 57-71.
- [9] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(1): 5-11.
- [10] 毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 70-77, 135.
- [11] Zhou J, Tan Y, Wang R, et al. Role of ferroptosis in fibrotic diseases [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 3689-3708.
- [12] Zhang B, Chen X, Ru F, et al. Liproxstatin-1 attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by inhibiting renal tubular epithelial cells ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 843.
- [13] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88.
- [14] Wang Y, Yang L, Zhang X, et al. Epigenetic regulation of ferroptosis by H2B monoubiquitination and p53 [J]. EMBO Rep, 2019, 20(7): e47563.
- [15] Hong T, Lei G, Chen X, et al. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer [J]. Redox Biol, 2021, 42: 101928.
- [16] van Raaij S, van Swelm R, Bouman K, et al. Tubular iron deposition and iron handling proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9353.
- [17] Ueda N, Baliga R, Shah SV. Role of 'catalytic' iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome [J]. Kidney Int, 1996, 49(2): 370-373.
- [18] Sheerin NS, Sacks SH, Fogazzi GB. *In vitro* erythrophagocytosis by renal tubular cells and tubular toxicity by haemoglobin and iron [J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(6): 1391-1397.
- [19] Sponsel HT, Alfrey AC, Hammond WS, et al. Effect of iron on renal tubular epithelial cells [J]. Kidney Int, 1996, 50(2): 436-444.
- [20] Wang J, Wang Y, Liu Y, et al. Ferroptosis, a new target for treatment of renal injury and fibrosis in a 5/6 nephrectomy-induced CKD rat model [J]. Cell Death Discov, 2022, 8 (1): 127.

杜晨飞,韩磊,范围,等. 熟地黄多糖调控 lncRNA MEG3 对碘乙酸钠致骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 92-99, 122.

Du CF, Han L, Fan W, et al. Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced chondrocyte damage in osteoarthritis regulated by lncRNA MEG3 [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 92-99, 122.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.012

熟地黄多糖调控 lncRNA MEG3 对碘乙酸钠致骨关节炎软骨细胞损伤的保护作用

杜晨飞¹, 韩磊², 范围³, 李红旗⁴, 郑福增^{1*}

(1.河南省中医院关节科, 郑州 450053; 2.河南中医药大学骨伤学院, 郑州 450046; 3.河南省中医院风湿病科, 郑州 450053; 4.河南省中医院创伤外科, 郑州 450053)

【摘要】 目的 探讨熟地黄多糖(RGP)调控长链非编码 RNA(lncRNA)母系表达基因 3(MEG3)对碘乙酸钠(MIA)诱导的骨关节炎(OA)软骨细胞凋亡的影响。**方法** 培养大鼠软骨细胞,不同浓度 MIA(0、1、2、4、8 μmol/L)诱导建立软骨细胞损伤模型,并给予不同浓度 RGP(50、100、200、400、800 mg/mL)处理筛选合适的实验浓度。实验分为正常组、MIA 组、RGP 组、RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组,Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测细胞活力;Hoechst 33258 染色及流式细胞术检测细胞凋亡情况;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测细胞中 MEG3、金属蛋白酶 13(MMP-13)、Ⅱ型胶原 α1(COL2A1)和蛋白聚糖(ACAN)mRNA 水平;蛋白免疫印迹(Western blot)检测细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、p-PI3K、丝/苏氨酸激酶(AKT)、p-AKT、BAX、BCL-2、caspase3 蛋白表达水平。**结果** MIA 以剂量依赖性方式降低软骨细胞活力,诱导细胞凋亡,并降低 MEG3 和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平,升高 MMP-13 mRNA 水平($P<0.05$)。100、200、400、800 mg/mL RGP 可升高软骨细胞活力及 MEG3 水平($P<0.05$)。与正常组相比,MIA 组细胞活力、MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平降低,细胞凋亡率、MMP-13 mRNA 和 BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组细胞活力、MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 和 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平升高,细胞凋亡率、MMP-13 mRNA 和 BAX、caspase3 蛋白水平降低($P<0.05$);敲低 MEG3 可减弱 RGP 对 MIA 诱导的软骨细胞损伤的保护作用。**结论** RGP 可促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制细胞凋亡,减轻 MIA 诱导的软骨细胞损伤,其作用机制可能与上调 MEG3 表达,诱导 PI3K/AKT 通路活化有关。

【关键词】 熟地黄多糖;长链非编码 RNA;母系表达基因 3;骨关节炎;软骨细胞;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0092-08

Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced chondrocyte damage in osteoarthritis regulated by lncRNA MEG3

DU Chenfei¹, HAN Lei², FAN Wei³, LI Hongqi⁴, ZHENG Fuzeng^{1*}

(1. Department of Arthritis, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China.
2. College of Orthopedics, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046.
3. Department of Rheumatology, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053.
4. Department of Trauma Surgery, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053)

【基金项目】 河南中医药大学科研苗圃工程项目(MP2020-13)。

【作者简介】 杜晨飞(1990—),男,硕士,主治医师,研究方向:中医骨伤。E-mail:dchenfei@163.com

【通信作者】 郑福增(1962—),男,主任中医师,博士生导师,研究方向:中医药防治风湿病。E-mail:zhengfuzengyx@126.com

[Abstract] Objective To explore the effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide (RGP) on apoptosis of osteoarthritis (OA) chondrocytes induced by sodium iodoacetate (MIA) via the regulation of long-chain non-coding RNA (lncRNA) maternal expression gene 3 (MEG3). **Methods** Rat chondrocytes were cultured with MIA 0, 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ to induce chondrocyte injury, and were then treated with RGP 50, 100, 200, 400, and 800 mg/mL , respectively, to detect the appropriate experimental concentration. Rats were divided into a normal group, MIA group, RGP group, RGP+control (NC) small interfering RNA (siRNA) group, and RGP+si-MEG3 group. Cell viability was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay and apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and flow cytometry. mRNA levels of *MEG3*, metalloproteinase 13 (*MMP-13*), type II collagen- $\alpha 1$ (*COL2A1*), and proteoglycan (*ACAN*) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction. Protein levels of PI3K, phospho (p) PI3K, serine/threonine kinase (AKT), p-AKT, BAX, BCL-2, and caspase3 were detected by Western blot. **Results** MIA decreased chondrocyte viability and induced apoptosis in a dose-dependent manner, decreased *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA levels, and increased *MMP-13* mRNA levels ($P<0.05$). RGP 100, 200, 400, and 800 mg/mL increased chondrocyte viability and *MEG3* levels ($P<0.05$). Cell viability, *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA, and p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and BCL-2 protein levels were decreased in the MIA group compared with the control group, while the apoptosis rate, *MMP-13* mRNA, and BAX and caspase3 protein levels were increased ($P<0.05$). Cell viability, *MEG3*, *COL2A1*, and *ACAN* mRNA, and p-PI3K/PI3K, P-AKT/AKT, and BCL-2 protein levels were increased in the RGP group compared with the MIA group, while the apoptosis rate, *MMP-13* mRNA, and BAX and caspase3 protein levels were decreased ($P<0.05$). Knockdown of *MEG3* weakened the protective effect of RGP on MIA-induced chondrocyte injury. **Conclusions** RGP can promote the synthesis of chondrocyte extracellular matrix and inhibit cell apoptosis and MIA-induced chondrocyte damage, possibly acting via a mechanism related to the up-regulation of *MEG3* expression and induction of PI3K/AKT pathway activation.

[Keywords] *Rehmannia glutinosa* polysaccharide; long non-coding RNA; maternally expressed gene 3; osteoarthritis; chondrocytes; apoptosis

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

软骨病变作为骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 发生的重要一环,作为软骨唯一细胞的软骨细胞一旦凋亡严重或死亡,则将致细胞再生缓慢,或无法再生,加剧 OA^[1-2],因此,对软骨细胞的保护是防治 OA 的重要途径。目前,OA 的治疗,尤其是非甾体抗炎药的治疗效果不佳,并且与胃肠道出血和心血管损伤等不良反应有关^[3]。因此,包括中药在内的天然产物及其活性成分在缓解软骨细胞损伤中备受关注。

中医治疗 OA 有着悠久的历史。熟地黄是一种在治疗 OA 的中药方剂 (如右归丸^[4]) 中被广泛使用的传统中药,具有温补肾阳、填精益髓的功效。其中熟地黄多糖 (*Rehmannia glutinosa* polysaccharide, RGP) 是其主要成分之一,不仅具有造血、抗氧化、提高机体免疫力作用,还具有抑制软骨细胞凋亡的作用,对于改善 OA 有一定意义^[5]。然而,关于 RGP 保护软骨细胞损伤的机制研究鲜有报道。研究显示,磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K)/丝/苏氨酸激酶 (serine/threonine kinase, AKT) 通路可能是 RGP 改善 OA 的作用靶点^[6]。PI3K/AKT 通路对于软骨细

胞生长、抗软骨细胞凋亡以及基质重塑均具有重要调控作用^[7]。

已有研究发现长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 母系表达基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) 在 OA 中低表达,影响细胞增殖和凋亡,为 OA 的重要分子靶标^[8]。此外, lncRNA MEG3 被报道可通过激活 PI3K/AKT 通路增强癫痫大鼠海马神经元细胞活力并抑制细胞凋亡^[9]。表明 lncRNA MEG3 可调控 PI3K/AKT 通路的活化。基于以上研究,笔者推测 RGP 调控 PI3K/AKT 通路影响 OA 进展的分子机制可能与 lncRNA MEG3 有关。因此,本研究采用碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 诱导软骨细胞建立 OA 细胞模型^[10],通过使用 RT-qPCR、CCK-8 法、Hoechst 33258 染色、流式细胞术及蛋白免疫印迹 (Western blot) 探究 RGP 对软骨细胞损伤的影响,并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5 只健康 SD 大鼠购自北京维通利华 [SCXK

(京)2021-0011], SPF 级, 雄性, 6 周龄, 体重 200~220 g。在温度 (24±1) °C 及湿度 (50±5) % 条件下饲养, 定期通风环境, 自由饮水摄食, 昼夜交替各 12 h, 暂养 7 d, 饲养于河南省中医院[SYXK(豫)2021-0018]。本实验经河南省中医院动物伦理委员会批准(PZ-HNSZYY-2021-050), 符合实验动物 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

RGP(陕西慈缘生物技术有限公司, 纯度>90%); MIA(美国 Sigma 公司, 货号: 57858-5G-F); 细胞凋亡试剂盒(Hoechst 染色, 上海索莱宝生物科技有限公司, 货号: G3680); 引物购自上海生工生物工程有限公司; si-NC、si-MEG3 由广州锐博生物有限公司合成; 一抗 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2、caspase3 及抗 II 型胶原蛋白的兔多克隆抗体(英国 abcam 公司, 货号分别为: ab154598、ab131067、ab38449、ab8805、ab32503、ab32370、ab179517 及 ab34712)。DMi1 倒置相差显微镜(德国 Leica 公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司, 型号: StepOne TM); 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司, 型号: CytoFLEX); 蛋白凝胶成像仪(美国赛默飞世尔公司, 型号: E-Gel Imager)。

1.3 实验方法

1.3.1 制备大鼠软骨细胞

大鼠软骨细胞提取方法参考文献^[11]提取, 无菌操作, 将大鼠双侧膝关节胫骨坪及髌骨内侧透明软骨刮取, 用手术剪将软骨剪碎(1 mm³), 消化后得单细胞悬液, 用含 20% 胎牛血清和 100 U/mL 青链霉素的 DMEM/F-12 培养液重悬, 培养细胞传至第 2~3 代, 再进行后续实验。

1.3.2 软骨细胞的鉴定

在倒置相差显微镜下观察不同培养日和不同世代的软骨细胞形态并捕获图像。应用 II 型胶原免疫组织化学鉴定第 2 代软骨细胞: 将第 2 代软骨细胞(调整细胞悬液浓度为 5×10⁴/mL) 植入 6 孔板中的无菌圆形盖玻片上。将 6 孔板(2 mL 培养基/孔)中的软骨细胞培养 48 h, 4% 多聚甲醛室温固定 10~20 min, PBS 冲洗 2 次, 每次 5 min, 然后随机分为两组: 阳性组和阴性组; 阳性组用 100 μL 抗 II 型胶原蛋白的兔多克隆抗体(稀释度 1:200)处理, 阴性组用 100 μL PBS 处理。两组均在 4 °C 下孵育过夜。孵育后, 在 37 °C 下, 用二抗(稀释度 1:200)处理 1 h; 使用 DAB 试剂盒显色, 细胞核用苏木精染色

1 min。脱水、透明并封片, 在光学显微镜下观察并比较两组细胞的染色情况。

1.3.3 MIA 诱导建立软骨细胞损伤模型

取第 2 代软骨细胞, 制备浓度为 3×10⁵/mL 的细胞悬液, 并以每孔 100 μL 的体积接种在 96 孔板中。细胞贴壁后, 用含不同浓度 MIA(0、1、2、4、8 μmol/L)的培养基处理 24 h。然后加入 CCK-8 溶液(10 μL)孵育 2 h, 酶标仪检测各孔光密度(optical density, OD)值, 均在 450 nm 处, 细胞相对活力为实验组与正常组 OD 值之比。

1.3.4 分组及转染

实验分为正常组、MIA 组、50 mg/mL RGP 组、100 mg/mL RGP 组、200 mg/mL RGP 组、400 mg/mL RGP 组、800 mg/mL RGP 组。软骨细胞置于 96 孔板中, 正常组含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液正常培养, 其余各组添加终浓度为 4 μmol/L MIA 处理 24 h^[10], 50 mg/mL RGP 组、100 mg/mL RGP 组、200 mg/mL RGP 组、400 mg/mL RGP 组、800 mg/mL RGP 组分别另添加对应浓度 RGP, 培养 24 h。选择 200 mg/mL RGP 组进行后续分组: 正常组、MIA 组、RGP 组(200 mg/mL RGP)、RGP+si-NC 组(200 mg/mL RGP+si-NC)、RGP+si-MEG3(200 mg/mL RGP+si-MEG3)组, RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组添加 200 mg/mL RGP 基础上用 Lipofectamine 2000 分别转染 si-NC、si-MEG3。培养 24 h 后收集细胞进行后续实验。

1.3.5 CCK-8 检测 RGP 对细胞活力的影响

将经过处理的各组软骨细胞接种在 96 孔板中, 步骤同 1.3.3 细胞相对活力检测方法。

1.3.6 Hoechst 33258 染色

正常组、MIA 组、RGP 组、RGP+si-NC 组、RGP+si-MEG3 组细胞置于 6 孔板中处理 24 h, 参考细胞凋亡试剂盒(Hoechst 染色)说明书方法, 细胞爬片, 经固定、Hoechst 染色液染色, 0.9% NaCl 洗片, 添加一滴抗淬灭封片剂封片, 荧光显微镜在激发波长 350 nm、发射波长 460 nm 下观察, 细胞核呈蓝色, 每张随机观察 3 个视野。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况

软骨细胞置于 6 孔板中处理 24 h, 按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每孔 1×10⁵ 个细胞, 经 0.25% 胰蛋白酶消化、磷酸缓冲液清洗后离心 5 min, 1000 r/min, 收集细胞加入 Binding Buffer 悬浮细胞(500 μL), 后依次加入 Annexin V-

FITC 5 μL、PI 5 μL 混匀,反应 5~15 min(室温避光),并在 1 h 内检测细胞凋亡(流式细胞仪)。

1.3.8 RT-qPCR 检测细胞中 *MEG3*、金属蛋白酶 13 (*MMP-13*)、Ⅱ型胶原 α1 (*COL2A1*) 和蛋白聚糖 (*ACAN*) mRNA 水平

收集经过处理的各组软骨细胞,添加 TRIzol 试剂,提取总 RNA 后合成 cDNA,在 RT-qPCR 仪上进行扩增。20 μL 上样体系:2×Mix 10 μL、ddH₂O 8.0 μL、50 ng/μL cDNA 1 μL、上/下游引物(均为 10 μmol/L)各 0.5 μL。设置反应条件为:95℃、60 s,95℃、35 s,61℃、40 s,40 个循环。*MEG3*、*MMP-13*、*COL2A1* 和 *ACAN* mRNA 表达水平进行定量分析,2^{-ΔΔCt} 法计算。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Genes	序列 Primer sequences
<i>MEG3</i>	F:5' -TTGCAACCCTCCTGGAATAG-3'
	R:5' -AGTCTTGGGTCCAGCATGTC-3'
<i>ACAN</i>	F:5' -GCAGACCAGGAGGATGTGAGG-3'
	R:5' -GTTGACAACTCCTGCTCCTCG-3'
<i>COL2A1</i>	F:5' -GCTCCCAGAACATCACCTACCA-3'
	R:5' -ACCTGCTATTGCCCTCTGCC-3'
<i>MMP-13</i>	F:5' -ATTAAGGAGCATGGCGACTTCT-3'
	R:5' -CCCAGGAGGAAAAGCATGAG-3'
<i>β-actin</i>	F:5' -CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
	R:5' -GTCATCCATGGCGAACTGGT-3'

1.3.9 Western blot 检测细胞中蛋白表达水平

软骨细胞置于 6 孔板中处理 24 h,磷酸缓冲液清洗细胞,冰上裂解 10 min 后离心 20 min,12 000 r/min,上清为总蛋白。蛋白浓度采用 BCA 检测,每孔上样 20 μg,凝胶电泳分离蛋白、PVDF 膜转膜,脱脂奶粉(5%)孵育 2 h,温度室温,分别加入一抗 PI3K(1:1000)、p-PI3K(1:1000)、AKT(1:500)、p-AKT(1:500)、BAX(1:1000)、BCL-2(1:1000)、caspase3(1:1000)、β-actin(1:2000),孵育过夜(4℃);加入对应二抗(1:2000)孵育 1 h(室温)。ECL 显影并用蛋白凝胶成像仪拍照分析。

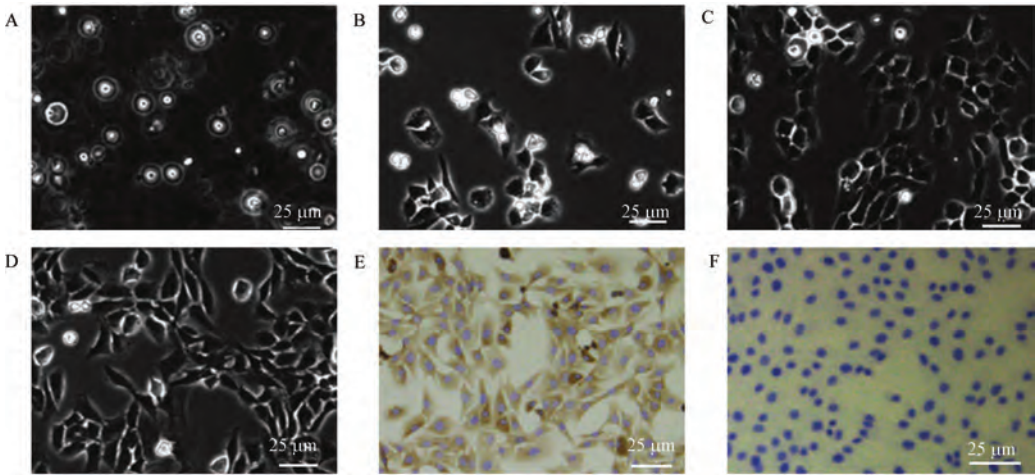
1.4 统计学方法

数据分析应用 SPSS 24,计量数据用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间单因素方差分析,组间两两比较 *SNK-q* 检验。*P*<0.05,则为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鉴定大鼠软骨细胞

倒置相差显微镜下观察到,培养 0 d 的大鼠关节软骨细胞呈球形,均匀悬浮在培养基中(图 1A)。培养 2 d 后,大部分细胞贴附在培养瓶上,形状不规则(图 1B)。第 1 代和第 2 代软骨细胞在培养 2 d 后形态呈圆形或椭圆形变化(图 1C、1D)。倒置相



注:A,培养 0 d 的软骨细胞;B,培养 2 d 的软骨细胞;C,软骨细胞在 1 次传代后培养 2 d;D,软骨细胞在 2 次传代后培养 2 d。E、F:通过Ⅱ型胶原免疫组织化学鉴定软骨细胞,阳性第 2 代软骨细胞的细胞质被染成棕色,阴性对照细胞未染色。

图 1 大鼠软骨细胞的鉴定

Note. A, Chondrocytes cultured for 0 d. B, Chondrocytes cultured for 2 d. C, Chondrocytes were cultured for 2 d after one passage. D, Chondrocytes were cultured for 2 d after two passages. E/F, Chondrocytes were identified by type II collagen immunohistochemistry, cytoplasm of positive 2nd generation chondrocytes was stained brown, negative control cells were not stained.

Figure 1 Identification of rat chondrocytes

差显微镜下,阳性组软骨细胞胞质呈棕褐色(图 1E),而阴性组软骨细胞的细胞质未染色(图 1F)。由于第 2 代关节软骨细胞表现出典型的软骨细胞形态和丰富的 II 型胶原蛋白,因此用于后续实验。

2.2 MIA 诱导的软骨细胞损伤模型的鉴定

与 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比,2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组软骨细胞活力、MEG3 和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,凋亡率、MMP-13 mRNA 水平升高 ($P<0.05$),且呈剂量依赖性(图 2,表 2)。其中,4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 对软骨细胞活力的抑制作用接近半数抑制浓度,因此选择 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 进行后续实验。

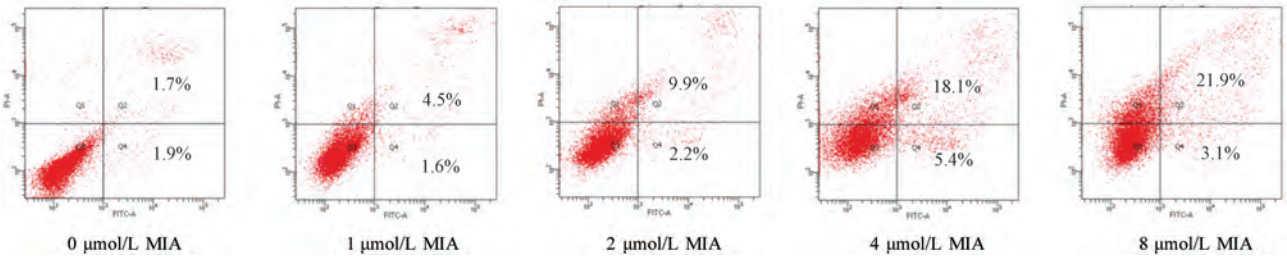


图 2 软骨细胞凋亡情况(流式细胞术)

Figure 2 Apoptosis of chondrocytes(flow cytometry)

表 2 不同浓度 MIA 作用下软骨细胞活力、细胞凋亡率及 mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)						
Table 2 Comparison of chondrocyte viability, apoptosis rate and mRNA levels under different concentrations of MIA						
MIA ($\mu\text{mol/L}$)	细胞活力 Cell viability	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate	MEG3	MMP-13 mRNA	COL2A1 mRNA	ACAN mRNA
0	1.00±0.08	3.58±0.51	1.01±0.10	0.99±0.11	1.00±0.09	1.02±0.12
1	0.90±0.09 [*]	6.12±0.67 [*]	0.90±0.08 [*]	1.24±0.13 [*]	0.85±0.08 [*]	0.79±0.09 [*]
2	0.72±0.07 ^{*#}	12.30±0.89 ^{*#}	0.52±0.07 [*]	1.59±0.16 [*]	0.67±0.07 [*]	0.55±0.07 [*]
4	0.54±0.06 ^{*#△}	22.79±1.14 ^{*#△}	0.37±0.05 ^{*#}	1.82±0.18 ^{*#}	0.42±0.05 ^{*#}	0.31±0.04 ^{*#}
8	0.36±0.05 ^{*#△▲}	25.08±1.26 ^{*#△▲}	0.21±0.04 ^{*#△▲}	2.03±0.19 ^{*#△▲}	0.30±0.04 ^{*#△▲}	0.20±0.03 ^{*#△▲}

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, $^*P<0.05$;与 1 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, $^{\#}P<0.05$;与 2 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 组相比, $^{\blacktriangle}P<0.05$ 。
Note. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, $^*P<0.05$. Compared with 1 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, $^{\#}P<0.05$. Compared with 2 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

表 3 不同浓度 RGP 作用下细胞活力及 MEG3 水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)		
Table 3 Comparison of cell viability and MEG3 level under different concentrations of RGP		
组别 Group	细胞活力 Cell viability	MEG3
正常 Normal	1.01±0.09	0.99±0.11
MIA	0.57±0.06 [*]	0.35±0.04 [*]
50 mg/mL RGP	0.69±0.07 [*]	0.46±0.05 [*]
100 mg/mL RGP	0.80±0.06 ^{*#}	0.58±0.06 ^{*#}
200 mg/mL RGP	0.91±0.06 ^{*#△▲}	0.76±0.08 ^{*#△▲}
400 mg/mL RGP	0.88±0.08 ^{*#△▲}	0.79±0.06 ^{*#△▲}
800 mg/mL RGP	0.87±0.07 ^{*#△▲}	0.82±0.05 ^{*#△▲}

注:与正常组相比, $^*P<0.05$;与 MIA 组相比, $^{\#}P<0.05$;与 50 mg/mL RGP 组相比, $^{\Delta}P<0.05$;与 100 mg/mL RGP 组相比, $^{\blacktriangle}P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, $^*P<0.05$. Compared with MIA group, $^{\#}P<0.05$. Compared with 50 mg/mL RGP group, $^{\Delta}P<0.05$. Compared with 100 mg/mL RGP group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

0.05);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞活力升高($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP + si-MEG3 组细胞相对活力降低($P<0.05$)。见表 4。

2.5 RGP 对软骨细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示,正常组细胞核染色均匀;MIA 组许多细胞出现细胞核皱缩或裂解现象;RGP 组和 RGP+si-NC 组可部分逆转 MIA 导致的细胞核皱缩或裂解现象;RGP+si-MEG3 组细胞核状态介于 MIA 组和 RGP 组之间。见图 3。流式细胞术检测结果显示,与正常组相比,MIA 组细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞凋亡率降低($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP+si-MEG3 组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。见图 4,表 4。

2.6 RGP 对软骨细胞中 MEG3、MMP-13、COL2A1 和 ACAN mRNA 水平的影响

与正常组相比,MIA 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,MMP-13 mRNA 水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平升高,MMP-13 mRNA 水平降低($P<0.05$);分别与 RGP 组、RGP+si-NC 组相比,RGP+si-MEG3 组细胞中 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低,MMP-13 mRNA 水平升高($P<0.05$)。见图 5。

2.7 RGP 对软骨细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2 和 caspase3 蛋白水平的影响

与正常组相比,MIA 组细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平降低($P<0.05$),BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);与 MIA 组相比,RGP 组、RGP+si-NC 组细胞中上述蛋白指标明显改善,呈相反趋势($P<0.05$);RGP + si-MEG3 组逆转 RGP 组、RGP + si-NC 组蛋白水平($P<0.05$)。见图 6。

表 4 5 组细胞相对活力及细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s,n=6$)
Table 4 Comparison of cell relative vitality and apoptosis rate in 5 groups

组别 Group	细胞活力 Cell viability	细胞凋亡率(%) Cell apoptosis rate
正常 Normal	1.00±0.12	3.15±0.31
MIA	0.55±0.07 [*]	34.15±6.15 [*]
RGP	0.87±0.09 ^{*#}	10.36±2.15 ^{*#}
RGP+si-NC	0.85±0.08 ^{*#}	10.42±2.09 ^{*#}
RGP+si-MEG3	0.66±0.07 ^{*#△▲}	23.47±3.20 ^{*#△▲}

注:与正常组相比,^{*} $P<0.05$;与 MIA 组相比,[#] $P<0.05$;与 RGP 组相比,[△] $P<0.05$;与 RGP+si-NC 组相比,[▲] $P<0.05$ 。
Note. Compared with normal group, ^{*} $P<0.05$. Compared with MIA group, [#] $P<0.05$. Compared with RGP group, [△] $P<0.05$. Compared with RGP+si-NC group, [▲] $P<0.05$.

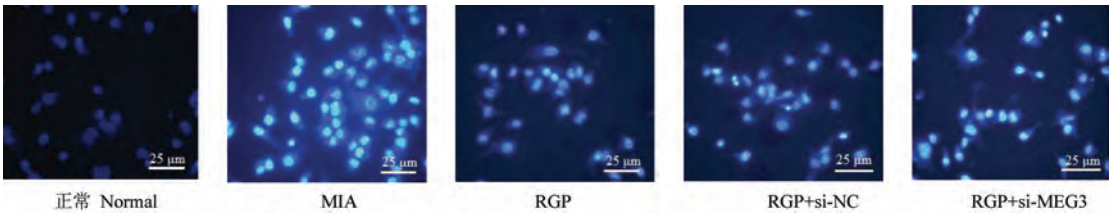


图 3 5 组细胞凋亡情况(Hoechst 33258 染色)

Figure 3 Cell morphology of 5 groups (Hoechst 33258 staining)

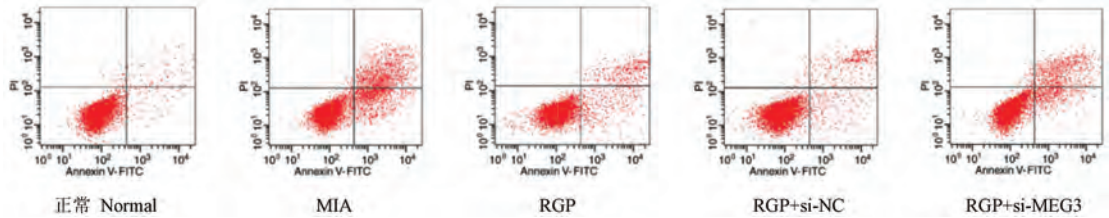
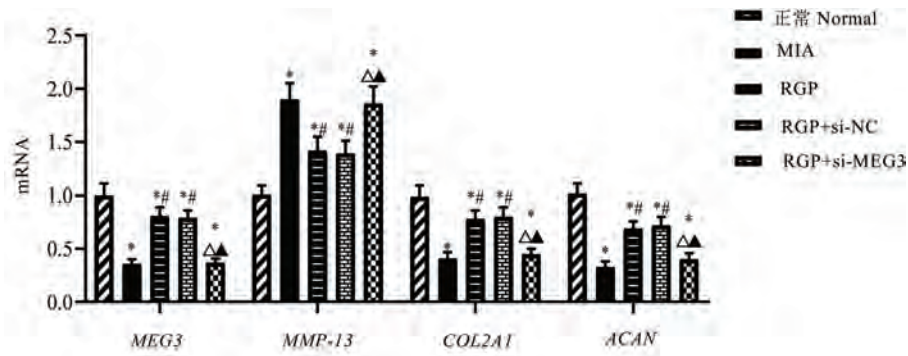


图 4 5 组细胞凋亡水平

Figure 4 Apoptosis level of 5 groups

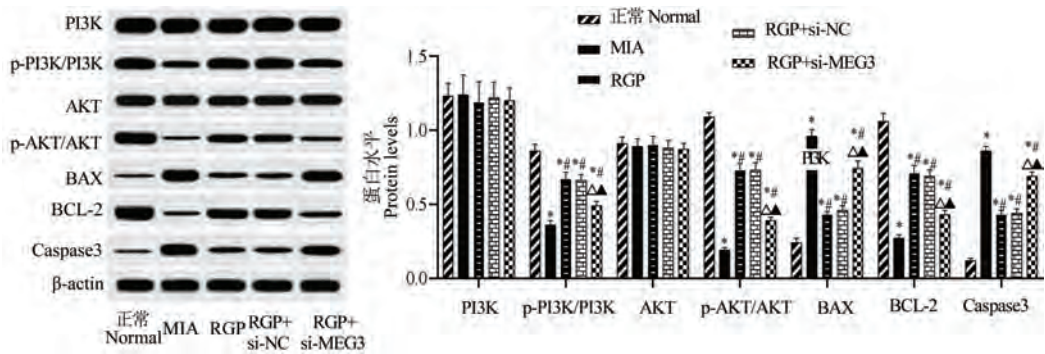


注:与正常组相比, * $P<0.05$;与 MIA 组相比, # $P<0.05$;与 RGP 组相比, $\Delta P<0.05$;与 RGP+si-NC 组相比, $\blacktriangle P<0.05$ 。

图 5 5 组细胞中 MEG3 水平及 MMP-13、COL2A1、ACAN mRNA 水平比较

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with MIA group, # $P<0.05$. Compared with RGP group, $\Delta P<0.05$. Compared with RGP+si-NC group, $\blacktriangle P<0.05$.

Figure 5 Comparison of MEG3 level and MMP-13, COL2A1 and ACAN mRNA levels in 5 groups of cells



注:与正常组相比, * $P<0.05$;与 MIA 组相比, # $P<0.05$;与 RGP 组相比, $\Delta P<0.05$;与 RGP+si-NC 组相比, $\blacktriangle P<0.05$ 。

图 6 5 组细胞中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、BAX、BCL-2 和 caspase3 蛋白表达情况

Note. Compared with normal group, * $P<0.05$. Compared with MIA group, # $P<0.05$. Compared with RGP group, $\Delta P<0.05$. Compared with RGP+si-NC group, $\blacktriangle P<0.05$.

Figure 6 Expression of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, BAX, BCL-2 and caspase3 proteins in 5 groups of cells

3 讨论

在正常情况下,关节软骨细胞凋亡与增殖处于动态平衡,但病理情况下,软骨细胞凋亡占主导,可引发 OA。OA 会导致关节疼痛、肿胀、僵硬,出现明显活动障碍,极大影响患者生活和工作质量。细胞因子 (IL-1 β 、TNF- α)、NO、能量代谢抑制剂 (如 MIA) 等均可导致软骨细胞损伤或死亡;MIA 能通过抑制细胞能量代谢导致软骨细胞因供养不足而死亡;这些改变与人类 OA 的病理特征相似。体外研究证实,MIA 可促使软骨细胞凋亡和软骨基质降解^[12-13]。本研究发现,给予不同浓度 MIA 诱导后,软骨细胞相对活力逐渐下降,细胞增殖受到抑制,且 ACAN 和 COL2A1 的表达水平降低,MMP-13 表达水平升高,呈剂量依赖性。软骨细胞通过协调产生和降解细胞外基质 (ECM) 来维持关节软骨,II 型

胶原蛋白 (由 COL2A1 基因编码) 和 ACAN 是关节软骨 ECM 的主要成分^[14]。MMPs 是一类参与 OA 进展的蛋白水解酶,可促进胶原蛋白 II 等软骨基质成分的降解,其中 MMP-13 在 OA 进展中起主要作用,其过度表达可破坏 ECM 合成和降解之间的平衡^[15]。以上研究表明,MIA 可成功诱导建立软骨细胞损伤模型;其中,4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 对软骨细胞活力的抑制作用接近半数抑制浓度,因此选择 4 $\mu\text{mol/L}$ MIA 进行后续实验。给予 RGP 处理后,随着其浓度升高,细胞相对活力逐渐升高,提示 RGP 可以提高软骨细胞活力,促进软骨细胞再生。

近年来许多基因药理学研究表明一些特异性非编码 RNA (lncRNA/miRNA/circRNA) 表达的改变可影响机体对药物的反应,产生药物治疗效果的差异。MEG3 作为肿瘤抑制因子参与各种癌症发生,且可抑制软骨细胞凋亡^[16]。研究显示,MEG3 在

OA 患者软骨组织中呈低表达,可通过靶向核苷酸寡聚化域样受体 5 调控类风湿性关节炎^[17],并可通过调控血管生成参与 OA 的发生发展过程^[18]。也有学者探究 MEG3 调控 OA 的机制发现,MEG3 能够促进 OA 软骨细胞增殖、抑制细胞凋亡和 ECM 降解,从而实现对疾病的缓解^[19]。在本研究中,给予不同浓度 MIA 诱导后,软骨细胞中 MEG3 表达以浓度依赖性的方式降低,添加 RGP 后 MEG3 水平升高,提示 RGP 可能通过 MEG3 影响软骨细胞增殖、凋亡、ECM 降解过程。

PI3K 具有脂类和蛋白的激酶活性,而且其代谢产物可激活 AKT 上丝/苏氨酸磷酸化位点,从而调节细胞增殖和凋亡相关基因表达^[20]。软骨细胞的增殖或凋亡可受多通路调控,如 PI3K/AKT 通路持续激活可下调 BAX、caspase3,上调 BCL-2 的表达,抑制细胞凋亡^[21]。据报道,MEG3 通过调控 PI3K/AKT 通路影响海马神经元凋亡过程^[9]。林健静等^[22]研究显示,白藜芦醇可通过激活 PI3K/Akt 通路,促进软骨细胞 ECM 合成,对关节软骨发挥保护作用。在本研究中,OA 模型细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平明显下降,而 BAX、caspase3 蛋白水平则呈上升趋势,提示 MIA 诱导的软骨细胞凋亡中 PI3K/AKT 通路被抑制。添加 RGP 后,软骨细胞凋亡状况明显改善,细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平升高, BAX、caspase3 蛋白水平降低,且 MEG3、COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平升高, MMP-13 mRNA 水平降低,表明 RGP 可上调 MEG3 表达,促进 PI3K/Akt 通路活化,进而促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制 MIA 诱导的软骨细胞凋亡。

为了验证 RGP 是否通过 MEG3 激活 PI3K/Akt 通路对软骨细胞发挥保护作用,本研究在给予 RGP 处理的基础上,采用小分子干扰技术敲低 MEG3 表达,结果发现,敲低 MEG3 后软骨细胞中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、BCL-2 蛋白水平和 COL2A1 mRNA、ACAN mRNA 水平降低, BAX、caspase3 蛋白水平和 MMP-13 mRNA 水平升高,细胞凋亡加剧, RGP 对软骨细胞损伤的保护作用被明显减弱;提示 RGP 可能通过上调 MEG3 表达,诱导 PI3K/AKT 通路活化,减轻 MIA 诱导的软骨损伤。

综上所述,RGP 可促进软骨细胞 ECM 合成,并抑制细胞凋亡,减轻 MIA 诱导的软骨细胞损伤,其作用机制可能与上调 MEG3 表达,进而诱导 PI3K/

AKT 通路激活有关。本研究为 RGP 治疗 OA 提供一定理论依据。RGP 作为熟地黄主要成分,有必要深入了解其功效,使其发挥最大药理活性。本文仅从体外细胞水平进行了初步研究,在未来的研究中将结合体内研究进一步验证 RGP 的作用机制。

参考文献:

- [1] Ba C, Ni X, Yu J, et al. Ubiquitin conjugating enzyme E2 M promotes apoptosis in osteoarthritis chondrocytes via Wnt/ β -catenin signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(4): 970-976.
- [2] Duan ZX, Tu C, Liu Q, et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates calcification of osteoarthritis chondrocytes by promoting autophagy [J]. J Cell Biochem, 2020, 121(5/6): 3333-3344.
- [3] Arora V, Singh G, O-Sullivan I, et al. Gut-microbiota modulation: the impact of the gut-microbiota on osteoarthritis [J]. Gene, 2021, 785: 145619.
- [4] 张宇,任艳玲,郑曲,等. 右归丸对肾阳虚型老年膝骨性关节炎近远期疗效影响 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 195-198.
- [5] 张明焕,毛文,刘雷,等. 熟地黄多糖对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡及炎症因子的影响及其机制 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(7): 1491-1494.
- [6] 风雯晴,刘凯洋,张嘉宁,等. 基于网络药理学和分子对接的熟地黄治疗骨关节炎的作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5336-5343.
- [7] Ren F, Chen X, Bai SC, et al. Silent information regulator 2 related enzyme 1 regulates autophagy and apoptosis of osteochondrocytes through mTOR/PI3K/AKT signaling [J]. J Biomater Tissue Eng, 2020, 10(9): 1344-1350.
- [8] 赵铁男,袁志,毕龙,等. LncRNA MEG3 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(24): 4617-4623.
- [9] Zhang H, Tao J, Zhang S, et al. LncRNA MEG3 reduces hippocampal neuron apoptosis via the PI3K/AKT/mTOR pathway in a rat model of temporal lobe epilepsy [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 2519-2528.
- [10] 董宝铁,李泓,高伟,等. miR-1286a 对 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和氧化应激的影响 [J]. 现代医学, 2020, 48(6): 723-727.
- [11] Zhang X, Xu X, Xu T, et al. β -ecdysterone suppresses interleukin-1 β -induced apoptosis and inflammation in rat chondrocytes via inhibition of NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Dev Res, 2014, 75(3): 195-201.
- [12] 李淑洁,陈秀娟,任艳玲,等. 牛膝提取物对碘乙酸钠诱导的软骨细胞保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 132-135.

李东东,李晓明,吴雪莲,等. 骨痹散通过调节 TGF- β /Smad 信号通路减轻兔膝关节炎损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 100–107.

Li DD, Li XM, Wu XL, et al. Gubi powder alleviates knee osteoarthritis injury by regulating transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in rabbits [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 100–107.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.013

骨痹散通过调节 TGF- β /Smad 信号通路减轻兔膝关节炎损伤

李东东¹,李晓明²,吴雪莲²,易 露¹,陈光友^{1*}

(1.西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000;2.西南医科大学康复医学系,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨骨痹散对骨关节炎的治疗效果及其机制。**方法** 将新西兰大白兔分为空白组、模型组、阳性组(双氯芬酸钾凝胶)与骨痹散组,每组 6 只,使用改良 Hulth 法构建兔膝关节炎模型,造模 8 周后给药 4 周。对软骨组织进行甲苯胺蓝染色后测量软骨厚度,番红-O 染色后进行 Mankin 评分;使用 Tunel 荧光染色法检测软骨组织中软骨细胞的凋亡情况;使用免疫组织化学法检测软骨组织中 Col II 与 Col X 蛋白的表达水平;使用 Western blot 法检测软骨组织中 Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38、p-Smad2、p-Smad3、TGF- β 1 的蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比,模型组软骨组织厚度减少,Mankin 评分升高,软骨细胞凋亡率升高,Col II、p-Smad2、p-Smad3、TGF- β 1 蛋白表达水平减低,Col X、Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38 蛋白表达升高。与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织厚度增加,Mankin 评分降低,软骨细胞凋亡率降低,Col II、p-Smad2、p-Smad3、TGF- β 1 蛋白表达水平升高,Col X、Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK、p-p38 蛋白表达降低。**结论** 骨痹散对骨关节炎具有良好的治疗效果,能通过减少软骨细胞凋亡,稳定软骨组织结构,促进软骨组织损伤后再生与修复,其机制可能与抑制 ERK/P38 通路、激活 TGF- β /Smad 通路有关。

【关键词】 骨关节炎;骨痹散;软骨组织;ERK/P38 通路;TGF- β /Smad 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0100-08

Gubi powder alleviates knee osteoarthritis injury by regulating transforming growth factor- β /Smad signaling pathway in rabbits

LI Dongdong¹, LI Xiaoming², WU Xuelian², YI Lu¹, CHEN Guangyou^{1*}

(1. the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Department of Rehabilitation Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of Gubi powder on osteoarthritis.
Methods New Zealand white rabbits were divided into a blank group, model group, positive group (diclofenac potassium gel), and Gubi powder group ($n = 6$ rabbits per group). A rabbit knee osteoarthritis model was constructed using the modified Hulth method, and the treatments were administered for 4 weeks after 8 weeks of modeling. Cartilage thickness was measured by toluidine blue staining and the Mankin score was derived after Mucovite O staining of cartilage tissue. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling fluorescence staining was used to detect the apoptosis of chondrocytes in cartilage tissue. Collagen (Col) II and collagen X protein expression levels in cartilage tissue were

[基金项目] 大学生创业国家级课题(202110632059);西南医科大学附属中医医院课题(2018XYLH-019)。

[作者简介] 李东东(1983—),男,硕士,主治医师,研究方向:骨关节与脊柱疾病。E-mail:lidd831116@163.com

[通信作者] 陈光友(1974—),男,博士,副教授,副主任中医师,研究方向:骨关节与脊柱疾病。E-mail:doctorcgy@swmu.edu.cn

detected by immunohistochemistry and expression levels of Bax, cleaved-caspase-3, phospho (p) extracellular signal-regulated kinase (ERK), p-p38, p-Smad2, p-Smad3, and transforming growth factor (TGF)- β 1 in cartilage tissues were detected by Western blot. **Results** Cartilage thickness was decreased, the Mankin score and chondrocyte apoptosis rate were increased, Col II, p-Smad2, p-Smad3, and TGF- β 1 protein expression levels were decreased, and Col X, Bax, cleaved-caspase-3, p-ERK, and p-p38 levels were increased in the model group compared with the control group. Cartilage thickness was increased, the Mankin score and chondrocyte apoptosis rate were decreased, Col II, p-Smad2, p-Smad3, and TGF- β 1 expression levels were increased, and Col X, Bax, cleaved-caspase-3, p-ERK, and p-p38 protein expression were decreased in the positive and Gubi powder groups compared with the model group. **Conclusions** Gubi powder showed good therapeutic efficacy against osteoarthritis in rabbits, by reducing chondrocyte apoptosis, stabilizing cartilage tissue structure, and promoting the regeneration and repair of cartilage tissue after injury. Its mechanism may be related to inhibition of the ERK/P38 pathway and activation of the TGF- β /Smad pathway.

[Keywords] osteoarthritis; Gubi powder; cartilage tissue; ERK/P38 signaling pathway; TGF- β /Smad signaling pathway

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

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种骨科常见疾病,主要临床表现为关节疼痛、肿胀和活动受限^[1]。流行病学研究表明,随着老龄化人口和肥胖患病率增加,OA 在全球范围内的患病率均有所增加,约有 31.4 亿患者,老年人占比超过 10%^[2]。迄今为止,OA 的发病机制尚未完全了解,软骨退行性病变被认为是 OA 发病的关键,如果在关节软骨出现严重损伤后不及时采取措施进行治疗,最终就会发展成为 OA^[3]。骨关节炎病理特征一般为软骨下出现透明软骨、钙化软骨、软骨下骨等退行性病变^[4],随着病情发展使关节软骨失去支撑或缓冲作用后,关节会迅速变脆,然后释放炎症因子,加重关节损伤^[5]。转化生长因子 (transforming growth factor, TGF- β) 对关节软骨的形成与分化十分关键,因为关节软骨由被细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 包裹的软骨细胞组成, TGF- β 1 通过调控下游 Smad 通路促进 ECM 形成,加快软骨再生从而修复关节软骨损伤^[6-7]。因此,软骨损伤的修复对降低 OA 发生率与缓解 OA 患者症状具有重要意义。目前骨关节炎治疗仅侧重于缓解症状,对软骨组织再生或重建的帮助微乎其微。

中医在治疗 OA 方面存在着一套独特的理论,如针刺穴位、针刀疗法、中药内服、推拿等,均对缓解病情有积极作用^[8-9]。现代药理学研究显示,中药方剂对膝骨关节组织的炎症有良好的抑制作用,对 TGF- β /Smad 通路也有一定的调节作用,这有可能成为治疗骨关节炎的突破口^[10]。本院的骨痹散,以制川乌、制草乌等 16 味中药组成,用蜂蜜调制后外用,在临床上对骨关节炎有一定的治疗作用,前期动物实验也发现骨痹散对软骨组织有促进修复

的效果,但其中所涉及的机制尚不明确,因此本实验将基于 TGF- β /Smad 通路进一步探讨骨痹散治疗骨关节炎的潜力。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验采用实验动物为新西兰大白兔,清洁级,24 只,体重 3~4 kg,4~5 月龄,雄性,购自成都达硕实验动物有限公司 [SCXK (川) 2019-0031]。本项目由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过 (swmu201901426)。所有动物饲养于西南医科大学实验动物中心 [SYXK (川) 2018-0065],室内温度保持在 20~24℃,所有动物在饲养与实验过程中均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

骨痹散由西南医科大学附属中医医院提供 (制川乌 18 g、制草乌 18 g、川芎 12 g、乳香 12 g、没药 12 g、海桐皮 24 g、透骨草 24 g、白鲜皮 18 g、酒军 18 g、秦艽 18 g、威灵仙 18 g、桑枝 18 g、甘草 12 g、禹白附 18 g、王不留行 24 g、莱菔子 24 g、蜂蜜调配);双氯芬酸钾凝胶,国药准字 H20020385,购自太极集团·四川天诚制药有限公司;Tunel 荧光染色试剂盒 (瑞士罗氏公司,货号:11684795910);胶原蛋白 II (Col II) (ab34712)、胶原蛋白 X (Col X) (ab182563)、BCL2 关联 X 蛋白 (Bcl2 Associated X Protein, Bax) (ab32503)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved-caspase-3) (ab214430)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK) (ab201015)、磷酸化 p38 蛋白 (p-p38) (ab4822)、磷酸化信号转导分子 2 (p-Smad2) (ab188334)、磷酸化信号转导分子 3 (p-Smad3)

(ab52903)、TGF-β1(ab215715)和 β-actin(ab8227)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

CX23 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); ChemiDoc 多功能凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); Mini-PROTEAN® Tetra 蛋白质电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 膝骨关节炎动物模型的构建^[11]

将 24 只动物分为空白组、模型组、阳性组与骨痹散组,每组 6 只,采用改良 Hulth 法构建膝骨关节炎兔子模型,先在耳缘静脉注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,在动物右膝骨关节髌内侧做 3 cm 纵向切口,逐层切开并暴露关节,髌骨往外脱位,完整切除内侧半月板、前交叉韧带(ACL),内侧副韧带(MCL)。空白组只进行关节暴露,不进行半月板与韧带切除。术后肌肉注射青霉素 160 万 IU/(kg

·d),连续注射 8 d。术后第 4 天即强迫动物进行奔跑(0.5 h/d),持续 8 周。

1.3.2 给药

模型构建完毕后开始给药,空白组与模型组膝关节处涂抹生理盐水,阳性组涂抹双氯芬酸钾凝胶,骨痹散组涂抹骨痹散,均匀覆盖膝关节表面,每天 2 次,持续 4 周。

1.3.3 动物膝骨关节病理学观察

给药完成后处死动物,收集膝骨关节软骨组织制作病理切片,甲苯胺蓝染色与番红-O 染色,测量软骨层厚度与 Mankin 评分,四项指标合计为最终得分,评分标准见表 1。

1.3.4 免疫荧光染色

各组动物软骨组织按标准流程制备病理切片,切片脱蜡后进行荧光 Tunel 染色,在荧光显微镜下观察凋亡细胞数量,每张切片采集 3 个区域,每个区

表 1 骨关节炎病理学评分表

Table 1 Pathological evaluation table of osteoarthritis		
项目 Items	评分 Score	描述 Description
骨组织 Bone tissue	0	正常组织 Normal tissue
	2	组织表面不规则及血管翳 Tissue surface irregularity and pannus
	4	组织裂隙深达软骨辐射层 Tissue fissures deep into the cartilaginous radiation layer
	6	组织结构完全破坏 Organizational structure is completely broken
软骨细胞 Chondrocyte	0	正常软骨细胞 Normal chondrocytes
	1	弥散性细胞数量增多 Number of diffuse cells increased
	2	出现增生性细胞簇 Chondrocytes show proliferative clusters
	3	细胞数量减少 Number of chondrocytes decreased
基质染色情况 Substrate staining	0	正常染色 Normal staining
	1	染色轻度减弱 Matrix staining was slightly weakened
	2	染色中度减弱 Matrix staining was moderately weakened
	3	染色重度减弱 Matrix staining was severely reduced
潮线完整性 Tidal-line integrity	4	未染色 Substrate unstained
	0	完整 Integrity of tide line
	1	出现血管穿越 Blood vessel crossing at tide line

域采集 3 张图片,分别为混合光 (Merged)、蓝光 (DAPI)、绿光 (Tunel),计算细胞凋亡率。

1.3.5 免疫组织化学

使用免疫组化法检测各组软骨组织中Ⅱ型胶原蛋白(Col Ⅱ)与 X 型胶原蛋白(Col X)的表达水平,每张组织切片在 200 倍放大倍数下采集 3 个视野计算平均光密度。

1.3.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot)

将各组动物软骨组织置于冰上进行蛋白质提取并进行蛋白质定量检测,按照 Western blot 法依次进行凝胶电泳,转膜、封闭、一抗孵育:TGF-β1 (1 : 1000)、p-ERK (1 : 1000)、p-p38 (1 : 1000)、Bax (1 : 1000)、cleaved-caspase-3 (1 : 1000)、p-Smad2 (1 : 1000)、p-Smad3 (1 : 1000)、β-actin (1 : 1000),最后使用 ECL 法对蛋白条带进行避光显影,于凝胶成像系统中进行曝光拍照,使用 Imagelab 对蛋白质条带进行分析,以 β-actin 作为内参计算各蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

数据用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。使用 SPSS 25.0 进行数据分析,统计方法为单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨痹散减轻膝骨关节炎新西兰大白兔组织损伤

甲苯胺蓝染色:与空白组相比,模型组软骨层

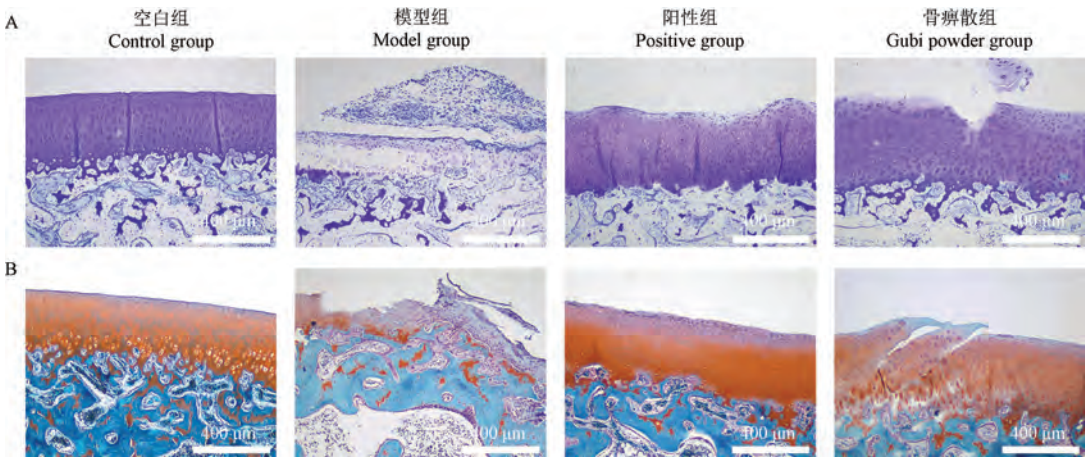
严重破损,分层不明显;与模型组相比,阳性组基本恢复正常,骨痹散组大部分软骨组织已经形成,局部还存在破损。测量软骨层厚度后,与空白组相比,模型组软骨层厚度减少 (*P*<0.01);与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨层厚度增加 (均 *P*<0.01),其中阳性组软骨层厚度比骨痹散组更厚 (*P*<0.01)。

番红 O 染色:空白组关节软骨层厚薄均匀,潮线完整;模型组关节软骨层厚度减少,着色不均,潮线不完整;阳性组关节软骨层厚薄不一,厚度恢复较好,潮线不完整。骨痹散组关节软骨软骨层厚薄不一,局部缺损,厚度比模型组厚,潮线不完整。具体结果见表 2,图 1。

表 2 软骨组织病理变化情况 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Pathological changes of cartilage tissue		
组别 Groups	Mankin 评分 Mankin score	软骨层厚度 (μm) Cartilage thickness
空白组 Control group	0.0±0.0	451.7±19.4
模型组 Model group	7.0±0.6**	147.9±29.1**
阳性组 Positive group	3.5±1.0##	407.4±49.1##
骨痹散组 Gubi powder group	4.3±1.1##	265.8±51.9##&&

注:与空白组相比,***P*<0.01;与模型组相比,##*P*<0.01;与阳性组相比,&&*P*<0.01。
Note. Compared with control group, ***P*<0.01. Compared with model group, ##*P*<0.01. Compared with positive group, &&*P*<0.01.



注:A;甲苯胺蓝染色;B:番红 O 染色。
图 1 各组动物软骨组织染色图
Note. A, Toluidine blue staining. B, Muscovite O staining.

Figure 1 Staining of cartilage tissues in each group

2.2 骨痹散减少膝骨关节炎新西兰大白兔软骨细胞凋亡

与空白组相比,模型组软骨组织中细胞凋亡率升高,组织内 Bax 与 cleaved-caspase-3 凋亡蛋白表达升高,ERK 与 p38 磷酸化蛋白表达水平升高($P<0.01$);与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织细胞凋亡率降低,Bax、cleaved-caspase-3、p-ERK 与 p-p38 蛋白表达降低,骨痹散组软骨细胞凋亡率高于阳性组。具体结果见表 3,图 2、图 3。

2.3 骨痹散刺激膝骨关节炎新西兰大白兔软骨细胞分化

与空白组相比,模型组膝骨关节炎软骨组织中 Col II、TGF- β 1、p-Smad2 与 p-Smad3 表达水平降低,Col X 表达水平升高($P<0.01$);与模型组相比,阳性组与骨痹散组软骨组织中 Col II、TGF- β 1、p-Smad2 与 p-Smad3 表达水平升高,Col X 表达水平降低($P<0.05$),骨痹散组促进软骨细胞分化的效果弱于阳性组($P<0.05$),具体见表 4,图 4、图 5。

表 3 骨痹散对膝骨关节软骨细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effects of Gubi powder on chondrocyte apoptosis in rabbits

组别 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate	Bax	Cleaved-caspase-3	p-ERK	p-p38
空白组 Control group	0.00±0.00	1.001±0.014	0.999±0.038	0.999±0.023	1.001±0.010
模型组 Model group	41.59±7.27**	1.664±0.028**	2.679±0.062**	2.357±0.037**	1.902±0.021**
阳性组 Positive group	14.20±8.12##	1.250±0.012##	1.532±0.080##	1.377±0.083##	1.447±0.026##
骨痹散组 Gubi powder group	24.12±11.76##&	1.394±0.029##&	2.057±0.021##&&	1.639±0.017##&&	1.598±0.022##&&

注:与空白组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$;与阳性组相比,& $P<0.05$,&& $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, ## $P<0.01$. Compared with positive group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

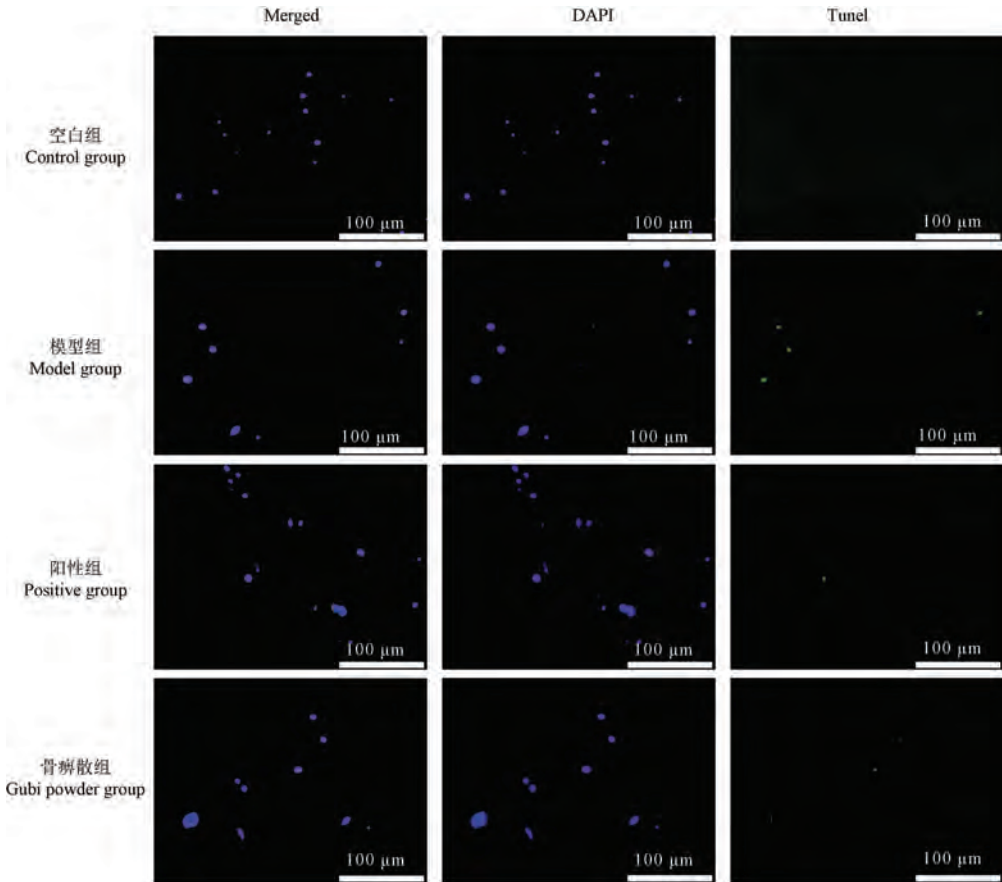


图 2 各组膝骨关节炎兔软骨组织免疫荧光染色图

Figure 2 Immunofluorescence staining of soft tissues of rabbits with knee osteoarthritis in each group

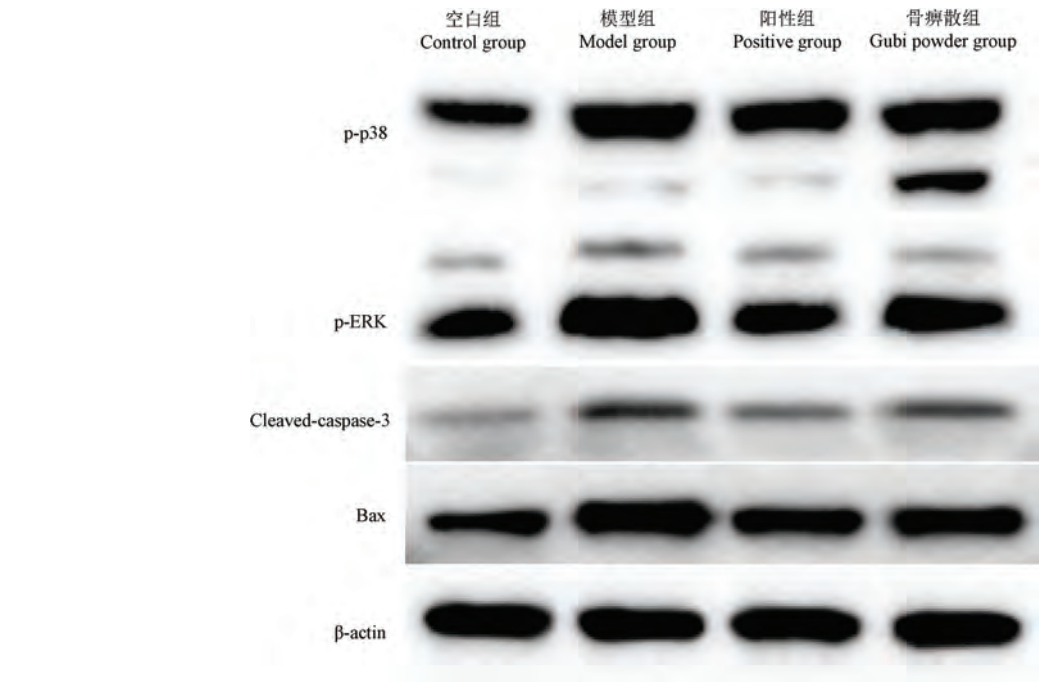


图3 各组膝关节炎软骨组织中蛋白表达水平

Figure 3 Protein expression levels in soft tissue of rabbits with knee osteoarthritis in each group

表4 骨痹散对膝骨关节软骨组织中细胞分化的影响(̄x±s)

Table 4 Effect of Gubi powder on cell differentiation in articular cartilage of the knee of white rabbits

组别 Groups	Col II	Col X	TGF-β1	p-Smad2	p-Smad3
空白组 Control group	7.360±0.718	3.344±0.570	1.000±0.007	0.999±0.002	1.000±0.005
模型组 Model group	3.212±0.634**	13.426±2.294**	0.453±0.014**	0.576±0.032**	0.548±0.010**
阳性组 Positive group	6.475±0.954##	6.227±1.030##	0.712±0.014#	0.796±0.018#	0.822±0.009#
骨痹散组 Gubi powder group	5.785±0.355##	9.990±1.598#&	0.547±0.012#&&	0.682±0.022#&&&	0.650±0.008#&&

注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与阳性组相比, & $P<0.05$, && $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with positive group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

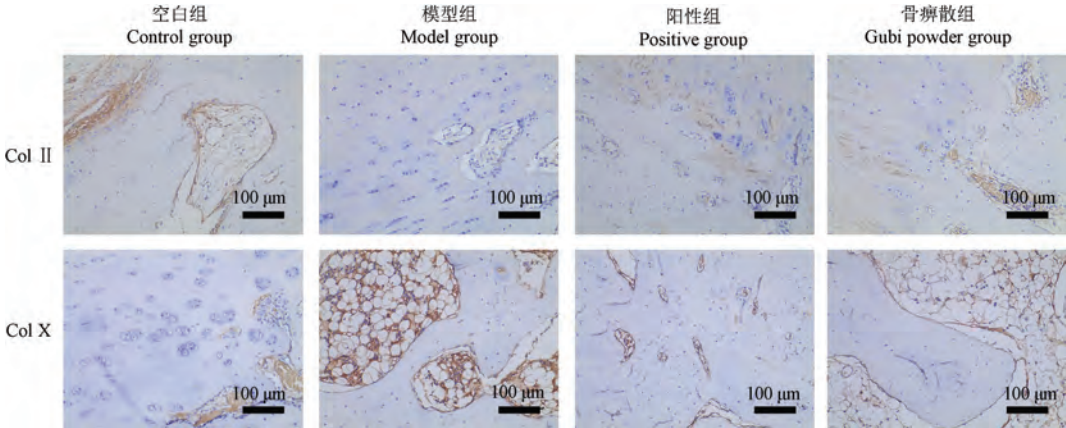


图4 各组动物软骨组织中 Col II 与 Col X 蛋白表达水平

Figure 4 Col II and Col X protein expression levels in cartilage tissues of each group

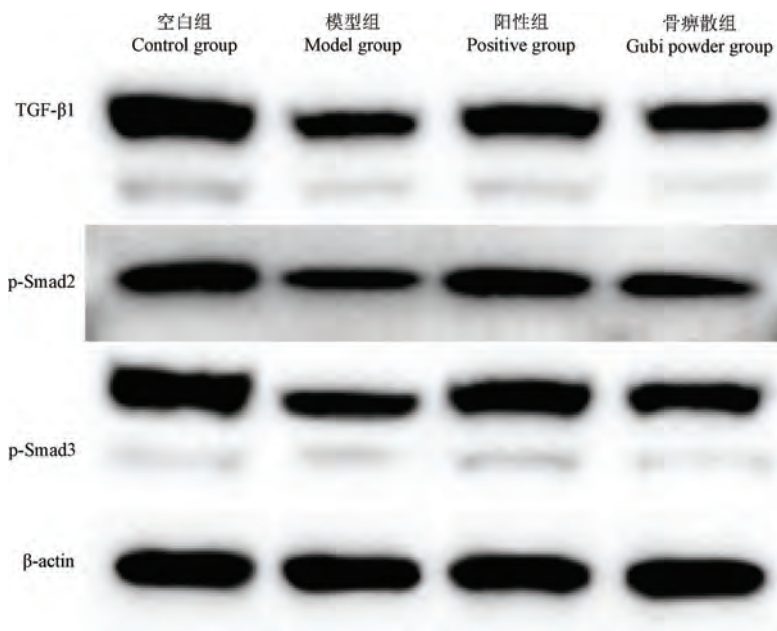


图 5 各组动物软骨组织中 TGF-β1、p-Smad2 与 p-Smad3 蛋白表达水平

Figure 5 Protein expression levels of TGF-β1, p-Smad2 and p-Smad3 in cartilage tissues of each group

3 讨论

OA 是一种累及软骨、软骨下骨、韧带、半月板、滑膜的全关节疾病,其中滑膜是一种包裹着关节的薄膜性组织,可分泌透明质酸和润滑剂等物质,维持关节正常功能^[12-13]。OA 引发的滑膜炎症和纤维化可导致关节软骨细胞凋亡,加速软骨损伤,影响关节功能,最终导致疼痛和关节僵硬^[14]。本团队发现骨痹散能减少关节软骨组织中凋亡细胞的数量,抑制凋亡蛋白表达,说明骨痹散能帮助细胞对抗由炎症引起的凋亡诱导,同时还发现,软骨组织中 ERK 与 p38 蛋白的磷酸化水平降低,说明骨痹散能抑制 ERK/p38MAPK 通路。MAPK 是导致软骨破坏的关键信号通路,该通路包含 p38MAPK、JNK 和 ERK1/2 等成员,促炎细胞因子如 TNF-α 和 IL-1β 通过激活 p38 细胞内信号通路诱导 OA,ERK1/2 则对聚蛋白多糖酶介导的降解至关重要^[15-16]。有研究发现,与正常软骨相比,出现关节炎的关节软骨组织中 p38 和 ERK 蛋白表达显著升高^[17],这与本实验结果基本一致。因此,抑制关节软骨组织细胞凋亡是治疗 OA 的基础,骨痹散具备治疗 OA 的能力。

OA 通常被定义为关节软骨退行性疾病,关节软骨由被 ECM 包裹的软骨细胞组成,覆盖在关节表面,促进运动并负责减震^[13]。软骨细胞负责 ECM 的合成、维持和降解,以响应来自细胞因子、炎症介

质和基质碎片的信号^[18],其中 ECM 包含的胶原蛋白则是影响软骨组织拉伸强度和形状的关键^[19]。Col II 能与聚蛋白多糖和其他蛋白多糖一起负责构建 ECM 网络结构^[20],Col X 则是肥大软骨细胞的标志蛋白,OA 患者膝骨关节中的软骨细胞会发生肥大分化,导致 Col X 蛋白表达增加,与病症的严重程度呈正相关^[21],因为关节软骨缺乏血管和淋巴管,愈合能力有限,会逐渐出现且加重进行性损伤^[22]。在本实验中,骨痹散增加软骨组织中 Col II 蛋白表达,降低 Col X 蛋白表达,维持与修复软骨组织的结构,减少软骨细胞凋亡与凋亡蛋白表达,确保软骨细胞正常分化。TGF-β1 被证明能通过调节下游 Smad 家族对关节软骨组织与软骨细胞发挥保护作用,并促进 Col II 的合成与分泌^[23]。在本实验中,骨痹散不仅能直接刺激软骨组织中的 TGF-β1 蛋白表达,还能通过增加 Smad2 与 Smad3 蛋白磷酸化激活 TGF-β/Smad 通路,稳定 ECM 平衡的同时还延缓关节软骨的退变速度,起到保护关节的作用。

综上所述,骨痹散对骨关节炎具有良好的治疗效果,能通过减少软骨细胞凋亡,稳定软骨组织结构,促进软骨组织损伤后再生与修复,其机制可能与抑制 ERK/p38 MAPK 通路、激活 TGF-β/Smad 通路有关。

参考文献:

[1] Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis [J]. Lancet,

- 2019, 393(10182): 1745–1759.
- [2] Kloppenburg M, Berenbaum F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(3): 242–248.
- [3] Klein JC, Keith A, Rice SJ, et al. Functional testing of thousands of osteoarthritis-associated variants for regulatory activity [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2434.
- [4] Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(11): 632–644.
- [5] Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(7): 390–398.
- [6] Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function [J]. Sports Health, 2009, 1(6): 461–468.
- [7] Zhang P, Zhong ZH, Yu HT, et al. Exogenous expression of IL-1Ra and TGF- β 1 promotes *in vivo* repair in experimental rabbit osteoarthritis [J]. Scand J Rheumatol, 2015, 44(5): 404–411.
- [8] 孙剑, 李飞, 薛正海, 等. 温针灸配合微针对膝骨性关节炎(风寒湿痹型)临床症状及关节活动度的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 217–220.
- [9] 郑皓云, 祝永刚, 柳根哲, 等. 铍针松解术配合中医推拿治疗膝骨性关节炎的疗效及安全性分析 [J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(2): 17–21.
- [10] 金连峰, 顾炜, 马楠. 新止骨增生丸基于 miR-146a 对 TGF- β /SMAD 信号转导通路下 TGF- β 1、SMAD4 表达的影响及治疗骨性关节炎的作用机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 141–145, 278.
- [11] 王恒树, 张冲. 自拟组方补肾固筋方对膝骨性关节炎兔血清及关节液白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(5): 1079–1081.
- [12] Remst DFG, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM. Unravelling osteoarthritis-related synovial fibrosis: a step closer to solving joint stiffness [J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(11): 1954–1963.
- [13] Yoo KH, Thapa N, Chwae YJ, et al. Transforming growth factor- β family and stem cell-derived exosome therapeutic treatment in osteoarthritis [J]. Int J Mol Med, 2022, 49(5): 62.
- [14] Li M, Luo X, Long X, et al. Potential role of mitochondria in synoviocytes [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(2): 447–457.
- [15] Wang P, Mao Z, Pan Q, et al. Histone deacetylase-4 and histone deacetylase-8 regulate interleukin-1 β -induced cartilage catabolic degradation through MAPK/JNK and ERK pathways [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 2117–2127.
- [16] Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, et al. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation—divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(3): 279–288.
- [17] Hossain MA, Adithan A, Alam MJ, et al. IGF-1 facilitates cartilage reconstruction by regulating PI3K/AKT, MAPK, and NF- κ B signaling in rabbit osteoarthritis [J]. J Inflamm Res, 2021, 14: 3555–3568.
- [18] Ansari MY, Khan NM, Haqqi TM. A standardized extract of *Butea monosperma* (Lam.) flowers suppresses the IL-1 β -induced expression of IL-6 and matrix-metalloproteases by activating autophagy in human osteoarthritis chondrocytes [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 198–207.
- [19] van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, et al. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 165: 41–48.
- [20] Kilmer CE, Battistoni CM, Cox A, et al. Collagen type I and II blend hydrogel with autologous mesenchymal stem cells as a scaffold for articular cartilage defect repair [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(6): 3464–3476.
- [21] 熊振飞, 汤样华, 王乾, 等. 自拟益气化瘀补肾方对膝骨关节炎小鼠 β -catenin 信号通路的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(9): 86–90.
- [22] Hu Y, Gui Z, Zhou Y, et al. Quercetin alleviates rat osteoarthritis by inhibiting inflammation and apoptosis of chondrocytes, modulating synovial macrophages polarization to M2 macrophages [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 145: 146–160.
- [23] 刘洋, 孙权, 杨砥, 等. 右归丸对骨性关节炎模型大鼠 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(10): 1419–1424.

[收稿日期] 2022–11–29

张秀云,杨坤,李佩甲,等.小柴胡汤治疗大鼠慢性化脓性颌骨骨髓炎模型疗效的实验研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(7):108-116.

Zhang XY, Yang K, Li PJ, et al. Experimental study of curative effect of xiaochaihu decoction in a rat model of chronic pyogenic osteomyelitis of the jaw [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 108-116.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.014

小柴胡汤治疗大鼠慢性化脓性颌骨骨髓炎模型 疗效的实验研究

张秀云¹,杨坤²,李佩甲¹,唐顺¹,杨思禹¹,陈晖^{2*}

(1.华北理工大学,河北唐山063200;2.华北理工大学附属医院口腔科,河北唐山063000)

【摘要】 目的 通过建立大鼠慢性化脓性颌骨骨髓炎模型,探究小柴胡汤对慢性化脓性颌骨骨髓炎愈合的影响。**方法** 选用65只SPF级SD大鼠,通过骨钻制备出圆形骨缺损滴入金黄色葡萄球菌建立慢性化脓性颌骨骨髓炎模型。1个月后随机抽取5只检测造模结果。模型建立成功后,将剩余大鼠随机均分为4组:A组清创术+生理盐水;B组清创术+小柴胡汤;C组清创术+头孢;D组清创术+小柴胡汤+头孢。给药后2、4、8周每组分别处死5只大鼠,CBCT检测骨缺损范围、酶联免疫吸附法检测炎症因子IL-6、IL-1 β 水平和免疫组化检测BMP-2,用统计学分析所得的数据。**结果** CBCT:与A组比较,B组、C组、D组在给药后2、4、8周骨缺损范围均减小($P<0.05$),与C组相比,B组、D组骨缺损范围减小($P<0.05$),与B组比较,D组骨缺损范围减小($P<0.05$)。炎症因子IL-6、IL-1 β 水平:与A组比较,B组、C组、D组在给药后2、4、8周IL-6、IL-1 β 水平均降低($P<0.05$),B组、D组IL-1 β 水平均低于C组($P<0.05$),D组IL-6水平低于C组($P<0.05$),但B组与C组IL-6水平虽然有差异但无统计学意义($P>0.05$),与B组比较,D组IL-1 β 、IL-6水平均低($P<0.05$)。BMP-2免疫组化检测:A组、B组、C组、D组均出现阳性表达,与A组比较,B组、C组、D组在给药后2、4、8周平均光密度高($P<0.05$),B组、D组平均光密度高于C组($P<0.05$),与B组比较,D组较高($P<0.05$)。**结论** 1.用金黄色葡萄球菌在大鼠下颌骨上成功建立慢性化脓性颌骨骨髓炎模型;2.小柴胡汤对大鼠慢性化脓性颌骨骨髓炎有一定的治疗作用,当与头孢联合应用时治疗效果优于小柴胡汤或头孢单独治疗效果。

【关键词】 小柴胡汤;慢性化脓性颌骨骨髓炎;白细胞介素-6;白细胞介素-1 β ;骨形态发生蛋白2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0108-09

Experimental study of curative effect of xiaochaihu decoction in a rat model of chronic pyogenic osteomyelitis of the jaw

ZHANG Xiuyun¹, YANG Kun², LI Peijia¹, TANG Shun¹, YANG Siyu¹, CHEN Hui^{2*}

(1. North China University of Technology, Tangshan 063200, China.

2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of North China University of Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To explore the healing effect of xiaochaihu decoction in a rat model of chronic pyogenic osteomyelitis of the jaw. **Methods** Sixty-five specific-pathogen-free rats were used to establish a model of chronic pyogenic osteomyelitis of the jaw, by introducing *Staphylococcus aureus* into round bone defects prepared using a bone drill. After 1 month, five rats were randomly selected to test the modeling result, and the other rats were divided randomly into four groups: group A, debridement+saline; group B, debridement+xiaochaihu decoction; group C, debridement+cefuroxime;

[作者简介]张秀云(1994—),女,硕士研究生,研究方向:口腔颌面外科。E-mail:1538681075@qq.com

[通信作者]陈晖(1976—),男,硕士,主任医师,研究方向:口腔颌面外科。E-mail:15383056663@163.com

and group D, debridement+xiaochaihu decoction+cefuroxime. Five rats in each group were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks after administration. The extent of the bone defect was detected by cone beam computed tomography (CBCT), levels of the inflammatory cytokines interleukin (*IL*)-6 and *IL*-1 β were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and bone morphogenetic protein-2 was detected by immunohistochemistry. **Results** CBCT showed that the bone defects in groups B, C, and D had decreased at 2, 4, and 8 weeks after administration, compared with group A ($P<0.05$). In addition, the bone defects were smaller in groups B and D compared with group C ($P<0.05$), and smaller in group D compared with group B ($P<0.05$). Levels of *IL*-6 and *IL*-1 β were lower in groups B, C, and D compared with group A at 2, 4, and 8 weeks after administration, *IL*-1 β levels were lower in groups B and D compared with group C, and levels of *IL*-6 were lower in group D compared with C ($P<0.05$); however, there was no significant difference in *IL*-6 levels between groups B and C ($P>0.05$). *IL*-1 β and *IL*-6 levels were both lower in group D compared with group B ($P<0.05$). BMP-2 expression was detected in groups A, B, C, and D, with higher mean optical densities in groups B, C, and D compared with group A, higher optical densities in groups B and D compared with group C, and in group D compared with group B at 2, 4, and 8 weeks after administration ($P<0.05$). **Conclusions** We successfully established a rat model of chronic pyogenic osteomyelitis of the mandible using *S. aureus*. Xiaochaihu decoction improved chronic pyogenic osteomyelitis, and the therapeutic effect of xiaochaihu decoction combined with cefuroxime was better than that of either drug alone.

【Keywords】 xiaochaihu decoction; chronic pyogenic osteomyelitis of jaws; interleukin-6; interleukin-1 β ; bone morphogenetic protein-2

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

慢性化脓性颌骨骨髓炎 (chronic pyogenic osteomyelitis of jaws) 指病程时间超过 1 个月的颌骨的炎症性改变^[1], 相比较于其他细菌而言, 金黄色葡萄球菌常常在该病的渗出液中被检出, 其可通过牙源性、创伤性及血源性途径感染颌骨及周围软组织^[2], 造成骨质发生炎症性破坏。当炎症进入慢性发展阶段, 往往不会伴有发热等全身症状, 但局部会出现脓液、瘘管, 颌骨发生坏死形成死骨^[3], 目前临床上常用的治疗方式是抗炎与手术结合治疗。小柴胡汤可以发挥较好的抗炎作用^[4], 并且促进骨形成^[5]。有研究表明中西医结合对死骨有较好的治疗作用, 但报道较少^[6]。本研究通过建立大鼠慢性化脓性颌骨骨髓炎模型, 观察小柴胡汤对其治疗的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

65 只健康的 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 (300 $\pm$ 20) g, 8~12 周龄, 动物来源于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2020-0004], 所有的实验操作均在华北理工大学实验动物中心屏障实验室 [SYXK (冀) 2020-0007] 完成, 实验过程严格遵守 3R 原则。动物实验通过了华北理工大学实验动物伦理委员会审查 (2022-SY-002), 饲养在华北理工大学实验动物中心 SPF 级动物房内, 室温 (25 $\pm$ 5) $^{\circ}$ C,

相对湿度 50%~70%, 提供实验室标准大鼠饲料和自由饮水。

1.1.2 细菌

金黄色葡萄球菌菌株 CMCC (B) 26003, 由华北理工大学生命科学学院提供, 将细菌菌株置无菌培养肉汤中培养并调制成浓度为 1.0×10^7 cfu/mL 悬液, 低温保存。

1.2 主要试剂与仪器

小柴胡汤: 柴胡 125.0 g、黄芩 46.9 g、人参 46.9 g、半夏 39.1 g、生姜 46.9 g、大枣 36.6 g、甘草 46.9 g (购于华北理工大学附属医院中药房), 用蒸馏水煎熬至所需提取浓度, 头孢呋辛酯干混悬剂 (0.125 g/包 山东鲁抗医药股份有限公司); 白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL*-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL*-1 β) 检测试剂盒, 货号分别为 CD30219、CD30216, 均为武汉纯度生物科技有限公司产品; 骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 抗体, 生产商 Affinity, 货号为 AF5163; Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody 抗体, 生产商 sino biological, 货号为 SSA004。

口腔颌面部锥形束 CT (Cone beam Computer Tomography, CBCT) 机 (德国卡瓦); 组织切片机 (德国 Leica SP1600); 离心机 (德国艾本德 5810R); 显微镜 (日本奥林巴斯 DP80); 烘片机 (中国航利达, HP-1); 低温冰箱 (日本普和希 MDF-U500VX); 恒温冰箱 (日本三洋 MDF382E)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立及分组

65 只 SD 大鼠正常喂养 1 周,用 3%戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 的剂量麻醉成功后剪毛消毒,于大鼠下颌骨后牙区颊侧骨板处开窗,利用球形钻头制成 4 mm×4 mm 的圆形骨缺损,用 0.9%生理盐水进行充分冲洗,压迫止血后滴入 0.1 mL 1.0×10^7 cfu/mL 细菌悬液,骨蜡封闭,生理盐水冲洗缝合(图 1),术后常规饲养 1 个月后随机抽取 5 只检测,参照文献^[7]纳入标准。造模成功后,将剩余大鼠分为 4 组:A 组 清创术+生理盐水、B 组 清创术+小柴胡汤(0.3 mg/kg 灌胃)、C 组 清创术+头孢(1.67 mg/kg 灌胃)、D 组 清创术+小柴胡汤+头孢,分别于 2、4、8 周随机抽取 5 只进行检测。

1.3.2 模型检测指标及方法

(1)大体观察

观察术区是否肿胀,体重是否减轻,是否有脓性分泌物,是否有瘘管形成。

(2)CBCT 检测

取下颌骨拍摄 CBCT,观察骨缺损的范围是否变大。

(3)细菌学检测

取少量脓性分泌物在血平板培养基上进行细菌培养,长出菌落后进行革兰氏染色,染色后进行乳胶凝集实验,证明是否是金黄色葡萄球菌。

(4)组织病理学检测

取下颌骨组织,骨组织脱钙后进行 HE 染色,观察是否有炎症细胞,是否有死骨。

1.3.3 实验检测指标及方法

(1)CBCT 影像学检测

于 2、4、8 周分别从各组中随机抽取 5 只,取下颌骨拍摄 CBCT,对比各组不同时间骨缺损范围。

(2)炎症因子表达水平

于 2、4、8 周分别对各组大鼠每只各采 4 mL 的腹主动脉血,离心后收集的上清液通过酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测血清中 *IL-6*、*IL-1 β* 的水平。

(3)免疫组化观察

取下颌骨,剥离掉软组织,脱钙后免疫组化常规处理,当胞质棕黄颗粒出现为免疫组化阳性结果。用图像处理软件进行阳性细胞表达光密度定量分析,用平均光密度表示结果,平均光密度越高,阳性越强。

1.4 统计学方法

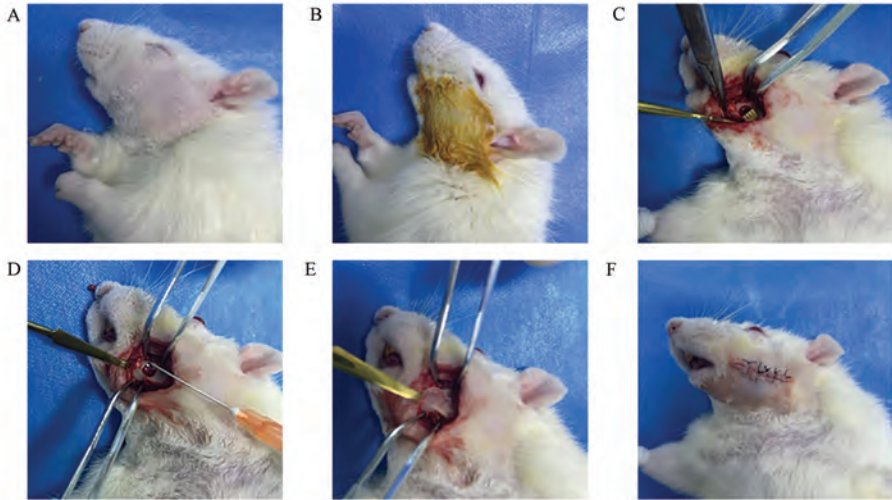
采用 SPSS 22.0 统计分析,用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述定量资料,配对样本 *t* 检验分析两组间数据,多因素方差分析多组数据和 LSD 法比较组间差异,以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 造模结果

2.1.1 肉眼观察结果

所有大鼠精神状况较差,术区软组织肿胀明显,1 周后肿胀好转,术区有脓液溢出,瘘管形成(图 2)。对大鼠术前及术后 1 周体重比较(表 1)发现与术前比较,术后体重较轻($P<0.05$),统计学有显著性差异。



注:A:剃毛;B:消毒;C:4 mm×4 mm 圆形骨缺损;D:滴入细菌;E:置入骨蜡;F:缝合。

图 1 慢性化脓性颌骨骨髓炎模型建立手术过程

Note. A, Shaving. B, Disinfection. C, 4 mm×4 mm round bone defect. D, Drip into the bacteria. E, Place the bone wax. F, Stitching.

Figure 1 Establishment of surgical procedure for chronic pyogenic osteomyelitis of jaws

表 1 术前术后大鼠体重比较($g, \bar{x} \pm s, n=65$)
Table 1 Weight comparison of rats before and after operation

术前/术后 Preoperative/Postoperative	体重 Weight
术前 Preoperative	315.36±0.33
术后 Postoperative	314.92±0.29*

注:与术前相比, * $P<0.05, t=3.061$ 。
Note. Compared with the preoperative results, * $P<0.05, t=3.061$.

2.1.2 CBCT

术后 1 个月随机抽取 5 只大鼠拍摄 CBCT 均可发现术区骨缺损范围变大(图 3)。

2.1.3 细菌学检测

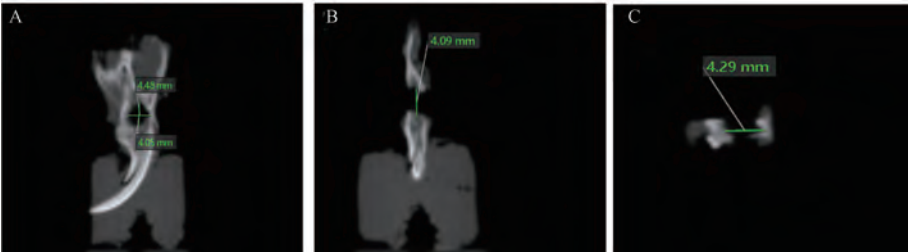
术后 1 个月取脓性分泌物在血平板上培养出现黄色圆形不透明菌落,出现溶血现象,进行革兰氏染色结果为阳性,用乳胶凝集法检测发生凝集反应(图 4)。



注:A:术区肿胀;B:术区有痿管形成;C:术区有脓性分泌物。
图 2 术后肉眼观察造模情况

Note. A, Swelling of the operating area. B, Fistula was formed in the operative area. C, There was purulent discharge in the operative area.

Figure 2 The model was observed by eyes after operation

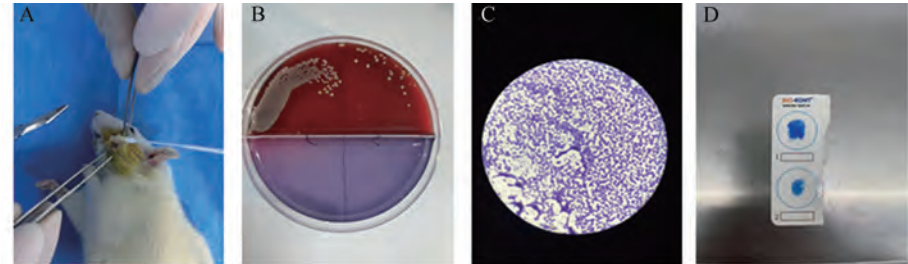


注:A:冠状面观察缺损范围变大;B:矢状面观察缺损范围变大;C:水平面观察缺损范围变大。

图 3 CBCT 表现

Note. A, Extent of the defect became larger in the coronal view. B, Extent of the defect became larger in the sagittal view. C, Extent of the defect became larger in the horizontal plane view.

Figure 3 CBCT findings



注:A:取脓性分泌物;B:血平板上细菌菌落;C:油镜下观察革兰氏染色呈蓝紫色;D:乳胶凝集反应。

图 4 细菌学检测结果

Note. A, Take purulent secretions. B, Bacterial colonies on the plate of blood. C, Gram stain was bluish-purple under oil microscope. D, Latex agglutination reaction.

Figure 4 Bacteriological test results

2.1.4 组织病理学检测

制成的病理切片在显微镜下观察可发现炎性细胞,有死骨形成(图5)。

2.2 实验结果

2.2.1 CBCT 结果

分别 2、4、8 周从各组中取下颌骨拍摄 CBCT(图6),CBCT 结果显示给药 2、4、8 周后,与 A 组生理盐水组比较,其他三组术区骨缺损范围均减小($P<0.05$),统计学有显著性差异,B 组小柴胡汤组、D 组小柴胡汤+头孢组骨缺损范围与 C 组头孢组相比减小($P<0.05$),统计学有显著性差异,D 组小柴胡汤+头孢组骨缺损范围较其他三组减小($P<0.05$),统计学有显著性差异,结果见表 2。

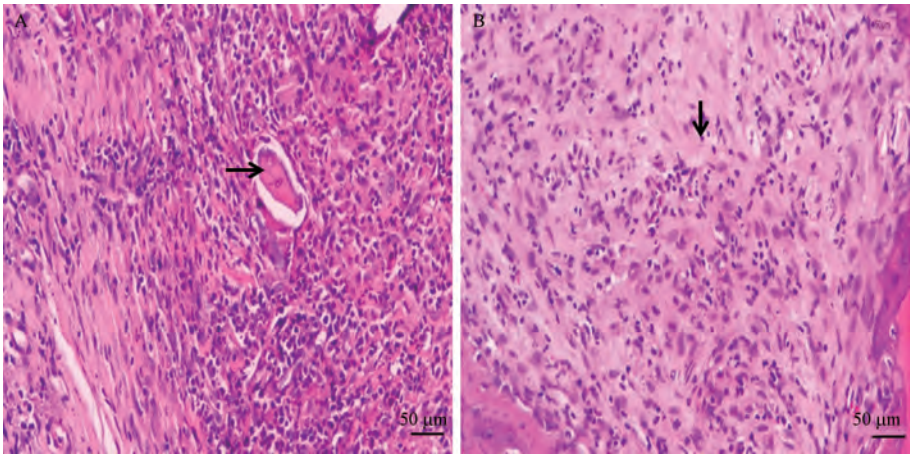
2.2.2 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 炎症因子水平比较

给药后 2、4、8 周,A 组生理盐水组 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 水平较其他三组均偏高($P<0.05$),统计学有显著性

差异,与 C 组头孢组比较,B 组小柴胡汤组 $IL-1\beta$ 水平降低($P<0.05$),统计学有显著性差异,但是 B 组小柴胡汤组 $IL-6$ 水平与 C 组头孢组比较在统计学上没有显著性差异($P>0.05$),D 组小柴胡汤+头孢组 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 水平较其他三组均降低($P<0.05$),统计学有显著性差异,结果见表 3。

2.2.3 免疫组化结果

给药后 2、4、8 周,四组均出现阳性表达(图7),A 组生理盐水组较其他三组比,平均光密度低,BMP-2 阳性表达弱($P<0.05$),统计学有显著性差异,与 C 组头孢组比较,B 组小柴胡汤组平均光密度较高,BMP-2 阳性表达强($P<0.05$),统计学有显著性差异,D 组小柴胡汤+头孢组平均光密度较其他三组均偏高,BMP-2 阳性表达强于其他三组($P<0.05$),统计学有显著性差异,结果见表 4。



注:A;箭头为死骨;B;箭头为炎性细胞。

图 5 组织病理结果(HE)

Note. A, Arrow shows the dead bone. B, Arrow shows the inflammatory cell.

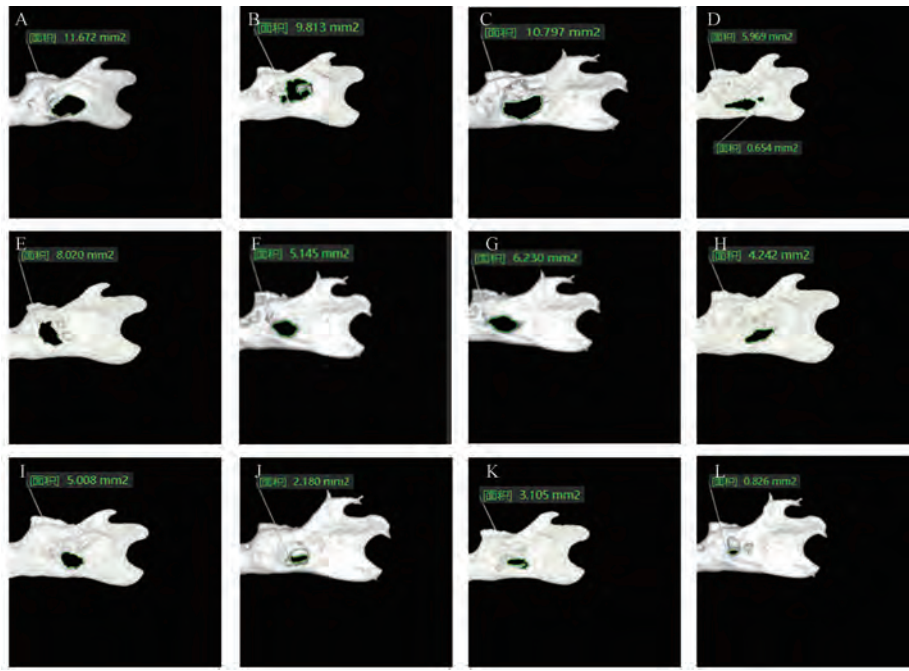
Figure 5 Histopathological findings(HE)

表 2 各时间段四组骨缺损范围比较($\text{mm}^2, \bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Comparison of bone defect extent in four groups at each time period		
组别 Group	时间(周) Time (week)	骨缺损范围 Extent of bone defect
A 组清创术+生理盐水 Group A debridement+saline	2	11.60±0.37
	4	8.29±0.31
	8	5.26±0.19
B 组清创术+小柴胡汤 Group B debridement+xiaochaihu decoction	2	9.55±0.24 ^{*&}
	4	5.50±0.29 ^{*&}
	8	2.26±0.20 ^{*&}
C 组清创术+头孢 Group C debridement+cefuroxime	2	10.39±0.30 [*]
	4	6.23±0.30 [*]
	8	3.22±0.15 [*]
D 组清创术+小柴胡汤+头孢 Group D debridement+xiaochaihu decoction+cefuroxime	2	6.50±0.26 ^{*&!*}
	4	3.13±0.10 ^{*&!*}
	8	0.80±0.13 ^{*&!*}

注:与 A 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 C 组相比, [&] $P<0.05$;与 B 组相比, [!] $P<0.05$ 。

Note. Compared with group A, ^{*} $P<0.05$. Compared with group C, [&] $P<0.05$. Compared with group B, [!] $P<0.05$.

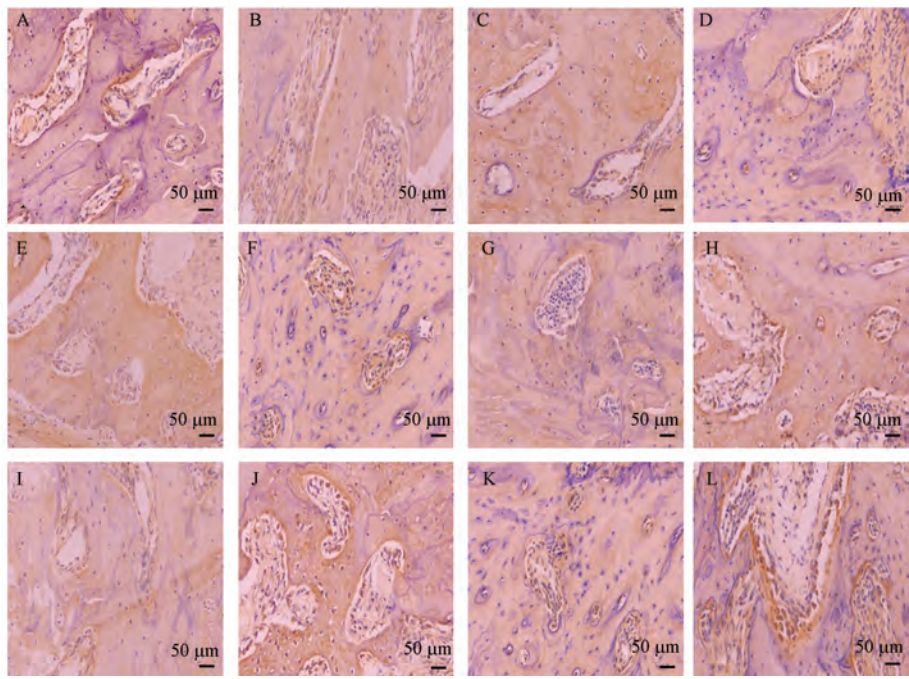


注:A~D:2 周时 A 组、B 组、C 组、D 组骨缺损范围大小;E~H:4 周时 A 组、B 组、C 组、D 组骨缺损范围大小;I~L:8 周时 A 组、B 组、C 组、D 组骨缺损范围大小。

图 6 四组不同时期骨缺损范围

Note. A~D, Size of bone defect at 2 weeks in groups A, B, C and D. E~H, Size of bone defect at 4 weeks in groups A, B, C and D. I~L, Size of bone defect at 8 weeks in groups A, B, C and D.

Figure 6 The bone defect extent in four groups at each time period



注:A~D:2 周时 A 组、B 组、C 组、D 组 BMP-2 阳性表达情况;E~H:4 周时 A 组、B 组、C 组、D 组 BMP-2 阳性表达情况;I~L:8 周时 A 组、B 组、C 组、D 组 BMP-2 阳性表达情况。

图 7 四组不同时间 BMP-2 阳性表达情况

Note. A~D, Positive expression of BMP-2 at 2 weeks in groups A, B, C and D. E~H, Positive expression of BMP-2 at 4 weeks in groups A, B, C and D. I~L, Positive expression of BMP-2 at 4 weeks in groups A, B, C and D.

Figure 7 Four groups of BMP-2 positive expression in different time

表 3 各时间段四组 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 3 The levels of $IL-1\beta$ and $IL-6$ were compared among the four groups at each time period

组别 Group	时间(周) Time(week)	$IL-1\beta$	$IL-6$
A 组清创术+生理盐水 Group A debridement+saline	2 周	45. 11±2. 23	172. 03±6. 70
	4	31. 09±0. 54	122. 92±26. 63
	8	28. 44±0. 95	77. 27±7. 46
B 组清创术+小柴胡汤 Group B debridement+xiaochaihu decoction	2	32. 55±1. 49 ^{* &}	134. 46±20. 49 [*]
	4	27. 93±0. 21 ^{* &}	80. 72±9. 93 [*]
	8	20. 76±2. 31 ^{* &}	58. 87±1. 95 [*]
C 组清创术+头孢 Group C debridement+cefuroxime	2	39. 29±4. 63 [*]	143. 74±18. 14 [*]
	4	29. 54±0. 46 [*]	85. 51±14. 20 [*]
	8	22. 83±2. 37 [*]	60. 53±5. 40 [*]
D 组清创术+小柴胡汤+头孢 Group D debridement+xiaochaihu decoction+cefuroxime	2	30. 84±0. 87 ^{* & @}	108. 38±7. 95 ^{* & !}
	4	25. 09±3. 30 ^{* & @}	68. 33±1. 37 ^{* & !}
	8	18. 29±1. 09 ^{* & @}	50. 48±1. 70 ^{* & !}

注:与 A 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 C 组相比, [&] $P<0.05$;与 B 组相比, [!] $P<0.05$, [@] $P<0.01$ 。
Note. Compared with group A, ^{*} $P<0.05$. Compared with group C, [&] $P<0.05$. Compared with group B, [!] $P<0.05$, [@] $P<0.01$.

表 4 各时间段四组 BMP-2 图像分析结果比较($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of the analysis results of four groups of BMP-2 images in each time period

组别 Group	时间(周) Time(week)	平均光密度 Mean optical density
A 组清创术+生理盐水 Group A debridement+saline	2	9. 91±0. 55
	4	17. 12±0. 23
	8	20. 28±0. 44
B 组清创术+小柴胡汤 Group B debridement+xiaochaihu decoction	2	16. 96±0. 13 ^{* &}
	4	25. 95±0. 26 ^{* &}
	8	36. 77±0. 23 ^{* &}
C 组清创术+头孢 Group C debridement+cefuroxime	2	16. 04±0. 20 [*]
	4	23. 13±0. 20 [*]
	8	33. 05±0. 13 [*]
D 组清创术+小柴胡汤+头孢 Group D debridement+xiaochaihu decoction+cefuroxime	2	23. 76±0. 43 ^{* & !}
	4	34. 79±0. 15 ^{* & !}
	8	52. 83±0. 49 ^{* & !}

注:与 A 组相比, ^{*} $P<0.05$;与 C 组相比, [&] $P<0.05$;与 B 组相比, [!] $P<0.05$ 。
Note. Compared with group A, ^{*} $P<0.05$. Compared with group C, [&] $P<0.05$. Compared with group B, [!] $P<0.05$.

3 讨论

慢性化脓性颌骨骨髓炎是一种好发生在下颌骨的较为常见的口腔颌面部疾病,其特征是炎症形成,脓液外流,死骨形成,新生骨附着及瘻管形成但全身反应不明显^[8],该病通常由金黄色葡萄球菌感染所致,中医角度认为邪毒入骨,困于筋骨,久聚未散,机体正气不足导致该病发生。该病治疗复杂,传统的治疗方法疗效不佳。因此本实验构建了慢性化脓性颌骨骨髓炎大鼠模型,模型建立后出现了上述特征,并给予小柴胡汤和抗生素观察其治疗效果的差异。

小柴胡汤在中医学上被认为是和解少阳的经典药方,因其组成独具特色,使其拥有寒温并用,苦寒为主,甘温为辅的特点,苦寒疏散气郁,祛除火

邪,甘温有益脾胃,可以扶正。其组成中的柴胡、黄芩性寒,二者配伍,可以解热;半夏、生姜属温,可以调节脾胃,防止呕吐;人参、大枣、炙甘草性温,可以益气补脾,扶正祛邪^[9],因此临床上常用来治疗发热类疾病与消化系统疾病。现代药理学研究发现小柴胡汤具有抗炎作用,有研究发现小柴胡汤可以改善大鼠关节炎炎性细胞及炎症因子的浸润^[10],降低急性上颌窦炎患者白细胞的数量,减轻炎症反应,促进愈合^[11]。中医角度认为骨生成过程是阴阳相互作用的过程,作为和解少阳经典药方的小柴胡汤能调节阴阳,达到“和”的作用。有相关研究表明小柴胡汤可以促进骨质疏松的大鼠成骨细胞及软骨的形成,改善骨密度、促使骨生成^[12-13]。无论是中医祛邪扶正角度还是抗炎、成骨作用均提示小柴胡汤可成为治疗慢性化脓性颌骨骨髓炎的药物。

临床上治疗该病基本原则是彻底清除病灶后全身应用抗生素,而 β -内酰胺类抗生素则是治疗金黄色葡萄球菌导致感染的首选药物^[14],临床治疗该病通常选用头孢类抗生素,其主要通过破坏金黄色葡萄球菌的细胞壁,抑制其繁殖而达到抗菌消炎作用^[15],因此选用头孢类药物为该实验阳性对照药物。

白细胞介素-6(interleukin-6, *IL-6*)是一种属于趋化因子家族的促炎性细胞因子,在炎症反应中起着关键作用^[16]。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)是免疫系统的一种重要介质可以调节炎症反应。慢性化脓性颌骨骨髓炎的发生与 *IL-6*、*IL-1 β* 增加有明显关系^[17-18]。小柴胡汤可以很好地发挥抗炎作用^[19],能够较好地下调 *IL-1 β* 、*IL-6* 的水平^[20],减轻由金黄色葡萄球菌引起的炎症反应。有实验研究证实,小柴胡汤可以抑制 *IL-1 β* 、*IL-6* 等炎症因子的释放从而较好的改善小鼠肺部炎症^[21]。本实验研究采用金黄色葡萄球菌制备慢性化脓性颌骨骨髓炎模型,采取血清进行检测后发现小柴胡汤对 *IL-1 β* 的下调作用略优于头孢($P<0.05$),而对 *IL-6* 下调作用,二者没有明显区别($P>0.05$),当二者联合作用时,*IL-1 β* 、*IL-6* 的水平被下调作用更明显($P<0.05$),说明小柴胡汤联合头孢治疗该病时可以更大程度地降低炎症水平,而单独使用小柴胡汤或头孢降低炎症时,二者效果相差不大。

小柴胡汤中含有槲皮素,可以刺激成骨细胞生成^[22],黄酮类成分可以通过而骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)途径刺激成骨细胞增殖,促进成骨^[23-24]。新骨用肉眼难以察觉,需要借助 CBCT 来观察,CBCT 可以清楚地反映骨缺损的范围。BMP-2 被公认为一种可以有效诱导骨和软骨形成的诱导因子^[25],可以从微观上反映新骨形成,骨形成作用越好,免疫组化检测 BMP-2 阳性表达越高。本研究观察 CBCT 发现小柴胡汤对骨缺损的修复作用优于头孢($P<0.05$),并且免疫组化检测 BMP-2 阳性表达也比头孢强,成骨作用好,而当二者联合使用来促进成骨时,成骨可以达到更活跃的状态,因此骨缺损范围较二者单独使用时小($P<0.05$),BMP-2 阳性表达较二者单独使用时强($P<0.05$),说明小柴胡汤和头孢均可以促进骨的形成,但小柴胡汤较头孢作用明显,二者联合成骨作用更好。

综上所述,通过给大鼠下颌骨开窗注射金黄色

葡萄球菌可以成功构建慢性化脓性颌骨骨髓炎模型。小柴胡汤可以抑制 *IL-1 β* 、*IL-6* 水平升高,提高 BMP-2 阳性表达而达到抗炎,促进成骨的作用,降低骨缺损,促进骨愈合,从而治疗慢性化脓性颌骨骨髓炎,而当与头孢中西医结合治疗时,效果更佳。

参考文献:

- [1] Haefls TH, Scott CA, Campbell TH, et al. Acute and chronic suppurative osteomyelitis of the jaws: a 10-year review and assessment of treatment outcome [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2018, 76(12): 2551-2558.
- [2] 韩龙,马坚.颌骨骨髓炎研究进展[J].甘肃医药,2021,40(3):198-201.
- [3] 张志愿.口腔颌面外科学[M].7版.北京:人民卫生出版社;2012.
- [4] 张志雄,刘春芳,刘明洋,等.小柴胡汤的药理作用及临床应用研究进展[J].中医药临床杂志,2021,33(3):580-584.
- [5] 胡利友.小柴胡汤化裁治疗老年旋后外旋IV°踝关节骨折术后疗效分析[D].山东:山东中医药大学,2022.
- [6] 王涛,张鹏,李建虎,等.中西医结合治疗放射性颌骨骨髓炎的效果[J].临床医学研究与实践,2018,3(18):115-116.
- [7] 张小磊,沈菊香,谢志坚.兔下颌骨慢性化脓性骨髓炎动物模型的建立[J].中国实验动物学报,2012,20(3):74-77,93.
- [8] Yadav S, Malik S, Mittal HC, et al. Chronic suppurative osteomyelitis of posterior maxilla: a rare presentation [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2014, 18(3): 481.
- [9] 奚然然,付书璠,赵永璐,等.从性味配伍探析小柴胡汤组方特点及临床运用[J].江西中医药,2022,53(10):15-17.
- [10] 张莹,周小莉,邵勤,等.小柴胡汤对胶原诱导性关节炎大鼠的抗炎作用及机制探讨[J].免疫学杂志,2015,31(9):781-785.
- [11] 朱小勇.小柴胡汤加减治疗急性上颌窦炎30例疗效分析[J].中国中医急症,2010,19(5):768,770.
- [12] 王科闯.王鸿度教授关于“少阳主骨”学术思想和临床经验总结(附“和解少阳”法对膝骨性关节炎合并骨质疏松的临床研究)[D].成都:成都中医药大学,2016.
- [13] 张芳.“和解少阳”:小柴胡汤与电针足少阳对骨质疏松大鼠骨密度、骨形态学指标的影响[D].泸州:泸州医学院,2013.
- [14] 邱佳琛.应用不同疗程抗生素治疗免疫慢性骨髓炎的疗效比较[D].兰州:甘肃中医药大学,2022.
- [15] Pigrau C, Almirante B, Rodriguez D, et al. Osteomyelitis of the jaw: resistance to clindamycin in patients with prior antibiotics exposure [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(4): 317-323.
- [16] 刘凯,杨晓江,孙绍卫.补肾活血方对去势大鼠 *IL-6* 以及骨

密度的影响 [J]. 山西中医, 2022, 38(5): 57-59, 63.

[17]

Scianaro R, Insalaco A, Bracci Laudiero L, et al. Deregulation of the IL-1β axis in chronic recurrent multifocal osteomyelitis [J]. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2014, 12: 30.

[18]

Evans CA, Jellis J, Hughes SP, et al. Tumor necrosis factor-α, interleukin-6, and interleukin-8 secretion and the acute-phase response in patients with bacterial and tuberculous osteomyelitis [J]. *J Infect Dis*, 1998, 177(6): 1582-1587.

[19]

汤鑫森, 崔悦, 朱鹤云, 等. 小柴胡汤化学成分与药理作用的研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(3): 213-215.

[20]

曹秋梅, 许周洁, 聂源, 等. 浅析小柴胡汤近十年药理研究与临床应用 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(2): 76-77.

[21]

陈平安, 黄家望, 廖灿, 等. 小柴胡汤对 NTHi 诱导的肺部炎症的影响 [J]. *中医药学报*, 2019, 47(4): 28-32.

[22]

杨亚军, 杨中林, 王冬春, 等. 芦丁与槲皮素对成骨细胞代谢影响的比较研究 [J]. *中药材*, 2006, 29(5): 467-470.

[23]

谢艳芳, 游丽娟, 张菊林, 等. 金雀异黄酮对去势大鼠分离培养的成骨细胞增殖及分化的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(24): 2671-2676.

[24]

柯可, 谢志坚, 杨晓峰. 黄酮类化合物对成骨细胞作用机制的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2015, 34(2): 81-86.

[25]

成亚琳. FSHβ 增强 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化的作用与机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.

[收稿日期] 2022-11-04

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R 国际刊号 ISSN 1671-7856 邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址: <http://zgswydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

张薇,王牧孜,邓少嫦. 实验动物屏障设施微生物污染防控管理要点 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 117-122.
Zhang W, Wang MZ, Deng SC. Operational management and prevention of contamination in barrier environment facilities of laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 117-122.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.015

实验动物屏障设施微生物污染防控管理要点

张薇¹,王牧孜²,邓少嫦^{2*}

(1.中山大学实验动物中心,广州 510006;2.广东至远生物医药科技有限公司,广州 510006)

【摘要】 实验动物屏障环境设施运行过程中的病原微生物污染严重影响研究人员和动物健康或导致生物安全事故,干扰实验结果或导致实验中断。然而,在其长期运行中杜绝污染并非易事,可因管理和操作细节的疏漏而发生。病原微生物污染是长期困扰实验动物管理者的难题。笔者从事实验动物屏障设施运行管理多年,深感细节管理在防止病原体微生物污染中的重要性,为此,根据多年的工作经验,结合设施布局、人员管理等细节问题,加以总结,以供同行探讨和借鉴。

【关键词】 实验动物屏障环境设施;病原微生物;污染;防控

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0117-06

Operational management and prevention of contamination in barrier environment facilities of laboratory animals

ZHANG Wei¹, WANG Muzi², DENG Shaochang^{2*}
(1. Laboratory Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangdong 510006, China.
2. Guangdong Zhiyuan Biopharmaceutical Technology Co., Ltd, Guangzhou 510006)

【Abstract】 Laboratory animal barrier contamination by pathogenic microorganisms during the operation of environmental facilities seriously affects research and animal health or leads to biosafety incidents, interference of experimental result, or interruption of experiments. However, elimination of contamination during their long-term operation is difficult, and can occur due to careless management or operational details. Contamination by pathogenic microorganisms is a major problem for laboratory animal managers. After engaged in laboratory animal barrier facility management for many years, The author deeply felt the importance of details management to prevent infection by pathogenic microorganism. Therefore, summarized of the details problem combined facility layout with staff management based on years of working experience, which in order to be discussed and used for reference.

【Keywords】 laboratory animal barrier environmental facility; pathogenic microbes; contamination; prevention and control

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

实验动物屏障环境设施运行过程中出现病原微生物污染的问题,影响实验人员和动物健康,轻则干扰实验结果,重则导致实验中断,甚至可能引发生物安全事故。设施病原微生物污染是长期困扰实验动物管理者的难题,笔者从事实验动物屏障设施 (laboratory animal barrier environmental

[作者简介] 张薇 (1964—),女,高级实验师,硕士,研究方向:实验动物学和人类疾病模型。E-mail: zwygqj@163.com
[通信作者] 邓少嫦 (1979—),女,硕士,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学、实验动物科技管理。
E-mail: dengshaochang@gdhami.com

facilities) 运行管理多年,深感细节管理在防止病原体微生物污染中的重要性,为此,对硬件设施的设计布局、人员管理等方面的控制关键环节和注意事项加以总结,为提升实验动物设施的管理质量和水平提供参考。

1 硬件设施的设计布局与管理细节

国内屏障设施的建设经过多年的发展,有比较完善、科学的设计布局理念。但仍存在实际运行中或多或少给管理者留下遗憾或缺陷,导致运行管理的困难。

1.1 技术夹层设计合理,方便运行维护维修

据国家标准,屏障设施室内净高和上方技术夹层的总层高不宜低于 $4.2\text{ m}^{[1]}$,其中夹层应预留一人高度便于设施运行过程中对风管、控制阀门等维护和检修。技术夹层高度不够多见于旧楼改造或建筑用途改变,或设计时预留高度不足,导致屏障设施室内高度挤压技术夹层空间,低矮夹层中风管、电源管路等密集拥挤,人员进入困难或无法进入维修,不能及时修复或无法修复故障,导致设施带病运行,环境参数不能达标,存在气流倒灌等污染风险。

国外有一部分机构的屏障设施,其技术夹层设计在屏障设施外相邻的普通走廊,风管等主要管路及关键部件安装顶部,支管穿越间隔墙体进入屏障设施顶部技术夹层,解决顶部夹层管道密集层高不足的问题,方便人员进入维护维修,且节省空间。近年来,国内有屏障设施将技术夹层布局在与污物走廊相邻水平位置,形成独立水平技术夹层走廊,风管等布局与前者相似,这种布局也可以很好的解决层高不足问题,但会占用有效水平空间。在实际设计布局中,可借鉴国内外的设计布局经验,结合具体情况选择,以解决设施技术夹层高度不够导致运行维护维修困难及其产生的次级问题。

1.2 屏障设施保持良好的密闭性

屏障设施内的环境参数是否达到国家标准,与其密闭性关系密切。屏障设施系统密闭性差,常见于送排风管接口、彩钢板拼接处、门窗、技术夹层缝隙等,主要原因是施工质量或日久老化等;除增加运行能耗外,最直接的影响是压差不稳定或不能达到国家标准^[2](相通区域最小静压差 $\geq 10\text{ Pa}$)或形成负压气流倒灌导致污染,甚至导致昆虫、野鼠入侵,造成更大生物安全隐患。因此,在施工中应严

控质量关,拼接缝隙严格密封牢固,且运行中定期维护检修,保障屏障设施的密闭性。

1.3 洁净单元房送排风调节阀门设置和排风口过滤装置

根据国家标准^[1]屏障设施洁净区送排风的设计宜“上送下排”,排风口应设置调节阀门和过滤装置。单元房送风支管和排风口均应设置风阀,一是调节单元房风量、压差,二是必要时可关闭排风和送风支管风阀,形成单元密闭空间,有利于单元隔离消毒和控制污染扩散;排风口设置过滤装置,可防止排风管粉尘堆积或堵塞或滋生微生物,甚或导致逆行污染。

屏障设施内各单元房间或区域的送排风管没有独立控制风阀,无法独立关闭送排风而形成局部负压隔离空间,一旦单元房间或局部区域出现污染,不能做到局部封闭消毒隔离和全面彻底消毒,极易造成污染扩散。因此,对进入每个单元房间的分支送风管、排风口应安装风阀,一旦出现污染,可以达到局部彻底消毒目的。

1.4 设置进入屏障设施的大型物品传递通道

对于屏障设施大型物品的消毒,目前比较通用的方法是屏障设施通过缓冲间传递大型物品,大型物品经表面擦拭消毒后放置缓冲间,在缓冲间紫外线照射消毒后传递进入屏障设施内^[3]。这种消毒方法的突出缺点是,设施在运行过程中传入大型物品困难,不易做到全面彻底消毒,尤其是物品隐蔽部位消毒不彻底,埋下交叉污染的隐患。因此,在设施布局时应考虑大型物品传递的密闭熏蒸消毒专用通道或大型传递消毒仓,以达到彻底消毒目的,减少大型物品传递过程中的污染风险。

1.5 设置进入屏障设施的物品传递渡槽

屏障设施没有配置渡槽,导致日常不能高压灭菌的小件物品不易做到彻底消毒,如拖鞋等塑料物品。或许经传递窗消毒传递可以解决,但紫外线照射存在死角,易受灰尘、有机残留物等影响,受到紫外线照射的病原微生物存在暗复活和光复活现象^[4-6],而物品浸泡在渡槽消毒液中 $30\sim 60\text{ min}$ 的消毒覆盖面更广,优于紫外线的消毒。

1.6 高压灭菌器容积配置与实际运行匹配

双扉高压灭菌器是屏障设施内物品消毒传递首选通道,但有屏障设施在设计 and 施工时,没有充分估算实际运行中所需配套物质的日或周的循环供给量,或资金预算不足或承重不够等,导致高压

灭菌器容积过小,屏障内物质补给不足,不得不提高开炉的频率,造成耗时、耗能、耗人力、易损坏的弊端,高压灭菌器的故障频率也随之增加,增加了设施污染的风险。

1.7 集中清洗交叉污染的控制

集中清洗优点是减少清洗设备的配置数量,节省空间、人力、能源等资源^[7];但不同等级笼盒等物资集中清洗分发,存在病原微生物交叉污染风险,主要发生在“集中与分发”两个环节。保持清洗笼具脏进洁出,单向流动,可减少交叉污染;但因洗笼机不能彻底杀灭笼具病原微生物,尤其是耐热芽孢、朊病毒等,仍存在外循环交叉污染风险。因此,清洗完毕分发前、各区域设施接收时有必要对笼具彻底喷雾高效消毒剂(如过氧乙酸等),再进入高压灭菌程序,可较大限度降低集中清洗导致的交叉污染风险,但长期运行仍存在污染隐患,在空间容积和经费预算充足的前提下,分开配置清洗空间和设备将更有利于长效预防交叉污染。

1.8 无菌水系统“无菌状态”的持续性

目前,国内屏障设施常用的无菌水系统主要有反渗透(反渗透+浸没式紫外线或+浓度次氯酸)、超滤(超滤+臭氧发生器+浸没式紫外线)、在线灭菌、微电解无菌水等。长期使用反渗透和超滤过滤膜,输水管道容易滋生病原微生物,而水中微生物滋生不能经过滤完全清除^[8]。微电解无菌水系统、在线灭菌系统可以维持长期无菌^[9-10],但在线灭菌存在耗能较高的缺点;微电解灭菌系统的输水管道布局为循环路径非常重要,尽可能减少死角或管路的并联旁支循环,方能达到循环杀菌的效果。因此,在布局无菌水系统时,要慎重考虑无菌水系统“无菌状态”的持续性。

1.9 屏障设施建筑结构布局分区域或单元独立控制

目前,屏障设施多为传统模式,即洁净走廊的两边布局洁净单元房间,工作人员往返多个房间,若某局部污染,工作人员将成为污染的携带和传播者;或洁净区域内功能室集中布局,如操作室或解剖室等集中在1~2间,因实验操作的需要,动物、人员在功能室交汇,一旦某动物污染,该功能室就成为交叉污染混合器,实验人员、动物成为污染的扩散者,很容易导致整个屏障设施内的污染。有学者跟踪观察某省饲养繁殖区域小鼠肝炎感染污染情况,认为饲养人员流动是导致交叉污染的重要因素

之一,屏障设施饲养人员应拥有各自独立的饲养间,避免繁育单元之间的交叉污染,符合人员单向流动原则^[11]。但做到人员不交叉,没有设施布局的配合,很难完成,除非有与设施单元数量相等的工作人员。在屏障环境生产设施的布局方面,可以借鉴维通利华的经验,布局各自独立且功能完整的繁殖小单元,有独立人流、物流、动物流通道等,人员、物品等做到全进全出,有益于及时控制感染,而互不干扰。

对于小型繁殖设施或用于实验的设施,可进行分区控制布局,洁净区内划分不同区域,区域间设置缓冲室间进行物理隔离;每区域的单元设置独立个操作间或2~3间单元室共同设计一个操作间;如此布局,优点是:(1)为人员执行单向流动提供了硬件条件;(2)硬件结构有利于控制局限污染,局部区域的划分可以快速实现隔离、消毒,有效的防止污染的扩散;(3)动物在同等级前提下可根据来源、品系特点、免疫特点、病原易感性、监测信任度等信息分区安置,从而减少交叉污染。缺点是:占用洁净空间,但从屏障设施长期运行,因污染带来的实验重复、时间浪费、人力和物力资源重复消耗,对动物、环境等消杀投入总体成本计算,这种结构对空间的占用是值得的。因此,在屏障设施的设计布局中充分考虑区域化分控设计,做到送排风、物理间隔空间独立控制,以缓冲间作为分隔或连通的物理介质。

2 软件管理的要点与细节

2.1 SOP 规范并具有可操作性

标准作业程序(standard operation procedure, SOP)是将某一事件的标准操作步骤和要求以统一的格式描述出来,用于指导完成该事件。SOP常见问题是:(1)规章制度与SOP混淆;(2)SOP罗列操作依据,文字垒砌,流程繁杂;(3)多个独立目标的操作编辑成一个SOP;(4)拿来主义,没有结合实验动物设施的具体情况。这些问题导致SOP的可操作性差、主观理解各异、操作不规范、不能快速阅读、实际情况与操作存在偏差等。

规章制度是原则性文件,对SOP具有指导性作用,而SOP是以完成一个任务目标的具体操作,无须长篇累述,仅需让操作者明确如何做,流程描述准确、简单、清楚、易懂;SOP的目的指向明确,以完成一个终点目标为一个独立SOP,让每一个操作者

即使是第一次执行,按照 SOP 能准确完成既定目标。SOP 是每个机构经验积累形成的文字程序,其发挥的作用不因人员的变动,而使技术流失或无法运行,是员工或新员工短期培训快速掌握的操作技术^[12]。

SOP 的制定应因地制宜,屏障设施的建设布局均是在遵守国家标准的大框架下构建的,但存在结构细节和配套设备不同,如单走廊结构与双走廊在制定人流、物流、动物物流的 SOP 的侧重细节有所不同,单走廊因洁净走廊与污物走廊混合使用,不可避免地存在一定流线交叉^[13],制定 SOP 时重点考虑预防单元房间、走廊使用过程中的交叉污染因素,重视 SOP 制定中的细节与实际因素的结合。

注重 SOP 的反复提炼、完善、更新,SOP 在投入执行后,要注意收集使用者反馈的信息,在遵守制度原则的框架下,完善 SOP,使其更具目的明确性、可操作性、简洁性、易执行和依从性。同时,在增加新的设备或改变设施布局后应及时补充更新。

2.2 从业人员训练有素

人员既是屏障设施运行过程中防止污染不可或缺的重要主体因素,也是导致交叉污染的重要因素之一。有报道分析我国在 1980~2010 年间人员的操作不当或失误等人为因素是导致实验动物设施感染事件发生的主要原因^[14]。训练有素的工作人员在保障设施正常、安全运行中发挥事半功倍的作用。

在职人员具有不同程度的自学能力,但受家庭琐事等干扰,时间有限;在有限时间内提高上课效率、加深记忆是最佳的解决办法。作者从 2007 年管理中山大学实验动物中心生产屏障设施,针对零基础或不规范操作习惯的技术人员、饲养人员,借鉴翻转课堂(flipped classroom)的方法,采用常规授课+自助授课+讨论提问模式,让培训者参与其中,使培训对象成为授课的主角,变被动学习为主动,提高学习效益,达到事半功倍之效果。

2.3 无菌技术、终末消毒理念在屏障设施运行中运用

“无菌技术”是指在医疗护理操作过程中,保持无菌物品、无菌区域不被污染、防止病原微生物侵入人体的一系列操作技术。该技术是医疗专业中常用的重要的技术操作,是预防手术、侵入性检查治疗等交叉污染的重要手段。借鉴引入到屏障设施人流、物流、动物物流等操作环节中,是防止病原微

生物侵入到屏障设施重要技术操作,可大大降低污染风险。

终末消毒是指传染源(包括患者和隐性感染者)离开有关场所后进行的最后一次彻底消毒,应确保终末消毒后的场所和其中的各种物品不再有病原体的存在。针对实验动物屏障设施发生污染风险时,采用终末消毒方法,可以彻底清除污染病原体。

2.4 “人流、动物物流、物流”从严规范管理

屏障设施运行过程中人流、动物物流、物流,是设施得以运行的三大关键环节,也是交叉污染的重要环节。其预防控制主要原则:(1)人流、动物物流(包括气流)执行单向流动;(2)加强动物流入屏障设施的病原微生物检测和设施内动物健康监测;(3)加强垫料、饲料、笼具等配套物质的消毒传递管理;(4)加强人员进入屏障设施的卫生健康和操作规范管理。但是,若在细节方面出现漏洞,仍然会导致感染,功亏一篑。

2.4.1 人流细节管理

生产屏障设施人流细节的管理难点主要在沐浴执行环节,人体皮肤上栖息着各种细菌、真菌、病毒,还有螨虫等小型节肢动物,它们的集合形成皮肤微生物组或皮肤菌群。人体皮肤常居住和临时居住大量的微生物^[15-17],高达 $10^7/\text{cm}^2$,其暂居菌中有致病菌或条件致病菌。因此,进入屏障内人员的沐浴清洁非常重要,这一观点可以从临床术前外科医生洗手预防手术感染的规范要求^[18-20]获得支持,而人流的沐浴环节涉及个人隐私,无法进行实时监控。目前,国内有机构采用的是全进全出,互相监督方法,即人流通道内布局设置多个独立沐浴点,规定沐浴时间,集体进入沐浴达到全进全出,互相监督的目的;有机构将沐浴设置在人流通道之外,人员沐浴更衣后,出沐浴室,再进入人流环节;监督环节在沐浴后。这两种方法可以作为借鉴,但加强人员培训,精炼操作程序,提高人员执行 SOP 依从性是关键。

使用屏障设施人流来源复杂,除工作人员外,有大量的课题组成员、学生等机构外人员,其难点在于:(1)机构外人员操作不熟练、不规范;(2)来源复杂流经多个实验室或接触不同等级实验动物或经济动物等,甚至 1 d 内往返多个不同等级实验室或接触不同等级动物;(3)不理解交叉污染的危害,依从性差。因此,需要设置严格的不流于形式的培

训考试门槛;进入实验室的培训内容、考试题目应具有专业实用性和针对性;采用闭卷理论与操作考试相结合,以加强掌握熟练程度和规范性;采用监督、惩罚与奖励多措并举,以加强该类人员的依从性。

2.4.2 动物流细节管理

新引进动物病原微生物隐性感染是屏障设施污染的主要原因之一^[21]。预防实验动物进入屏障设施导致的污染风险,主要方法是:(1)流入动物的病原微生物检测,符合标准方可进入屏障内;(2)污染动物净化符合标准后进入。即使如此严格,仍发生动物流入屏障导致的污染,其主因是设施检疫室仅布局 1 间,无法定期或必要时进行终末消毒,来源不同的动物在检疫室形成交叉污染;发生污染后,虽然将问题动物撤出,但未及时进行内源性污染的有效拦截,即:未及时对检疫室环境以及问题动物接触到的所有物品、场所进行消毒,未对共居一室的动物隔离检疫,未对接触人员隔离衣、手套、拖鞋进行紧急消毒处理等,这些问题细节终将带来交叉污染。因此,根据设施运行容量需要,布局两个或以上检疫室,且设置动物来源信任名单、来源背景可疑名单,分类检疫;对检疫不合格动物的撤出路径、及其接触的环境、物品、动物、人员等细节制定切实可行的紧急消毒 SOP,方能最大限度拦截外源性和内源性污染。

2.4.3 物流细节管理

维持屏障设施基本运行的配套物品主要有饲料、垫料、笼具等,大部分可经双扉高压灭菌器传递。用于实验的屏障设施,需要传递的实验仪器、试剂等种类繁多,需要分类消毒传递;且物品无论是经高压灭菌、传递窗、渡槽、熏蒸通道传递,均应进行首次拦截消毒与二次清洁消毒,即:喷雾消毒进入屏障设施外勤区域的物品,减少病原微生物对屏障设施外勤区域的污染;不能高压灭菌的物品需再次进行清洁消毒剂擦拭或清洗,减少有机物对化学消毒剂、紫外线消毒的干扰,保障后续消毒的有效性,降低后续传递环节的污染风险。

3 总结

屏障环境设施条件下运行过程中,可以感染大小鼠等实验动物的病原微生物很多,引起感染的因素或单因素或多因素^[22]。预防控制污染的关键环节是人流、物流、动物流过程中防御污染的细节控

制。如:不同等级、区域人员交叉流动;屏障内的工作人员出现手套破损或口罩带断裂处理不当,忽视疑似污染问题等细节,均可导致污染的发生。实验动物屏障环境设施长期运行,维持洁净状态并非易事^[3],病原微生物污染的控制是该行业共同的难题,污染会在悄无声息之中发生或暴发流行,无法做到未卜先知;《黄帝内经》曰:“上工治未病,不治已病”,无论是疾病或交叉污染,防患于未然是首选;预防污染的环节涉及建设布局、运行管理的各个细节,在设施布局、人员管理、SOP 的制定、监督检查中要充分考虑预防污染的细节因素,并加以整合融入,注重设施硬件、软件管理细节的互补,尽可能做到预防污染的全覆盖,最大限度地降低、减少污染发生或扩散的风险。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国住房和城乡建设部. 实验动物国家标准《GB 50447-2008 实验动物设施建筑技术规范》: GB 50447-2008 [S]. 2008.
- [2] 全国实验动物化标准委员会. 实验动物国家标准《实验动物环境与设施 GB14925-2010》: GB 14925-2010 [S]. 2010.
- [3] 彭丽娜,王朝霞. 高校实验动物屏障设施微生物监控管理 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 154-159.
- [4] 矫彩山,孙晓宇,邓国政. 紫外线消毒中的光复活作用 [J]. 环境科学与管理, 2006, 31(9): 125-128.
- [5] Lazarova V, Savoye P, Janex ML, et al. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives [J]. Water Sci Technol, 1999, 40(4-5): 203-213.
- [6] 尤作亮,张金松,刘茜. 饮用水紫外消毒技术 [J]. 城镇供水, 2004, 1(1): 61-63.
- [7] 郑琳琳,舒加乐,徐汪节,等. 实验动物设施洗笼机配置调研及安装设计 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 92-96.
- [8] Kurtz DM, Feeney WP. The influence of feed and drinking water on terrestrial animal research and study replicability [J]. ILAR J, 2020, 60(2): 175-196.
- [9] 张薇,唐彬,赵勇,等. 微电解无菌水系统在实验动物屏障设施中应用的跟踪监测 [J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2): 117-121.
- [10] 张薇,唐彬,黎福荣,等. 微电解水用于 SPF 级实验动物饮用水初探 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 394-398.
- [11] 刘香梅,张钰,赵维波,等. 广东省屏障设施小鼠群中小鼠肝炎病毒感染情况 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 72-74.
- [12] 王金恒,范昌发,刘佐民. 屏障设施实验动物生产管理 SOP 的制定和实施 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(3): 32-33.
- [13] 杨九祥. 实验动物设施屏障环境设计与建造要点 [J]. 洁净与空调技术, 2021, 7(4): 92-96.

[14] 刘艳, 武桂珍, 王琬. 实验动物设施感染案例分析及控制对策 [J]. 中国公共卫生管理, 2012, 28(2): 128-129.

[15] Edmonds-Wilson SL, Nurinova NI, Zapka CA, et al. Review of human hand microbiome research [J]. J Dermatol Sci, 2015, 80(1): 3-12.

[16] Fredricks DN. Microbial ecology of human skin in health and disease [J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2001, 6(3): 167-169.

[17] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body [J]. PLoS Biol, 2016, 14(8): e1002533.

[18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 医院管理国家标准《病区医院感染管理规范》: WS/T 510 - 2016 [S]. 2016.

[19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中华人民共和国卫生行业标准《医务人员手卫生规范》: WS/T313 - 2019 [S]. 2019.

[20] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公告 [J]. 中国卫生法制, 2020, 28(2): 24.

[21] 乔彦华, 姚紫彤, 孙泉, 等. 屏障设施条件下控制大鼠感染仙台病毒的措施 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(8): 113-115.

[22] 马春艳, 耿志宏, 刘伟. 浅谈生物安全实验室安全事故的预防 and 有效控制 [J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(4): 37-40.

[收稿日期] 2022-08-11

(上接第 99 页)

[13] 姜丽平, 李龙婕, 宫德正, 等. 碘乙酸钠诱导原代大鼠软骨细胞凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(2): 247-253.

[14] Rockel JS, Bernier SM, Leask A. Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNFalpha-induced MEK/ERK signalling [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(1): R8.

[15] Jiang C, Luo P, Li X, et al. Nrf2/ARE is a key pathway for curcumin-mediated protection of TMJ chondrocytes from oxidative stress and inflammation [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(3): 395-406.

[16] 丁童, 周彦鹏, 冯立平. 长链非编码 RNA MEG3 靶向下调 miR-21 对 IL-1 β 诱导的软骨细胞凋亡及炎症反应的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(4): 515-523.

[17] Liu YR, Yang L, Xu QQ, et al. Long noncoding RNA MEG3 regulates rheumatoid arthritis by targeting NLRC5 [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 14270-14284.

[18] 刘振峰, 梁治权, 邓迎杰, 等. 骨性关节炎中 lncRNA MEG3 的表达及其与 VEGF 的相关性分析 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(16): 8-12.

[19] Wang A, Hu N, Zhang Y, et al. MEG3 promotes proliferation and inhibits apoptosis in osteoarthritis chondrocytes by miR-361-5p/FOXO1 axis [J]. BMC Med Genomics, 2019, 12(1): 201.

[20] Lin JY, Kuo WW, Baskaran R, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus [J]. Aging, 2020, 12(8): 6852-6864.

[21] Liu W, Chen Q, Liu Z, et al. Zihuai recipe alleviates cyclophosphamide-induced diminished ovarian reserve via suppressing PI3K/AKT-mediated apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 113789.

[22] 林健静, 曾晖, 肖德明, 等. 白藜芦醇激活 PI3K/Akt 信号通路对软骨细胞细胞外基质合成的影响 [J]. 中国矫形外科杂志, 2017, 25(13): 1220-1224.

[收稿日期] 2023-01-31

彭梦薇,刘燕,张艳,等. 蛋白合成与降解信号参与肿瘤恶病质肌肉萎缩及中医药调节机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 123-129.

Peng MW, Liu Y, Zhang Y, et al. Protein synthesis and degradation signals are involved in tumor Cachexia muscle atrophy and the regulatory mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 123-129.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.016

蛋白合成与降解信号参与肿瘤恶病质肌肉萎缩及中医药调节机制研究进展

彭梦薇,刘 燕,张 艳,郝羚伦,陈玉龙,吴耀松*

(河南中医药大学 中医药科学研究院,河南省中医方证信号传导重点实验室,郑州 450046)

【摘要】 恶病质是一种涉及多个器官的多因素代谢障碍综合征,是恶性肿瘤患者常见的致死因素。临床最主要的症状为肌肉萎缩和丢失,其机制与蛋白质过度降解及合成障碍相关。近年来中医药凭借副作用少以及多靶点、多通路干预疾病等显著优势,在防治肿瘤恶病质肌肉萎缩的方面具有独特价值。本文主要是从不同信号介导的肌肉蛋白降解及合成对肿瘤恶病质肌肉萎缩的影响及中医药的调节作用展开论述,以期 of 中医药治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩的临床应用和研究提供一定的参考。

【关键词】 肿瘤恶病质;肌肉萎缩;蛋白质合成;蛋白质降解;调控信号;中医药防治

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0123-07

Protein synthesis and degradation signals are involved in tumor Cachexia muscle atrophy and the regulatory mechanism of traditional Chinese medicine

PENG Mengwei, LIU Yan, ZHANG Yan, HAO Linglun, CHEN Yulong, WU Yaosong*

(Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Syndrome and Prescription in Signaling, Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Cachexia is a syndrome of multifactorial metabolic disorders involving multiple organs and is a common fatal factor in patients with malignant tumors. The major clinical symptoms are muscle atrophy and loss, and their mechanism is associated with excessive protein degradation and synthesis disorders. In recent years, traditional Chinese medicine has made a significant advantage in the use of few side effects, multi-targets, and multi-channel intervention diseases. It has unique value in preventing and treating tumor disease and muscle atrophy. This review mainly discusses the effect of muscle protein degradation and synthesis mediated by various signals on tumor Cachexia muscle atrophy and the regulatory role of traditional Chinese medicine to provide a reference for the clinical application and research of traditional Chinese medicine in the treatment of tumor Cachexia muscle atrophy.

【Keywords】 cancer Cachexia; muscle atrophy; protein synthesis; protein degradation; molecular mechanism; traditional Chinese medicine prevention and treatment

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

肿瘤恶病质是一种多因素导致的代谢障碍综合征,是晚期肿瘤患者致死的常见并发症^[1]。其中肌肉的持续性减少导致进行性的体重下降是肿瘤恶病质患者最主要的临床表现,蛋白质丢失是引起

【基金项目】 国家自然科学基金(82104717);河南省科技攻关重点研发与推广专项(202102310493);河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020028);河南省科技攻关(192102310160)。

【作者简介】 彭梦薇(1996—),女,硕士研究生,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证基础。E-mail: pengmengwei1@126.com

【通信作者】 吴耀松(1976—),女,硕士,教授,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证基础。E-mail: linawys@163.com

肌肉减少或萎缩的主要因素。近年来相关的研究报道显示,研究者们对肿瘤恶病质患者肌肉减少症的关注日渐增加,认为肌肉的减少或萎缩与蛋白质过度降解及合成障碍有关^[2]。中医药在治疗肿瘤恶病质方面具有显著优势,可减轻肌肉萎缩,增强机体免疫力,延长患者生存期,关于其作用机制,尤其是对肌肉蛋白合成和降解调节方面已经开展了大量的研究,现将中医药调节肌肉蛋白合成和降解防治肿瘤恶病质肌肉萎缩的机制作一综述,以供后续相关研究参考和借鉴。

肿瘤恶病质归属于中医“虚劳”范畴,罹患久病重病失于调理、气血耗伤或手术、放化疗伤及正气是该病形成的主要诱因。《素问·玉机真藏论篇》曰:“大骨枯槁,大肉陷下,胸中气满,喘息不便,其气动形,期六月死……”是该病的临床表现。中医学认为,该病的核心病机为气血阴阳虚衰,脏腑元气亏损,脾胃运化失常,久虚不复最终出现肌肉萎缩^[3-4],虽主要病位在脾胃,但病程中多出现五脏交亏,互为转换的状况,“虚者补之”“扶正培本”是治疗虚劳的基本原则,脾主水谷运化,为后天之本,气血生化之源,中医临床主要通过调理脾胃固本,资后天而补先天,以促进五脏虚损的修复。而肿瘤恶病质临床流行病学调查研究也证实,其最常见的证型是气虚证,最常见的病位证候要素为脾^[5]。研究者认为骨骼肌蛋白降解增加、合成减少与中医脾虚具有相通性,肿瘤恶病质导致的肌肉萎缩既是脾失健运的原因,又是脾虚的结果^[6]。还有研究者认为肿瘤恶病质患者肌肉瘦削,舌淡,食欲下降,能耗增加的表现,张锡纯将其辨证为脾虚证,从脾论治是张锡纯治虚劳的切入点,其治疗主要以调养脾胃为主^[3]。由此可知,肿瘤恶病质的中医核心病机主要责之于脾虚,因此,临床上本病的治疗常以健脾类中药为主。已有大量研究报道了中医药治疗肿瘤恶病质的临床运用和分子机制,结果表明,中药单体和中药复方可调节肌肉蛋白的合成和降解信号靶点与通路发挥抗肿瘤恶病质肌肉萎缩的作用。

现代研究认为,肌肉质量是通过蛋白质合成和降解之间的平衡来决定的,生理条件下,肌肉蛋白合成和降解维持在动态平衡范围^[7],肿瘤恶病质肌肉消耗萎缩的本质是肌肉蛋白合成下降、分解代谢旺盛、肌肉蛋白合成与分解平衡被打破的结果^[8]。研究显示,细胞内多个信号通路参与了肌肉蛋白降解和合成的过程,其中参与蛋白质降解过程的主要

信号通路有泛素-蛋白酶体依赖性途径(UPP)、线粒体凋亡途径及自噬途径^[9];而以雷帕霉素靶蛋白(mTOR)为中心的信号网络主要调控骨骼肌蛋白质的合成代谢^[10]。研究显示,中药主要可影响以上信号通路调节肌肉蛋白的合成与降解发挥肿瘤恶病质肌肉萎缩的治疗作用。

1 蛋白质合成与降解参与肿瘤恶病质肌肉萎缩的发生机制

1.1 泛素-蛋白酶体途径

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-dependent proteasome pathway, UPP)是介导体内肌纤维和大部分可溶性蛋白降解最主要的途径之一,其信号激活会加速骨骼肌蛋白质的降解。UPP是由泛素化底物蛋白的酶和识别并分解泛素标记底物蛋白的蛋白酶体构成,这种泛素与底物的结合是通过E1、E2、E3酶组成的级联反应进行的^[11],其中泛素蛋白连接酶E3是泛素化中的关键酶,主要是通过特异性识别靶蛋白,参与底物识别来进行蛋白质的降解^[12]。泛素连接酶E3中肌肉环指状基因1(muscle ring finger 1, MuRF1)和肌肉萎缩基因(muscle atrophy f-box, MAFbx/Atrogin-1),通常通过STAT3、NF- κ B、FoxO3和p38 MAPK被激活,其在肿瘤恶病质动物模型中高表达被看作是肌萎缩的重要标志物^[13-14]。肿瘤微环境中存在大量IL-6促炎因子,可通过磷酸化下游转录因子STAT3蛋白,激活UPP途径相关因子MuRF1、MAFbx的表达,促进蛋白质降解^[15]。NF- κ B是p50/p65构成的最为常见的异源二聚体,而IL-1、TNF- α 、TNF样凋亡诱导(TNF like weak inducer of apoptosis, TWEAK)等在内的许多炎症因子通过激活IKK复合物,磷酸化I κ B α ,活化NF- κ B的核移位导致泛素连接酶高表达,激活了UPP,泛素化的I κ B α 被26S蛋白酶体降解,诱导异源二聚体对细胞核进行定位,发挥转录活性,增加了蛋白质降解^[16]。FoxO3属于叉头因子O蛋白家族(forkhead box class O family, FoxO),既是PI3K/AKT信号的下游调节因子,也是骨骼肌蛋白质降解的调节器。PI3K/AKT信号通过抑制FoxO3核转位而阻止其转录,同时阻止E3连接酶MuRF1和MAFbx/Atrogin-1的上调,抑制蛋白水解系统激活,减少蛋白降解^[17]。p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)也被称为应激激活蛋白激酶,是MAPK家族中的一员,同时也是MAFbx/Atrogin-1和MuRF-1泛

素连接酶的信号调节因子,炎症因子激活 p38 MAPK,触发泛素连接酶的上调,启动 UPP 蛋白水解机制参与恶病质肌肉损耗^[18]。p38 还能磷酸化并激活 NF- κ B,二者通过不同通路被激活,不依赖于 Akt 和 NF- κ B 信号通路。

1.2 自噬溶酶体途径

自噬溶酶体系统 (the autophagy lysosomal pathway, ALP) 是真核细胞内广泛存在的蛋白水解途径之一,在调节肌肉蛋白稳态中起着重要的作用^[19-20]。自噬是溶酶体介导的降解过程,参与细胞质内蛋白质和细胞器的溶解。自噬的过程包括诱导、启动、延长、成熟降解四个阶段。自噬前体在形成半月形分隔膜后,延伸并完全包裹底物,将其运输至溶酶体后,形成自噬溶酶体,进而完成底物的彻底降解。肿瘤组织生长过快会导致营养匮乏,荷瘤动物会出现肌肉萎缩等恶病质状态,是因为能诱导骨骼肌发生自噬为其肿瘤组织的快速生长提供必要的能量,其骨骼肌中可见自噬相关基因 (Atg6/Beclin1、P62、LC3B/LC3A、Atg1/ULK1) 表达上调^[21]。丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 是一种十分重要的自噬相关蛋白,其定位在细胞质中,当 Akt 激活后能进一步活化其底物 mTOR,从而抑制细胞自噬的发生,促进肌肉蛋白的合成。另外在 Akt 的下游还有一个基因 FoxO3,被证实与肌肉蛋白降解密切相关。LC3B 作为广泛使用的自噬标记物参与自噬体的形成,而 Sirtuin-1 可通过去乙酰化作用,调节自噬相关蛋白,如 Atg5、Atg7 和 Atg8,从而调节自噬现象。

1.3 线粒体凋亡途径

线粒体凋亡途径是特异性骨骼肌蛋白质降解途径,在癌性恶病质患者以及动物模型中广泛存在。线粒体凋亡途径中,在凋亡诱导因子的作用下,Caspase-8 被激活,蛋白被后者剪切,移位 C 端到线粒体外膜,其余 Bcl-2 家族促凋亡蛋白改变线粒体膜的通透性,将线粒体内的蛋白释放到胞质,从而促进 Caspase-9 前体活化,活化的 Caspase-9 激活 Caspase-3,从而诱导细胞凋亡^[22]。半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 是细胞凋亡中关键因子,凋亡启动后,下游的 Caspase 通过死亡受体途径进行一系列级联反应,激活 Caspase-8、Caspase-10,并通过剪切下游 Caspase-3 来执行凋亡,完成蛋白质的降解。而 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关蛋白 (Bcl-2) 位于线粒体膜上,其表达的激活能打破线粒体平衡,改变线粒体膜通透性,同时

激活反馈机制,通过抑制 Bax 活性,促进细胞凋亡。

1.4 TGF- β 途径

激活素 A (activin A, Act A)、TNF 样凋亡诱导 (TNF like weak inducer of apoptosis, TWEAK)、肌生成抑制蛋白 (myostatin) 等多种蛋白质都属于转化因子- β 超家族 (TGF- β)。TGF- β 家族包含的各种因子已被各种体内外研究证实与肿瘤恶病质肌肉萎缩的发生发展密切相关,可通过磷酸化下游转录因子 Smad2/3,调节 Akt 介导的下游因子 mTOR 和 FoxOs,通过 mTOR 途径抑制肌蛋白的合成,通过 FoxOs 激活 UPP 途径,使肌蛋白合成受阻,降解加剧^[23-24]。由骨骼肌细胞合成分泌的肌肉生长抑制素 (Myostatin) 通过抑制细胞周期过渡,放缓成肌细胞的生长速度,抑制肌细胞增殖,诱导恶病质的发生。肌分化生长因子 (myogenic differentiation, MyoD) 和肌细胞生成素 (Myogenin, MyoG) 是 C2C12 肌管中常见的骨骼肌分化标志,MyoG 的生成受到 Myostatin 的抑制,使成肌细胞不能分化为多核的融合肌管细胞。而活化的 NF- κ B 能够促进 myostatin 表达增加,抑制 MyoD 的表达^[25-26]。TWEAK 是 TNF 超家族成员之一,其高表达能激活 NF- κ B 信号,增强炎症因子的表达,降低骨骼肌氧化代谢,介导骨骼肌萎缩的发生发展^[27-28]。

1.5 线粒体途径

癌性恶病质中骨骼肌萎缩发生的重要因素之一是线粒体能量代谢障碍^[29-30]。线粒体的形态结构的稳定对维持骨骼肌细胞的正常生理功能也至关重要^[31-32]。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (Per-oxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α , PGC-1 α) 是调节线粒体生成和骨骼肌氧化代谢关键因子,PGC-1 α 的过表达能增加线粒体 ATP 含量,恢复线粒体生物合成功能,促进骨骼肌中线粒体功能调节相关蛋白的表达来抑制骨骼肌萎缩^[33]。研究发现,PGC-1 α 通过调控核呼吸因子 (nuclear respiratory factors, NRFs) NRF1/2 表达,激活线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM),达到促进线粒体生成的目的。线粒体解偶联蛋白-2 (UCP-2) 和解偶联蛋白-3 (UCP-3) 是解偶联蛋白家族成员,与线粒体氧化磷酸化功能密切相关,其表达在癌因性恶病质肌肉能量代谢中显著上升,与骨骼肌的消耗有关^[34]。

1.6 mTOR 信号通路

mTOR 信号通路在蛋白质合成代谢中起重要作用

用,是肿瘤恶病质肌肉萎缩的关键通路。该途径由磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 组成, PI3K 生成的磷脂酰肌醇三磷酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P), 是 Akt 被活化所必需的, PI3P 调控蛋白质的合成代谢是通过磷酸化 Akt 的 Ser473 和 Thr308 位点^[35], 最后磷酸化 mTOR, 抑制蛋白质合成^[36]。IGF-1 诱导下游因子 PI3K/AKT 激活来介导肌肉萎缩, Akt 可以通过调节下游因子 mTOR 途径促进肌蛋白的合成。胰岛素生长因子-1 (insulin-like growth factors-1, IGF-1) 是一种刺激肌卫星细胞生长分化以及肌蛋白合成调节因子, 通过诱导下游因子 PI3K/AKT 来介导肌肉萎缩, Akt 可以双向调节其下游因子 mTOR 和 FoxOs 来达到抑制骨骼肌减少的目的, 通过 mTOR 途径促进肌蛋白的合成, 也可以通过抑制 FoxOs 来抑制泛素蛋白连接酶 MuRF1 和 MAFbx。mTOR 途径的激活是通过 Akt 磷酸化 mTOR 调控其下游分子真核生物启动因子 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1) 和核糖体 S6 蛋白激酶 (S6k), 增加翻译起始和延长来促进骨骼肌蛋白的合成^[37]。

1.7 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路是较为保守的通路, 拥有复杂的调控网络, 其关键蛋白的异常可引起通路的激活, 从而在癌症的进展中发挥重要作用。靶向该通路的药物对于癌症肿瘤恶病质的治疗有潜在的作用。

2 中医药对蛋白质合成与降解信号参与肿瘤恶病质肌肉萎缩的调节作用

2.1 泛素-蛋白酶体途径

大量研究显示, 部分中药单体和复方能通过调节 UPP 信号和相关靶点发挥肿瘤恶病质肌肉萎缩的干预作用, 主要涉及 UPP 上下游的 STAT3、NF- κ B、FoxO3 和 p38 MAPK 等主要分子和靶点。报道显示中药单体隐丹参酮、复方六君子汤等可抑制 STAT3 的磷酸化, 下调 UPP 系统相关因子 MuRF1、MAFbx 的表达, 从而阻止荷瘤小鼠骨骼肌的降解^[38-39]。而六君子汤、欧前胡素、山姜素等可显著降低血清中炎症细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的表达, 下调 MuRF1 和 Atrogin-1 表达水平, 其机制也与 UPP 上游信号 STAT3 信号活性受抑有关^[40-43]。表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、黄芩苷、芍药提取物等中药单体能通过抑制 NF- κ B (p-p65、p65、I-

κ B α) 的活性, 进而抑制 UPP 下游因子 MuRF1、MAFbx 等的表达, 缓解荷瘤小鼠骨骼肌的萎缩^[44-46]。而黄芩苷、芍药以及鲜枸杞提取物、山姜素等抗肿瘤恶病质肌肉萎缩的作用可能与药物抑制肿瘤细胞分泌炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 有关, 通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活, 从而减少了蛋白质的降解^[43, 45-47]。黄豆苷元可通过 FoxO 途径抑制 UPP 的激活, 同时下调 Atrogin-1、MuRF1 的水平, 并上调 MyHC 和 MyoG 的水平发挥抗肌肉萎缩的作用^[48]。另外涉及 FoxO 相关 UPP 信号缓解肿瘤恶病质肌肉萎缩的中药还有知母、黄柏、芳樟醇、厚朴酚等^[26-27], 知母、黄柏、芳樟醇、厚朴酚能通过提高 IGF-1 或 Akt 的水平来下调 FoxO3、Atrogin-1 和 MuRF1 的水平, 抑制 UPP 的激活, 知母、黄柏同时还可下调炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 水平。保元解毒汤能明显抑制 E3 泛素连接酶 Atrogin-1 和 MuRF1 基因的表达水平, 抑制 p38 MAPK mRNA 表达和蛋白质磷酸化^[49]。而鲜枸杞提取物能下调人类肝癌细胞系 HepG2 荷瘤小鼠血清中促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和肌肉中 p38 MAPK、NF- κ B 的表达^[47]。

2.2 自噬溶酶体途径

研究显示, 中药活性成分、复方、单味中药等可调节不同自噬蛋白影响肿瘤恶病质肌肉萎缩的动物或细胞模型及细胞分化, 保护肌肉细胞的功能, 发挥抗肌肉萎缩的效应, 主要涉及的自噬关键信号分子有 Akt、LC3、sirtuin-1 等。中药黄芪和当归药对可显著上调 Akt 和 mTOR 蛋白的表达, 具有促进肿瘤恶病质小鼠骨骼肌肌肉蛋白合成的作用, 其机制可能与细胞自噬受抑有关^[50]。中药单体苦参碱可提高 Akt、mTOR 和 FoxO3 的磷酸化水平, 改善骨骼肌蛋白合成, 促进成肌细胞分化, 改善肌管萎缩^[51]。研究发现, 知母和黄柏药对可通过 Akt 相关信号干扰自噬溶酶体途径, 诱导自噬标志物 LC3B 的活性, 使小鼠生存期显著延长, 逆转晚期癌症诱导的骨骼肌萎缩^[52]。报道显示, 中药单体姜黄素和白藜芦醇可改善荷瘤小鼠腓肠肌、比目鱼肌的重量以及肌纤维横截面积, 增加荷瘤小鼠肌肉组织中 Sirtuin-1 的表达, 减弱荷瘤小鼠的肌蛋白水解^[53]。

2.3 线粒体凋亡途径

研究证明, 中药单体和复方的活性成分可调节不同的凋亡因子影响蛋白质的降解, 发挥抗肿瘤恶病质的功能, Caspase-3、Bcl-2 是评价细胞凋亡水平的关键因子。姜黄素类似物通过活化 Caspase-3, 诱

导了埃利希氏腹水癌细胞的凋亡,有显著抗恶病质作用^[54]。芪胶胶囊诱导的 HCT 116 (人结肠癌细胞)的凋亡伴 Caspase-3 蛋白表达的下调,同时能预防荷瘤小鼠体重减轻与恶病质^[55]。中药有效成分藏红花水提物可影响 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠骨骼肌凋亡指数,上调抗凋亡蛋白(Bcl-2)和 Bax 的表达比例,降低促凋亡蛋白(Caspase-3 和 Bax)的水平,拮抗线粒体凋亡途径激活所致蛋白质的降解^[56]。

2.4 TGF- β 途径

中药有效成分厚朴酚能降低 Myostatin 的表达,抑制 SMAD2/3 的磷酸化,并升高 p-FoxO3a 的表达,同时显著逆转 MyoG、MyoD 表达的下降,发挥抗肿瘤恶病质肌肉萎缩的作用^[57]。而牛樟芝提取物则可通过抑制 Myostatin 的释放,调节相关基因的表达,如促进 ActRIIB、FoxO3、MuRF1、MAFbx 等基因的表达,抑制 p-Akt 和 p-FoxO3 表达,从而显著逆转肌肉萎缩^[58]。

2.5 线粒体途径

中药复方保元解毒汤和人参皂苷 Rg3 可促进包括 PGC-1 α 、TFAM、NRF1/NRF2 在内的线粒体合成关键蛋白的表达,改善小鼠腓肠肌线粒体形态和数量,增加腓肠肌质量和肌纤维横径,减缓动物体重下降,缓解癌因性肌肉萎缩^[49,59-61]。同时,保元解毒汤能显著降低 UCP-2、UCP-3 mRNA 和蛋白表达水平,改善 Apc^{min/+} 恶病质小鼠模型肌肉萎缩,其机制可能与血清中 IL-6 含量,UPP 活性受抑有关^[62]。

2.6 mTOR 信号通路

黄芪、当归药对、褐藻多糖硫酸酯、厚朴酚通过上调 IGF-1 的水平,激活 mTOR 信号通路,通过促进肌蛋白的合成缓解骨骼肌的萎缩^[50,63-64]。而褐藻多糖硫酸酯、厚朴酚、知母黄柏药对、芳樟醇、牛樟芝提取物能上调 IGF-1 的水平同时抑制 FoxO3 介导的 UPP 的激活,下调泛素蛋白酶 E3 MuRF1 和 MAFbx 的水平抑制肌蛋白的降解^[52,58,63-65]。据报道显示,可调节 mTOR 信号的中药及单体主要有褐藻多糖硫酸酯、厚朴酚。褐藻多糖硫酸酯、厚朴酚可通过上调 IGF-1 的水平,诱导肌蛋白合成相关因子(p70S6k、4EBP-1)激活,增加肌蛋白的合成,发挥抗肿瘤恶病质肌肉萎缩的作用^[63-64]。

2.7 Wnt 信号通路

通过网络药理学分析,四君子汤主要通 PI3K-Akt 和 Wnt 信号通路缓解癌因性恶病质,但这仅仅

是基于数据分析,缺乏体内外实验证明^[66]。研究发现,表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)能够抑制 Wnt 信号通路,从而抑制其关键下游转录激活因子肌卫星细胞的增殖^[67]。通过蛋白质组学(液相色谱-串联质谱法,LC-MS/MS)联合 IPA (ingenuity pathway analysis,通路分析软件)进行了探索性分析,发现表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECG)通过 Wnt 以及 mTOR 信号通路增强 C2C12 细胞的分化活性^[68]。

3 总结与展望

基于以上文献综述,由于肿瘤恶病质复杂的因素、机制和骨骼肌合成降解的网络信号途径,多数信号调控肌蛋白的合成和降解往往是相互影响、同时发生的,例如,同一个蛋白分子可能介导多种信号途径参与蛋白合成和降解过程。因此,在进行中医药抗肿瘤恶病质的研究时应充分考虑各通路之间的协同作用,针对多通路的关键因子进行检测,同一通路介导的不同途径之间进行关联研究,可能更能体现中医复方多靶点、多通路干预特点。

关于肿瘤恶病质的发病机制也需要进一步的研究,大量的文献表明了正是因为肿瘤恶病质肌肉萎缩各信号通路相互耦联作用的复杂机制,单一的干预途径很难遏制恶病质的进展,导致以靶向药物治疗的现代医学治疗在复杂的肿瘤微环境中非但不能起到理想的治疗作用,甚至会带来严重的并发症,而中医治疗的整体观念,以及中医药的单体和复方多靶点、多环节的作用特点,在临床肿瘤恶病质的治疗中具有独特的优势。但目前中医药防治肿瘤恶病质蛋白质降解及调节肌肉蛋白合成的相关机制研究还停留的初步阶段,主要集中于泛素-蛋白酶体途径、自噬溶酶体途径、水解蛋白依赖途径、mTOR 信号通路、Wnt 信号通路、骨骼肌代谢调节因子等信号通路,关于中药复方或单体治疗肿瘤恶病质的机制尚缺少大量、系统、深入的研究来论证。

参考文献:

- [1] Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia; an international consensus [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.
- [2] Vainshtein A, Sandri M. Signaling pathways that control muscle mass [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(13): 4759.
- [3] 刘杰, 罗莉, 苗翠影, 等. 浅析张锡纯治“虚劳”思路在肿瘤恶病质治疗中的应用 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2019, 1(3):

- 18–20.
- [4] 桑亚洲, 张艳, 刘燕, 等. 肿瘤恶病质发病机制及中医药防治研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 203–213.
- [5] 苏雅, 祝永福, 夏黎明. 中医辨证治疗癌症恶病质临床疗效观察 [J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(9): 1251–1254.
- [6] 靖林林, 陈筱婷, 孙学刚. 肿瘤诱导细胞自噬致营养不良与脾主肌肉四肢的相关性探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4365–4367.
- [7] Aversa Z, Costelli P, Muscaritoli M. Cancer-induced muscle wasting: latest findings in prevention and treatment [J]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(5): 369–382.
- [8] Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(1): 58–74.
- [9] 黄燕峰, 魏连波. 骨骼肌蛋白代谢及其调控机制研究进展 [J]. 广东医学, 2015, 36(23): 3728–3731.
- [10] Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy [J]. Cells, 2020, 9(9): 1970.
- [11] Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment [J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(11): 1144–1161.
- [12] Eddins MJ, Marblestone JG, Suresh Kumar KG, et al. Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy [J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 60(1–2): 113–118.
- [13] Patel HJ, Patel BM. TNF- α and cancer cachexia: molecular insights and clinical implications [J]. Life Sci, 2017, 170: 56–63.
- [14] 周开国, 何桂珍. 肿瘤恶病质的机制及可能的治疗 [J]. 基础医学与临床, 2011, 31(1): 104–107.
- [15] 桑亚洲, 张艳, 陈玉龙, 等. JAK/STAT3 介导肿瘤恶病质肌肉萎缩及药物干预研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 118–124.
- [16] Peterson JM, Bakkar N, Guttridge DC. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease [J]. Curr Top Dev Biol, 2011, 96: 85–119.
- [17] Zhang X, Zhuang T, Liang Z, et al. Breast cancer suppression by aplysin is associated with inhibition of PI3K/AKT/FOXO3a pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 63923–63934.
- [18] Girven M, Dugdale HF, Owens DJ, et al. L-glutamine improves skeletal muscle cell differentiation and prevents myotube atrophy after cytokine (TNF- α) stress via reduced p38 MAPK signal transduction [J]. J Cell Physiol, 2016, 231(12): 2720–2732.
- [19] 汪敏加, 齐梓伊, 朱玮华, 等. 肌肉萎缩机制及临床研究进展: 基于第 65 届美国运动医学学会年会的思考 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(15): 2421–2426.
- [20] 赵高远, 苗玉芳, 侯润苏, 等. 线粒体损伤与慢性阻塞性肺疾病骨骼肌功能障碍及中医药治疗进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 133–137, 144.
- [21] Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, et al. Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository [J]. Cancer Res, 2014, 74(1): 330–340.
- [22] Wyke SM, Tisdale MJ. NF- κ B mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle [J]. Br J Cancer, 2005, 92(4): 711–721.
- [23] Yoshida T, Tabony AM, Galvez S, et al. Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(10): 2322–2332.
- [24] Padrão AI, Moreira-Gonçalves D, Oliveira PA, et al. Endurance training prevents TWEAK but not myostatin-mediated cardiac remodelling in cancer cachexia [J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 567: 13–21.
- [25] Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, et al. NF- κ B-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia [J]. Science, 2000, 289(5488): 2363–2366.
- [26] Mitch WE, Price SR. Transcription factors and muscle cachexia: is there a therapeutic target? [J]. Lancet, 2001, 357(9258): 734–735.
- [27] Burkly LC. TWEAK/Fn14 axis: the current paradigm of tissue injury-inducible function in the midst of complexities [J]. Semin Immunol, 2014, 26(3): 229–236.
- [28] Johnston AJ, Murphy KT, Jenkinson L, et al. Targeting of Fn14 prevents cancer-induced Cachexia and prolongs survival [J]. Cell, 2015, 162(6): 1365–1378.
- [29] Carson JA, Hardee JP, VanderVeen BN. The emerging role of skeletal muscle oxidative metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer-induced muscle wasting [J]. Semin Cell Dev Biol, 2016, 54: 53–67.
- [30] Penna F, Ballarò R, Beltrá M, et al. Modulating metabolism to improve cancer-induced muscle wasting [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 7153610.
- [31] Kou G, Li Z, Wu C, et al. Citrus tangeretin improves skeletal muscle mitochondrial biogenesis via activating the AMPK-PGC1- α pathway *in vitro* and *in vivo*: a possible mechanism for its beneficial effect on physical performance [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(45): 11917–11925.
- [32] Chen PB, Yang JS, Park Y. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to obesity, exercise, and polyunsaturated fatty acids [J]. Lipids, 2018, 53(3): 271–278.
- [33] Brault JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α or 1 β overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy [J]. J Biol Chem, 2010, 285(25): 19460–19471.
- [34] Toime IJ, Brand MD. Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(4): 606–611.
- [35] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 癌症, 2008, 27(3): 331–336.
- [36] Pende M. mTOR, Akt, S6 kinases and the control of skeletal muscle growth [J]. Bull Cancer, 2006, 93(5): E39–E43.
- [37] Ries A, Trottenberg P, Elsner F, et al. A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced

- cancer; an EPCRC cachexia guidelines project [J]. Palliat Med, 2012, 26(4): 294-304.
- [38] Chen L, Yang Q, Zhang H, et al. Cryptotanshinone prevents muscle wasting in CT26-induced cancer cachexia through inhibiting STAT3 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 113066.
- [39] 张艳, 桑亚洲, 彭梦薇, 等. 六君子汤调控 STAT3/泛素蛋白酶途径防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 8-15.
- [40] 贺倩文, 刘冬静, 刘燕, 等. 六君子汤干预 IL-6/STAT3 信号影响肿瘤环境下 C2C12 细胞分化机制的研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(10): 3630-3637.
- [41] 陈林林. 基于 STAT3 抑制作用的中药活性成分筛选及其抗肿瘤恶病质作用研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2020.
- [42] Chen L, Xu W, Yang Q, et al. Imperatorin alleviates cancer cachexia and prevents muscle wasting via directly inhibiting STAT3 [J]. Pharmacol Res, 2020, 158: 104871.
- [43] Zhang Y, Zhang Y, Li Y, et al. Preclinical investigation of alpinetin in the treatment of cancer-induced Cachexia via activating PPAR γ [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 687491.
- [44] Wang H, Lai YJ, Chan YL, et al. Epigallocatechin-3-gallate effectively attenuates skeletal muscle atrophy caused by cancer cachexia [J]. Cancer Lett, 2011, 305(1): 40-49.
- [45] Li B, Wan L, Li Y, et al. Baicalin, a component of *Scutellaria baicalensis*, alleviates anorexia and inhibits skeletal muscle atrophy in experimental cancer cachexia [J]. Tumour Biol, 2014, 35(12): 12415-12425.
- [46] Bae T, Jang J, Lee H, et al. *Paeonia lactiflora* root extract suppresses cancer cachexia by down-regulating muscular NF- κ B signalling and muscle-specific E3 ubiquitin ligases in cancer-bearing mice [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 246: 112222.
- [47] 刘婷, 丁艳, 杨婷婷, 等. 鲜枸杞子提取物通过 p38 MAPK 信号通路抑制人肝癌细胞 HepG2 诱导小鼠恶病质的作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 89-94.
- [48] Zhang H, Chi M, Chen L, et al. Daidzein alleviates cisplatin-induced muscle atrophy by regulating Glut4/AMPK/FoxO pathway [J]. Phytother Res, 2021, 35(8): 4363-4376.
- [49] 章洪华. 基于 P38MAPK/PGC-1 通路研究保元解毒汤调控线粒体功能改善癌因性肌肉萎缩机制 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- [50] 王洮. 芪归相须干预肿瘤恶病质的机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2019.
- [51] 陈力. 苦参碱通过 BDK 调控肿瘤恶病质骨骼肌萎缩作用和机制研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2019.
- [52] Zhuang P, Zhang J, Wang Y, et al. Reversal of muscle atrophy by Zhimu and Huangbai herb pair via activation of IGF-1/Akt and autophagy signal in cancer cachexia [J]. Support Care Cancer, 2016, 24(3): 1189-1198.
- [53] Penedo-Vázquez A, Duran X, Mateu J, et al. Curcumin and resveratrol improve muscle function and structure through attenuation of proteolytic markers in experimental cancer-induced Cachexia [J]. Molecules, 2021, 26(16): 4904.
- [54] Faião-Flores F, Suarez JA, Pardi PC, et al. DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1, 4-dienyl]-2-methoxy-phenolate; a curcumin analog with a synergic effect in combination with paclitaxel in breast cancer treatment [J]. Tumour Biol, 2012, 33(3): 775-785.
- [55] Guo D, Guo C, Fang L, et al. Qizhen capsule inhibits colorectal cancer by inducing NAG-1/GDF15 expression that mediated via MAPK/ERK activation [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 273: 113964.
- [56] Ahmadabadi F, Saghebjo M, Huang CJ, et al. The effects of high-intensity interval training and saffron aqueous extract supplementation on alterations of body weight and apoptotic indices in skeletal muscle of 4T1 breast cancer-bearing mice with cachexia [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2020, 45(5): 555-563.
- [57] Ge Z, Liu D, Shang Y, et al. Magnolol inhibits myotube atrophy induced by cancer cachexia through myostatin signaling pathway *in vitro* [J]. J Nat Med, 2020, 74(4): 741-749.
- [58] Chen MC, Hsu WL, Chou TC. Anti-cachectic effect of *Antrodia cinnamomea* extract in lung tumor-bearing mice under chemotherapy [J]. Oncotarget, 2018, 9(28): 19584-19596.
- [59] 宗鑫. 保元解毒汤改善癌因性恶病质肌肉萎缩的转录组学分析及机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [60] Wang D, Chen W, Bi Q, et al. Baoyuan Jiedu Decoction alleviates cancer-induced myotube atrophy by regulating mitochondrial dynamics through p38 MAPK/PGC-1 α signaling pathway [J]. Front Oncol, 2020, 10: 523577.
- [61] 徐大玉. 人参皂甙 Rg3 通过激活 AMPK 改善癌症相关性疲劳的机制研究 [D]. 大连: 大连医科大学, 2020.
- [62] 宗鑫, 张亚楠, 章洪华, 等. 保元解毒汤改善 Apc^{min/+} 恶病质模型肌肉萎缩的机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 19-24.
- [63] Chen MC, Hsu WL, Hwang PA, et al. Combined administration of fucoidan ameliorates tumor and chemotherapy-induced skeletal muscle atrophy in bladder cancer-bearing mice [J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 51608-51618.
- [64] Chen MC, Chen YL, Lee CF, et al. Supplementation of magnolol attenuates skeletal muscle atrophy in bladder cancer-bearing mice undergoing chemotherapy via suppression of FoxO3 activation and induction of IGF-1 [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0143594.
- [65] Zhang H, Chi M, Chen L, et al. Linalool prevents cisplatin induced muscle atrophy by regulating IGF-1/Akt/FoxO pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 598166.
- [66] 陈江锋, 林芝娴, 郭勇. 基于网络药理学策略探讨四君子汤治疗癌性恶病质的潜在机制 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2022, 32(2): 122-128.
- [67] Otto A, Schmidt C, Luke G, et al. Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration [J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 17): 2939-2950.
- [68] 李鹏辉. 儿茶素促进小鼠骨骼肌干细胞分化的作用和机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.

田静,马英杰,王鹏,等. 血管内皮功能障碍及其评估技术 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 130-140.
Tian J, Ma YJ, Wang P, et al. Vascular endothelial dysfunction and its functional assessment [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 130-140.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.017

血管内皮功能障碍及其评估技术

田 静^{1,2}, 马英杰^{1,2}, 王 鹏^{1,2}, 李 阳^{1,2}, 曾 露², 李 彬^{1,2,3*}, 苏国海^{1,2,3*}

(1. 山东第一医科大学, 济南 250013; 2. 济南市中心医院, 济南 250013;
3. 专科转化研究中心, 山东第一医科大学附属中心医院, 济南 250013)

【摘要】 血管内皮细胞是覆盖于血管壁表面的一类薄层扁平上皮细胞, 作为一个效应器官, 它可以对各种体内外刺激作出反应, 释放血管活性物质来调节机体内环境稳定。然而, 在多种致病因素的诱导下内皮细胞易发生功能障碍, 表现为血管舒缩功能受损、血栓形成和动脉壁增殖等。研究表明, 血管内皮功能障碍 (vascular endothelial dysfunction, VED) 与动脉粥样硬化、心力衰竭等心血管疾病的发生发展密切相关, 因此, 有效评估内皮功能对心血管疾病的防治至关重要。本文就血管内皮的功能、调控原理及其与心血管疾病的关系进行综述, 并对现有内皮评估技术的基本原理和优缺点进行总结, 助力于心血管疾病的诊治。

【关键词】 血管内皮功能障碍; 一氧化氮; 肾素-血管紧张素系统; 活性氧; 血流介导的血管扩张功能; 光学相干层析成像

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0130-11

Vascular endothelial dysfunction and its functional assessment

TIAN Jing^{1,2}, MA Yingjie^{1,2}, WANG Peng^{1,2}, LI Yang^{1,2}, ZENG Lu², LI Bin^{1,2,3*}, SU Guohai^{1,2,3*}

(1. Shandong First Medical University, Jinan 250013, China. 2. Jinan Central Hospital, Jinan 250013.

3. Research Center of Translational Medicine, Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250013)

【Abstract】 Vascular endothelial cells form a thin layer of flattened cells that cover the surface of the vessel wall, As an effector tissue, the vessel wall responds to various stimuli to release vasoactive substances to maintain homeostasis. However, endothelial cells are prone to dysfunction induced by multiple pathological factors, which is manifested by an impaired vasomotor function, thrombosis, and arterial wall proliferation. Studies have shown that vascular endothelial dysfunction is closely related to the occurrence and development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis and heart failure. Therefore, effectively evaluating endothelial functions is essential to prevent and treat cardiovascular diseases. In this review, we discuss the functions and regulatory principles of the vascular endothelium and its relationship with cardiovascular diseases and summarize the basic principles and advantages and disadvantages of existing endothelial assessment techniques to assist in the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases.

【Keywords】 vascular endothelial dysfunction; nitric oxide; renin-angiotensin system; reactive oxygen species; flow-mediated vasodilation; optical coherence tomography

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

【基金项目】 中国博士后科学基金 (2020M682119); 山东省自然科学基金 (ZR2020MH026); 济南市临床医学科技创新计划 (202019045)。

【作者简介】 田静 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 心衰。E-mail: 3465586159@qq.com

【通信作者】 李彬 (1980—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 心力衰竭。E-mail: qingquan0615@163.com

苏国海 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动脉粥样硬化。E-mail: gttstg@163.com

* 共同通信作者

血管内皮细胞是存在于心脏、血管和淋巴管内表面的单层扁平上皮细胞,它不仅可以调节血管壁的通透性,在体内外因素的刺激下,其还可以释放多种血管活性物质来参与血管壁张力、血小板功能以及炎症反应等机体活动的调节^[1]。研究表明血管内皮功能缺陷与多种心血管疾病,包括高血压、冠心病、糖尿病、动脉粥样硬化和心力衰竭等的发生密切相关^[2]。近年来有多种评估血管内皮功能的技术,其中,血流介导的血管扩张功能(flow-mediated dilatation, FMD)是目前临床上检测血管内皮功能的常用手段,而光学相干层析成像(optical coherence tomography, OCT)是目前最适合完成小鼠 FMD 测试的成像技术。现就血管内皮功能障碍(vascular endothelial dysfunction, VED)及其对心血管疾病的发生发展作一综述,并对现有血管内皮评估技术的优缺点进行讨论。

1 血管内皮细胞形态和功能

血管内皮细胞是人体最大的内分泌器官,成人体内约有 $1 \times 10^{13} \sim 6 \times 10^{13}$ 个内皮细胞,若收集全身的内皮细胞,其重量与肝的重量相当,总表面积约为 $3000 \sim 6000 \text{ m}^2$,相当于 6 个网球场的面积^[3]。内皮细胞的基本结构与正常细胞一致,包括胞膜、胞质和胞核。胞核居中,淡染,突向腔面;胞质内可见一种特有的杆状细胞器 W-P 小体,其可作为鉴定内皮细胞的证据之一^[4];胞膜由磷脂双分子层组成,并与多种蛋白交叉,这些蛋白可作为受体或离子通道参与细胞通透性的调节和信号转导过程。一般情况下,内皮细胞较薄且略长,尺寸约为长 $30 \sim 50 \mu\text{m}$,宽 $10 \sim 30 \mu\text{m}$,厚 $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$,大多呈梭形,排列与血流方向一致;在动脉分支处内皮细胞可变为球形,细胞边缘呈锯齿状,相互嵌合。然而,在不同器官和整个血管床上内皮细胞有明显的表型异质性,正是这些差异确保了它们在不同区域发挥特定的功能,Krüger-Genge 等^[3]对其进行过全面的回顾。

内皮细胞可作为半选择性屏障调节血管壁的通透性,主要包括以下几个调节途径:从细胞水平上,主要包括紧密连接和黏附连接(内皮细胞间和内皮-基底膜间)、基底膜的完整性和内皮细胞骨架蛋白等;从信号转导角度来看,主要涉及环磷酸腺苷/蛋白激酶 A(cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)、Rho GTP 酶(Rho GTPase)等信号

通路及其组成的级联反应^[5]。上述各因素之间既相互独立又相互联通,共同调节血管通透性^[5]。其中,一些因素会引起内皮细胞结构紊乱,显著增加血管通透性,最终导致多种疾病的发生。因此,针对这些靶点开展药物实验可能会为疾病的治疗提供理论依据。研究表明,在一些炎症介质和细胞因子,如内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、血管紧张素 II(angiotensin II, AngII)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等作用下, Rho/Rho 激酶(Rho/Rho-associated kinase, Rho/ROCK)通道可被激活并诱导肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化,从而引起肌动-肌球蛋白收缩性增加,使内皮细胞通透性增高^[6];此外,激活 Rho/ROCK 通路还可以增强细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达^[7],促进中性粒细胞转运,最终导致炎症的发生。相反,乌司他丁可通过抑制炎症介质的释放从而改善血管内环境的紊乱^[8]。

内皮细胞不仅有屏障作用,还可合成和分泌多种血管活性物质来维持正常的心血管功能,有研究者称内皮细胞是一个具有高度代谢和分泌活性的器官^[9]。正常情况下,它可以感知血管内部各种物理和化学刺激,如剪切应力、炎症信号和激素水平等,对这些刺激作出反应并释放多种血管活性物质,如血管扩张剂和血管收缩剂、促凝剂和抗凝剂、抗炎剂和促炎剂、氧化剂和抗氧化剂等,从而维持血管张力和结构,调节体内平衡^[1]。然而在病理情况下,内皮细胞在内外致病因素的诱导下发生功能障碍,具体表现为 NO 生成减少或利用度下降、血管通透性紊乱和 ROS 生成增加^[2],最终引起血管舒缩功能受损、促炎状态、血栓形成、氧化应激和动脉壁增殖等不良结果的发生(图 1)。研究表明 VED 是高血压、糖尿病、动脉粥样硬化和心力衰竭等^[10]终末期心血管疾病发生的关键因素,而保护内皮功能在预防和治疗心血管疾病方面发挥着重要作用^[11]。

2 几种典型的内皮细胞调节因子

2.1 一氧化氮(nitric oxide, NO)

内皮衍生松弛因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)来源于内皮细胞,由 Furchgott RF 和 Zawadzki JV 在 1980 年首次报道^[12]。后来,有研究者发现 EDRF 的化学本质即为 NO^[13],近期 Lancaster 等^[14]亦对哺乳动物 NO 的产生、生理及病理生理机制进行回顾,进一步证实了以上观点。NO



图1 血管内皮功能障碍时分泌生物活性因子失衡

Figure 1 The secretion of bioactive factors is unbalanced in vascular endothelial dysfunction.

是一种低分子量、脂溶性的气体,易透过内皮内膜到达平滑肌层,并通过 NO-sGC-cGMP/PKG 通路介导血管平滑肌舒张^[2]。NO 作为血管舒张的主要介质,有利于维持血管稳态,其失衡与内皮功能障碍密切相关。当体内 NO 不足时,机体受到大量缩血管物质(如 ET-1 和 Ang II)的刺激而无法产生舒血管效应,导致内皮功能发生障碍;当体内 NO 过多时,可诱导过氧化物生成增多,从而抑制内皮源性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)辅助因子的活性,导致 NO 生成减少^[15]。

L-精氨酸和 O₂ 在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的作用下生成 L-瓜氨酸并释放一氧化氮^[16],需要钙离子/钙调蛋白、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)、四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)等作为辅助因子。NOS 同工酶有 3 种,包括神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、eNOS 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。iNOS 在促炎细胞因子作用下可产生大量 NO,在免疫反应中协助巨噬细胞对抗病原体^[17];此外,若在内皮细胞中被诱导,iNOS 会与 eNOS 竞争 BH4,从而减少 eNOS 介导的 NO 生成^[18]。nNOS 和 eNOS 二者酶活性主要受 Ca²⁺ 和钙调蛋白的调节(钙依赖型),相反地,iNOS 一旦表达就会持续性激活并且不受细胞内 Ca²⁺ 浓度的调节(钙非依赖型)^[19]。一项转基因动物研究表明,iNOS 有致动脉粥样硬化作用,而 nNOS 和 eNOS 的作用

与之相反^[20]。

eNOS 主要存在于内皮细胞中,可通过生成 NO 来诱导血管扩张并抑制血小板黏附与聚集^[21]。此外,研究发现当敲除 ApoE 小鼠的 eNOS 基因时其患动脉粥样硬化的风险大大增加,证明 eNOS 还有抗动脉粥样硬化的作用^[22]。Ca²⁺ 可诱导钙调蛋白/钙调素(calmodulin)与 eNOS 结合,当细胞内 Ca²⁺ 浓度升高时,eNOS 的活性明显增强。有研究发现,磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase, PI3K/Akt)信号转导通路可介导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中 eNOS 的磷酸化激活,从而导致 NO 生成增加^[20]。此外,热休克蛋白 90(heat-shock protein90, HSP90)作为一种保护性蛋白,可通过变构激活 eNOS 并促进 eNOS 偶联发挥血管内皮保护作用^[23]。辅助因子 BH4 作为 eNOS 活性和功能的关键调节因子,当 BH4 因下调其合成和上调其氧化而相对缺乏时,eNOS 解耦联,引起 ROS 过量产生、NO 生成减少和生物利用度下降,最终导致 VED^[24]。相反,当 BH4 水平上调时,可促进 eNOS 耦联改善并增强血管损伤后内皮细胞和循环内皮祖细胞的增殖能力^[25]。有证据表明,补充 BH4 可通过改善内皮功能逆转吸烟、肺动脉高压及糖尿病患者的症状^[26-27]。

剪切应力是刺激内皮细胞持续产生 NO 的重要因素,在剪切应力作用下内皮细胞膜上的钙激活的钾通道开放,使内皮细胞超极化,增加 Ca²⁺ 进入的驱动力,从而激活 eNOS 酶和随之产生的 NO。另一潜在机制为剪切应力通过刺激 eNOS 基因表达上调和 eNOS 启动子的转录激活,使其在内皮细胞中表达增加,从而使 NO 释放增多。有研究表明,动脉分支或弯曲处的血流紊乱将产生低切应力,通过诱导血管炎症和内皮细胞过度凋亡增加动脉对高胆固醇脂蛋白的通透性,最终导致动脉粥样硬化的发生^[28]。同时,低剪切应力与粥样斑块的进展密切相关,在临床研究中,Timmins 等^[29]证实冠心病患者的斑块负担与低切应力有关;在动物模型中,Förstermann 等^[30]观察到低切应力促进易损性炎症病变的发展。与之相反,生理水平的剪切应力对内皮细胞具有保护作用。

总之,NO 可通过舒张血管、抗炎、抗氧化、抗血小板、抗增殖、抗迁移和调节血压等作用,有效阻止动脉粥样硬化的发生与发展。因此,NO 是重要的

抗动脉粥样硬化因子。

2.2 肾素-血管紧张素系统 (rein-angiotensin system, RAS)

RAS 是由一系列肽类激素及相应酶组成的重要体液调节系统,可通过调节人体血压、水和电解质从而维持机体内环境稳定。肾脏球旁细胞分泌的肾素,可将血液中的血管紧张素原(angiotensinogen, Agt)转变为无生理活性的血管紧张素 I (angiotensin I, AngI), AngI 在血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)的作用下形成 8 肽的 Ang II 和 7 肽的血管紧张素 III (angiotensin III, Ang III)。其中尤以 Ang II 活性最强,它主要作用于血管紧张素 1 型受体(angiotensin II receptor-1, AT1R),引起血管收缩、炎症和氧化应激,并促进黏附分子表达和白细胞黏附,最终导致动脉粥样硬化的发生。因此,Ang II 在心血管疾病的发生发展中起着非常重要的作用。

在动脉硬化性高血压内皮损伤过程中,Ang II 产生增加并激活 AT1R 信号传导途径使 NADPH 氧化酶、ROS 和 ET-1 生成增多^[24]。一般情况下,体内的 ET-1/NO 处于动态平衡,当 ET-1 产生增多或 NADPH 氧化酶促使 ROS 过表达,可诱导 eNOS 解耦联,最终引发 NO/ET-1 系统失衡,致使内皮功能障碍。最新研究表明,一种名为 VMP-19 的肽可缓解由 AngII 引起的 HUVECs 凋亡和氧化损伤,发挥内皮保护作用^[31]。此外,没食子酸(gallic acid, GA)作为一种新型的免疫蛋白酶抑制剂,可抑制 eNOS 降解和 NO 水平降低从而减轻 Ang II 诱发的高血压和血管功能障碍,然而使用 eNOS 抑制剂——N-硝基-L-精氨酸甲酯(NG-nitro-L-argininemethyl-ester, L-NAME)可消除 GA 的作用^[32]。Verma 等^[33]发现作为 Ang II 的拮抗因子,血管紧张素-(1-7) [angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)]通过逆转氧化应激诱导的血管内皮功能损伤、抑制 AngII 引起的血管平滑肌细胞增殖与迁移、舒张血管、抑制心室重构等机制发挥心血管保护作用。其中 VED 是动脉粥样硬化的始动因素,而血管平滑肌增殖和迁移是动脉粥样硬化发展的主要变化之一,因此 Ang-(1-7) 有利于抑制动脉粥样硬化。

Ang II 的大部分病理生理学机制都是由 AT1R 介导的。然而,一些细胞和动物研究表明,血管紧张素 2 型受体(angiotensin II receptor-2, AT2R)通过介导血管扩张、抗增殖和凋亡等产生与 AT1R 相反

的作用^[34]。Savoia 等^[35]和 Fatima 等^[36]发现在接受 AT1R 拮抗剂治疗的高血压和糖尿病患者的阻力动脉中,AT2R 上调并参与 Ang II 诱导的血管舒张,这可以通过介导 eNOS 磷酸化激活和随之启动的 NO-sGC-cGMP 依赖性途径而实现。最近的一项研究发现,AT2R 介导的内皮 NOS 激活可能与 PI3K/Akt 通路的激活有关^[37]。因此,AT2R 可能有利于保护血管内皮功能。

NO 与 AngII 具有相反的作用,机体依赖于这两者的平衡共同调节机体内环境稳定。一些有害因素如吸烟、高血糖、高同型半胱氨酸血症、雌激素缺乏、高龄和慢性全身感染等可破坏 NO/AngII 的平衡,导致内皮功能障碍和动脉粥样硬化的发生。

2.3 活性氧(reactive oxygen species, ROS)

ROS 是体内一类氧的单电子还原产物,包括超氧阴离子(superoxide anion radical, $O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)和羟基自由基(hydroxyl radical, OH)等,因核外未配对电子的存在,ROS 具有很强的化学反应活性。ROS 作为氧代谢的副产物,或通过非偶联 eNOS、NADPH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸的还原形式)氧化酶和黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOR)等途径产生。在生理水平时,ROS 具有重要的信号转导作用,例如它帮助宿主抵御感染因子,并调节细胞生长、细胞粘附、细胞衰老和细胞凋亡。据报道,ROS 诱导的信号轴不仅可以维持内皮细胞的血管张力,而且可以促进血管生成和抑制入侵病原体引发的急性炎症反应^[38]。正常情况下,ROS 可由体内存在的抗氧化物酶系和非酶抗氧化剂转化或清除;在病理情况下,ROS 产生过多,体内氧化-抗氧化平衡状态被打破,这种情况被称为“氧化应激”。

在氧化应激状态下,一方面,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)极易被氧化为氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oX-LDL),而后者可形成泡沫细胞并参与粥样斑块的形成;另一方面,NOS 二聚体不稳定而解耦,导致超氧自由基而非 NO 生成增多,而超氧化物可以氧化 NO 并将其转化为过氧亚硝酸根离子(peroxynitrite, $ONOO^-$),后者可降低 NO 的生物利用度,从而参与血管收缩和细胞的黏附和增殖,加速动脉硬化的损伤^[39]。因此,氧化应激是 VED 和动脉粥样硬化的促发因素。

NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, Nox)复合物

是血管壁中 ROS 的主要来源。它主要包括 Nox1、Nox2、Nox4 和 Nox5 四种亚型,其中 Nox1、Nox2 和 Nox5 可增加 O_2^- 的形成,同时降低 NO 的利用度,促进 VED。有研究表明过氧化物酶 (peroxidase, PXDN) 可以通过 NOX2/HOCl/Akt 通路减少 eNOS 的磷酸化,从而引起晚期糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 诱导的糖尿病血管内皮功能障碍^[40]。其中, PXDN 通过催化 H_2O_2 产生 HClO 从而加重血管氧化应激^[41]; 而 NOX2 促使 eNOS 脱偶联并使其磷酸化水平降低,导致 NO 生成减少,最终诱导 VED 的发生^[17]。当用小干扰 RNA 沉默 PXDN 或应用 NOX2 抑制剂时上述情况可得到显著缓解^[40]。然而,相比氧化应激的有害影响,某些 ROS 却对血管壁有正向作用,研究表明,内皮亚型 Nox4 产生的 H_2O_2 具有血管保护作用,后者可通过 AKT 依赖的 eNOS 磷酸化 (Ser473/Thr308) 来诱导内皮释放 NO^[42]。此外,在小鼠和人体内, H_2O_2 作为内皮衍生超极化因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF), 通过钙激活的钾通道可介导血管平滑肌细胞超极化,从而引起血管舒张^[43]。因此, Nox4 可改善 VED 和动脉粥样硬化的发展。

3 VED 与心血管疾病

3.1 VED 与动脉粥样硬化

血管内皮通透性增高和 VED 被认为是早期动脉粥样硬化的启动因素,有研究者在一项动物实验中发现,与对照组相比,高脂饮食组的兔子出现了动脉粥样硬化病变和内皮通透性增高,同时 Western blot 显示 MLC 和肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 的表达也显著增高,这些病变在使用 ML7 (MLCK 抑制剂) 后部分逆转。MLCK 表达和 MLC 磷酸化促使内皮细胞收缩从而使其通透性增高,最终引起内皮依赖性血管扩张功能受损和动脉粥样硬化的发生^[44]。此外,内皮细胞功能障碍亦参与了动脉硬化的发展,最近的研究表明,在成熟动脉粥样硬化病变中可以检测到微小胆固醇晶体 (CCs) 的形成, CCs 可被内皮细胞内吞从而降低 eNOS 的表达活性和 NO 的生成,上调粘附分子的表达并使单核细胞粘附到内皮上,最终导致内皮细胞功能障碍。sirtuin6 (SIRT6)—烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性脱乙酰酶通过激活核因子- κ B 相关因子 2 (Nuclearfactor erythroidderived 2-like 2, Nrf2) 的表达

从而逆转 CCS 引起的内皮功能障碍,这可能为动脉粥样硬化的治疗提供新思路^[45]。

B 类 I 型清道夫受体 (scavenger receptor class B type I, SR-B1) 是位于细胞表面的一种呈马蹄形结构的糖蛋白^[46],而最近的一项研究首次揭示了 SR-B1 可通过胞质分裂作用因子 4 (cytokinesis effective factor, DOCK4) 驱动内皮细胞 LDL 颗粒转胞吞作用,从而促进动脉粥样硬化的发生^[47]。与正常动脉相比,在病变形成前,小鼠主动脉的粥样斑块易感区及人类粥样硬化动脉中均可检测到 SR-B1 和 DOCK4 的表达增加,且 SR-B1 可能通过与一些高危因素相互作用,从而导致心脑血管疾病的发生^[48]。因此针对 SR-B1 的药物研究或将成为心血管疾病治疗的新方向。此外,有研究者发现,内皮细胞 T 细胞转录因子 (forkhead box protein 1, Foxp1) 可以负性调控炎症小体复合物,从而延缓动脉粥样硬化形成与发展。Foxp1 受内皮 Kruppel 样因子 2 (kruppel-like factor 2, Klf2) 的调节,在振荡剪切应力作用下, Klf2 被抑制随之 Foxp1 生成减少,促使内皮炎症活化增加,最终导致动脉硬化病变的形成;而辛伐他汀通过调节内皮 Klf2 与 Foxp1 在动脉易感血管内皮中的表达减少,减轻血管炎症从而对动脉硬化起抑制作用^[49]。

3.2 VED 与心力衰竭

研究表明,内皮功能障碍与心力衰竭 (heart failure, HF) 之间有着千丝万缕的联系,在一项临床研究中,可观察到 HF 患者体内糖化白蛋白可诱导 HUVEC 中粘附分子表达增加,从而使外周血中单核细胞更多地粘附到内皮细胞上,引起内皮功能受损^[50]。按 HF 的性质,其可分为收缩性心衰和舒张性心衰,舒张性心衰又名射血分数保留性心衰 (heart failure with preserved ejection fraction, HFPEF)。近年来 HFPEF 的发病率越来越高,随着我国老龄化速度加快,在未来几年 HFPEF 可能成为 HF 的主要形式。并且,由于人们对于 HFPEF 的确切病理生理学机制尚不清楚,目前一些针对射血分数降低性心衰 (heart failure with reduced ejection fraction, HFrEF) 的药物对 HFPEF 的疗效和预后十分有限。心血管系统的结构和分子异常,如心肌缺血、心肌肥大和内皮细胞受损所导致的 NO 作用减弱可能是 HFPEF 发病的原因。据不完全统计, HFPEF 患者中约 40% 存在 VED,一些研究表明 VED 和血管结构异常可能与 HFPEF 的发病和维持

有关,因此以上因素可成为治疗 HFPEF 的潜在靶标^[51]。另外,在调整了包括年龄、性别、糖尿病、高血脂血症等一系列心血管危险后,VED 仍可作为 HFPEF 患者未来心血管事件的独立预测因子。

Yamamoto 等^[52]发现,与非 HF 患者相比, HFPEF 患者血清中活性氧化代谢衍生物水平显著降低,并伴有 BH_4/BH_2 比值大大降低,以上结果提示喋啶代谢紊乱诱导 ROS/NO 水平失衡(eNOS 解耦)可能参与了血管内皮功能障碍和心脏舒张功能障碍。其具体机制在于 ROS 可将 eNOS 的必要辅助因子 BH_4 氧化,生成无活性的二氢生物喋呤(dihydrobiopterin, BH_2),从而引起 eNOS 脱耦联。因此,人们期待通过补充叶酸来逆转 HFPEF 患者的内皮功能障碍,有研究发现叶酸和其代谢产物 5-甲基四氢叶酸可以通过增加 eNOS 耦联和 NO 生成及直接清除超氧自由基来提高 NO 的生物利用度,从而保护和改善血管内皮^[53]。近几年来随着人们对于 HEPEF 的认知更加深入,从临床角度出发, HFPEF 被认为是一个多层面、多器官疾病的临床综合征,Schiattarella 等^[54]建立的 HFPEF 小鼠模型显著概括了 HFPEF 的众多特征,并依靠该模型发现代谢炎症及其主要介质 iNOS 的激活(iNOS 诱导 $IRE1\alpha$ -XBP1 通路失调)是 HFPEF 发病的主要病理生理机制,因此抑制 iNOS 及其他促炎介质的激活可能为 HFPEF 的治疗带来新希望。

综上所述,血管内皮功能障碍与心血管事件的发生、发展密不可分,因此评估血管内皮功能是非常必要的。

4 血管内皮功能的评估

血管舒张有两种形式:内皮依赖性血管舒张与非内皮依赖性血管舒张。其中内皮依赖性血管舒张:指内皮细胞在药物或生理性刺激下释放 NO,作用于血管平滑肌引起血管扩张;非内皮依赖性血管舒张:指将外源性 NO 供体(如硝酸甘油、硝酸钠等)注入体内可直接作用于血管平滑肌引起血管舒张^[55],因此,研究者们一般用它来评价血管平滑肌功能或作为人类 FMD 的对照实验^[56]。近些年来,有许多评估血管内皮功能的方法,它们大致可以分为两类,即有创评估法和无创评估法。有创评估法主要包括冠状动脉内皮功能检测,而无创评估法主要包括 FMD、外周动脉张力测定法(PAT)、外周脉搏波波形分析(PWA)、应变力计体积描记术、无创

生化检测等方法。

4.1 冠状动脉内皮功能检测

有创评估工具即为冠状动脉内灌注结合定量血管技术(包括定量冠状动脉造影法和超声和心导管相结合的技术),此法的原理为通过向冠状动脉内注入乙酰胆碱引起冠状内皮释放血管舒张因子,从而介导冠状血管舒张^[57]。Ludmer 等^[58]发现,与正常冠脉反应不同,中、重度冠状动脉粥样硬化患者检测时出现冠状动脉收缩,这提示冠状内皮功能发生障碍,同时,他们还注意到当注入硝酸甘油时冠状血管扩张,这表明平滑肌功能未受损。有研究者使用同样的方法,发现随着血液中总胆固醇或 LDL-胆固醇含量的增加, Ach 介导的冠脉扩张水平降低。后来, Al-Badri 等^[59]证实外周血管内皮功能与冠脉内皮功能变化有一定的相关性,即外周血管内皮功能可以很好地反映内皮依赖性冠状动脉和微血管功能以及冠状动脉血流储备情况。因此,冠状动脉导管因其侵入性和高风险性且不适用于大规模人群筛查而被替代。此外,不论心血管危险因素独立或联合存在,都与内皮依赖性血管舒张反应呈显著负相关。

4.2 反应性充血-外周动脉张力测定法(peripheral arterial tonometry, PAT)

21 世纪初,由 Itamar Medical Ltd 开发的 Endo-PAT 系统通过反应性充血-外周动脉张力测定法(reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry, RH-PAT)来评估外周血管内皮功能,其具体操作步骤已有文献报道^[57]。研究者们通常使用一个计算机算法与在线系统自动计算 RH-PAT 指数(RHI),公式为 $RHI = \ln\{[RH-PAT \text{ 比值}] \cdot [0.226 \cdot \ln(\text{基线}) - 0.2]\}$,即给 RH-PAT 值取自然对数^[60]。显然, RHI 越大,提示内皮功能越好,反之越差。RH-PAT 测量在很大程度上是不依赖于操作者的,不同操作人员或是同一操作人员内部差异对结果的影响可以忽略不计。过去的研究显示 RH-PAT 技术具有良好的重现性,研究者们为确定该技术的可靠性,经常用 PAT 和 FMD 的相关性来验证。然而,众多研究者们得到的结论却是不一致的, Matsuzawa 等^[61]发现 FMD 测量的血流依赖的血管扩张与 RH-PAT 之间存在显著相关性:与他们的观点恰恰相反, Lee 等^[62]认为 PAT 和 FMD 之间没有相关性,甚至由此质疑 PAT 的有效性。

4.3 脉搏波分析 (pulse wave analysis, PWA)、应变力计体积描记术和无创生化检测

PWA:脉搏波波形中反射波会随着血管壁弹性和动脉粥样硬化的进展而变化,故通过分析反射波增量百分比可间接反映血管内皮功能,该技术依赖操作者的水平,故重复性较差^[57]。应变力计体积描记术:血管内皮在剪切应力作用下出现反应性充血,通过测量基线和充血后最大值的血流量百分率可反映血管内皮功能,该技术特异性较 FMD 低^[57]。无创生化检测:临床中主要包括循环生物标记物检测(如 ADMA、CRP、内皮素和可溶性细胞黏附分子等)和微量白蛋白尿化验,其中微量白蛋白尿检测可反映内皮结构损伤情况,其结果准确性与采集的样本直接相关;而循环生物标记物检测所需样本量较大,分析过程较为复杂^[63]。以上技术因依赖操作者水平,特异性差,易受多种因素的影响等缺点而很难大规模应用于临床早期筛查和诊断(表 1)。

4.4 FMD

1992 年,FMD 首次作为一种无创的内皮功能测试方法被引入,Celermajer 等^[64]通过超声对肱动脉扩张水平进行了评估。2002 年发表的关于 FMD 的指南明确了其主要操作步骤^[65]:首先测定静息时肱动脉内径的基础值,然后将血压计附于患者前臂肘关节下 2~3 cm 处,通过给袖带充气,测得血压高于

收缩压 50 mmHg(1 mmHg≈0.1333 kPa)后停止打气,并维持 5 min,从而压迫前臂引起缺血。随后给袖带放气,在放气后 60~90 s 内测量肱动脉同一部位反应性充血后的内径,此时因血液流向前臂,这就产生了一个强的剪切应力,可诱导内皮细胞释放 NO 从而引起血管扩张。血管扩张程度与 NO 释放量成正比,静脉注射 L-NAME 可显著降低 FMD,证明 FMD 与内皮功能之间具有良好的相关性。我们可以通过测量放气后动脉内径相对于基线值的百分比来评估血管内皮功能,具体公式为:FMD=(反应性充血后肱动脉内径-反应性充血前肱动脉内径)/反应性充血前肱动脉内径×100%。近些年来,大量的临床证据表明肱动脉 FMD 与内皮功能呈显著相关,其效果和准确性已被医学界所接受并且成为临床研究中评估内皮功能的金标准^[66]。

大量使用 FMD 的心血管研究使我们已经深入了解了内皮功能障碍在心血管疾病中的作用。一些心血管危险因素,如衰老、吸烟、糖尿病、高血压、肥胖等,都会导致 VED,表现为 FMD 值下降。以上因素可以通过一个共同的途径,即氧化应激来增加 ROS 的生成,最终导致 NO 被降解或利用度下降,内皮舒张受损(图 2)。相应地,这些危险因素的逆转,如戒烟、降压、降糖、减肥、降低血清胆固醇水平等改善了内皮依赖的血管扩张反应,表现为 NO 生成

表 1 各种血管内皮功能评估技术的原理及优缺点

Table 1 Principles, advantages and disadvantages of various vascular endothelial function assessment techniques		
名称 Name	原理 Principle	优缺点 Relative merits
冠状动脉内皮功能检测 Detection of endothelial function of coronary artery	冠状动脉内灌注结合定量血管造影 Coronary perfusion combined with quantitative angiography	精确性高,有创,耗时较长、费用高 High accuracy, invasive, time-consuming and expensive
反应性充血-外周动脉张力测定法 Reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry	测定指尖动脉搏动容积变化 Measurement of pulsation volume change of fingertip artery	自动化程度高、不依赖操作者 High degree of automation, independent of operators 可靠性存在争议 Reliability is controversial
脉搏波分析 Pulse wave analysis	反映动脉僵硬度 Reaction artery stiffness	无创,简便 Noninvasive and simple 可重复性较差 Poor repeatability
应变力计体积描记术 Strain gauge plethysmography	同 FMD Same as FMD	成本低,不依赖操作者 Low cost, operator-independent 特异性较低 Low specificity
无创生化检测 Noninvasive biochemical examination	循环生物标记物检测和微量白蛋白尿化验 Circulating biomarker detection and microalbuminuria	前者所需样本量较大,分析过程较为复杂;后者结果准确性与采集的样本直接相关 Former requires large sample size and complicated analysis process; accuracy of the latter results is directly related to the sample taken

增多^[67]。

此外,针对临床前动物实验,FMD 作为活体检测手段,无须处死小鼠,可以长期对同一小鼠的血管功能进行跟踪比较,提高实验结果的说服力。Schuler 等^[68]对小鼠股动脉 FMD 的生理特征进行了描述,这是研究 CVD 最有用和有效的动物模型。目前 FMD 作为临床上常用的血管内皮细胞功能检测手段,需要对血管直径进行准确测量,而小鼠的血管直径一般仅为人体的十分之一,用于人体检测的超声和 MRI 等技术因分辨率限制,无法在小鼠上完

成高精度的测试。光学相干层析成像 (optical coherence tomography, OCT) 技术是一种基于低相干干涉原理,利用光电探测器扫描机体内部不同深度组织的反射、散射等信号并将其转化为电信号,最后通过计算机重建出易于识别和分析的生物组织图像^[69]。一般来讲,OCT 技术的分辨率可以达到十微米及以下量级,相较于超声(分辨率百微米量级)提高了近 10 倍,且 OCT 技术拥有快速三维成像能力,在对血管的测量中,可以大幅度降低动物呼吸、心跳等生理活动引起的测量错误(图 3,引自参考文

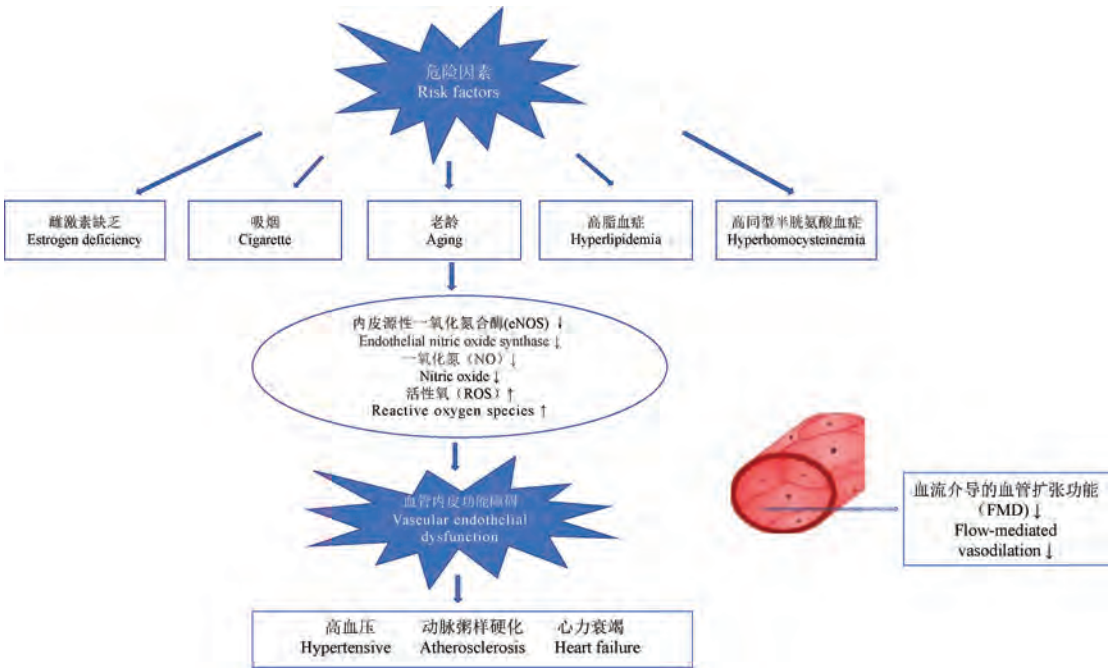
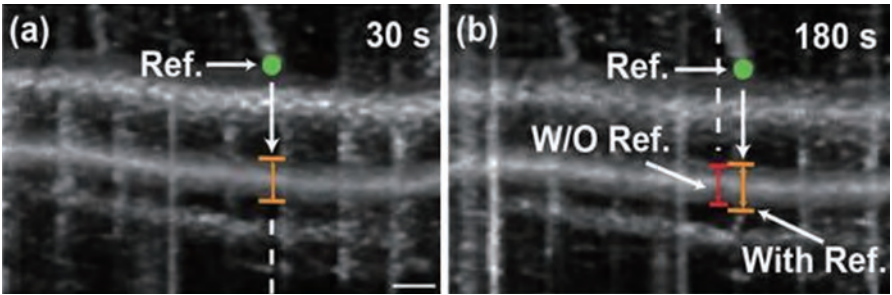


图2 高危因素-血管内皮功能障碍(FMD ↓)-心血管疾病
Figure 2 Risk factors-vascular endothelial dysfunction(FMD ↓)-cardiovascular disease



注:(a)和(b)来自于不同时间的测量,因小鼠移动,成像区域略有不同,如果采用二维成像,将会测量到血管不同位置直径,引起测量误差。而 OCT 三维成像,可以通过寻找基准点的方式确保血管直径的测量来自于血管的同一位置。

图3 动物移动造成的测量误差在三维成像中可以被很好地消除

Note. (a) And (b) measurements from different times. The imaging areas are slightly different due to the movement of mice. If two-dimensional imaging is used, the diameters of different positions of blood vessels will be measured, resulting in measurement errors. OCT three-dimensional imaging can ensure that the measurement of blood vessel diameter comes from the same position of blood vessels by looking for reference points.

Figure 3 The measurement error caused by animal movement can be well eliminated in three-dimensional imaging

献^[66]),是目前最适合完成小鼠 FMD 测试的成像技术。因此,该仪器对小鼠血管功能检测具有重要的应用价值。但是,相比于超声成像,OCT 技术的穿透深度低,在实验中仍需剪开皮肤,暴露血管进行测量。所以,OCT 的优势为:分辨率高,成像速度快,可进行三维成像;劣势为:成像深度低,实验中仍需剪开皮肤。

5 总结与展望

血管内皮是人体内具有高度代谢和分泌活性的器官,它可以感知内外环境的变化并分泌多种血管活性物质来维持机体内环境稳定。然而,在有害因素的刺激下,内皮细胞受损,导致血管通透性增加、NO 生成减少以及 ROS 生成增多,最终引起多种心血管疾病的发生。因此,评估血管内皮功能对于心血管疾病的早期筛查、诊断和治疗具有重要作用,并可显著提高人民的生活质量和水平。近年来,血管内皮评估技术经历了从有创到无创的巨大飞跃,然而,PAT、PWV 和无创生化检测等无创检测手段因其弊端无法大规模应用于临床。目前,FMD 作为一种临床上常用的内皮功能检测方法,在 OCT 系统的支持下也可用于动物实验研究,该系统因分辨率高且可以进行快速三维成像而备受关注。然而,相比于超声成像,OCT 技术的穿透深度低,在实验中仍需剪开皮肤,暴露血管进行测量。在未来或许可以通过提高系统成像穿透深度,实现不剪开皮肤对血管进行成像,从而在小鼠血管功能检测时达到真正的“无创”。

参考文献:

- [1] Weber T, Wassertheurer S, O'Rourke MF, et al. Pulsatile hemodynamics in patients with exertional dyspnea: potentially of value in the diagnostic evaluation of suspected heart failure with preserved ejection fraction [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61(18): 1874-1883.
- [2] Zuchi C, Tritto I, Carluccio E, et al. Role of endothelial dysfunction in heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2020, 25(1): 21-30.
- [3] Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, et al. Vascular endothelial cell biology: an update [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4411.
- [4] 郑奇军,蔡振杰,刘维永.生物瓣再内皮化研究的进展[J].中华实验外科杂志,2004,21(11): 1407-1408.
- [5] 王雪岩,刘瑞霞,郭易楠,等.血管内皮通透性的细胞及信号转导调控机制[J].微循环学杂志,2018,28(4): 61-66.
- [6] 国伟,孟建中,陈宇. Rho/Rho 激酶信号通路与血管内皮通透性的研究 [J]. 生物医学工程研究, 2009, 28(2): 154-158.
- [7] Shimada H, Rajagopalan LE. Rho kinase-2 activation in human endothelial cells drives lysophosphatidic acid-mediated expression of cell adhesion molecules via NF- κ B p65 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(17): 12536-12542.
- [8] 刘思佚,魏伏,刘疏柯,等. 乌司他丁抑制肿瘤坏死因子- α 诱导血管内皮细胞高通透性的机制研究 [J]. 中华重症医学电子杂志(网络版), 2018, 4(2): 170-175.
- [9] 王芳芳,郑小丽,祝芳,等. 血管内皮细胞基因表达的影响因素 [J]. 河南大学学报(医学版), 2015, 34(2): 145-152.
- [10] Xu S, Ilyas I, Little PJ, et al. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies [J]. Pharmacol Rev, 2021, 73(3): 924-967.
- [11] Li H, Förstermann U. Pharmacological prevention of eNOS uncoupling [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(22): 3595-3606.
- [12] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. Nature, 1980, 288(5789): 373-376.
- [13] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor [J]. Nature, 1987, 327(6122): 524-526.
- [14] Lancaster JR. Historical origins of the discovery of mammalian nitric oxide (nitrogen monoxide) production/physiology/pathophysiology [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 176: 113793.
- [15] Reidy K, Kang HM, Hostetter T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2333-2340.
- [16] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? [J]. Pharmacol Ther, 2013, 140(3): 239-257.
- [17] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function [J]. Eur Heart J, 2012, 33(7): 829-837.
- [18] Gunneth CA, Lund DD, McDowell AK, et al. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8): 1617-1622.
- [19] Liu VWT, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(1): 19-29.
- [20] Hemmens B, Mayer B. Enzymology of nitric oxide synthases [J]. Methods Mol Biol, 1998, 100: 1-32.
- [21] Li H, Förstermann U. Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(27): 3133-3145.
- [22] Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, et al. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice [J]. Circulation, 2001, 104

- (20): 2391–2394.
- [23] Gu L, Lian D, Zheng Y, et al. Echinacoside-induced nitric oxide production in endothelial cells: roles of androgen receptor and the PI3K-Akt pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(4): 1195–1202.
 - [24] 李苗, 王丽丽, 常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 730–736.
 - [25] Ali ZA, Rinze R, Douglas G, et al. Tetrahydrobiopterin determines vascular remodeling through enhanced endothelial cell survival and regeneration [J]. *Circulation*, 2013, 128(11 Suppl 1): S50–S58.
 - [26] Zhu ML, Gao ZT, Lu JX, et al. Amorphous nano-selenium quantum dots prevent pulmonary arterial hypertension through recoupling endothelial nitric oxide synthase [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(3): 3368–3385.
 - [27] Carnicer R, Duglan D, Zibera K, et al. BH4 increases nNOS activity and preserves left ventricular function in diabetes [J]. *Circ Res*, 2021, 128(5): 585–601.
 - [28] Kwak BR, Bäck M, Bochaton-Piallat ML, et al. Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications [J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(43): 3013–3020.
 - [29] Timmins LH, Molony DS, Eshtehardi P, et al. Oscillatory wall shear stress is a dominant flow characteristic affecting lesion progression patterns and plaque vulnerability in patients with coronary artery disease [J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14(127): 20160972.
 - [30] Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 713–735.
 - [31] Xu Z, Ding J, Zhang L, et al. Peptidomics analysis revealed that a novel peptide VMP-19 protects against AngII-induced injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 298.
 - [32] Yan X, Zhang QY, Zhang YL, et al. Gallic acid attenuates angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction by inhibiting the degradation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1121.
 - [33] Verma S, Kumar VL. Artesunate affords protection against aspirin-induced gastric injury by targeting oxidative stress and proinflammatory signaling [J]. *Pharmacol Rep*, 2018, 70(2): 390–397.
 - [34] Volpe M, Musumeci B, de Paolis P, et al. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? [J]. *J Hypertens*, 2003, 21(8): 1429–1443.
 - [35] Savoia C, Touyz RM, Volpe M, et al. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients [J]. *Hypertension*, 2007, 49(2): 341–346.
 - [36] Fatima N, Patel SN, Hussain T. Angiotensin II type 2 receptor: a target for protection against hypertension, metabolic dysfunction, and organ remodeling [J]. *Hypertension*, 2021, 77(6): 1845–1856.
 - [37] Peluso AA, Bertelsen JB, Andersen K, et al. Identification of protein phosphatase involvement in the AT₂ receptor-induced activation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(7): 777–790.
 - [38] Craige SM, Kant S, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in endothelial function-from disease to adaptation- [J]. *Circ J*, 2015, 79(6): 1145–1155.
 - [39] Siragusa M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(7): 1125–1137.
 - [40] Cao J, Zhang G, Liu Z, et al. Peroxidase promotes diabetic vascular endothelial dysfunction induced by advanced glycation end products via NOX2/HOCl/Akt/eNOS pathway [J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102031.
 - [41] Peng H, Zhang K, Liu Z, et al. VPO₁ modulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) in abdominal aortic aneurysms [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(17): e010069.
 - [42] Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 68(1): 26–36.
 - [43] Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor [J]. *Pflugers Arch*, 2010, 459(6): 915–922.
 - [44] Ding J, Li Z, Li L, et al. Myosin light chain kinase inhibitor ML7 improves vascular endothelial dysfunction and permeability via the mitogen-activated protein kinase pathway in a rabbit model of atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110258.
 - [45] Jin Z, Xiao Y, Yao F, et al. SIRT6 inhibits cholesterol crystal-induced vascular endothelial dysfunction via Nrf2 activation [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 387(1): 111744.
 - [46] 朱明燕, 曾高峰, 莫中成. SR-B1 在抑制炎症反应中的作用 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(1): 81–85.
 - [47] Huang L, Chambliss KL, Gao X, et al. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis [J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 565–569.
 - [48] Lenahan C, Huang L, Travis ZD, et al. Scavenger Receptor Class B type 1 (SR-B1) and the modifiable risk factors of stroke [J]. *Chin Neurosurg J*, 2019, 5: 30.
 - [49] Zhuang T, Liu J, Chen X, et al. Endothelial Foxp1 suppresses atherosclerosis via modulation of Nlrp3 inflammasome activation [J]. *Circ Res*, 2019, 125(6): 590–605.
 - [50] Paradelo-Dobarro B, Bravo SB, Rozados-Luís A, et al. Inflammatory effects of *in vivo* glycated albumin from cardiovascular patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108763.
 - [51] Kishimoto S, Kajikawa M, Maruhashi T, et al. Endothelial dysfunction and abnormal vascular structure are simultaneously present in patients with heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 231: 181–187.
 - [52] Yamamoto E, Hirata Y, Tokitsu T, et al. The pivotal role of eNOS uncoupling in vascular endothelial dysfunction in patients

- with heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 190: 335–337.
- [53] Stanhewicz AE, Kenney WL. Role of folic acid in nitric oxide bioavailability and vascular endothelial function [J]. *Nutr Rev*, 2017, 75(1): 61–70.
- [54] Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Nature*, 2019, 568(7752): 351–356.
- [55] 唐雪梅, 顾鹏. 血管内皮功能的检测和临床应用 [J]. *中国临床实用医学*, 2010, 4(5): 248–250.
- [56] Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, et al. Nitroglycerine-induced vasodilation for assessment of vascular function: a comparison with flow-mediated vasodilation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6): 1401–1408.
- [57] 赵佳佳, 杨展, 张利娟, 等. 血管内皮功能检测技术及其临床应用进展 [J]. *河南医学研究*, 2015, 24(5): 73–75.
- [58] Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries [J]. *N Engl J Med*, 1986, 315(17): 1046–1051.
- [59] Al-Badri A, Kim JH, Liu C, et al. Peripheral microvascular function reflects coronary vascular function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(7): 1492–1500.
- [60] Akiyama E, Sugiyama S, Matsuzawa Y, et al. Incremental prognostic significance of peripheral endothelial dysfunction in patients with heart failure with normal left ventricular ejection fraction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(18): 1778–1786.
- [61] Matsuzawa Y, Kwon TG, Lennon RJ, et al. Prognostic value of flow-mediated vasodilation in brachial artery and fingertip artery for cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(11): e002270.
- [62] Lee CR, Bass A, Ellis K, et al. Relation between digital peripheral arterial tonometry and brachial artery ultrasound measures of vascular function in patients with coronary artery disease and in healthy volunteers [J]. *Am J Cardiol*, 2012, 109(5): 651–657.
- [63] 李桂香, 黄德群, 唐元梁, 等. 无创血管内皮功能检测技术研究进展与应用 [J]. *中国医疗设备*, 2019, 34(12): 156–159, 181.
- [64] Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis [J]. *Lancet*, 1992, 340(8828): 1111–1115.
- [65] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(2): 257–265.
- [66] Song W, Zhou L, Kot KL, et al. Measurement of flow-mediated dilation of mouse femoral artery *in vivo* by optical coherence tomography [J]. *J Biophotonics*, 2018, 11(11): e201800053.
- [67] Correale M, Mazzeo P, Mallardi A, et al. Switch to SGLT2 inhibitors and improved endothelial function in diabetic patients with chronic heart failure [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2022, 36(6): 1157–1164.
- [68] Schuler D, Sansone R, Freudenberger T, et al. Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(12): 2651–2657.
- [69] 樊延明. 经桡动脉冠状动脉介入治疗对桡动脉结构和功能影响的系列研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[收稿日期]2022-10-24

王宝玥,王永福,孙晓林. 长链非编码 RNA 在系统性硬化症中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 141-148.
Wang BY, Wang YF, Sun XL. Research progress of long non-coding RNA in systemic sclerosis [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 141-148.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.018

长链非编码 RNA 在系统性硬化症中的研究进展

王宝玥^{1,2},王永福^{2,3*},孙晓林^{2*}

(1.内蒙古科技大学包头医学院,内蒙古 包头 014010;2.内蒙古科技大学包头医学院
第一附属医院中心实验室(内蒙古自治区自体免疫学重点实验室),内蒙古 包头 014010;
3.内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院风湿免疫科,内蒙古 包头 014010)

【摘要】 越来越多的研究表明长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)在内皮细胞损伤、炎症、癌症及自身免疫性疾病中发挥重要作用。系统性硬化症(systemic sclerosis,SSc)是一种发病机制尚未明确的自身免疫性疾病,而研究人员发现 lncRNA 可能通过调控免疫失调、微血管病变以及纤维化等过程参与 SSc 的发生和发展,还可能作为 SSc 的生物标志物来预测疾病的发生、活性程度以及进展阶段,因此可为 SSc 提供新的治疗靶点。
【关键词】 长链非编码 RNA;系统性硬化症;发病机制;生物标志物;靶向治疗
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0141-08

Research progress of long non-coding RNA in systemic sclerosis

WANG Baoyue^{1,2}, WANG Yongfu^{2,3*}, SUN Xiaolin^{2*}

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China.
2. Central Laboratory of the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology(Key Laboratory of Autoimmunity of Inner Mongolia), Baotou 014010.
3. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010)

【Abstract】 Accumulating studies have shown that long non-coding RNA (lncRNA) plays major roles in endothelial injury, inflammation, cancer, and autoimmune diseases. Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease with an unclear pathogenesis. lncRNA may be involved in the occurrence and development of SSc by regulating immune disorders, microvascular disease, and fibrosis, and may be a biomarker of SSc to predict occurrence, activity and progression of the disease. Therefore, lncRNA may be a novel therapeutic target of SSc.
【Keywords】 long non-coding RNA; systemic sclerosis; pathogenesis; biomarkers; targeted therapy
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

系统性硬化症(systemic sclerosis,SSc)是一种病因尚未明确且病死率较高的自身免疫性疾病^[1]。SSc的特征是自身免疫反应受到异常激活、微血管发生病变以及皮肤等多器官发生纤维化,进而可引起肺、肝、肾等多器官衰竭^[2]。由于其发病机制复杂,并发症严重,SSc被认为是风湿免疫治疗中最具

【基金项目】国家自然科学基金资助项目(81860294);内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2019MS08055,2021MS08045);内蒙古自治区科技计划项目(201802089,2019GG052)。
【作者简介】王宝玥(1992—),女,硕士研究生,研究方向:自身免疫性疾病。E-mail:aidi9264@163.com
【通信作者】孙晓林(1989—),女,博士,主管检验师,研究方向:自身免疫性疾病。E-mail:yolo_1010@126.com
王永福(1968—)男,博士,教授,研究方向:风湿免疫学。E-mail:wyf5168@hotmail.com * 共同通信作者

挑战的疾病之一,而清楚地了解 SSc 潜在的发病机制将有助于 SSc 的预防、诊断和治疗。多项研究通过高通量测序技术发现,长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在真核转录中发挥重要作用, lncRNA 可与 DNA、RNA 或蛋白质分子相互作用,调控基因的表达修饰、转录以及转录后的表达^[3]。近年来有学者发现, lncRNA 可能是 SSc 发病机制的重要参与者^[4-5],但是关于 lncRNA 在 SSc 中的作用尚未完全明确。因此,本文就 lncRNA 在 SSc 免疫失调、微血管病变、组织及器官纤维化,以及 SSc 临床诊断及治疗中作用的研究进展进行综述,进而为 SSc 的靶向治疗提供参考。

1 lncRNA 概论

lncRNA 是长度超过 200 个核苷酸并且没有编码蛋白质能力的转录 RNA^[6]。大多数 lncRNA 是由 RNA 聚合酶 II 转录形成,只有少数是由 RNA 聚合酶 III 转录,具有 mRNA 样结构,但 lncRNA 比 mRNA 表达量低^[7]。根据 lncRNA 编码序列在蛋白质编码基因的位置可分为以下 5 类:编码序列在 mRNA 有义链上的正义 lncRNA、编码序列在 mRNA 反义链上的反义 lncRNA、编码序列来自 mRNA 内含子的内含子 lncRNA、编码序列完全在两个 mRNA 位点之间的基因间 lncRNA、编码序列位于邻近基因启动子 1 kb 范围内,但与该基因转录方向相反的双向 lncRNA^[8]。

lncRNA 功能多样且复杂, lncRNA 不仅可以作为信号分子、诱饵分子、向导分子和支架分子调节 mRNA 的转录^[9],还可以作为竞争性内源 RNA(competitive endogenous RNA, ceRNA),即“分子海绵”,与一些含有互补位点的微小 RNA(microRNA, miRNA)结合,从而抑制 miRNA 对其靶基因的调控作用^[10]。此外, lncRNA 在不同的器官、组织、细胞中呈特异性表达,但其表达水平,在不同疾病,或疾病的不同发展阶段会有所不同,因此, lncRNA 也可作为疾病诊断、治疗和预后的生物标志物^[11]。

2 lncRNA 在 SSc 中的作用机制

据报道, lncRNA 在一些自身免疫性疾病发生和发展中发挥关键作用。Yan 等^[12]研究表明,在类风湿关节炎患者中, lncRNA HIX003209 通过靶向 miRNA-6089,激活核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路,促进巨噬细胞的增殖和炎症细胞因

子的产生,加重患者炎症反应。Liao 等^[13]研究证实, lncRNA RP11-2B6.2 在狼疮性肾炎患者的肾组织中呈高表达,该 lncRNA 通过抑制细胞因子信号传导抑制蛋白(suppressor of cytokine signaling, SOCS)1 的转录,促进肾细胞中 I 型干扰素的过度激活。然而, lncRNA 在 SSc 发病机制中的作用仍然知之甚少。有研究认为, SSc 发病相关的因子受到 lncRNA 的调控后,可引起免疫系统失调、内皮细胞损伤、组织缺血和慢性炎症,最终导致组织纤维化的形成^[14](见图 1)。

2.1 lncRNA 与 SSc 免疫失调

在 SSc 中,淋巴细胞、树突状细胞和单核细胞等免疫细胞激活后可分泌各种促炎细胞因子和生长因子,如白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β (transform growth factor- β , TGF- β),导致成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,从而引起组织纤维化^[15]。干扰素(interferon, IFN)反应是一种防御机制,可以防止病毒入侵并启动免疫反应^[16],而 IFN 反应在 SSc 发病机制中发挥重要作用。Wu 等^[17]研究表明,干扰素调节因子 7(interferon regulatory factor-7, IRF7)是促进 IFN 产生的关键因子,其表达水平在博来霉素诱导的 SSc 小鼠皮肤中显著增加,敲低 IRF7 基因可以抑制促炎因子及胶原蛋白的产生,减轻 SSc 小鼠炎症反应并改善真皮纤维化。Mariotti 等^[18]研究发现, lncRNA NRIR 可以增加 IFN 反应,引起 SSc 免疫系统的失调。在 SSc 患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 NRIR 的表达显著上调,当干扰 PBMC 中的 NRIR 表达时, IFN 靶基因 C-X-C 基序趋化因子配体 10(CXC chemokine ligand-10, CXCL10)和 CXCL11 的表达水平也同样降低,而这两种趋化因子可激活免疫细胞,导致 SSc 的免疫失调,加重炎症反应。Servaas 等^[19]通过分析 SSc 患者的转录组数据发现 886 个 lncRNA 在单核细胞中差异表达,其中 lncRNA PSMB8-AS1 是 SSc 患者 PBMC 中基因表达改变的关键调节因子,该 lncRNA 可调控 IL-6 和 TNF- α 的分泌,当 PSMB8-AS1 表达上调时, IL-6 和 TNF- α 的水平增加并且皮肤纤维化的程度也加重。

综上所述, IFN 反应与 SSc 免疫失调密切相关。Guo 等^[20]也证明 Anifrolumab 可通过抑制 IFN 反应,引起 SSc 患者血清中 CXCL10 水平和 CD40 配体的降低,减轻 SSc 患者炎症及组织纤维化。而 lncRNA

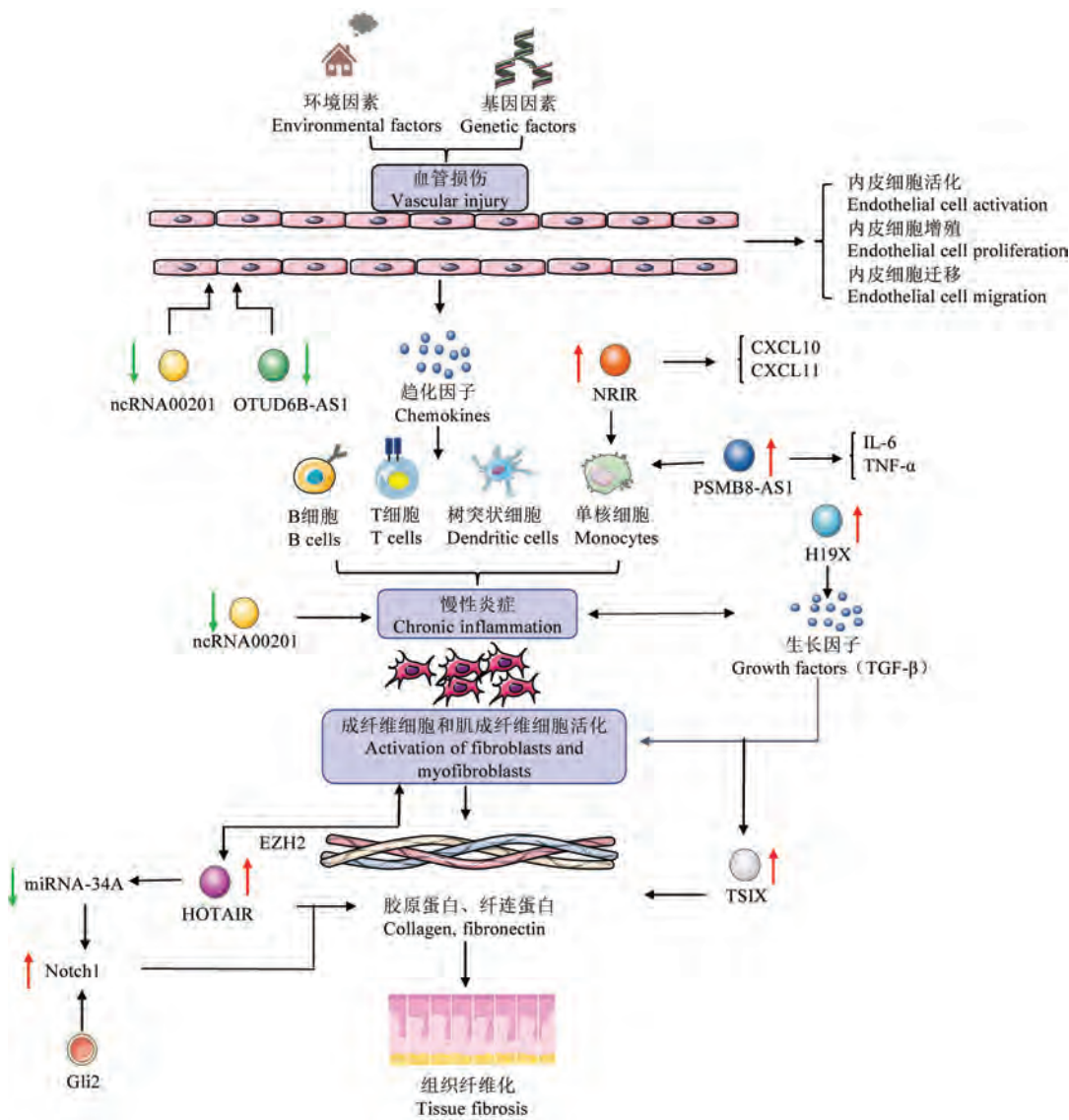


图 1 lncRNA 在 SSc 发病机制中的作用

Figure 1 Role of lncRNA in the pathogenesis of SSc

可以调控 IFN 反应引起 SSc 患者免疫细胞中促炎因子的活化,引起 SSc 免疫失调。因此深入探讨两者之间的联系,可为 SSc 的诊断和治疗提供新的思路。

2.2 lncRNA 与 SSc 微血管病变

SSc 微血管病变可能是由于内皮细胞受到损伤,导致血管狭窄,进而引起局部组织缺血,最终表现为皮肤硬化以及局部坏死等。研究表明,lncRNA STEEL,lncRNA GATA6-AS 和 lncRNA MANTIS 是血管生成的重要调节因子,这些 lncRNA 是通过血流动力和缺氧的刺激来调节血管生成^[21]。此外,一些 lncRNA 的异常表达可以加重血管内皮功能障碍,引起多种疾病的发生。Zeng 等^[22] 研究显示,与健康人群相比,血栓形成患者血清中的 lncRNA ANRIL 水平升高,ANRIL 进而通过靶向 miRNA-99a 和

miRNA-449a,上调自噬相关基因 beclin-1 的表达,引起血栓调节蛋白的表达水平升高,促进患者血栓形成;体内实验也证明干扰 ANRIL 的表达可减少 SD 大鼠的血栓形成。Zhang 等^[23] 研究发现,用高糖刺激人脐静脉内皮细胞时,这些内皮细胞中 lncRNA MALAT1 的表达水平显著升高;当抑制 lncRNA MALAT1 的表达时,可促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成,同时抑制内皮细胞凋亡,对改善内皮功能障碍具有重要意义。

在 SSc 中,细胞周期调节、细胞增殖和细胞凋亡对微血管病变尤为重要,其中血管平滑肌细胞持续地增殖可导致血管壁增厚和小动脉阻塞^[24]。细胞周期蛋白 D1 是最重要的细胞增殖相关基因之一^[25]。Takata 等^[26] 研究表明,在 SSc 患者病变皮肤

中 lncRNA OTUD6B-AS1 的表达下调,使用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 干扰真皮成纤维细胞和人肺动脉平滑肌细胞中 OTUD6B-AS1 的表达,其真皮成纤维细胞和人肺动脉平滑肌细胞的凋亡受到抑制。此外,OTUD6B-AS1 敲低通过增加靶基因周期蛋白 D1 的表达水平,抑制了真皮成纤维细胞和人肺动脉平滑肌细胞的增殖,但这可能是一种抑制细胞凋亡的代偿机制。这些说明,OTUD6B-AS1 通过调节细胞周期蛋白 D1 的表达来控制细胞凋亡和增殖,从而引起了 SSc 的血管病变。

Dolcino 等^[27]对来自 20 例 SSc 患者和 20 例健康供体 PBMC 中 lncRNA 表达的分析显示,只有一个 lncRNA ncRNA00201 在 SSc 中显著下调,而 Sutaria 等^[28]研究表明该 lncRNA 还可促进肿瘤细胞的增殖,侵袭和迁移。进一步对 ncRNA00201 靶向 miRNA 和基因的生物信息学分析表明,其靶基因异质核糖核蛋白 C (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C, hnRNP C) 可编码 SSc 相关的自身抗原,并且 ncRNA00201 在调节 SSc 的血管病变、自身免疫以及组织和器官纤维化中也发挥重要作用,这为 lncRNA 在 SSc 发病机制中的研究开辟了新的思路^[27]。因此,lncRNA 可能具有调控 SSc 血管病变的作用,但目前对 lncRNA 的研究多为转录组测序技术分析其差异表达,而具体的作用机制尚不十分清楚,故需要更多的样本以及进一步的临床试验去阐明 lncRNA 在 SSc 血管病变中的作用,进而为 SSc 的治疗带来新的突破。

2.3 lncRNA 与 SSc 纤维化

TGF- β 既可以诱导胶原蛋白和其他细胞外基质的过量生成,也可以抑制细胞外基质的降解,因此 TGF- β 是 SSc 纤维化过程中的关键调节因子^[29]。Wang 等^[30]研究发现,SSc 患者的血清和皮肤成纤维细胞中的 lncRNA TSIX 表达上调,该 lncRNA 可能是通过促进 TGF- β 信号传导,导致成纤维细胞中的胶原蛋白的合成增强;当干扰 TSIX 的表达时,I 型胶原蛋白的水平降低,表明 lncRNA 可参与调节 SSc 纤维化。H19X 是一种在 X 染色体上发现的基因间 lncRNA,Pachera 等^[31]研究证实,lncRNA H19X 可通过抑制 DNA 损伤诱导的转录本 4 样蛋白 (DNA damage-inducible transcript 4-like protein, DDIT4L) 基因的转录,促进 TGF- β 活化,引起成纤维细胞分化成肌成纤维细胞,导致细胞外基质的过量沉积,也

可通过抑制肌成纤维细胞的凋亡进一步加重 SSc 患者皮肤纤维化;此外,lncRNA H19X 在肺纤维化、克罗恩病患者的回肠中同样高表达,因此对 H19X 进行靶向药物的研发可能有助于预防许多疾病纤维化的发生。

除了 TGF- β 可以调控 SSc 纤维化,Notch 信号通路也可以调控肌成纤维细胞的活化,从而参与 SSc 纤维化的形成^[32]。有研究表明,在胶质母细胞瘤中,miRNA-34a 可通过抑制 Notch 信号传导来影响细胞增殖^[33]。Wasson 等^[34]通过体外实验证明,在 SSc 真皮成纤维细胞中,lncRNA HOTAIR 通过促进组蛋白甲基转移酶 Zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 的表达,引起 miRNA-34a 的表观遗传抑制,继而增强 Notch1 的信号传导,从而诱导肌成纤维细胞分化及胶原蛋白的形成;此外,在真皮成纤维细胞中的过表达 HOTAIR,可直接引起胶原蛋白 1A1、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -Smooth Actin, α -SMA) 等纤维化标志物的水平升高以及 EZH2 的数量增加。Tsou 等^[35]研究表明,EZH2 可促进 SSc 纤维化的形成。另一项关于 HOTAIR 的研究发现,HOTAIR 可以激活 Notch 信号来促进 Hedgehog 信号通路转录因子 Gli2 的表达,增加真皮成纤维细胞中的胶原蛋白及 α -SMA 的表达水平,促进 SSc 纤维化^[36]。

此外,Messemaker 等^[37]发现,SSc 患者皮肤中许多反义 lncRNA 的表达上调,其中 CTBP1-AS2、OTUD6B-AS1 和 AGPP2-AS1 与皮肤纤维化有关。总之,lncRNA 与 SSc 纤维化的形成密切相关,lncRNA 不仅能作为 ceRNA 促进肌成纤维细胞的分化,还能直接调控纤维化相关因子的水平,而目前也有一些研究通过干扰 lncRNA 的表达水平,来达到治疗效果,因此今后还需深入研究 lncRNA 在 SSc 纤维化中的作用机制 (表 1)。

3 lncRNA 在 SSc 临床诊断及治疗中的作用

鉴于 lncRNA 在 SSc 发病机制中的重要性,研究人员通过 RNA 测序等技术发现 SSc 患者体内有很多差异表达的 lncRNA,这些 lncRNA 可能作为 SSc 的生物标志物来预测疾病的发生、活性程度以及进展阶段,而深入分析 lncRNA 和 SSc 的相关性,可为 SSc 临床诊断及治疗提供帮助。

3.1 lncRNA 可能作为 SSc 生物标志物

抗分化非编码 RNA (anti-differentiation ncRNA,

表 1 参与 SSc 发病机制的 lncRNA
Table 1 lncRNA involved in the pathogenesis of SSc

lncRNA	表达水平 Expression level	组织或细胞类型 Tissue or cell type	靶基因 Target gene	作用 Role
NRIR	↑	单核细胞 Monocytes	CXCL10, CXCL11	增加 IFN 反应,引起 SSc 免疫系统的失调 ^[18] 。 Increases IFN response and causes dysregulation of SSc immune system.
PSMB8-AS1	↑	单核细胞 Monocytes	IL-6, TNF-α	引起 SSc 免疫失调,并促进 SSc 皮肤纤维化 ^[19] 。 Causes SSc immune dysregulation and promotes SSc skin fibrosis.
OTUD6B-AS1	↓	皮肤组织,人肺动脉平滑肌细胞 Skin tissue, human pulmonary artery smooth muscle cells	细胞周期蛋白 D1 Cyclin D1	通过调节细胞周期蛋白 D1 的表达来控制细胞凋亡和增殖,引起 SSc 的血管病变 ^[26] 。 Regulation of Cyclin D1 expression to control apoptosis and proliferation and causes vascular lesions in SSc.
ncRNA00201	↓	单核细胞 Monocytes	hnRNPC	调节 SSc 血管病变、自身免疫和组织纤维化以及肿瘤细胞的增殖 ^[27] 。 Regulation of SSc vasculopathy, autoimmunity and tissue fibrosis, and tumor cell proliferation.
TSIX	↑	皮肤组织 Skin tissue	I 型胶原蛋白 Collagen type I	TSIX 的上调导致 I 型胶原蛋白的表达显著升高,促进 SSc 组织纤维化 ^[30] 。 Upregulation of TSIX leads to a significant increase in type I collagen expression and promotes SSc tissue fibrosis.
H19X	↑	皮肤、肺组织 Skin tissue, lung tissue	DDIT4L	H19X 促进 TGF-β 诱导的细胞外基质合成以及肌成纤维细胞分化,引起 SSc 的组织纤维化 ^[31] 。 H19X promotes TGF-β-induced extracellular matrix synthesis as well as myofibroblast differentiation, which in turn causes tissue fibrosis in SSc.
HOTAIR	↑	皮肤组织 Skin tissue	通过调控 EZH2 来抑制 miRNA-34a Inhibition of miRNA-34a by regulating EZH2	促进胶原蛋白和 α-SMA 表达增加,抑制 miRNA-34a, 并激活 Notch 信号,引起 SSc 的组织纤维化 ^[34] 。 Promotes increased collagen and α-SMA expression, inhibits miRNA-34a, and activates Notch signaling, which in turn causes tissue fibrosis in SSc.
CTBP1-AS2, AGPP2-AS1	↑	皮肤组织 Skin tissue	本研究未提及 Not mentioned in this study	本研究未提及 ^[37] Not mentioned in this study

ANCR)是一种表皮 lncRNA,可抑制祖细胞分化,使表皮维持在基底层^[38]。终末分化诱导的非编码 RNA(terminal differentiation-induced ncRNA TINCR)可调控与分化相关的基因,促进角质形成细胞分化^[39]。SPRY4 内含子转录物 1 (SPRY4 intronic transcript 1,SPRY4-IT1) 来源于 Sprouty4 基因的内含子,在黑色素细胞、角质形成细胞中高表达,可以阻止细胞凋亡,促进黑色素瘤的生长^[40]。远端 HOXA 转录物(the HOXA transcript at the distal tip, HOTTIP)可控制细胞生长、增殖和凋亡^[41]。而 Abd-Elmawla^[42] 研究发现,在 SSc 患者血浆中 lncRNA TINCR、lncRNA HOTIP 和 lncRNA SPRY4-IT1 的表达水平升高,lncRNA ANCR 表达水平下降;改良 Rodnan 评分也发现,SPRY4-IT1、HOTIP 和

MRSS 的表达水平与 SSc 患者皮肤评分呈正相关,而 ANCR 表达水平仅与局限性皮肤型 SSc 患者的皮肤评分呈负相关。在 SSc 患者血浆中 ANCR 下调促进祖细胞分化,TINCR 上调促进角质形成细胞分化,因此可能增加 SSc 患者的表皮厚度。SPRY4-IT1 可与 miR-101-3p 结合,通过调节靶基因 ZEB1 的表达来促进宫颈癌的上皮-间充质转化^[43],而上皮-间充质转化与 SSc 纤维化的形成密切相关,但是在 SSc 血浆中高表达的 SPRY4-IT1 是否促进 SSc 纤维化还需进一步研究。同样,HOTIP 可作为 miR-150 的竞争性内源性 RNA 促进肝星状细胞活化,进而导致肝纤维化^[44],而 SSc 患者血浆中 HOTIP 的表达上调也可能与 SSc 纤维化有关。此外,这些 lncRNA 与 SSc 患者的临床数据也存在相关性。

ANCR 表达水平与疾病持续时间、患者血脂情况和肺动脉高压呈正相关, TINCR 表达水平和血沉正相关, HOTIP 表达水平与抗核抗体呈正相关, SPRY4-IT1 表达水平不仅与肺动脉高压呈正相关, 还可区分 SSc 的临床亚型, 预测 SSc 的严重性^[42]。这些表明 lncRNA 可能作为 SSc 的生物标志物, 帮助 SSc 的诊断以及评估 SSc 患者的治疗效果。

3.2 lncRNA 与 SSc 治疗

由于 lncRNA 独特的自身优势, 其表达更特异, 更能反映疾病的状态, 因此 lncRNA 可能是治疗 SSc 的新靶点。

Tang 等^[45]发现, 在博来霉素诱导的小鼠皮肤中, lncRNA GAS5 表达下调, 而增加 GAS5 的表达水平, 可抑制 TGF- β 诱导的成纤维细胞向肌成纤维细胞的转变, 降低胶原蛋白和 α -SMA 的水平, 改善小鼠皮肤纤维化。Nong 等^[46]研究表明, lncRNA COL1A2-AS1 在肥厚的疤痕组织和成纤维细胞中表达水平升高, 该 lncRNA 可作为内源性海绵吸附 miRNA-21, 促进 TGF- β 负调节因子 SMAD7 的转录, 进而抑制成纤维细胞的增殖。此外, 核富含丰富的转录本 1 (nuclear-enriched abundant transcript 1, NEAT1) 参与了多种疾病纤维化的发展。Zhang 等^[47]发现, NEAT1 通过靶向 miRNA-9-5p, 促进 TGF- β 信号传导, 引起肺纤维化的形成。Ye 等^[48]研究显示, NEAT1 可作为“分子海绵”结合 miRNA-129-5p, 增加细胞因子信号转导抑制因子 2 (suppressor of cytokine signaling 2, SOCS2) 的水平, 导致酒精性肝炎患者的肝纤维化发生; Li 等^[49]证明, NEAT1 通过抑制 miRNA-129, 上调 I 型胶原蛋白的表达, 引起肾纤维化的形成。而 SSc 可引起肺、肝、肾等器官的纤维化, 因此 NEAT1 也可能与 SSc 纤维化的发生和发展相关, 但需要相关研究去证明, 而干扰 NEAT1 的表达有望成为治疗 SSc 纤维化的新策略。

研究表明反义寡核苷酸 (antisense Oligonucleotide, ASO) 和小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可以与 lncRNA 的互补序列特异性结合, 抑制 lncRNA 的转录, 影响其靶基因功能, 因此靶向 lncRNA 可能成为治疗疾病的新兴方法^[50]。同时, 有研究证实靶向 lncRNA 可以治疗肿瘤和神经系统的疾病, 但由于靶向 lncRNA 的疗法存在特异性低、特异性传递阻滞以及脱靶效应等问题, 导致这种疗法目前还处在临床开发阶段, 无法

应用到疾病的治疗中^[51]。此外, 关于靶向 lncRNA 治疗 SSc 的研究也较为缺乏, 但随着不断的临床试验和技术的提高, 相信这种治疗面临的挑战终将被克服。

4 总结与展望

长期以来, SSc 是一个无法攻克的难题, 其疾病的反复性、治疗的长期性以及并发症的严重性和药物的不良反应, 不仅给人体造成了损害, 还给心理上带来了无法治愈的创伤。因此, 更加深入地了解 SSc 的发病机制, 寻找更有效的治疗方法成为了当务之急。目前, 我们了解到 SSc 的常见特征有自身免疫功能异常、血管损伤、皮肤和器官纤维化等, 那么这些特征具体的调节机制值得我们深入研究。近些年来, 随着高通量测序等技术的发展, lncRNA 与 SSc 发病机制的相关性逐渐显现出来。研究人员发现 lncRNA 在调控 SSc 自身免疫、血管损伤以及组织和器官纤维化中均发挥重要作用, 包括调控单核细胞中 IFN 反应的 lncRNA NRIR、参与细胞激活并促进炎症细胞因子产生的 lncRNA PSMB8-AS1、抑制成纤维细胞凋亡的 lncRNA OTUD6B-AS1、促进胶原增加的 lncRNA TSIX、增强 TGF- β 驱动细胞外基质产生的 lncRNA H19X、导致肌成纤维细胞数量增加的 lncRNA HOTAIR, 而 ncRNA00201 不仅调节 SSc 自身免疫、血管损伤以及组织和器官纤维化, 在致癌方面也发挥作用。此外, lncRNA 还有望成为帮助疾病诊断、提供预后和评估疗效的生物标志物。

但由于 lncRNA 复杂多样、保守性低以及目前的生物学技术发展较慢等原因, 仍有很多谜团待解开, 比如 lncRNA 调控 SSc 的具体机制, 作为生物标志物, lncRNA 是否比其他非编码 RNA 更具有优势, 能否研发出靶向 lncRNA 的药物, 均需要进一步去验证。除此之外, 有些研究仅存在于体外实验, 样本量小、可靠性低, 缺乏体内研究以及动物实验, 也需要通过大量的探索实验去逐步验证。但总体来说, 深入研究 lncRNA 的生物学功能和靶向 lncRNA 的治疗技术, 有望成为 SSc 的治疗手段之一。

参考文献:

- [1] Abignano G, Hermes H, Piera-Velazquez S, et al. Global gene expression analysis of systemic sclerosis myofibroblasts demonstrates a marked increase in the expression of multiple *NBPF* genes [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 20435.
- [2] Orlandi M, Lepri G, Damiani A, et al. One year in review

- 2020; systemic sclerosis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38(3): 3–17.
- [3] Chen X, Song J, Wang X, et al. LncRNA LINC00460: function and mechanism in human cancer [J]. Thorac Cancer, 2022, 13(1): 3–14.
- [4] Statello L, Guo CJ, Chen LL, et al. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 96–118.
- [5] Yin H, Li R, Lu L, et al. Understanding fibrosis in systemic sclerosis: novel and emerging treatment approaches [J]. Curr Rheumatol Rep, 2020, 22(11): 77.
- [6] 王利然, 杨丽红, 宁文华, 等. 长链非编码 RNA 调控血管新生的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 143–149.
- [7] Carlevaro-Fita J, Johnson R. Global positioning system: understanding long noncoding RNAs through subcellular localization [J]. Mol Cell, 2019, 73(5): 869–883.
- [8] 李发靖, 陈鹏, 杨仁华, 等. LncRNA 调控细胞自噬的分子机制及在神经系统疾病中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 111–116, 122.
- [9] Walther K, Schulte LN. The role of lncRNAs in innate immunity and inflammation [J]. RNA Biol, 2021, 18(5): 587–603.
- [10] Tsai CY, Hsieh SC, Wu TH, et al. Pathogenic roles of autoantibodies and aberrant epigenetic regulation of immune and connective tissue cells in the tissue fibrosis of patients with systemic sclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(9): 3069.
- [11] Rusek M, Krasowska D. Non-coding RNA in systemic sclerosis: a valuable tool for translational and personalized medicine [J]. Genes (Basel), 2021, 12(9): 1296.
- [12] Yan S, Wang P, Wang J, et al. Long non-coding RNA HIX003209 promotes inflammation by sponging miR-6089 via TLR4/NF- κ B signaling pathway in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2218.
- [13] Liao Z, Ye Z, Xue Z, et al. Identification of renal long non-coding RNA RP11-2B6.2 as a positive regulator of type I interferon signaling pathway in lupus nephritis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 975.
- [14] Muntyanu A, Le M, Ridha Z, et al. Novel role of long non-coding RNAs in autoimmune cutaneous disease [J]. J Cell Commun Signal, 2022, 16(4): 487–504.
- [15] Benfaremo D, Svegliati S, Paolini C, et al. Systemic sclerosis: from pathophysiology to novel therapeutic approaches [J]. Biomedicines, 2022, 10(1): 163.
- [16] Valadkhan S, Plasek LM. Long non-coding RNA-mediated regulation of the interferon response: a new perspective on a familiar theme [J]. Pathog Immun, 2018, 3(1): 126–148.
- [17] Wu M, Skaug B, Bi X, et al. Interferon regulatory factor 7 (IRF7) represents a link between inflammation and fibrosis in the pathogenesis of systemic sclerosis [J]. Ann Rheum Dis, 2019, 78(11): 1583–1591.
- [18] Mariotti B, Servaas NH, Rossato M, et al. The long non-coding RNA NRIR drives IFN-response in monocytes: implication for systemic sclerosis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 100.
- [19] Servaas NH, Mariotti B, van der Kroef M, et al. Characterization of long non-coding RNAs in systemic sclerosis monocytes: a potential role for PSMB8-AS1 in altered cytokine secretion [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4365.
- [20] Guo X, Higgs BW, Bay-Jensen AC, et al. Suppression of T cell activation and collagen accumulation by an anti-IFNAR1 MAb, anifrolumab, in adult patients with systemic sclerosis [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(10): 2402–2409.
- [21] Subramaniam N, Nair R, Marsden PA. Epigenetic regulation of the vascular endothelium by angiogenic lncRNAs [J]. Front Genet, 2021, 12: 668313.
- [22] Zeng R, Song XJ, Liu CW, et al. LncRNA ANRIL promotes angiogenesis and thrombosis by modulating microRNA-99a and microRNA-449a in the autophagy pathway [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(12): 7441–7448.
- [23] Zhang SH, Zhang SG, Zhou P, et al. LncRNA MALAT1 affects high glucose-induced endothelial cell proliferation, apoptosis, migration and angiogenesis by regulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(19): 8551–8559.
- [24] Barsotti S, Orlandi M, Codullo V, et al. One year in review 2019: systemic sclerosis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2019, 37(4): 3–14.
- [25] Zhang Z, Cui Z, Xie Z, et al. Deubiquitinase USP5 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation by stabilizing cyclin D1 [J]. Transl Lung Cancer Res, 2021, 10(10): 3995–4011.
- [26] Takata M, Pachera E, Frank-Bertoncelj M, et al. OTUD6B-AS1 might be a novel regulator of apoptosis in systemic sclerosis [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1100.
- [27] Dolcino M, Tinazzi E, Puccetti A, et al. In systemic sclerosis, a unique long non coding RNA regulates genes and pathways involved in the three main features of the disease (vasculopathy, fibrosis and autoimmunity) and in carcinogenesis [J]. J Clin Med, 2019, 8(3): 320.
- [28] Sutaria DS, Jiang J, Azevedo-Pouly ACP, et al. Expression profiling identifies the noncoding processed transcript of HNRNPU with proliferative properties in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Noncoding RNA, 2017, 3(3): 24.
- [29] Xu B, Xu G, Yu Y, et al. The role of TGF- β or BMPR2 signaling pathway-related miRNA in pulmonary arterial hypertension and systemic sclerosis [J]. Arthritis Res Ther, 2021, 23(1): 288.
- [30] Wang Z, Jinnin M, Nakamura K, et al. Long non-coding RNA TSIX is upregulated in scleroderma dermal fibroblasts and controls collagen mRNA stabilization [J]. Exp Dermatol, 2016, 25(2): 131–136.
- [31] Pachera E, Assassi S, Salazar GA, et al. Long noncoding RNA H19X is a key mediator of TGF- β -driven fibrosis [J]. J Clin Invest, 2020, 130(9): 4888–4905.
- [32] Seguro Paula F, Delgado Alves J. The role of the Notch pathway in the pathogenesis of systemic sclerosis: clinical implications

- [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2021, 17(12): 1257–1267.
- [33] di Bari M, Bevilacqua V, De Jaco A, et al. miR-34a-5p mediates cross-talk between M2 muscarinic receptors and Notch-1/EGFR pathways in U87MG glioblastoma cells: implication in cell proliferation [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1631.
- [34] Wasson CW, Abignano G, Hermes H, et al. Long non-coding RNA HOTAIR drives EZH2-dependent myofibroblast activation in systemic sclerosis through miRNA 34a-dependent activation of NOTCH [J]. Ann Rheum Dis, 2020, 79(4): 507–517.
- [35] Tsou PS, Campbell P, Amin MA, et al. Inhibition of EZH2 prevents fibrosis and restores normal angiogenesis in scleroderma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(9): 3695–3702.
- [36] Wasson CW, Ross RL, Wells R, et al. Long non-coding RNA HOTAIR induces GLI2 expression through Notch signalling in systemic sclerosis dermal fibroblasts [J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1): 286.
- [37] Messemaker TC, Chadli L, Cai G, et al. Antisense long non-coding RNAs are deregulated in skin tissue of patients with Systemic sclerosis [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(4): 826–835.
- [38] Kretz M, Webster DE, Flockhart RJ, et al. Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR [J]. Genes Dev, 2012, 26(4): 338–343.
- [39] Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR [J]. Nature, 2013, 493(7431): 231–235.
- [40] Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, et al. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion [J]. Cancer Res, 2011, 71(11): 3852–3862.
- [41] Hu X, Tang J, Hu X, et al. Silencing of long non-coding RNA HOTTIP reduces inflammation in rheumatoid arthritis by demethylation of SFRP1 [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 468–481.
- [42] Abd-Elmawla MA, Hassan M, Elsabagh YA, et al. Deregulation of long noncoding RNAs ANCR, TINCR, HOTTIP and SPRY4-IT1 in plasma of systemic sclerosis patients: SPRY4-IT1 as a novel biomarker of scleroderma and its subtypes [J]. Cytokine, 2020, 133: 155124.
- [43] Fan MJ, Zou YH, He PJ, et al. Long non-coding RNA *SPRY4-IT1* promotes epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer by regulating the miR-101-3p/ZEB1 axis [J]. Biosci Rep, 2019, 39(6): BSR20181339.
- [44] Zheng J, Mao Y, Dong P, et al. Long noncoding RNA HOTTIP mediates SRF expression through sponging miR-150 in hepatic stellate cells [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(2): 1572–1580.
- [45] Tang R, Wang YC, Mei X, et al. LncRNA GAS5 attenuates fibroblast activation through inhibiting Smad3 signaling [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(1): C105–C115.
- [46] Nong Q, Li S, Wu Y, et al. LncRNA COL1A2-AS1 inhibits the scar fibroblasts proliferation via regulating miR-21/Smad7 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(1): 319–324.
- [47] Zhang Y, Yao XH, Wu Y, et al. LncRNA NEAT1 regulates pulmonary fibrosis through miR-9-5p and TGF- β signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(16): 8483–8492.
- [48] Ye J, Lin Y, Yu Y, et al. LncRNA NEAT1/microRNA-129-5p/SOCS2 axis regulates liver fibrosis in alcoholic steatohepatitis [J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 445.
- [49] Li C, Liu YF, Huang C, et al. Long noncoding RNA NEAT1 sponges miR-129 to modulate renal fibrosis by regulation of collagen type I [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 319(1): F93–F105.
- [50] Winkle M, El-Daly SM, Fabbri M, et al. Noncoding RNA therapeutics—challenges and potential solutions [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(8): 629–651.
- [51] Chen Y, Li Z, Chen X, et al. Long non-coding RNAs: from disease code to drug role [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(2): 340–354.

[收稿日期]2022-11-03

宋亚刚,田硕,乔靖怡,等. 基于文献分析的中药毒性分级方法及思考 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 149-154.

Song YG, Tian S, Qiao JY, et al. Preliminary exploration of toxicity classification method for traditional Chinese medicines based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 149-154.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.019

基于文献分析的中药毒性分级方法及思考

宋亚刚,田硕,乔靖怡,武香香,朱星昊,留甜甜,苗明三*

(河南中医药大学,郑州 450056)

【摘要】 中药毒性问题成为制约中医药国际化的主要障碍。合理的毒性中药分级策略是解决该问题的主要途径之一。现有的中药毒性分级仍沿用传统分级法,该分级法虽对中医临床用药具有合理的指导作用,但缺乏定量数据,不够精准,出现同种药物不同书籍对毒性分级记载不同的现象。毒性分级现代研究主要有以口服生药LD₅₀值划分、多指标综合分类法、基于“物质-功效-毒性”有毒中药评价模式分级方法、沿用现代毒理研究模式等方法,虽然实现了中药毒性分级的定量标准,但脱离中医药理论指导,且与临床实际相差较大,未能体现中医药临床复方用药的实质。在梳理前人中药毒性研究的基础上,提出基于数据挖掘结合毒理研究的赋值评分分级法。该方法基于数据挖掘(毒性中药的古文献毒性记载、临床报道和体内外实验研究)综合现代毒理研究成果,对各项进行赋值加权评分,提出基于文献发掘的毒性中药分级方法,评分越高,毒性越大,并以附子为例,开展其毒性等级确定。本分级方法注重临床复方用药的优势,对临床具有一定的指导作用,可反映毒性大小,但该分级方法内容仍需进一步细化。随着该毒性中药分级法的逐步完善、细化,以期为临床毒性中药的合理应用及中医药国际化提供一定的参考。

【关键词】 毒性中药;数据挖掘;毒理研究;毒性分级

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0149-06

Preliminary exploration of toxicity classification method for traditional Chinese medicines based on data mining

SONG Yagang, TIAN Shuo, QIAO Jingyi, WU Xiangxiang, ZHU Xinghao, LIU Tiantian, MIAO Mingsan*
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450056, China)

【Abstract】 Toxicity has become a major obstacle to the international use of traditional Chinese medicines, and a rational grading strategy for their toxicity is therefore needed. Although the existing traditional toxicity classification can help to guide the clinical use of traditional Chinese medicines, it lacks quantitative data and is not sufficiently accurate, with different sources reporting different toxicity classifications for the same drug. Modern research on toxicity classification mainly includes classification method based on LD₅₀ of oral raw drugs, multi indicator comprehensive classification method, evaluation model of toxic traditional Chinese medicine based on “substance efficacy toxicity”, and the use of modern toxicology research models. Although these toxicity grading method achieve quantitative standards for traditional Chinese medicine toxicity grading, they deviate from the theoretical guidance of traditional Chinese medicine and differ significantly

【基金项目】 河南省重大公益专项 (201300310100); 河南省中医药科学研究专项课题 (20-21ZYD02); 国家公益性行业科研专项 (201507004-2); 河南省高等学校重点科研项目计划 (22A360013); 河南省科技攻关项目 (212102310351); 河南省青年人才托举工程项目 (2021HYTP055)。

【作者简介】 宋亚刚 (1991—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理。E-mail: songyagang1016@163.com

【通信作者】 苗明三 (1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中药药理教学与研究。E-mail: miaomingsan@163.com

from clinical practice, failing to reflect the essence of clinical compound medication of traditional Chinese medicine. To sort previous studies on the toxicity of traditional Chinese medicines, this paper proposes a scoring and grading method based on data mining combined with toxicological studies. The proposed method is based on data mining of historical toxicity records for traditional Chinese medicines, clinical reports, and experimental *in vitro* and *in vivo* studies, as well as comprehensive modern toxicological research result, followed by the assignment of weighted scores to each item, to derive a toxicity classification method for traditional Chinese medicines. For example, aconite would be graded as highly toxic according to this procedure. This grading method has the advantages of focusing on clinical compound drug use, as well as providing guidance for clinical practice. It can quantitatively indicate the degree of toxicity, thus reflecting the modern characteristics of traditional Chinese medicine. This grading method needs further refinement, but after gradual improvement and refinement, this toxicity classification method for traditional Chinese medicines is expected to promote their rational clinical application and wider international use.

【Keywords】 toxic traditional Chinese medicine; data mining; toxicology research; toxicity classification

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

中医药在中华民族防治疾病过程中发挥了重要作用,通过历代医药家的整理和归纳,其内容丰富,理论成熟,疗效确切,为中华民族的繁衍生息作出了不朽的贡献^[1-3]。近年来,随着中医药在新冠肺炎疫情中的突出疗效,中医药现代化、国际化成为主流趋势,在国家“一带一路”战略的规划实施大背景下,为加快中医药国际化提供了良好的机遇。但近来各地有关中药“毒性”的报道频出,致使中药毒性问题成为国内外关注的焦点^[4-5]。自日本的小柴胡汤事件以来,新加坡的“小檗碱事件”,比利时的马兜铃酸事件,乃至国内的葛根素风波、鱼腥草事件等^[6],无一不将矛头对准了中药毒性问题。可见,毒性问题是制约中医药国际化进程的主要障碍。

有毒无毒是中药药性理论的主要内容之一,中药毒性具有狭义和广义之分,广义上毒性指中药偏性,凡药皆具有偏性,因其偏性,所以治病^[7]。狭义上毒性指中药对机体产生的不良反应,与临床治疗无关的药理作用^[8-9]。现今研究的中药毒性一般指狭义上的毒性。如何科学地认识和管控中药“毒性”,成为目前制约中医药发展的瓶颈^[10-11]。中药毒性分级策略是解决该问题的主要途径之一。本文通过对中药毒性分级的历史考证归纳分析,中药毒性分级的现代研究分析,提出基于数据挖掘结合毒理研究的赋值评分分级法。随着该毒性中药分级法的逐步完善、细化,以期为临床毒性中药的合理应用及中医药国际化提供一定的支撑作用。

1 中药毒性分级的历史考证

毒性是中药药性的主要内容之一,古人对中药毒性分级主要基于临床实践,以用药后的反应程度为依据,进行划分^[12]。历代本草著作对中药毒性进

行了系统的分级整理^[13]。最早提出毒性分级的《黄帝内经·素问》五常政大论篇将药物分为“大毒”“常毒”“小毒”“无毒”四级,提出:大毒治病,十去其六,常毒治病,十去其七,小毒治病,十去其八,无毒治病,十去其九,谷肉果蔬,食养尽之。我国最早的药物专著《神农本草经》载药 365 种,按照毒性大小分为上、中、下三品,其中上、中、下各 120 味,下药 125 味。上药为君,主养命以应天,无毒,多服、久服不伤人;中药为臣,主养性以应人,无毒、有毒,斟酌其宜;下药,为佐使,主治病以应地,多毒,不可久服。随后历代本草按照大毒、小毒、无毒对中药进行分级^[14-15]。汉末《名医别录》载药 733 种,以大毒、有毒、小毒进行分级,含毒性中药占收载药物总量的 6.0%^[16]。唐《新修本草》载药 853 种,也按照大毒、有毒、小毒分级,含毒性中药占收载药物总量的 15.6%^[17]。宋《证类本草》载药 1749 种,大毒、有毒、小毒进行分级,含毒性中药占收载药物总量 12.8%^[18]。明《本草纲目》载药 1892 种,以大毒、有毒、小毒和微毒分级,含毒性中药占收载药物总量 19.1%^[19]。2015 版《中华人民共和国药典》收载中药材 618 味,毒性中药 83 种,大毒 10 种,小毒 31 种,有毒 42 种,占收载药材总量 13.4%^[20]。目前中药毒性分级仍沿用传统分级法,该法虽对中医临床用药具有合理的指导作用,但存在一定的局限性与随意性,缺乏定量数据,不够精准,甚至出现同种药物不同书籍对毒性分级记载不同的现象,如 2010 版《药典》记载黄藤、射干、花椒、虎耳等 10 种无毒的药物,《中药大辞典》记载有毒。2010 版《药典》收载有毒的北豆根、蛇床子、罂粟壳等 13 种药物在《中药大辞典》记载无毒。2020 版《药典》收载无毒的益母草、大黄、苍术等,国外文献报道有肾毒性风

险^[21]。这种不够准确的记载,一度造成毒性预警及分级较为混乱,难以得到国际社会的普遍认可,阻碍中医药国际化进程。

2 中药毒性分级的现代研究

2.1 LD₅₀ 毒性分级法

关于中药毒性分级的现代研究较多,分级标准也不尽相同。研究人员参考西药毒性分级方法,提出毒性中药急性毒性分级法,以动物口服生药煎剂 LD₅₀ 值大小进行划分^[22]。该方法虽然具有一定的参考价值,但中药来源不一,药材质量受炮制、储存等多重因素的影响。因此同种药材不同产地,不同批次,不同炮制方法等可出现不同的 LD₅₀ 值,难以界定中药的毒性大小,现代研究结果也显示急性毒性分级结果与实际相差较大^[23]。此外,LD₅₀ 是以死亡为终点的指标,并不是临床应用的毒性,难以对临床展开实用性指导。

2.2 多重指标中药毒性进行分级

有学者在《毒药本草》中依据临床中毒症状、动物实验半数致死量、有效剂量与中毒剂量的距离及剂量大小、中毒潜伏期等多重指标对中药毒性进行分级^[24]。又有学者提出根据中药的 LD₅₀、成人可能中毒量和致死量、临床中毒倍数(中毒量/极量)、临床致死倍数(致死量/极量)等参数,试拟了中药毒性的四级分类标准^[25]。这种分级方法综合了临床和动物多种毒性指标,得到多数学者的认同。虽然该法对毒性中药的临床毒性评价具有较大的参考价值,但该方法中将成人单次服用中毒量纳为指标,与临床实际不符;中药治病以偏纠偏,因毒为能,机体的生理和病理状态对中药的反应程度及耐受性当有不同,套用西药毒理研究模式有失偏颇;此外将临床指标与动物实验指标笼统地混在一起,实验结果和实际尚不能相符^[26]。

2.3 基于中药“物质-功效-毒性”有毒中药质量评价模式

学者基于中药“物质-功效-毒性”有毒中药质量评价模式,将毒性分级与反应相关联,毒性分级与化学组成关联,中药毒性(效能-效强或靶器官等)和药性(性味、归经等)相关联,并制订了分级标准,且对 20 种有毒中药毒效相关物质、动物毒性效应谱、特征、剂量-反应等进行了基础研究^[27]。该方法建立了与国际接轨的中药毒性分级新评价方法体系,且能够体现中医药特色,对临床具有一定的

参考价值,但该法仍侧重于动物实验的毒理研究,且方法仍以西医毒理研究模式为主,未能符合临床实际,未能重视临床患者机体状况,体现中医药“以偏纠偏”治疗疾病的核心内涵。目前关于有毒中药的分级未有得到公认的统一标准,《药典》及各版本《中药学》教材仍沿用传统的有毒中药分级模式。建立一种能够体现中医药治病特点,毒性描述尽量统一,符合临床实际,且便于临床应用的中药毒性分级评价方法体系成为中药毒性研究的关键。

3 中药毒性分级新方法的提出

无论中药还是西药,归根结底要应用于临床,解决临床实际问题。中药毒性分级的最终目的亦是为毒性中药的临床用药提供指导,因此从为临床服务的基点出发兼顾中药毒性分级的定量指标,有目的地进行中药毒性分级研究应是中药毒理研究的重点。在梳理前人中药毒性研究的基础上,本文根据娄鑫等^[28]提出的毒性分级,提出基于数据挖掘结合毒理研究的赋值评分分级法。该方法基于数据挖掘(毒性中药的古文献毒性记载)综合现代毒理研究成果(临床报道、体内外实验和毒理机制研究),对各项进行赋值加权评分。古文献记载和现代研究各赋值 50%,明确的临床报道(中药饮片毒性)赋值满分为 30%,体内实验报道(中药饮片或成分)满分为 10%,体外实验报道(中药饮片或成分)满分为 5%,明确的毒理机制报道(中药饮片或成分)满分为 5%进行分类赋值,合计 100%。从理论上提出毒性中药的分级方法,毒性分级标准初步设置为四级,分别为微毒(0~20%),小毒(20%~40%),有毒(40%~60%)和大毒(≥60%),评分越高,毒性越大,具体方法见图 1。

3.1 以附子为例古籍文献毒性分级评分

基于权威本草文献《名医别录》《本草经集注》《开宝本草》《新修本草》《本草纲目》《证类本草》《本草备要》《中华本草》《中药大辞典》和《中国药典》。按照 10 部本草著作的分级标准,古籍中有三级和四级分类法,见表 1。

计算附子的古籍文献得分情况:《名医别录》《本草经集注》《开宝本草》《新修本草》《本草纲目》和《证类本草》记载为大毒;《本草备要》《中华本草》《中药大辞典》和 2020 版《中国药典》记载为有毒,则附子的文献分析评分为:(40%+30%+50%×5+30%×3)/10=46%。

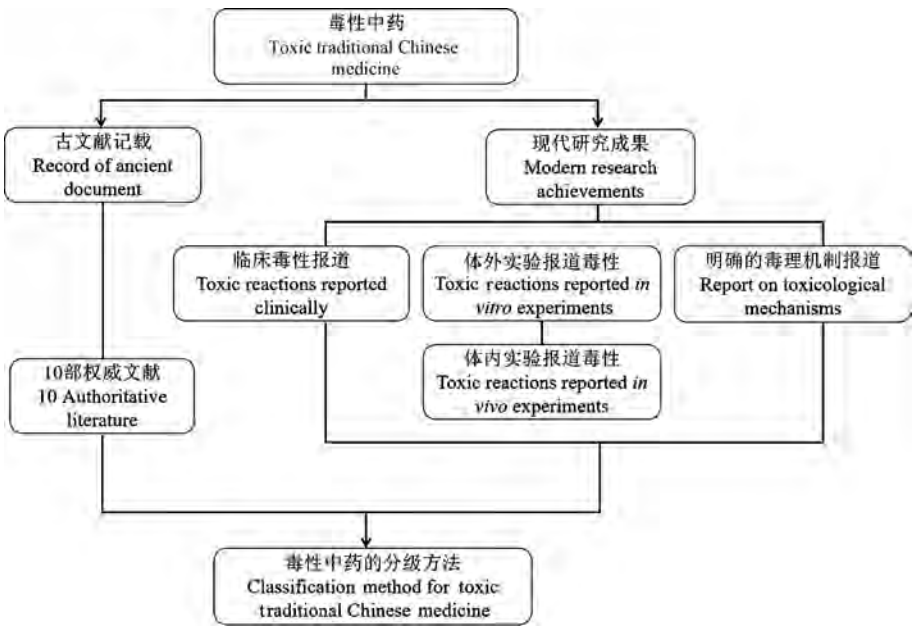


图 1 中药毒性分级新方法

Figure 1 New method for toxicity classification of traditional Chinese medicine

表 1 古籍文献毒性分级评分标准
Table 1 Grading criteria for toxicity of ancient literature

类别 Category		微毒 Light poisonous	小毒 Middle poisonous	有毒 High poisonous	大毒 Virulent poisonous
四级分类法 Four-level classification method	《本草纲目》 Compendium of materia medica	10%	20%	30%	40%
	《中药大辞典》 Great dictionary of Chinese medicine	10%	20%	30%	40%
	《名医别录》 Mingyi Bielu	/	20%	30%	50%
	《本草经集注》 Bencao jizhu	/	20%	30%	50%
	《开宝本草》 Kaibao Bencao	/	20%	30%	50%
	《新修本草》 Tang materia medica	/	20%	30%	50%
	《证类本草》 Classified materia medica	/	20%	30%	50%
	《本草备要》 Essential of materia medica	/	20%	30%	50%
三级分类法 Three-level classification method	《中华本草》 Chinese materia medica	/	20%	30%	50%
	《中国药典》 Chinese pharmacopoeia	/	20%	30%	50%

3.2 附子的现代研究成果毒性分级评分

通过检索毒性中药相关关键词,搜集中国知网、万方、Pubmed 等数据库,搜索毒性中药的相关报道。按照明确的临床报道(中药饮片毒性)赋值满分为 30%,体内实验报道(中药饮片或成分)满分为 10%,体外实验报道(中药饮片或成分)满分为 5%,

明确的毒理机制报道(中药饮片或成分)满分为 5% 进行分类赋值,具体的评分细则见表 2。

根据文献检索,临床报道附子相关毒性 98 篇,体内实验报道 213 篇,体外实验报道 108 篇,明确的毒理机制报道 135 篇。综上,附子的现代研究成果评分应为:10%+4%+2%+2%=18%。

表 2 现代研究成果毒性分级评分标准

Table 2 Grading criteria for toxicity of traditional Chinese medicine based on modern research results

类别 Category	论文数量(篇) Number of papers (pieces)			
	≤10	10~50	50~100	≥100
临床报的毒性反应 Toxic reactions reported clinically	2%	3%	10%	15%
体内实验报道毒性 Toxic reactions reported <i>in vivo</i> experiments	1%	2%	3%	4%
体外实验报道毒性 Toxic reactions reported <i>in vitro</i> experiments	0.50%	1%	1.50%	2%
明确的毒理机制报道 Report on toxicological mechanisms	0.50%	1%	1.50%	2%

3.3 附子的综合评分结果及毒性等级

综合古文献分析得出的毒性评分为 42%,现代研究成果评分为 18%,综合二者评分:18%+46%=64%,根据评分结果,附子的最终评分≥60%,即当被记为大毒。

4 展望

有毒中药毒性分级是指导中药临床应用的主要内容。在中医药历史发展进程中,对有毒中药毒性分级一直存在较大的争议。《黄帝内经》以大毒、常毒、小毒和无毒 4 类分级,《吴氏本草经》以有毒、无毒两级分,《名医别录》以大毒、有毒、毒三级分类,历代本草分类均存在差异。从历代本草记载来看,由于毒性分级差异,导致出现“此云大毒,彼云有毒或小毒,或记载使用剂量不一致”的尴尬现象。如半夏,《千金翼方》《本草纲目》《证类本草》等记载为小毒,《要药分剂》记载无毒;朱砂《神农本草经》《名医别录》记载无毒,《药性论》记载有大毒,《日华子本草》言微毒;雷公藤《本草纲目拾遗》述其为大毒,《滇南本草》记载有毒。现代本草著作对毒性中药的毒性分级也存在该现象,2020 版《药典》记载花椒、藤黄等无毒,《中药大辞典》记载有毒,《药典》标记有毒的蛇床子、罂粟壳、艾叶等,《中药大辞典》记载无毒。可见规范统一的毒性分级标准成为毒性中药临床应用的迫切需求。

毒性中药毒性分级现代研究已取得相当的成就,但均存在不足之处。以口服生药 LD₅₀ 值划分,脱离中医药理论基础,对中医临床应用指导意义不大。多指标综合分类法虽对临床毒性评价具有一定的参考价值,但与临床实际仍不能相符。基于“物质-功效-毒性”有毒中药评价模式能够体现中医药特色,且对临床毒性评价具有指导意义,但仍

偏重于西药毒理研究模式,未能体现中医临床辨证用药重视患者体质因素的实质。本文试图采用文献归纳分析的方法,通过纳入古文献和现代文献报道(临床报道、体内外实验报道、毒理机制报道)进行加权赋值评分的方法,从理论上提出毒性中药新的四级分类法。该分级方法在理论分级上具有注重临床的优势,对临床具有一定的指导作用,能够定量的反映毒性大小,且体现了中医药辨证论治的特色,但该法仅是初步提出,具体内容仍需进一步细化。如本评价方法对中药毒性的剂量、给药方式和用药时间等未纳入评价范畴。后期我们将开展中药毒性评价数据库的建立,在毒性数据库的建立中,将关联每味毒性中药的毒性分级,使用剂量、使用时间、毒性成分、功效成分、安全范围等信息,根据数据库信息,提出完善本方法的具体方案。此外,本方法也未将中药毒性成分与功效成分关系体现在毒性评价中,本研究将基于后期建立的中药毒性评价数据库,细化本评价方法中,分层次、分类别开展该类中药的毒性评价。在中药毒性成分与功效成分一致的情况下我们考虑安全范围的寻找,根据相应的算法定义相应的安全范围;不一致考虑炮制、配伍等减毒方法减少毒性成分含量,以毒性成分含量范围进行安全性评价。随着该毒性中药分级法的逐步完善、细化,以期对毒性中药的管控,临床合理用药及中医药国际化提供一定的指导和推进作用。

最后笔者认为中药毒理参数的获得,应纳入病症结合动物模型的考量,中药治疗疾病“疗寒以热药,疗热以寒药”,药性峻烈是为毒,虽附子、雷公藤大毒之品,作用病人,辨证得当,亦不显毒性,然常人剂量虽小,亦有致毒风险。在正常动物毒理研究基础上纳入中医药病症结合动物模型,不仅体现中

医药特色,亦能获得合理的毒性研究结果。因此提倡在毒性中药的现代研究中应采用正常动物和病证结合动物模型展开研究,分别获取毒性靶器官的致毒作用及毒理相关参数,将获得的数据回归于临床,结合临床实践,不断完善改进,获得确切的中药毒理研究数据。

参考文献:

- [1] 曲聪聪,张冰,林志健,等.清代本草著作中警戒思想的探析[J].中国中药杂志,2019,44(21):4751-4755.
- [2] 王涛,戴明珠,李延川,等.复方中药提取物增强免疫力作用及初步机制研究[J].中国实验动物学报,2022,30(2):198-207.
- [3] 于瑞,李彬,王永霞,等.中药心脏毒性及临床评价方法的思考[J].中草药,2019,50(18):4485-4489.
- [4] 李李佳.中药炮制方法与降低中药毒副作用分析[J].数理医药学杂志,2019,32(9):1386-1387.
- [5] 周跃华,路金才.毒性分级为“有毒”的药材范围及相关问题探讨[J].中国新药杂志,2019,28(16):1926-1940.
- [6] 魏湘萍,白莉,苗明三.毒性中药分级变化的思考[J].中华中医药杂志,2021,36(4):2158-2161.
- [7] 陈仁寿.中药毒性的本质与合理使用原则[J].中国合理用药探索,2022,19(2):1-5.
- [8] 柏兆方,王伽伯,肖小河.中药毒性认知创新与安全精准用药[J].中国中药杂志,2022,47(10):2557-2564.
- [9] 戴明珠,黄燕烽,彭逸,等.斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J].中国实验动物学报,2020,28(1):137-142.
- [10] 赵晓霞,赵巍,张永文.中药制剂关键质量属性确认的思考[J].中草药,2019,50(17):4008-4012.
- [11] 梁创奇.浅析如何安全使用毒性中药及其管理[J].光明中医,2019,34(15):2421-2423.
- [12] 段亚萍,骆骄阳,刘好,等.中药中内源性毒性成分分析方法研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(24):4808-4816.

- [13] 关建红,翁维良.对中药“毒性”与毒性分级的思考[J].中国中药杂志,2008,33(4):485-487.
- [14] 白俊杰,陈子杰,翟双庆.白话《黄帝内经》中之“毒”[J].西部中医药,2017,30(5):27-29.
- [15] 周宜,陈钢,张新渝,等.《黄帝内经》中的中药毒性理论[J].四川中医,2009,27(3):33-34.
- [16] 陶弘,尚志钧.名医别录[M].北京:人民卫生出版社;1986.
- [17] 苏敬,尚志钧.新修本草:辑复本[M].合肥:安徽科学技术出版社;2005.
- [18] 唐慎微,曹孝忠,张存惠.重修政和备急证类本草[M].北京:中医古籍出版社;2010.
- [19] 李时珍.本草纲目[M].北京:人民卫生出版社;1977.
- [20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典——一部:2015年版[M].北京:中国医药科技出版社;2015.
- [21] 冯雪,方赛男,高雨鑫,等.中药肾毒性国内外研究现状[J].中国中药杂志,2018,43(3):417-424.
- [22] 孙文燕,侯秀娟,王斌,等.中药毒性分级概况与研究思路探讨[J].中国中药杂志,2012,37(15):2199-2201.
- [23] 樊青,关建红.5种临床常用辛味中药饮片急性毒性初探——探讨毒性中药界定与分级标准的不足[J].世界中西医结合杂志,2021,16(8):1443-1446,1452.
- [24] 张智,闪增郁,向丽华,等.15味有毒中药小鼠半数致死量的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(6):435-436.
- [25] 杨仓良.毒药本草[M].北京:中国中医药出版社;1993.
- [26] 张广平,叶祖光.有毒中药的“毒性”与毒性分级[J].世界中医药,2014,9(2):175-177.
- [27] 赵军宁,叶祖光.传统中药毒性分级理论的科学内涵与《中国药典》(一部)标注修订建议[J].中国中药杂志,2012,37(15):2193-2198.
- [28] 娄鑫,田硕,白明,等.一种新的有毒中药毒性分级方法——四级毒性分类[J].中医学报,2020,35(2):370-373.

[收稿日期]2022-06-18