郭民,郭永昌,张瑞虎,等. 不同月龄 C57BL/6 小鼠大脑皮质功能区的微血管形态计量学分析［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 1-6.
Guo M, Guo YC, Zhang RH, et al. Microvascular morphometric analysis of cerebral cortical functional areas in C57BL/6 mice of various ages［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 1-6.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.001

不同月龄 C57BL/6 小鼠大脑皮质功能区的微血管形态计量学分析

郭　民[1],郭永昌[1],张瑞虎[1],张引红[1],王海龙[2*],陈朝阳[1*]

(1.山西医科大学实验动物中心,太原　030001;2.山西医科大学基础医学研究中心,山西 晋中　030600)

【摘要】　目的　观察不同月龄 C57BL/6 小鼠大脑皮质不同功能区的微血管构筑,并进行定量分析。**方法**　采用改良碱性磷酸酶染色法染色 C57BL/6 小鼠大脑皮质运动皮质区(初级运动皮层、次级运动皮层)、感觉皮质区(初级体感皮层、次级体感皮层)、视觉皮质区(初级视觉皮层、次级视觉皮层)、听觉皮质区(初级听觉皮层、次级听觉皮层)、嗅觉皮质区(外嗅皮层、内嗅皮层)的微血管形态,OLMPUS BX51 显微镜结合 Image-Pro Plus 5.1 进行图像捕获,采用 Image-Pro Plus 5.1 软件进行微血管长度密度(mlcrovascular length density,Lv)、微血管表面积密度(microvascular surface area density,Sv)、微血管体积密度(microvascular volume density,Vv)的定量分析。**结果**　碱性磷酸酶在成年组和老年组的大脑皮质微血管内表达丰富,在幼年组略有表达,而在乳鼠组无表达;软脑膜血管进入皮质的方式分 T 字形、Y 字形、大弧形和小弧形四种;相同年龄不同部位的 Lv、Sv 和 Vv 显示运动皮质区、感觉皮质区、视觉皮质区、听觉皮质区、嗅觉皮质区呈现下降趋势,且运动皮质区和感觉皮质区与嗅觉皮质区比较 Lv、Sv、Vv 微血管密度有统计学意义($P<0.05$)。老年组的各功能区血管密度均较成年组降低,但无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　C57BL/6 小鼠大脑皮质不同功能区微血管内碱性磷酸酶的表达随年龄增长而增多,成年时达到峰值,其脑内微血管构筑为脑血管疾病及模型制备提供形态学参数。

【关键词】　碱性磷酸酶染色;C57BL/6 小鼠;大脑皮质;微血管构筑
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0001-06

Microvascular morphometric analysis of cerebral cortical functional areas in C57BL/6 mice of various ages

GUO Min[1], GUO Yongchang[1], ZHANG Ruihu[1], ZHANG Yinhong[1], WANG Hailong[2*], CHEN Zhaoyang[1*]
(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.
2. Basic Medical Research Center, Shanxi Medical University, Jinzhong 030600)

【Abstract】　Objective　To observe and analyze functional areas of the cerebral cortex in C57BL/6 mice of various ages. **Methods**　Improved alkaline phosphatase staining was used to reveal the microvascular morphology of the cerebral cortex in C57BL/6 mice, including the motor cortex (primary and secondary motor cortex), sensory cortex (primary and secondary somatosensory cortex), visual cortex (primary and secondary visual cortex), and auditory cortex (primary and

[**基金项目**]国家重点研发计划项目(2021YFF0702805)。
[**作者简介**]郭民(1970—),男,高级实验师,研究方向:人类疾病动物模型制备。E-mail:gm5647@163.com
[**通信作者**]陈朝阳(1972—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病动物模型制备。E-mail:ccytycn@163.com
王海龙(1973—),男,教授,硕士生导师,研究方向:基因的结构和功能。E-mail:longwty@163.com
*共同通信作者

secondary auditory cortex), olfactory cortex (extrarhinal and entorhinal cortex). Images were captured under an OLYMPUS BX51 microscope with Image-Pro Plus 5.1 software. The microvascular length density (Lv), microvascular surface area density (Sv), and microvascular volume density (Vv) were analyzed by Image-Pro Plus 5.1 software. **Results** Expression of alkaline phosphatase was abundant in cerebral cortical microvessels of adult and elderly mice, and slightly expressed in juvenile mice, but not in lactating mice. Pial blood vessels enter the cortex in T shape, Y shape, large arc, and small arc four manners. Lv, Sv and Vv in different parts of the same aged mice showed a decreasing trend in motor, sensory, visual, auditory and olfactory cortexes, and the microvascular density of Lv, Sv and Vv in motor and sensory cortexes was statistically significant compared with the olfactory cortex ($P<0.05$). The vascular density in all functional areas in elderly mice was lower than that in adult mice, but no statistical significance was found ($P>0.05$). **Conclusions** The expression of alkaline phosphatase in microvessels in functional areas of the cerebral cortex in C57BL/6 mice increases with age and reached its peak value in adulthood. The microvascular architecture in the brain provides morphological parameters to establish cerebrovascular disease models.

【**Keywords**】 alkaline phosphatase staining; C57BL/6 mice; cerebral cortex; microvascular construction

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

脑是生物体最复杂的器官,其基本功能单位是神经元。神经元功能的实现依赖于氧气和营养物质的供应,而脑微血管是保证营养物质输送和维持脑细胞新陈代谢的主要通道,对神经元的正常活动及维持局部脑血流量具有重要意义[1-3]。目前关于大脑皮质不同功能区微血管的分布及密度研究较少,尤其是对不同发育阶段小鼠大脑皮质功能区微血管构筑及定量研究未见报道。鉴此,本文就不同发育阶段 C57BL/6 小鼠大脑皮质不同功能区即运动皮质区(初级运动皮层、次级运动皮层)、感觉皮质区(初级体感皮层、次级体感皮层)、视觉皮质区(初级视觉皮层、次级视觉皮层)、听觉皮质区(初级听觉皮层、次级听觉皮层)、嗅觉皮质区(外嗅皮层、内嗅皮层)的微血管构筑进行了形态学观察和定量分析,旨在为脑血管疾病及模型制备提供形态学依据和理论参数。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 SPF 级 C57BL/6 小鼠,共 24 只,分为 4 组,每组雌雄各半。乳鼠组为 0~7 d、体重(2.0±0.5)g 小鼠;幼鼠组为 1~2 月龄、体重(16.0±1.3)g 小鼠;成年组 3~4 月龄、体重(25.0±2.8)g 小鼠;老年组 21~24 月龄、体重(40.0±3.6)g 小鼠,每组 6 只[4-5]。动物来源于山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2019-0004],实验均在山西医科大学实验动物中心屏障设施内进行[SYXK(晋)2019-0007],所有实验动物操作经山西医科大学实验动物伦理委员会批准(SYDL2020003),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

无水氯化钙、β-甘油磷酸钠、硝酸铅、硫化铵均购自 Sigma-Aldrich 公司;戊巴比妥钠购自淄博化学试剂厂有限公司。BX51 型 OLYMPUS 显微镜(日本,奥林巴斯株式会社);Image-Pro Plus 5.1 图像分析系统(美国,Media Cybernetics 公司);LEICA RM2016 病理切片机(德国,LEICA 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 碱性磷酸酶染色

生理盐水配置 3%的戊巴比妥钠,腹腔注射(10 mL/kg)。麻醉后颈椎脱臼处死小鼠,开颅取全脑,固定脱水,常规火棉胶包埋,制成厚度为 60 μm 的组织切片,经改良碱性磷酸酶法染色[6],梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在 OLYMPUS BX51 型显微镜下观察和拍片。

1.3.2 微血管构筑的定量分析

使用 Image-Pro Plus 5.1 图像分析系统,对不同年龄段小鼠大脑皮质功能区的运动皮质区、感觉皮质区、嗅觉皮质区。视觉皮质区、听觉皮质区的微血管按生物体视学方法随机取样,用 10×10 方网测试系统,测试点数及线数目为 100,a 为每个测试点所代表的面积 1 mm^2,N 为每条测试线长度 0.2 mm。从规定的各组检测样本中随机取 12 张切片,每张切片随机选取 2 个视野,测算每一测试面内 Qxi(微血管的横截点数)、Ixi(微血管与测试线交点数)、Pxi(微血管断面内的测试点数)及 Pci(每一测试面内的测试点数),按公式 $Lv=2\times Qxi/a\times Pci$、$Sv=2\times Ixi/Pci\times N$、$Vv=Pxi/Pci$ 进行计算和分析比较[7]。

1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS

23.0 统计分析软件，组间比较采用单因素方差分析，方差齐时采用 LSD 法，方差不齐时采用 *T*2 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

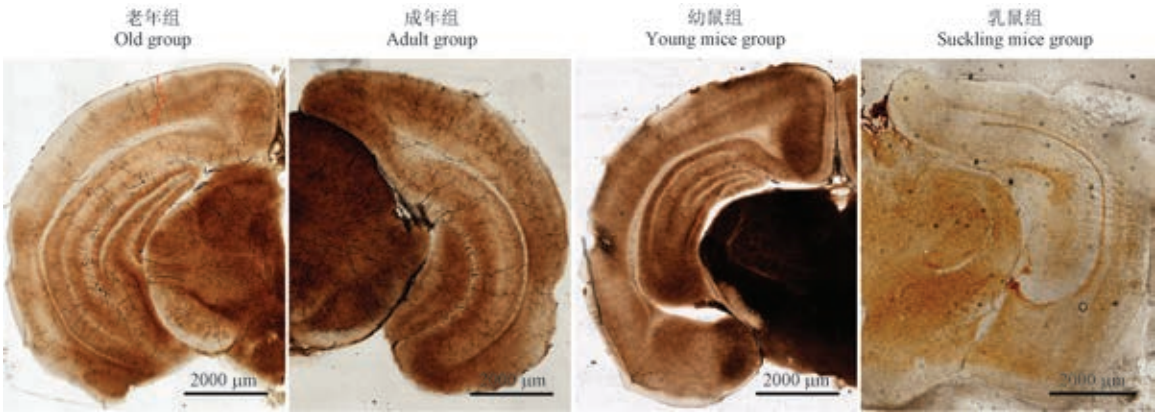
2　结果

2.1　C57BL/6 小鼠大脑皮质碱性磷酸酶的表达

碱性磷酸酶染色可清晰显示老年组和成年组 C57BL/6 小鼠较完整的大脑皮质内微血管（呈棕黑色）；而幼鼠组仅可显示少量微血管；乳鼠组使用碱性磷酸酶染色法未能使其脑内微血管显示，我们推测乳鼠脑组织内有微血管，只是目前文章所有方法无法使其清晰显示（图 1）。

2.2　C57BL/6 小鼠大脑皮质微血管的进入方式

如图 2 所示，各年龄组皮质区微血管形态在各

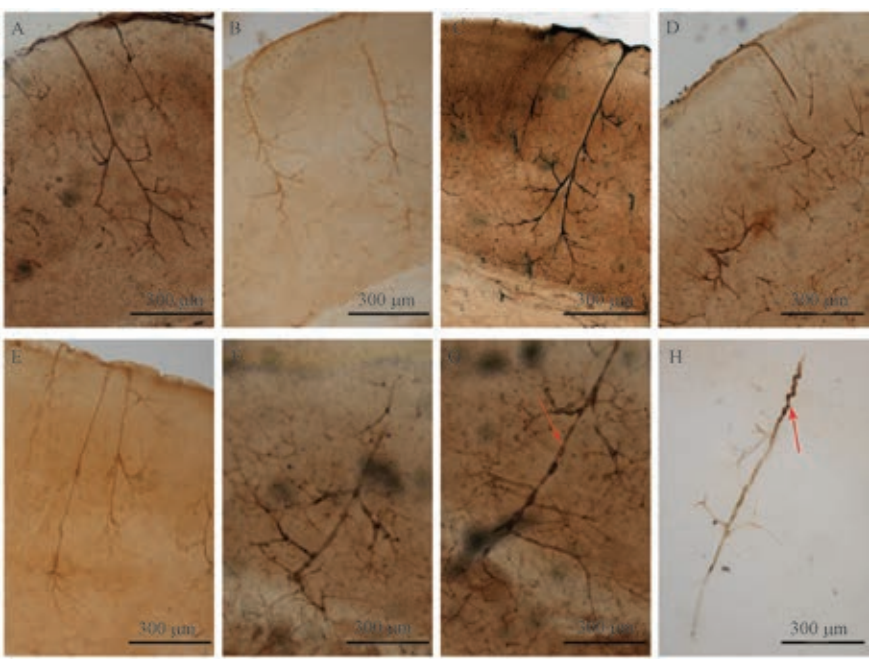


注：老年鼠组图中数字表示皮质分层。

图 1　不同年龄 C57BL/6 小鼠大脑皮质微血管碱性磷酸酶染色

Note. Numbers in picture of aged mice indicate cortical stratification.

Figure 1　Alkaline phosphatase staining of cerebral cortex microvessels in C57BL/6 mice of different ages



注：A：T 字形血管；B：大弧形血管；C：Y 字形血管；D：小弧形血管；E：皮质浅血管、皮质中血管、皮质深血管；F：皮质髓质血管；G：中箭头为串珠样血管；H：中箭头为螺旋样血管。

图 2　C57BL/6 小鼠皮质区微血管形态

Note. A, T-shaped blood vessels. B, Large arcuate blood vessels. C, Y-shaped blood vessels. D, Small arcuate blood vessels. E, Superficial cortical vessels, middle cortical vessels and deep cortical vessels. F, Cortical medullary blood vessels. G, Arrow indicates beaded blood vessels. H, Arrow indicates helical vessels.

Figure 2　Microvascular morphology of cortex in C57BL/6 mice

功能区颇为相似,形状多为枯树枝状,皮质内血管多由软脑膜血管发出,多以四种近似直角的方式穿入大脑实质。第一种方式:直接起自软脑膜血管并与其完全成直角即 T 字形(图 2A);第二种方式:起自软脑膜血管并在脑表面潜行一段后以大弧形穿入皮质,皮质主干与脑表面近似成直角(图 2B);第三种方式:虽直接起自软脑膜血管,但在起始处形成一个 Y 字形,分支与主干形成近似直角(图 2C);第四种方式:起自软脑膜血管并在脑表面潜行一段后以小弧形穿入脑皮质,皮质主干与脑表面近似成直角(图 2D)。根据进入皮质深度的不同,可将其分成皮质浅血管、皮质中血管、皮质深血管及皮质髓质血管四种类型(图 2E~2G)。在水平及冠状切片层面,皮质各功能区的微血管分层明显,形成多层微血管密集区,且疏密相间,各层宽窄厚薄各一,即使同一层也不均一。各功能区分界处可见层次合并现象,其中运动皮质区、感觉皮质区、视觉皮质区、听觉皮质区可分为 4~6 层,嗅觉皮质区可分为 3~4 层。皮质中血管、皮质深血管和皮质髓质血管在穿过其上一层血管密集区时大多会在该区发出侧支,参与血管密集区构成(图 2C、2G)。但也有部分血管从起始部发出后沿途基本没有分支,直到本血管密集区才发出分支,形成本区的血管密集区(图 2A、2E)。此外,C57BL/6 小鼠皮质髓质血管长度可及髓质对侧的核团(图 2G),以及在老年鼠和成年鼠大脑皮质的各区域均发现有串珠样血管及螺旋样血管存在(图 2G、2H)。

2.3 C57BL/6 小鼠大脑皮质微血管特征

改良碱性磷酸酶染色显示 C57BL/6 小鼠大脑皮质的动、静脉区别不明显,不易区分。毛细血管走形迂曲、错综复杂、无一定方向,并未发现吻合成网,而是彼此互相交织和重叠,以致在镜下通过多个连续视野均难以同时找到它们的起始与终末两端,同时也未见毛细血管前的动-静脉吻合及动-动脉或静-静脉吻合。

2.4 成年组小鼠皮质各功能区 Lv、Sv、Vv 微血管密度比较

如表 1 所示,成年组小鼠嗅觉皮质区的 Lv、Sv、Vv 分别是(30.48 ± 7.57)、(0.0096 ± 0.0051)、(0.1622 ± 0.0400),与感觉皮质区 Lv(48.61 ± 13.85)、Sv(0.0175±0.0027)、Vv(0.2636±0.0346)和运动皮质区 Lv(55.02 ± 10.55)、Sv(0.0184 ±

表 1 成年组与老年组 C57BL/6 小鼠皮质各功能区 Lv、Sv 和 Vv 微血管密度(n=24)

Table 1 Microvascular density of Lv, Sv and Vv in different cortical functional areas of C57BL/6 adult and elderly mice

部位 Position	长度密度(/mm²) Lv	表面积密度(/mm) Sv	体积密度(%) Vv
成年组嗅觉皮质区 Olfactory cortical area of adult group	30.48±7.57	0.0096±0.0051	0.1622±0.0400
成年组听觉皮质区 Auditory cortex of adult group	41.52±9.68	0.0134±0.0037	0.2004±0.0775
成年组视觉皮质区 Visual cortex of adult group	40.54±8.88	0.0135±0.0031	0.2209±0.0749
成年组感觉皮质区 Sensory cortical area in adult group	48.61±13.85*	0.0175±0.0027*	0.2636±0.0346*
成年组运动皮质区 Motor cortical area of adult group	55.02±10.55*	0.0184±0.0035*	0.2542±0.0689*
老年组嗅觉皮质区 Olfactory cortical area in elderly group	27.23±7.63	0.0080±0.0029	0.1339±0.0367
老年组听觉皮质区 Auditory cortical area in elderly group	37.25±14.14	0.0110±0.0023	0.1716±0.0394
老年组视觉皮质区 Visual cortical area in elderly group	34.22±10.97	0.0121±0.0033▲	0.1857±0.0531▲
老年组感觉皮质区 Sensory cortical area in elderly group	44.67±10.97#	0.0133±0.0048#	0.2074±0.0394#★
老年组运动皮质区 Motor cortical area in elderly group	52.67±13.43#	0.0150±0.0031#	0.2528±0.0566#

注:与成年组小鼠嗅觉皮质区的 Lv、Sv 和 Vv 比较,*P<0.05;与老年组小鼠嗅觉皮质区的 Sv 和 Vv 比较,▲P<0.05;与老年组小鼠嗅觉皮质区的 Lv、Sv 和 Vv 比较,#P<0.05;与成年组小鼠感觉皮质区的 Vv 比较,★P<0.05。

Note. Compared with the Lv, Sv and Vv in olfactory cortex of adult mice, *P<0.05. Compared with the Sv and Vv in olfactory cortex of elderly mice, ▲P<0.05. Compared with the Lv, Sv and Vv in olfactory cortex of elderly mice, #P<0.05. Compared with the Vv in sensory cortical area of adult mice, ★P<0.05.

0.0035)、Vv(0.2542±0.0689)比较,有显著差别(P<0.05);而与听觉皮质区 Lv(41.52±9.68)、Sv(0.0134±0.0037)、Vv(0.2004±0.0775)、视觉皮质区 Lv(40.54±8.88)、Sv(0.0135±0.0031)、Vv(0.2209±0.0749)比较,无显著差异(P>0.05),其他各功能区两两比较均无显著差异(P>0.05)。老年组小鼠大脑嗅觉皮质区的 Lv、Sv、Vv 分别是(27.23±7.63)、(0.0080±0.0029)、(0.1339±0.0367),其微血管密度不但与感觉皮质区 Lv(44.67±10.97)、Sv(0.0133±0.0048)、Vv(0.2074±0.0394)及运动皮质区 Lv(52.67±13.43)、Sv(0.0150±0.0031)、Vv(0.2528±0.0566)有显著性差异(P<0.05),而且还与视觉皮质区的 Sv(0.0135±0.0031)、Vv(0.2209±0.0749)有显著性差异(P<0.05),其他各功能区两两比较皆无显著差异(P>0.05)。老年组小鼠的嗅觉皮质区、听觉皮质区、视觉皮质区、感觉皮质区、运动皮质区微血管密度 Lv、Sv、Vv 都低于成年组小鼠相对应部位的微血管密度,但只有感觉皮质区 Vv 具有统计学意义(P<0.05),其余各组两两比较无统计学意义(P>0.05)。

3　讨论

大脑皮层微血管分布、密度的研究以往虽有报道[8-10],但多关注于大脑皮质大体分区(额区、顶区、枕区等),而大脑皮质不同功能区微血管的构筑及计量研究未见报道。本研究选择不同发育阶段的 C57BL/6 小鼠,对其大脑皮质各功能区进行改良碱性磷酸酶显色观察,发现乳鼠组大脑皮质各功能区微血管内未见碱性磷酸酶表达,幼鼠组微血管中碱性磷酸酶有少许表达,成年组和老年组微血管中碱性磷酸酶表达丰富,说明碱性磷酸酶在乳鼠脑内血管内皮细胞中的表达量较低或无表达,使得碱性磷酸酶染色法无法使其显色,随着年龄的不断增长血管内皮细胞中碱性磷酸酶也不断增加,而使得幼年鼠及成年鼠脑内微血管得以显现,并逐渐增多。这与人脑的表达形式是不相同的[9-11]。

多数研究显示,软脑膜血管进入大脑皮质的方式为近似直角[8,11],但具体以何种方式并未报道。本研究显示,C57BL/6 小鼠软脑膜血管进入大脑皮质的方式大多以大弧形、小弧形、Y 字形和 T 字形进入大脑皮质,其中尤以弧形多见,而这种方式也更符合血流动力学原理。据我们所知,这是首次对软脑膜血管进入大脑皮质的具体方式进行的描述,旨在为脑血管疾病的研究及动物模型制备提供形态学依据。

由于微静脉内皮细胞碱性磷酸酶分布不集中,活性也较低,传统碱性磷酸酶染色法难以对其着色显示[12-13]。我们使用改良后的碱性磷酸酶染色法也不能有效分辨 C57BL/6 小鼠大脑皮质内微动脉和微静脉,主要是因为 C57BL/6 小鼠大脑皮质的微静脉不符合以往如人脑微静脉的判定标准[14-15]。有研究者认为着色较浅、管径较同级动脉粗、直角汇入、汇入处有三角形膨大即为微静脉[16],但我们观察发现 C57BL/6 小鼠脑皮质体积较小,微血管直径较细,无法从颜色及管径区分同级微动脉和微静脉,至于直角汇入和三角形膨大,本研究发现在一根血管上偶有几处显示有直角汇入和三角形膨大,但其他分支却不表现这些特征,使得无法准确判定其为微静脉。因此,对于存在直角汇入和三角形膨大的这种微血管,需要其他方法进一步加以证明,所以我们并不认为改良碱性磷酸酶染色法不能显示微静脉。

关于 C57BL/6 小鼠大脑皮质毛细血管是否吻合成网,我们通过 80 μm 切片连续视野多层次反复观察均未发现毛细血管吻合成网,亦未见毛细血管前的动-静脉吻合及动-动脉或静-静脉吻合,更多表现为错综复杂的互相交织和重叠,偶尔发现有极少的形成多边形或近似圆形的网,据此推测 C57BL/6 小鼠大脑皮质的微血管为终动脉,进一步证据仍需要其他研究方法的进一步研究。研究还发现成年组和老年组 C57BL/6 小鼠大脑皮质内存在多量串珠样血管,而这种血管又与高血压疾病有关[17],因此提示 C57BL/6 小鼠可能更有利于高血压疾病动物模型的建立。

脑组织的微血管密度与脑组织代谢率、脑血流量呈正相关[18]。本研究结果显示,成年组和老年组均呈现运动皮质区、感觉皮质区、视觉皮质区、听觉皮质区和嗅觉皮质区的 Lv、Sv、Vv 微血管密度依次递减趋势,且成年组小鼠大脑嗅觉皮质区的 Lv、Sv、Vv 微血管密度与运动皮质区、感觉皮质区有显著差别。而老年组小鼠嗅觉皮质区不仅与运动皮质区、感觉皮质区的 Lv、Sv、Vv 有显著差别,而且还与视觉皮区的 Sv、Vv 有显著差别。在 C57BL/6 小鼠大脑皮质这几个功能区中,嗅觉皮质区的组织代谢率及耗氧量相对于其他各功能区最低,其相对功能较

弱,这可能与小鼠昼伏夜出的生活习性有关。随着年龄的增长组织功能的退化,老年小鼠大脑各功能区血管密度普遍低于成年组,提示老年小鼠大脑的组织代谢率及耗氧量较成年小鼠均有所下降,且视觉皮质区的下降速度明显快于其他各功能区。这些微血管指标的改变能够较好地解释一些随着年龄增加而出现的功能退化,如视力减退等。

参考文献:

[1] Hirsch S, Reichold J, Schneider M, et al. Topology and hemodynamics of the cortical cerebrovascular system [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(6): 952-967.

[2] Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Staufenbiel M, et al. Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(9): 3587-3592.

[3] Gu YH, Hawkins BT, Izawa Y, et al. Intracerebral hemorrhage and thrombin-induced alterations in cerebral microvessel matrix [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2022, 42(9): 1732-1747.

[4] 徐伟超, 顾剑洁, 葛蓉, 等. C57BL/6J 小鼠冻融胚胎移植后所得小鼠及其子代生物学特性数据测定与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4): 69-74.

[5] Zhai X, Li XY, Wang YJ, et al. Fancd2os reduces testosterone production by inhibiting steroidogenic enzymes and promoting cellular apoptosis in murine testicular leydig cells [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2022, 37(3): 533-546.

[6] 乔海兵, 邢开宇. 改良碱性磷酸酶染色法 [J]. 实用医技杂志, 2006, 13(6): 1011-1012.

[7] 邵伟华, 李琛, 陈林, 等. 大鼠大脑白质、皮质毛细血管的体视学定量研究 [J]. 解剖学报, 2010, 41(3): 446-451.

[8] 谢红林, 高树欣, 薛景凤. 大鼠皮质、海马微血管构筑的定量分析 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25(2): 123-125.

[9] 乔海兵, 洛树东. 人脑视皮质微血管的形态学分析 [J]. 山西医科大学学报, 2001, 32(4): 289-291.

[10] 吕华, 郭旭方, 赵全明. 发育阶段人脑视觉系统微血管形态及年龄变化的研究 [J]. 临床医药实践, 2003, 12(12): 913-915.

[11] 郭民, 洛树东. 幼儿基底神经节微血管构筑 [J]. 解剖学杂志, 2010, 33(5): 630-632, 封 3.

[12] 王有伟, 陈以慈. 碱性磷酸酶染色法(钙铅法)在研究人脑和心脏微血管方面的应用 [J]. 解剖学杂志, 1986, 9(3): 227-228.

[13] 孔祥玉, 赵淑敏, 周天启. 单宁酸-金属盐联用媒染脑血管的研究 [J]. 解剖学杂志, 1997, 20(1): 53-56.

[14] 王有伟,陈以慈. 人大脑内部微血管构筑一组织化学显示法研究 [J]. 解剖学杂志, 1988, 11(3): 143-145.

[15] 孔艳蕾. 人大脑皮质微血管构筑的研究进展 [J]. 山西医科大学学报, 2003, 34(2): 184-187.

[16] 韩卉, 张为龙. 胎儿大脑中动脉皮质支和中央支微血管铸型的扫描电镜观察 [J]. 解剖学杂志, 1994, 17(3): 209-213.

[17] 赵蓓蕾, 牟建军. 病例 246: 44 岁男性高血压、慢性肾炎、单侧肾缩小 [J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(5): 408, 419.

[18] Hatakeyama M, Ninomiya I, Kanazawa M. Angiogenesis and neuronal remodeling after ischemic stroke [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1): 16-19.

〔收稿日期〕2023-02-22

李长美,金亚,孙寅,等. *IGHG*1 对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的机制研究［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 7-13, 54.
Li CM, Jin Y, Sun Y, et al. Mechanism study of *IGHG*1 on proliferation, apoptosis, and invasion of THP-1 cells in acute myeloid leukemia［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 7-13, 54.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.002

*IGHG*1 对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的机制研究

李长美,金　亚,孙　寅,刘　建,姜道亮,张教国,杨　瑞,杨　勇,邱　立*

(滕州市中心人民医院儿科,山东 滕州　277500)

【摘要】　目的　探讨免疫球蛋白 γ-1 重链恒定区(immunoglobulin γ-1 heavy chain constant region,*IGHG*1)在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)THP-1 细胞中的表达以及调控转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)/Smad 通路对细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法**　以 9 例 AML 患儿的骨髓标本、8 例骨折患儿的骨髓标本、人骨髓基质细胞 HS-5 及人 AML 细胞 THP-1、HL60 为研究对象,Western blot 检测 IGHG1 蛋白表达;将 THP-1 细胞分组为空白(细胞未经任何处理)、si-NC、si-*IGHG*1-1、si-*IGHG*1-2、si-*IGHG*1-3、TGF-β、si-*IGHG*1-1+TGF-β、si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947(TGF-β/Smad 通路抑制剂)组。CCK-8 法检测细胞增殖;流式细胞术和 Transwell 实验分别测定细胞凋亡和侵袭;Western blot 评估细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达。**结果**　与骨折患儿骨髓比较,AML 患儿骨髓中 IGHG1 蛋白((0.24±0.03)*vs*(0.87±0.12))表达水平显著升高(P<0.05);与 HS-5 细胞比较,THP-1、HL60 细胞中 IGHG1 蛋白((0.89±0.14)(0.75±0.08)*vs*(0.21±0.02))表达升高(P<0.05);与空白组比较,si-*IGHG*1-1 组 THP-1 细胞 OD_{450} 值(24、48、72 h)、侵袭细胞数目、TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达均显著降低,细胞凋亡率升高,TGF-β 组对应指标呈相反变化(P<0.05);TGF-β 逆转了沉默 *IGHG*1 对 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响;与 si-*IGHG*1-1+TGF-β 组比较,si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD_{450} 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著降低,细胞凋亡率升高(P<0.05)。**结论**　*IGHG*1 在 AML 细胞中高表达,沉默 *IGHG*1 可抑制 AML 细胞增殖及侵袭,并促进 AML 细胞凋亡,该机制可能与抑制 TGF-β/Smad 通路有关。

【关键词】　急性髓系白血病;免疫球蛋白 γ-1 重链恒定区;TGF-β/Smad 通路;增殖;凋亡
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0007-07

Mechanism study of *IGHG*1 on proliferation, apoptosis, and invasion of THP-1 cells in acute myeloid leukemia

LI Changmei, JIN Ya, SUN Yin, LIU Jian, JIANG Daoliang, ZHANG Jiaoguo, YANG Rui, YANG Yong, QIU Li*
(Department of Pediatrics, Tengzhou Central People's Hospital, Tengzhou 277500, China)

【Abstract】　Objective　To investigate the expression of immunoglobulin γ-1 heavy chain constant region (*IGHG*1) in acute myeloid leukemia (AML) THP-1 cells and its influence on cell proliferation, apoptosis, and invasion via its regulation of the transforming growth factor β (TGF-β)/Smad pathway. **Methods**　Bone marrow specimens from nine children with AML and eight children with fractures, human bone marrow stromal HS-5 cells, and human AML THP-1 and HL60 cells were used in the research. Western blot was used to detect IGHG1 protein expression. THP-1 cells were divided into a blank group (without any treatment), si-NC group, si-*IGHG*1-1 group, si-*IGHG*1-2 group, si-*IGHG*1-3

[**基金项目**]山东省医药卫生科技发展计划项目(202006010355);徐州医科大学附属医院发展基金面上项目(XYFM2020018)。
[**作者简介**]李长美(1984—),女,主治医师,研究方向:儿科。E-mail:lichangmeil@163.com
[**通信作者**]邱立(1974—),男,硕士,主任医师,研究方向:儿科。E-mail:t4068w@163.com

group, TGF-β group, si-*IGHG*1-1 + TGF-β group, and si-*IGHG*1-1 + TGF-β + LY364947 group. Cell proliferation was measured by CCK-8 method. Flow cytometry and Transwell experiment were performed to measure apoptosis and invasion. Western blot was used to detect the protein expression of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 in each group of cells. **Results** Compared with the bone marrow of children with fractures, the bone marrow of children with AML ($P<0.05$) had significantly higher expression levels of IGHG1((0.24±0.03) vs (0.87±0.12)). Compared with HS-5 cells, human AML THP-1 and HL60 cells had significantly increased expression levels of IGHG1((0.89±0.14) (0.75±0.08) vs (0.21±0.02)) ($P<0.05$). Compared with the blank group, the si-*IGHG*1-1 group of THP-1 cells showed significantly reduced OD_{450} values (24 h, 48 h, 72 h), invading cell numbers and protein expression of TGF-β, p-Smad2, p-Smad3 and their apoptosis rate was increased ($P<0.05$), while the corresponding indexes showed the opposite trend in the TGF-β group ($P<0.05$). TGF-β reversed the effects of silencing *IGHG*1 on the proliferation, apoptosis and invasion of THP-1 cells. Compared with the si-*IGHG*1-1+TGF-β group, the si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 group had significantly decreased TGF-β, p-Smad2, p-Smad3 and protein levels, OD_{450} values and cell invasion numbers and the apoptosis rate was increased ($P<0.05$). **Conclusions** *IGHG*1 is highly expressed in AML cells. Silencing the *IGHG*1 gene can inhibit the proliferation and invasion of AML cells and promote the apoptosis of AML cells. This mechanism may be related to the inhibition of the TGF-β/Smad pathway.

【**Keywords**】 acute myeloid leukemia; immunoglobulin γ-1 heavy chain constant region; TGF-β/Smad pathway; proliferation; apoptosis

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

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一种以大量细胞遗传学和分子畸变为特征的造血系统疾病,属于血液学癌症类型,其特征是髓系原始细胞在骨髓、血液和其他组织中恶性增殖,导致正常骨髓造血障碍[1]。相关数据显示,儿童 AML 约占儿童白血病的 25%,虽然发生率相对较低,但预后较差[2]。因此,确定参与儿童 AML 增殖与侵袭的机制对于开创新的治疗方法和改善患儿的预后具有重要意义。免疫球蛋白 γ-1 重链恒定区(immunoglobulin γ-1 heavy chain constant region, *IGHG*1)是位于 14 号染色体 q32.33 上的基因,其在卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中表达明显增多[3]。但 *IGHG*1 在 AML 中表达及作用尚不清楚。已有研究证实,*IGHG*1 在胃癌组织中的高表达可通过激活转化生长因子 β(transforming growth factor β, TGF-β)/Smad3 信号通路诱导胃癌细胞上皮间质转化,促进细胞增殖、迁移和侵袭[4]。研究发现,AML 细胞分泌 TGF-β1,其自主激活 TGF-β 信号通路并诱导其表型变异,阻断 TGF-β 信号通路不仅可抑制 AML 细胞变异,还抑制 AML 细胞增殖、迁移及侵袭,并诱导细胞凋亡[5-6]。然而,*IGHG*1 能否通过调控 TGF-β/Smad 通路来影响 AML 细胞的增殖及侵袭尚不明确。故本文探讨 AML 中 *IGHG*1 表达情况以及 *IGHG*1 影响 AML 细胞增殖、侵袭的潜在机制,旨在为 AML 的靶向药物的开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人骨髓基质细胞 HS-5 及人 AML 细胞 THP-1、HL60 均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 临床标本收集

收集 2018 年 3 月至 2021 年 3 月期间在本院首次确诊为 AML 患儿的骨髓标本共 9 例,另取同时期本院的骨折患儿的骨髓标本 8 例作为对照。本研究在试验开始时获得患儿监护人的书面知情同意,并经济宁医学院附属滕州市中心人民医院伦理委员会批准(2018-01108)。

1.2 主要试剂与仪器

根据 siRNA 设计原则设计 *IGHG*1 的 3 条干扰序列 si-*IGHG*1-1、si-*IGHG*1-2、si-*IGHG*1-3、及阴性对照序列 si-NC(均广州基迪奥生物科技有限公司合成,批号:20150217、20171120、20170523、20160924);TGF-β 过表达质粒(上海禾午生物公司,批号:20161125);TGF-β/Smad 通路抑制剂 LY364947(美国 Selleck Chemicals 公司,批号:20150910);Lipofectamine™ 2000 试剂(北京宜科思源科技有限公司,批号:20160511);胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、RPMI 1640 培养基、BCA 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司,批号:20170622、20151019、20170720);膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin

V- fluorescein isothiocyanate,Annexin V-FITC)细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:20160427、20151206);总蛋白提取试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,批号:20170326);β-actin、TGF-β、p-Smad2、p-Smad3、Smad2、Smad3 兔多克隆抗体(anti-β-actin、anti-TGF-β、anti-p-Smad2、anti-p-Smad3、anti-Smad2、anti-Smad3)及辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记的羊抗兔二抗(美国 Abcam 公司,批号:20170821、20170522、20160325、20170924、20170326、20151206、20170321)。CO_2 培养箱(艾美捷科技有限公司,批号:20170922);凝胶成像系统(北京原平皓生物技术有限公司,批号:20161127)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及分组

将人 AML 细胞 THP-1、HL60、U937 及人骨髓基质细胞 HS-5 在含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养,培养条件为 5% CO_2、37℃。取对数生长期的 THP-1 细胞,加入 4 μL 脂质体 Lipofectamine™ 2000 和 100 μL 无血清的培养液进行转染,为了验证 *IGHG*1 能否通过调控 TGF-β/Smad 通路来影响 AML 细胞的增殖及侵袭,需在转染 *IGHG*1 小干扰 RNA 的同时加入 TGF-β 过表达质粒或 TGF-β/Smad 通路抑制剂 LY364947 干预 THP-1 细胞,并分组为:空白组(细胞未经任何处理)、si-NC 组(20 pmol si-NC 转染细胞,si-NC 序列:5'-CGUCACCUGAACGACAC-3')、si-*IGHG*1-1 组(20 pmol si-*IGHG*1-1 转染细胞,si-*IGHG*1-1 序列:5'-CCAAGGACACCCTCATGAT-3')、si-*IGHG*1-2 组(20 pmol si-*IGHG*1-2 转染细胞,si-*IGHG*1-2 序列:5'-AGTGCAAGGTCTCCAACAA-3')、si-*IGHG*1-3 组(20 pmol si-*IGHG*1-3 转染细胞,si-*IGHG*1-3 序列:5'-GCCTCCTTCTTCCTCTACAG-3')、TGF-β 组(40 μmol/L TGF-β 转染细胞)、si-*IGHG*1-1+TGF-β 组(20 pmol si-*IGHG*1-1 和 40 μmol/L TGF-β 同时处理细胞)、si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947[6] 组(20 pmol si-*IGHG*1-1、40 μmol/L TGF-β 同时处理细胞 24 h 后再用 40 μmol/L LY364947 处理细胞 24 h)共 8 组。

1.3.2 Western blot 检测 IGHG1 及 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达水平

利用总蛋白提取试剂盒提取组织和细胞中的总蛋白,等量的蛋白质在 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)上分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上,然后用 5%脱脂牛奶封闭 1 h。将膜与一抗在 4℃下孵育过夜。使用以下一抗:anti-IGHG1(1∶2000)、anti-TGF-β(1∶2000)、anti-Smad2(1∶1000)、anti-p-Smad2(1∶3000)、anti-Smad3(1∶2000)、anti-p-Smad3(1∶2000)、anti-β-actin(1∶2500)。次日,将膜用 TBST 洗涤 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗在 37℃下孵育 1 h 后,使用 ECL 化学发光试剂盒观察蛋白条带显色情况,以 β-actin 为参照,通过 Image J 软件分析蛋白质条带灰度值,实验设置 6 个复孔。

1.3.3 CCK-8 法测定细胞增殖

将各组 THP-1 细胞以 10^3/孔密度接种到 96 孔细胞板上,并在 37℃、5%CO_2 下孵育。在细胞转染或处理的 0、24、48、72 h 时,每孔分别添加 CCK-8 溶液 10 μL。37℃下孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光值以评估细胞的增殖能力,实验设置 6 个复孔。

1.3.4 Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide,PI)双染检测细胞凋亡

不同处理后收获细胞,用 PBS 洗涤两次。然后将细胞重悬在 500 μL 的结合缓冲液中,用 5 μL Annexin V-FITC 染色 15 min,5 μL PI 染色 5 min,在 4℃的黑暗中染色。流式细胞术检测各组凋亡细胞的百分率(Annexin V+/PI-为早期凋亡,Annexin V+/PI+为晚期凋亡)。

1.3.5 Transwell 法测定细胞侵袭

将稀释的基质胶加入每个小室中,并在自然条件下风干。将各组细胞用不含 FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬,并以 2×10^5/孔的密度接种到上室中。将含有 10% FBS 的 500 μL RPMI 1640 培养基加入到下室中。37℃、5% CO_2 培养 48 h 后,取出 Transwell 小室,弃去孔内培养基,用棉签去除小室上表面细胞,然后用甲醛固定穿过基质胶的细胞并用结晶紫(0.1%)染色 30 min。显微镜下对细胞计数,观察细胞侵袭具体情况,实验设置 6 个复孔。

1.4 统计学方法

本研究所有数据均符合正态分布,并以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用独立样本 t 检验对两组数据进行比较,采用单因素方差分析对多组数据进行比较,并用 *SNK-q* 检验进行进一步的两两比较。使用 SPSS 25.0 作为分析软件。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGHG1 在 AML 患儿骨髓及不同 AML 细胞中的表达

与骨折患儿骨髓(0.24±0.03)比较,AML 患儿骨髓中 IGHG1 蛋白(0.87±0.12)表达水平显著升高($P<0.05$,图 1A)。与人骨髓基质细胞 HS-5(0.21±0.02)比较,人 AML 细胞 THP-1(0.89±0.14)、HL60(0.75±0.08)中 IGHG1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),且 IGHG1 蛋白在 THP-1 细胞中的表达量最高,因此,选择 THP-1 细胞进行后续转染实验(图 1B)。

2.2 各组细胞转染后 IGHG1 蛋白表达比较

与空白组和 si-NC 组比较,si-*IGHG*1-1 组、si-*IGHG*1-2 组、si-*IGHG*1-3 组 THP-1 细胞中 IGHG1 蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$),且 si-*IGHG*1-1 组中 IGHG1 蛋白的表达量最低,因此,以 si-*IGHG*1-1 组细胞为研究对象进行后续细胞生物学功能的研究(图 2,表 1)。

2.3 沉默 *IGHG*1 对 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响

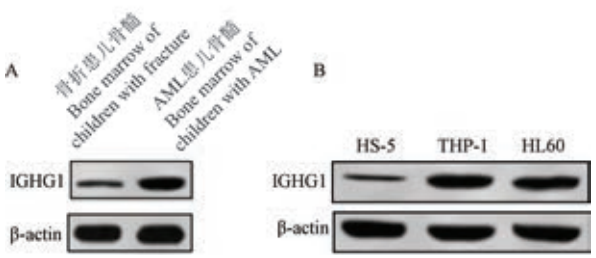
与空白组和 si-NC 组比较,si-*IGHG*1-1 组 THP-1 细胞 OD_{450} 值(0、24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与空白组比较,si-NC 组 THP-1 细胞 OD_{450} 值(0、24、48、72 h)、细胞凋亡率及侵袭细胞数目无显著性差异($P>0.05$,图 3,表 2)。

2.4 沉默 *IGHG*1 对 IGHG1 蛋白及 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达的影响

与空白组和 si-NC 组比较,si-*IGHG*1-1 组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);空白组与 si-NC 组比较,上述指标无显著性差异($P>0.05$,图 4,表 3)。

2.5 沉默 *IGHG*1 通过抑制 TGF-β/Smad 通路抑制 THP-1 细胞增殖与侵袭

与空白组比较,TGF-β 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD_{450} 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$);与 si-*IGHG*1-1 组比较,si-*IGHG*1-1+TGF-β 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD_{450} 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$);与 si-*IGHG*1-1+TGF-β 组比较,si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 组 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 蛋白、OD_{450} 值(24、48、72 h)及侵袭细胞数目显著降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),IGHG1 蛋白的表达变化差异无统计学意义($P>0.05$,图 5、图 6,表 4、表 5)。



注:A:骨髓中的 IGHG1 蛋白表达;B:不同 AML 细胞系中的 IGHG1 蛋白表达。

图 1 Western blot 检测 IGHG1 蛋白表达

Note. A, IGHG1 protein expression in bone marrow. B, IGHG1 protein expression in different AML cell lines.

Figure 1 Western blot detection of IGHG1 protein expression

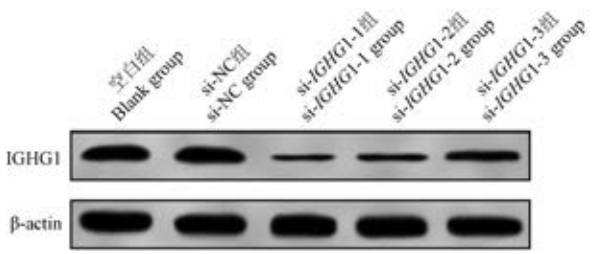


图 2 Western blot 检测每个转染组 THP-1 细胞中的 IGHG1 蛋白表达

Figure 2 Western blot detection of IGHG1 protein expression in THP-1 cells of each transfection group

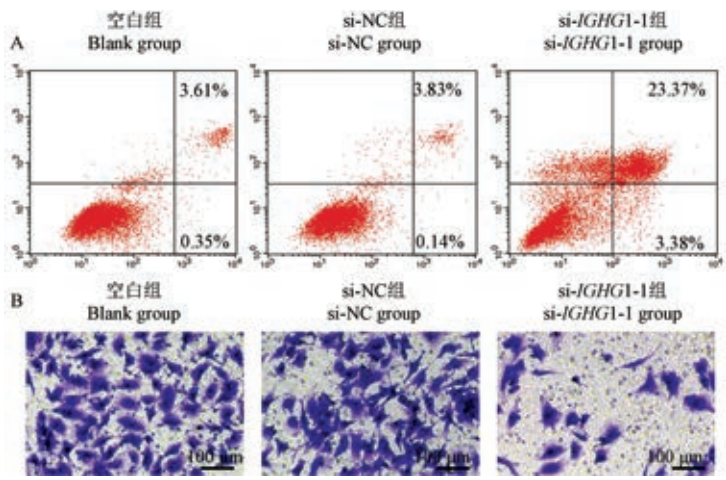
表 1 各转染组 THP-1 细胞中 IGHG1 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Comparison of IGHG1 protein expression in THP-1 cells of each transfection group

组别 Groups	IGHG1/β-actin
空白组 Blank group	0.88±0.13
si-NC 组 si-NC group	0.89±0.12
si-*IGHG*1-1 组 si-*IGHG*1-1 group	0.12±0.02*#
si-*IGHG*1-2 组 si-*IGHG*1-2 group	0.18±0.01*#
si-*IGHG*1-3 组 si-*IGHG*1-3 group	0.23±0.03*#

注:与空白组比较,*$P<0.05$;与 si-NC 组比较,#$P<0.05$。

Note. Compared with blank group, *$P<0.05$. Compared with si-NC group, #$P<0.05$.



注：A：流式细胞术检测细胞凋亡；B：Transwell 法检测细胞侵袭（结晶紫染色）。

图 3　各组细胞凋亡和侵袭水平

Note. A, Apoptosis was detected by flow cytometry. B, Cell invasion was detected by Transwell assay (crystal violet staining).

Figure 3　Cell apoptosis and invasion levels in each group

表 2　各组 THP-1 细胞 OD_{450} 值和侵袭细胞数的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 2　Comparison of OD_{450} values and number of invasion cells of THP-1 cells in each group

组别 Groups	OD_{450}				凋亡率(%) Apoptosis rate	侵袭细胞数 Number of invasion cells
	0 h	24 h	48 h	72 h		
空白组 Blank group	0.21±0.04	0.53±0.04	0.87±0.09	1.23±0.14	3.94±0.45	87.67±10.63
si-NC 组 si-NC group	0.22±0.03	0.55±0.06	0.88±0.07	1.21±0.13	4.01±0.48	85.24±9.89
si-*IGHG*1-1 组 si-*IGHG*1-1 group	0.23±0.05	0.27±0.02$^{*\#}$	0.39±0.04$^{*\#}$	0.84±0.12$^{*\#}$	26.52±1.13$^{*\#}$	30.29±4.68$^{*\#}$

注：与空白组相比，$^{*}P<0.05$；与 si-NC 组相比，$^{\#}P<0.05$。

Note. Compared with blank group, $^{*}P<0.05$. Compared with si-NC group, $^{\#}P<0.05$.

表 3　各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 3　Comparison of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells of each group

组别 Groups	IGHG1/β-actin	TGF-β/β-actin	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3
空白组 Blank group	0.87±0.12	0.82±0.12	0.57±0.04	0.43±0.03
si-NC 组 si-NC group	0.88±0.14	0.83±0.11	0.55±0.05	0.42±0.04
si-*IGHG*1-1 组 si-*IGHG*1-1 group	0.11±0.01$^{*\#}$	0.34±0.03$^{*\#}$	0.15±0.01	0.10±0.01

注：与空白组相比，$^{*}P<0.05$；与 si-NC 组相比，$^{\#}P<0.05$。

Note. Compared with blank group, $^{*}P<0.05$. Compared with si-NC group, $^{\#}P<0.05$.

表 4　各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 4　Comparison of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells of each group

组别 Groups	IGHG1/β-actin	TGF-β/β-actin	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3
空白组 Blank group	0.87±0.12	0.81±0.06	0.56±0.04	0.44±0.03
TGF-β 组 TGF-β group	0.85±0.13	1.24±0.15*	0.89±0.06*	0.72±0.04*
si-*IGHG*1-1 组 si-*IGHG*1-1 group	0.13±0.01	0.34±0.02	0.18±0.01	0.10±0.01
si-*IGHG*1-1+TGF-β 组 si-*IGHG*1-1+TGF-β group	0.12±0.01	0.72±0.05$^{\#}$	0.37±0.03$^{\#}$	0.32±0.02$^{\#}$
si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 组 si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 group	0.14±0.01	0.30±0.02$^{\&}$	0.19±0.01$^{\&}$	0.12±0.01$^{\&}$

注：与空白组相比，$^{*}P<0.05$；与 si-*IGHG*1-1 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 si-*IGHG*1-1+TGF-β 组相比，$^{\&}P<0.05$。

Note. Compared with blank group, $^{*}P<0.05$. Compared with the si-*IGHG*1-1 group, $^{\#}P<0.05$. Compared with si-*IGHG*1-1+TGF-β group, $^{\&}P<0.05$.

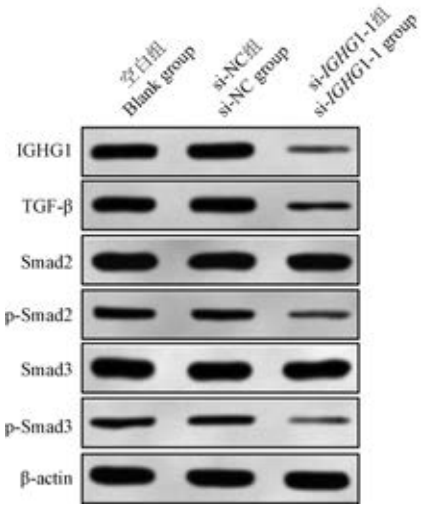


图 4 Western blot 检测各组 THP-1 细胞中 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达

Figure 4 Western blot detection of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression in THP-1 cells in each group

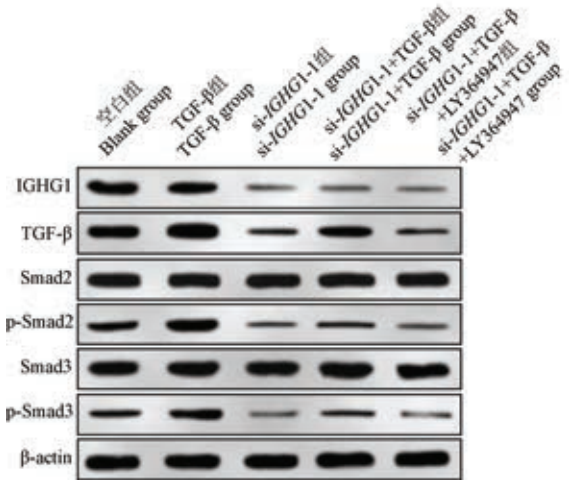
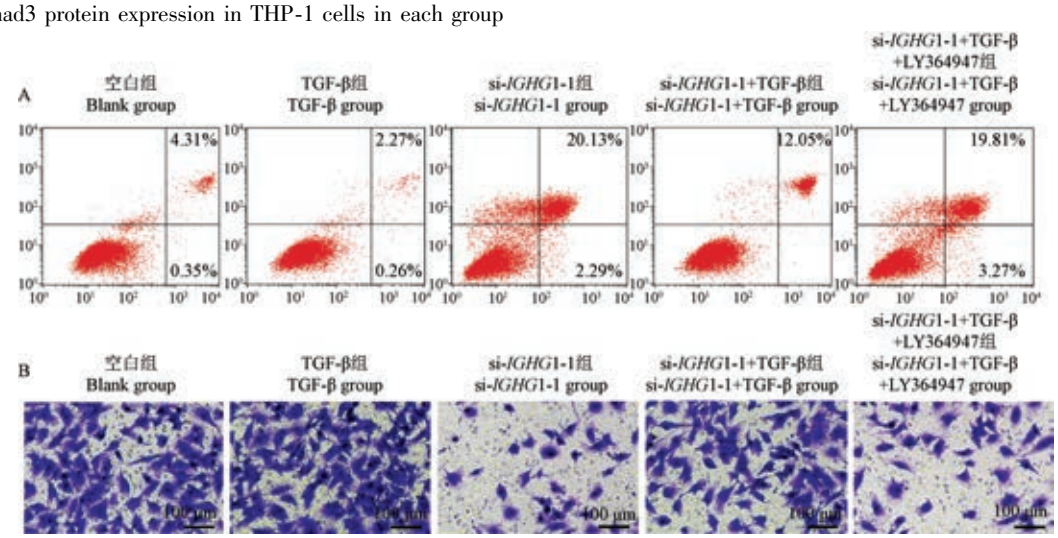


图 5 Western blot 检测 IGHG1、TGF-β、p-Smad2 和 p-Smad3 的蛋白表达

Figure 5 Western blot detection of IGHG1, TGF-β, p-Smad2 and p-Smad3 protein expression



注：A：流式细胞术检测细胞凋亡；B：Transwell 法检测细胞侵袭（结晶紫染色）。

图 6 各组细胞凋亡和侵袭水平

Note. A, Apoptosis was detected by flow cytometry. B, Cell invasion was detected by Transwell assay (crystal violet staining).

Figure 6 Cell apoptosis and invasion levels in each group

表 5 各组 THP-1 细胞中 OD_{450} 值和侵袭细胞数量的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 5 Comparison of OD_{450} values and number of invasive cells in each group of THP-1 cells

组别 Groups	OD_{450} 0 h	OD_{450} 24 h	OD_{450} 48 h	OD_{450} 72 h	凋亡率(%) Apoptosis rate	侵袭细胞数 Number of invasion cells
空白组 Blank group	0.23±0.02	0.59±0.04	0.91±0.07	1.19±0.13	4.24±0.52	90.18±7.25
TGF-β 组 TGF-β group	0.22±0.03	0.72±0.05*	1.23±0.11*	1.37±0.15*	2.51±0.30*	112.35±8.42*
si-*IGHG*1-1 组 si-*IGHG*1-1 group	0.25±0.02	0.29±0.02	0.41±0.04	0.82±0.06	22.30±0.91	32.57±3.08
si-*IGHG*1-1+TGF-β 组 si-*IGHG*1-1+TGF-β group	0.24±0.01	0.52±0.04$^{\#}$	0.83±0.06$^{\#}$	1.03±0.09$^{\#}$	11.85±0.64$^{\#}$	79.89±6.26$^{\#}$
si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 组 si-*IGHG*1-1+TGF-β+LY364947 group	0.23±0.03	0.31±0.03$^{\&}$	0.40±0.02$^{\&}$	0.80±0.06$^{\&}$	21.92±0.87$^{\&}$	34.78±2.86$^{\&}$

注：与空白组相比，$^{*}P<0.05$；与 si-*IGHG*1-1 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 si-*IGHG*1-1+TGF-β 组相比，$^{\&}P<0.05$。

Note. Compared with blank group, $^{*}P<0.05$. Compared with the si-*IGHG*1-1 group, $^{\#}P<0.05$. Compared with si-*IGHG*1-1+TGF-β group, $^{\&}P<0.05$.

3 讨论

研究显示,AML/ALL 患者血清 IgG 水平高于健康者[7]。IgG1 是 IgG 亚类中最常用的治疗性 IgG 抗体,抗 IgG1 抗体可有效治疗 AML[8]。*IGHG*1 的表达量随肿瘤中 IgG 水平的增高而增加,且 *IGHG*1 参与肿瘤细胞增殖、抗凋亡、免疫逃逸、转移等过程[9-10]。据报道,*IGHG*1 在胃癌[11]、前列腺癌[12]、卵巢癌[13]中高表达,下调 *IGHG*1 表达能促进癌细胞凋亡并抑制增殖、迁移和侵袭。本研究结果显示,IGHG1 蛋白在 AML 患儿骨髓及 AML 细胞 THP-1、HL60 中高表达,且 THP-1 细胞中 IGHG1 蛋白相对表达量最高,因此,选择 THP-1 细胞进行后续转染实验。本研究通过 RNA 干扰技术敲减 *IGHG*1 在 THP-1 细胞中的的表达,发现 si-*IGHG*1-1 组、si-*IGHG*1-2 组、si-*IGHG*1-3 组 THP-1 细胞中 *IGHG*1 蛋白表达水平显著低于空白组和 si-NC 组,且 si-*IGHG*1-1 组中 IGHG1 蛋白表达量最低,因此,选择 si-*IGHG*1-1 组细胞为研究对象进行后续细胞生物学功能研究。此外,本研究还发现抑制 *IGHG*1 表达可明显抑制 THP-1 细胞的增殖与侵袭能力,并诱导 THP-1 细胞凋亡,这与既往的研究结果一致[11-13],提示 *IGHG*1 在 AML 中发挥促癌作用。

TGF-β/Smad 信号传导由活化的 TGF-β 与 TGF-β II 型受体的结合启动,然后募集 TGF-β I 型受体以激活并磷酸化下游的 Smad2 和 Smad3,其磷酸化后与 Smad4 结合形成三聚体,然后转移到细胞核中以促进下游靶基因的转录[14-15]。据报道,TGF-β 的高表达与多种癌症的恶性程度相关,如乳腺癌[16]、胃癌[17]、卵巢癌[18]和肝癌[19]。TGF-β/Smad 信号通路是造血的负调节剂,该通路的失调被认为是白血病发生的主要因素[20]。LY364947(TGF-β 信号通路抑制剂)能通过阻滞 TGF-β 通路抑制白血病细胞增殖,并诱导细胞凋亡[6]。本实验发现,沉默 *IGHG*1 降低了 TGF-β/Smad 通路相关蛋白 TGF-β、p-Smad2、p-Smad3 的表达,提示沉默 *IGHG*1 对 THP-1 细胞增殖与侵袭的抑制作用可能是通过抑制 TGF-β/Smad 通路实现的。为了验证该猜想,本研究在沉默 *IGHG*1 的基础上利用 TGF-β 过表达质粒进行干预,发现过表达 TGF-β 可减弱沉默 *IGHG*1 对 THP-1 细胞增殖与侵袭的抑制作用以及对 THP-1 细胞凋亡的促进作用。最后,在 TGF-β 过表达质粒和沉默 *IGHG*1 共同处理的 THP-1 细胞中添加 TGF-β/Smad 通路抑制剂 LY364947,结果显示,LY364947 会拮抗 TGF-β 过表达质粒处理后的作用。以上结果证实了沉默 IGHG1 可抑制 AML 细胞的增殖与侵袭,并诱导 THP-1 细胞凋亡,该机制与抑制 TGF-β/Smad 通路有关。

综上所述,*IGHG*1 在 AML 细胞中高表达,沉默 *IGHG*1 可能通过对 TGF-β/Smad 通路的抑制,从而抑制 AML 细胞的增殖与侵袭,并进一步诱导 THP-1 细胞凋亡。本研究首先证实 *IGHG*1 在 AML 中充当致癌基因,可能是治疗 AML 的潜在靶点,为 AML 的靶向治疗提供了理论依据。然而,本研究尚未涉及到 *IGHG*1 对 AML 细胞其他的生物学特性的影响以及机制,是否有其他信号通路参与此过程,后续将进行相关探究。

参考文献:

[1] 吴福群, 阴常欣, 邓绍团, 等. 急性髓系白血病患者血清 sPD-L1、VEGF 表达及相关性[J]. 中国医药导报, 2019, 16(20): 76-79, 87.

[2] Lonetti A, Pession A, Masetti R. Targeted therapies for pediatric AML: gaps and perspective[J]. Front Pediatr, 2019, 7: 463.

[3] Zhang Y, Fang X, Sun Y. IGHG1 promotes malignant progression in breast cancer cells through the regulation of AKT and VEGF signaling[J]. Biomol Biomed, 2023, 23(4): 616-623.

[4] Li Y, Wang P, Ye D, et al. IGHG1 induces EMT in gastric cancer cells by regulating TGF-β/SMAD3 signaling pathway[J]. J Cancer, 2021, 12(12): 3458-3467.

[5] Shingai Y, Yokota T, Okuzaki D, et al. Autonomous TGFβ signaling induces phenotypic variation in human acute myeloid leukemia[J]. Stem Cells, 2021, 39(6): 723-736.

[6] 林晓静, 赵臻怡, 陈舒雅, 等. 沉默血红素加氧酶-1 对急性单核细胞白血病小鼠模型的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 7-13, 42.

[7] Wu L, Xia M, Sun X, et al. High levels of immunoglobulin expression predict shorter overall survival in patients with acute myeloid leukemia[J]. Eur J Haematol, 2020, 105(4): 449-459.

[8] Yeung YA, Krishnamoorthy V, Dettling D, et al. An optimized full-length FLT3/CD3 bispecific antibody demonstrates potent anti-leukemia activity and reversible hematological toxicity[J]. Mol Ther, 2020, 28(3): 889-900.

[9] Sheng Z, Liu Y, Qin C, et al. IgG is involved in the migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(6): 497-504.

[10] 王国辉, 杨雄涛, 朱广迎. 利用生物信息学、免疫组化分析肿瘤来源免疫球蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22(6): 341-348.

(下转第 54 页)

姜雯雯,刘欢,陈晓燕,等. 京尼平苷通过 PI3K/Akt 通路促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 14-20.
Jiang WW, Liu H, Chen XY, et al. Geniposide promotes skin ulcer wound healing in diabetic rats through the PI3K/Akt pathway［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 14-20.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.003

京尼平苷通过 PI3K/Akt 通路促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合

姜雯雯,刘　欢,陈晓燕*,荣小娟,刘燕玲,曾　威

(江西科技学院医学院,南昌　330098)

【摘要】　目的　探讨京尼平苷对糖尿病性皮肤溃疡大鼠的保护作用及其机制。**方法**　将大鼠分为正常组、模型组、京尼平苷治疗组(Gen(L):200 mg/kg;Gen(H):500 mg/kg)。在糖尿病大鼠皮肤溃疡造模后,各组大鼠均灌胃生理盐水或京尼平苷(n=6)。每天给药 1 次,每天记录各组伤口愈合情况及炎症情况。在糖尿病性皮肤溃疡治疗 7 d 后,分别通过测量皮肤溃疡创口面积、组化切片与 TUNEL 染色及 Western blot 蛋白免疫印迹法量化分析创面愈合、细胞凋亡及其相关调节蛋白表达的变化情况。**结果**　与模型组相比,京尼平苷(200 mg/kg 和 500 mg/kg)口服能显著促进糖尿病大鼠创面愈合,增加损伤处的收缩。在糖尿病大鼠皮肤创面凋亡研究中,京尼平苷治疗大鼠 TUNEL 染色阳性细胞明显减少(P<0.05)。京尼平苷能显著抑制皮肤炎症,促进创面修复可能与促进 PI3K 和 Akt 蛋白磷酸化有关。**结论**　京尼平苷通过抑制炎症反应和细胞凋亡促进糖尿病大鼠皮肤创面修复。

【关键词】　京尼平苷;糖尿病性皮肤溃疡;PI3K;Akt;细胞凋亡
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0014-07

Geniposide promotes skin ulcer wound healing in diabetic rats through the PI3K/Akt pathway

JIANG Wenwen, LIU Huan, CHEN Xiaoyan*, RONG Xiaojuan, LIU Yanling, ZENG Wei
(School of Medicine, Jiangxi University of Science and Technology, Nanchang 330098, China)

【Abstract】　Objective　To investigate the protective effect of geniposide against diabetic rats with skin ulcer and the mechanism. **Methods**　Rats were divided into a normal group, model group, and geniposide subgroups (Gen(L): 200 mg/kg; Gen(H): 500 mg/kg). Diabetic rats were treated with normal saline or geniposide by intragastric administration (n=6). Treatments were administered once a day, and the wound healing and inflammation of each group were recorded every day. After 7 days of treatment for diabetic skin ulcers, the wound area, tissue sections, TUNEL staining and Western blot were used to quantitatively analyze changes in wound healing, apoptosis, and related regulatory protein expression. **Results**　Compared with the model group, the group receiving orally administered geniposide (200 and 500 mg/kg) showed significantly improved wound healing and increased contraction of the injured area. In terms of skin wound apoptosis in diabetic rats, TUNEL-positive cells were significantly reduced in geniposide subgroups (P<0.05).

[基金项目]江西省中医药管理局科技计划项目(2023A0367);江西省卫生健康委科技计划项目(202311153);江西科技学院校级自然科学项目(23ZRZD05);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ202016)。
[作者简介]姜雯雯(1990—),女,讲师,研究方向:生物活性。E-mail:jwwdwj@163.com
[通信作者]陈晓燕(1984—),女,副教授,研究方向:中药学。E-mail:chenxyan5@126.com

Geniposide significantly inhibited skin inflammation and promoted wound repair, which may be related to promotion of PI3K and Akt phosphorylation. **Conclusions** Geniposide promoted skin wound repair in diabetic rats by inhibiting inflammatory responses and apoptosis.

【**Keywords**】 geniposide; diabetic skin ulcer; PI3K; Akt; cell apoptosis

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

糖尿病长期高糖暴露可对组织器官造成持续损害,最终导致糖尿病周围神经病变、糖尿病肾病和糖尿病皮肤溃疡(diabetic skin ulcers,DSU),是糖尿病的主要并发症[1-2]。糖尿病足是 DSU 的代表性表现,因高糖所致的神经病变、感染风险、血管病变等综合因素,其创面处理后往往预后不佳、难以正常自然痊愈,容易并发感染甚至可导致截肢[3-5]。针对传统创面愈合治疗不佳的问题,目前已有多种新型促进糖尿病患者创面愈合的方法,如局部应用重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶、封闭负压引流术、富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)及中药外洗联合高压氧等,但均因成本高或效果不理想等因素而受到限制[6-8]。

京尼平苷是栀子中主要的环烯醚萜苷之一。大量文献报道,京尼平苷的药理活性可能通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)/核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase,PI3K)-蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt/PKB)信号通路被介绍为抗氧化、抗炎症、抗血栓形成和抗缺血性脑卒中[9-10]。此外,已有大量研究表明,栀子水提物和京尼平苷具有显著的抗血栓活性,通过调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)功能增加自噬和抑制细胞凋亡[11-12]。然而,京尼平苷在治疗糖尿病皮肤溃疡方面的效果尚不清楚,因此本研究将基于 PI3K/Akt 通路探究京尼平苷对糖尿病大鼠皮肤溃疡创面的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠共计 48 只,雄性,8 周龄,体重(250±20)g,购自江西中医药大学实验动物中心[SCXK(赣)2019-0001];饲养间保持温度(22±5)℃,湿度(55%±5%),光照时间为 7:00~19:00,之后光照自动关闭。所有大鼠在实验前均在江西中医药大学实验动物中心动物房[SYXK(赣)2018-0007]适应性饲养 5~7 d。无菌手术在江西中医药大学药理学动物实验中心开展,相关动物实验获江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(JZLLSC20210071),手术操作按实验动物 3R 原则给予人道的关怀,尽量减少痛苦和使用数量。

1.2 主要试剂与仪器

京尼平苷(HPLC>95%,成都双子叶中药资源有限公司,批号 20191210);链脲霉素(上海源叶生物科技有限公司,批号 S17049);血糖试纸配合欧姆龙血糖仪;p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 抗体(美国 CST 公司,p-PI3K:#4228;PI3K:#4255;p-Akt:#4060;Akt:#4685);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 10009218);TBS 缓冲液(10×)(上海百赛生物技术公司,批号 P25033);山羊血清(北京索莱宝生物科技公司,批号 SL038);吐温-20(Tween 20,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 T104863)。组织自动脱水仪(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,KH-S101 型);生物组织自动包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,KH-BL 型);石蜡切片机(沈阳誉德电子仪器有限公司,SYD-S2020);超纯水仪(德国 Millipore 公司);垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-MINI 4);垂直转膜仪(北京六一生物科技有限公司,DYCZ-TRANS 2);凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司,GenoSens 1860);Odyssey 双色红外荧光扫描成像系统(美国 Li-Cor Biosciences 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病皮肤溃疡模型

所有大鼠适应正常饲养环境并喂养和自由饮水 5~7 d,随后改用高脂饲料连续饲喂 10 周。大鼠禁食一晚后腹腔注射链脲佐菌素(55 mg/kg,0.1 mol/L 缓冲盐水,pH=4.5)。48 h 后测定空腹尾静脉血糖水平。空腹血糖(≥16.7 mmol/L)大鼠作为糖尿病大鼠[13-14]。如未达标可再次注射并重复检测血糖水平。

糖尿病大鼠皮肤溃疡的造模[15]:糖尿病大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠注射液(40 mg/kg)麻醉。在用脱毛膏去除右侧背部残留的毛发后,用打孔机在筋膜下层形成一个直径 2 cm 的伤口。为了防止手

术后纱布被老鼠撕破,用细线将纱布包裹起来,将每只大鼠放入笼中单独饲养。创面周围皮肤于术后第 3 天肿胀,呈暗红色,伤发后第 5~7 天广泛诱发皮肤溃疡。

1.3.2 实验分组与药物干预

将入选的糖尿病性皮肤溃疡大鼠分为非糖尿病对照(control)组、糖尿病模型(model)组、京尼平苷低剂量(Gen(L):200 mg/kg)组和京尼平苷高剂量(Gen(H):500 mg/kg)组。除 control 组选择正常大鼠外,其余每组随机选取 6 只造模成功大鼠,分别口服灌胃生理盐水溶液、京尼平苷低浓度剂量(200 mg/kg)和京尼平苷高浓度剂量(500 mg/kg)。每天给药 1 次,每天记录各组创面伤口的愈合情况和炎症表现,并于第-14、-7、0、7 天测定大鼠空腹(前 1 d 晚上禁食)血糖。具体动物造模和药物干预的流程可见图 1。

1.3.3 创面愈合情况评估

各组糖尿病性皮肤溃疡大鼠在造模后第 1、3、7 天用透明膜描迹法将伤口边缘描下,用面积纸计算伤口面积[16]。创面愈合率计算公式为:创面愈合率(%)=(用药前创口面积-用药后创口面积)/用药前创口面积×100%。对伤口完全愈合的大鼠,计算瘢痕面积(%)=瘢痕面积/用药前创口面积×100%。

1.3.4 原位末端标记(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling,TUNEL)染色评价凋亡细胞

分离皮肤组织,在 4℃梯度乙醇溶液(75%~95%)中脱水 3~5 d。皮肤组织在 55~65℃石蜡中固定,石蜡切片机切成 10 μm 切片。制备皮肤切片,用自由漂浮切片法贴于玻片上。对冠状切面进行二甲苯脱蜡,用梯度乙醇溶液(95%~75%)再水化,然后在 37℃的 TUNEL 反应分辨率中荧光染色 30 min。0.01 mol/L 磷酸缓冲盐(pH=7.4)洗涤 3 次后,在室温下加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)染细胞核 5 min。切片在×100 倍放大的荧光显微镜下观察。每片进行细胞凋亡计数,取 3 个样本的平均值作为代表性数据。

1.3.5 蛋白印迹实验

使用 RIPA 裂解液提取创伤组织蛋白后,与上样缓冲液进行预混,高温加热后用丙烯酰胺凝胶完成电泳、转膜过程,将聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜在 5%脱脂奶粉中室温孵育封闭 2 h 后,加入相应的 p-PI3K、PI3K(1∶1000)、p-Akt、Akt(1∶1000)一抗,4℃过夜后回收一抗,经 Tris-HCl 缓冲盐+Tween 20(Tris-HCl buffer saline with Tween 20,TBST)洗涤 3 次后加入相应的二抗溶液在室温中孵育 1 h。TBST 洗涤二抗后,加入化学发光试剂,凝胶成像系统成像后,用 Image J 软件量化分析相应蛋白条带的灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件统计分析,数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较进行非参数 t 检验,统计结果以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血糖值变化比较

在第-14、-7、0 天对大鼠空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)进行测定,所有大鼠血糖水平均无明显差异。糖尿病性皮肤溃疡大鼠造模成功后,各组血糖值均存在显著升高。给予京尼平苷灌胃给药后,低剂量组和高剂量组的大鼠血糖值逐渐下降,连续给药的第 7 天血糖值明显下降($P<0.05$),但未降低至正常水平(图 2)。

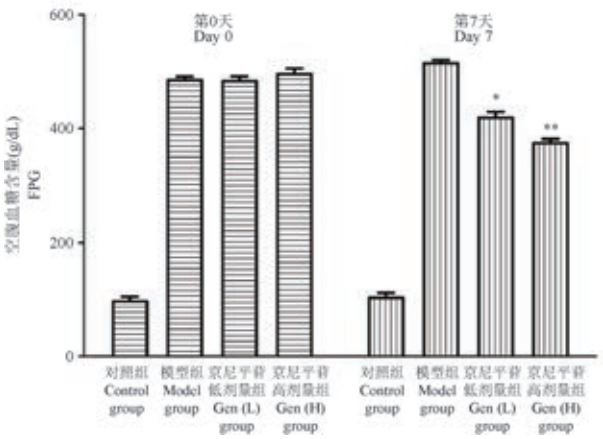
2.2 创面愈合情况评估

通过对第 1、3、7 天创面愈合情况进行观察,灌

图 1 链脲佐菌素诱导的高血糖大鼠进行皮肤溃疡造模及药物干预实验流程

Figure 1 Procedure of skin ulcer modeling and drug intervention in hyperglycemia rats induced by streptozotocin

胃京尼平苷溶液可明显减少伤口大小，相对于模型对照组，病灶回缩的百分比显著增加（图 3）。口服京尼平苷溶液从第 3 天起可促进病灶创面回缩百分比显著升高，且这种愈合差异一直持续。通过肉眼观察，糖尿病性皮肤溃疡大鼠创面肉芽组织存在生长不良、愈合较差的情况，甚至有脓性感染，越往后模型大鼠伤口愈合速度显著下降。第 7 天时京尼平苷治疗大鼠（Gen（L）和 Gen（H））肉芽组织情况良好，且创面周围可见大量新生的毛发，提示愈合效果较好。



注：与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 2　糖尿病性皮肤溃疡大鼠不同时间的空腹血糖

Note. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2　Fasting blood glucose at different time in diabetic rats with skin ulcer

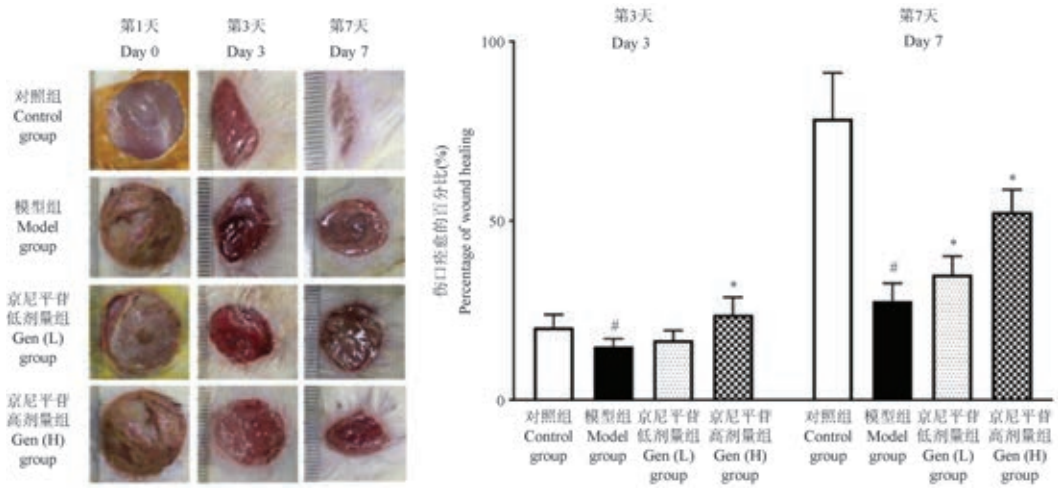
2.3　TUNEL 染色法评价京尼平苷抑制皮肤细胞凋亡的效果

皮肤溃疡作为一种慢性皮肤病，其生物医学变化一般较为稳定，恢复速度较慢，因此我们习惯于根据经验在一个时间点评估疗效。在糖尿病致皮肤溃疡模型中，分别于损伤发生后第 7 天进行细胞凋亡和生化指标的后续检测。

对照组大鼠皮肤表皮和真皮层荧光信号较弱，TUNEL 阳性凋亡细胞较少。真皮内凋亡细胞主要集中在毛囊周围。由于样本量小，无法进行 Shapiro-Wilk 正态性检验，最后进行非参数 t 检验。京尼平苷治疗糖尿病大鼠术后第 7 天 TUNEL 阳性细胞显著减少（第 7 天模型 vs Gen（L）：$t = 8.36$，$P < 0.0001$；第 7 天模型 vs Gen（H）：$t = 12.84$，$P < 0.001$，图 4）。各治疗组大鼠 TUNEL 阳性细胞主要分布在表皮，少数与真皮层相关。

2.4　京尼平苷对创面皮肤组织 PI3K/Akt 通路的激活

由于样本量小，无法进行 Shapiro-Wilk 正态性检验，最后进行非参数 t 检验。如图 5 所示，Western blot 灰色弯曲分析结果显示，糖尿病大鼠术后第 7 天 PI3K 和 Akt 磷酸化水平均显著降低（pPI3K/PI3K：$t = 4.52$，模型 vs Gen（L）$P = 0.011$；$t = 6.96$，模型 vs Gen（H）$P = 0.0022$；pAkt/Akt：$t = 8.01$，模型 vs Gen（L）$P = 0.0013$；$t = 13.21$，模型 vs Gen（H）$P = 0.0002$），在京尼平苷处理的糖尿病大鼠中逆转。提示京尼平苷至少部分通过 PI3K/Akt 信号通路促进创面愈合。

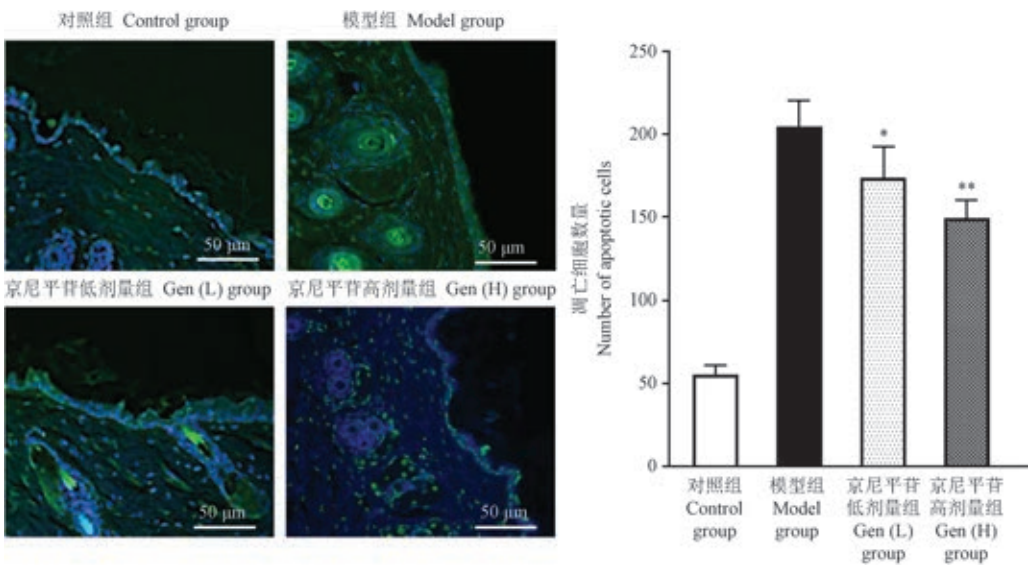


注：与对照组相比，$^{\#}P<0.05$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$。

图 3　各组大鼠不同时间点的创面愈合率情况

Note. Compared with control group, $^{\#}P<0.05$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$.

Figure 3　Wound healing rate of rats in each group at different time points

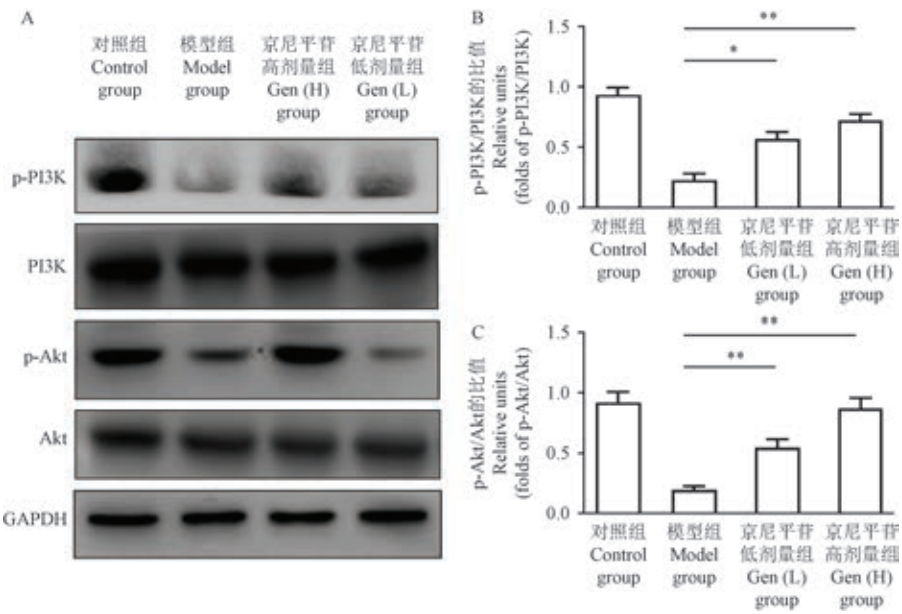


注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$。

图 4 京尼平苷抑制糖尿病性皮肤溃疡大鼠第 7 天皮肤组织的细胞凋亡

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

Figure 4 Genipine inhibited apoptosis of skin tissue on day 7 in diabetic rats with skin ulcer



注:A:蛋白印迹实验条带;B:p-PI3K/PI3K 蛋白印迹条带的量化分析;C:p-Akt/Akt 蛋白印迹条带的量化分析。与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$。

图 5 不同组模型大鼠皮肤组织中 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达情况。

Note. A, Experimental bands of Western blot. B, Quantitative analysis of p-PI3K/PI3K blot bands. C, Quantitative analysis of p-Akt/Akt blot bands. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression of PI3K/Akt signaling pathway in skin tissues of rats in different groups

3 讨论

伤口愈合不良是临床实践中常见的糖尿病并发症之一。通常糖尿病患者皮损部位由于高糖水平、局部免疫力低下,容易受外界因素影响出现炎症反应,同时伤口部位内源性因素的变化会导致伤口愈合延迟,包括胶原蛋白合成、成纤维细胞的增殖以及巨噬细胞功能变化等。本实验结果显示,京

尼平苷经口服可显著降低糖尿病大鼠血糖水平,并主要通过抑制局部炎症反应和促进局部血管新生等方式促进糖尿病伤口愈合。

糖尿病患者在伤口部位产生的大量炎症细胞可能会强烈限制伤口闭合进程。文献研究表明,高糖条件下的伤口能够引起抗炎性细胞因子(例如白细胞介素 10(interleukin-10,IL-10))的表达降低,以及促炎细胞因子(例如肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素 1β(interleukin-1β,IL-1β)和白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6))的表达增高[17]。另外,促炎症细胞因子不仅参与了炎症过程,其也被认为是细胞增殖和分化的介质。例如,当被角质层细胞激活时,IL-6 可刺激肉芽组织的形成,并促进上皮形成机制的发生和血管再生[18]。TNF-α 在减少肉芽组织形成和胶原纤维排列方面具有双重作用[19]。抗炎因子 IL-10 是一种多效性细胞因子,可以在多种类型细胞中发挥免疫抑制或免疫刺激的作用,另外 IL-10 可通过其抗炎作用间接促进成纤维细胞增殖和胶原在创伤部位的沉积[20]。本研究发现口服京尼平苷后糖尿病大鼠伤口部位的炎症细胞减少,特别是在病变的中心区域。京尼平苷可通过减少促炎性细胞因子(例如 IL-6)和上调抗炎性细胞因子 IL-10 的水平来良好地调节这些炎症介质。而京尼平苷可能是通过 PI3K/Akt/IL-10 等信号途径发挥抗炎作用。另外,京尼平苷还能够更好地促进肉芽组织的形成,较快促进成纤维细胞的增殖和胶原纤维的堆积,另外血管形成的速度也在加快。这些结果表明,京尼平苷在显著降低大鼠血糖水平的基础上,通过抗炎、促成纤维细胞增殖和胶原沉积的方式,有力改善糖尿病皮肤溃疡的症状,促进组织加速修复。

皮肤伤口愈合过程分为以下 3 个阶段:由于促炎症介质的高释放和免疫系统受损导致的炎症阶段;通过成纤维细胞增殖,胶原纤维沉积和形成胶原形成的增殖阶段;涉及受损组织修复的血管新生和重塑阶段[21]。而糖尿病皮肤溃疡往往由于长期糖代谢紊乱,高糖诱发肢体神经病变与血管阻塞:(1)可致周围神经传导速度下降,感觉性神经功能丧失,进而引起皮肤创面麻木,患者失去自我保护机制,难以察觉外部刺激,增加外伤及感染风险;(2)而血管病变可导致血小板聚集异常,血供效应下降,内皮细胞损害加重,创口修复缓慢。本文验证了京尼平苷的确具有一定的调节血糖功效,与前期文献报道一致[22-23]。京尼平苷被证实是一种从中药栀子果实中提取的小分子胰高糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激动剂,此外还发现许多其他类似结构的环烯醚萜苷类化合物具有该受体激动剂功能[24-25]。目前已知 GLP-1 受体激动剂是一种新型降糖靶向药物,能通过激动胰腺 β 细胞上的 GLP-1 受体促进胰岛素的表达。因此,尽管本研究尚未评价京尼平苷与传统降糖药物的联用情况,但可以预见京尼平苷可能存在一定的协同降糖功效。此外,京尼平苷还具有神经保护及抗炎症抗氧化等生物学功能,可能在其他机制方面对创口愈合有促进作用,因此相关机制还待进一步研究。寻找可以在上述过程的多个甚至所有阶段中均可有效参与伤口愈合,且成本低廉且副作用少的药物则成为一个重要的研究方向。

本研究发现表明,京尼平苷经过持续灌胃可减少糖尿病皮肤溃疡大鼠第 7 天的伤口创面大小,并伴有伤口收缩,在降低模型动物血糖的同时可有效促进高血糖大鼠皮肤伤口的愈合,在皮肤伤口愈合的多个阶段均能发挥治疗作用。上述研究为栀子及其制剂在糖尿病皮肤溃疡性病变的应用提供了良好的实验基础。

参考文献:

[1] 周琦. 糖尿病研究及其防治 [J]. 现代医药卫生, 2013, 29(4): 560-562.

[2] 刘昱灼, 冷锦红. 糖尿病周围神经病变中细胞自噬的研究进展 [J]. 中国糖尿病杂志, 2023, 31(1): 75-77.

[3] 白松杰, 颜亚岚, 张莉, 等. 自体富血小板胶治疗糖尿病性皮肤溃疡疗效的 Meta 分析 [J]. 医学研究杂志, 2020, 49(4): 128-134.

[4] 毛庆琳. 表皮生长因子联合湿润烧伤膏治疗糖尿病皮肤溃疡疗效 [J]. 糖尿病天地, 2020, 17(8): 90.

[5] 付俊玲, 穆志静, 孙丽娜, 等. 老年住院 2 型糖尿病患者肌少症与炎症因子关系的研究 [J]. 中华糖尿病杂志, 2023, 15(1): 20-25.

[6] 周克飞, 顾娟娟, 武楠. 中药外洗联合高压氧对糖尿病足介入术后患者创面愈合的影响 [J]. 四川生理科学杂志, 2021, 43(6): 964-965.

[7] 朱林, 郝润红, 吴敏, 等. 封闭负压引流技术对糖尿病足患者创面愈合的影响 [J]. 现代诊断与治疗, 2021, 32(2): 242-243.

[8] 黄晓罡, 牛东升, 闫香果, 等. 局部应用重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶对糖尿病患者创面愈合的影响 [J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2022, 17(5): 430-434.

[9] 王湘琦, 赵超然, 熊爱兵. 低氘水联合富血小板血浆对大鼠糖尿病溃疡创面愈合的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学

版), 2020, 40(3): 326-332.
[10] Li F, Chen Y, Li Y, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF-κB pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 886: 173449.
[11] 史永平, 孔浩天, 李昊楠, 等. 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 281-289.
[12] Shen B, Feng H, Cheng J, et al. Geniposide alleviates non-alcohol fatty liver disease via regulating Nrf2/AMPK/mTOR signalling pathways [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9): 5097-5108.
[13] Shaher F, Wang S, Qiu H, et al. Effect and mechanism of *Ganoderma lucidum* spores on alleviation of diabetic cardiomyopathy in a pilot *in vivo* study [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13: 4809-4822.
[14] Chen N, Jiang K, Yan GG. Effect of fenofibrate on diabetic retinopathy in rats via SIRT1/NF-κB signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(19): 8630-8636.
[15] Beserra FP, Vieira AJ, Gushiken LFS, et al. Lupeol, a dietary triterpene, enhances wound healing in streptozotocin-induced hyperglycemic rats with modulatory effects on inflammation, oxidative stress, and angiogenesis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3182627.
[16] 马源源, 宋伟, 胡威, 等. 龙珠软膏促小鼠伤口愈合及抗菌作用 [J]. 医药导报, 2018, 37(12): 1461-1465.
[17] Feng Y, Sanders AJ, Morgan LD, et al. Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing [J]. Regen Med, 2016, 11(2): 193-209.
[18] Finnerty CC, Herndon DN, Przkora R, et al. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients [J]. Shock, 2006, 26(1): 13-19.
[19] Breder JSC, Pires ALR, Azevedo FF, et al. Enhancement of cellular activity in hyperglycemic mice dermal wounds dressed with chitosan-alginate membranes [J]. Braz J Med Biol Res, 2019, 53(1): e8621.
[20] Wei HX, Wang B, Li B. IL-10 and IL-22 in mucosal immunity: driving protection and pathology [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1315.
[21] Tan SS, Yeo XY, Liang ZC, et al. Stromal vascular fraction promotes fibroblast migration and cellular viability in a hyperglycemic microenvironment through up-regulation of wound healing cytokines [J]. Exp Mol Pathol, 2018, 104(3): 250-255.
[22] 李敏, 杨晨钰, 傅超慧, 等. 马齿苋/甘草/蒲公英及其复方改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 517-524.
[23] Lone IM, Nun NB, Ghnaim A, et al. High-fat diet and oral infection induced type 2 diabetes and obesity development under different genetic backgrounds [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(2): 131-145.
[24] Zheng Y, Xiao Y, Zhang D, et al. Geniposide ameliorated dexamethasone-induced cholesterol accumulation in osteoblasts by mediating the GLP-1R/ABCA1 axis [J]. Cells 2021, 10(12): 3424.
[25] Liu H, Ou MX, Han QQ. Microglial M2 polarization mediated the neuroprotective effect of morroniside in transient MCAO-induced mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 784329.

〔收稿日期〕2023-02-17

王静,路成吉,臧建新,等. 人羊膜上皮细胞移植对子宫瘢痕模型大鼠子宫内膜的影响及机制［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 21-27.
Wang J, Lu CJ, Zang JX, et al. Effect and mechanism of transplantation of human amniotic epithelial cells on endometrium of uterine scar model rats［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 21-27.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.004

人羊膜上皮细胞移植对子宫瘢痕模型大鼠子宫内膜的影响及机制

王　静[1],路成吉[1*],臧建新[1],衣志爽[1],彭家晟[1],张　峰[2]

(1.新乡医学院三全学院临床学院,河南 新乡　453000;2.郑州大学第三附属医院妇产科,郑州　450000)

【摘要】　目的　探讨人羊膜上皮细胞(hAECs)移植对大鼠子宫瘢痕模型子宫内膜的改善及对基质金属蛋白酶 8(MMP-8)、血管内皮生长因子(VEGF)的影响。**方法**　建立大鼠子宫瘢痕模型,并随机分为模型组及移植组,每组各 18 只,另取 18 只大鼠作为假手术组。移植组大鼠于子宫瘢痕处注射 hAECs,模型组及假手术组仅给予等量 PBS。4 周后,各组取 8 只大鼠子宫组织,HE 染色和 Masson 染色分别观察组织形态学变化和纤维化情况,测量子宫内膜厚度和腺体数量;细胞角蛋白和整合素 β3 免疫组化染色分别评估子宫内膜生长和容受性;RT-qPCR 技术检测子宫内膜组织中 MMP-8、VEGFA mRNA 表达水平;Western blot 法检测组织中 MMP-8、VEGFA 蛋白表达水平;8 周后,取各组剩余 10 只大鼠进行妊娠能力测定。**结果**　模型组及移植组大鼠子宫内膜厚度、腺体数、角蛋白和整合素 β3 IOD 值、MMP-8、VEGFA mRNA 和蛋白相对表达水平、妊娠率和子宫胚胎数低于假手术组($P<0.05$);移植组大鼠子宫内膜厚度、腺体数、角蛋白和整合素 β3 IOD 值、MMP-8、VEGFA mRNA 和蛋白相对表达水平、妊娠率和子宫胚胎数高于模型组($P<0.05$),另外,hAECs 移植可改善子宫瘢痕大鼠子宫内膜组织病理形态,减轻子宫内膜纤维化程度。**结论**　hAECs 移植可改善子宫内膜损伤,减少瘢痕形成,提高子宫内膜容受性,并增强模型大鼠的妊娠功能,其作用机制可能与促进 MMP-8 和 VEGFA 表达有关。

【关键词】　人羊膜上皮细胞;子宫瘢痕;子宫内膜;基质金属蛋白酶 8;血管内皮生长因子 A
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0021-07

Effect and mechanism of transplantation of human amniotic epithelial cells on endometrium of uterine scar model rats

WANG Jing[1], LU Chengji[1*], ZANG Jianxin[1], YI Zhishuang[1], PENG Jiasheng[1], ZHANG Feng[2]

(1. Clinical College of Sanquan College of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000, China.
2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

【Abstract】　Objective　To investigate the effect of human amniotic epithelial cell (hAEC) transplantation on endometrium improvement and matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in a rat model of uterine scaring. **Methods**　The uterine scar model was established in rats that were randomly divided into model and transplantation groups with 18 rats in each group. The other 18 rats were used as the sham operation

[基金项目]2020 年河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20200448)。
[作者简介]王静(1987—),女,主治医师,讲师,研究方向:临床妇产科学,高等医学教育。E-mail:disho899@163.com
[通信作者]路成吉(1956—),男,主任医师,教授,研究方向:全科医学,高等医学教育。E-mail:moyin354@163.com

group. Rats in the transplantation group were injected with hAECs in the uterine scar, and rats in model and sham operation groups were administered the same amount of PBS. After 4 weeks, the uterine tissues of eight rats in each group were collected. Histomorphological changes and endometria fibrosis were observed by HE staining and Masson staining respectively, and the endometrial thickness and number of glands were measured. Endometrial growth and receptivity were evaluated by immunohistochemical staining of cytokeratin and integrin β3, respectively. mRNA expression of MMP-8 and VEGFA in endometrial tissues was measured by RT-qPCR. Western blot was used to measure MMP-8 and VEGFA protein expression. After 8 weeks, the remaining 10 rats in each group were used to assess gestational ability. **Results** The endometrial thickness, gland number, IOD value of keratin and integrin β3, relative mRNA and protein expression levels of MMP-8 and VEGFA, pregnancy rate and number of uterine embryos in model and transplantation groups were lower than those in sham operation group ($P<0.05$). The endometrial thickness, gland number, IOD value of keratin and integrin β3, relative mRNA and protein expression of MMP-8 and VEGFA, pregnancy rate and number of uterine embryos were higher than those in model group ($P<0.05$). Additionally, hAEC transplantation improved the pathological morphology of endometrial tissue in rats with uterine scaring and reduced the degree of endometrial fibrosis. **Conclusions** hAEC transplantation improves endometrial injury, reduces scar formation, improves endometrial receptivity, and enhances pregnancy function in model rats, which may be related to promotion of MMP-8 and VEGFA expression.

【**Keywords**】 human amniotic epithelial cells; uterine scar; endometrium; matrix metalloproteinase 8; vascular endothelial growth factor A

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

正常情况下子宫内膜可随月经动态、周期性地生长、分化、脱落和再生,损伤后无法自行修复,可发生纤维化、瘢痕化及粘连,引起月经紊乱、痛经、不孕等后果,因而积极促进子宫内膜再生及修复对育龄妇女具有重要意义[1-2]。众所周知,所有涉及子宫的侵入性手术如剖宫产都会在不同程度上破坏其结构和功能的完整性,并不可避免地导致异常瘢痕形成[3],研究发现,相对于非剖宫产瘢痕综合征组,剖宫产瘢痕缺损极易导致子宫内膜异位及慢性子宫内膜炎的发生[4],而在子宫瘢痕模型中探讨子宫内膜的相关研究较少。干细胞疗法已被公认为是子宫瘢痕的潜在治疗策略[5],来自胎盘的人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells,hAECs)基于其安全性及可用性,国外学者认为其可能对子宫瘢痕的功能修复和胶原降解有效,但这一点缺乏足够实验依据支持[6]。孟宪宁等[7]证明基质金属蛋白酶 8(matrix metalloproteinase 8,MMP-8)和血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A,VEGFA)参与了子宫瘢痕疾病发生,但关于其是否可通过 MMP-8 和 VEGFA 促进子宫内膜修复还需进一步探究。故本研究拟构建子宫瘢痕大鼠模型,并进行 hAECs 移植,通过对比观察子宫内膜组织学变化,并检测 MMP-8 和 VEGFA 因子的表达水平,以期为 hAECs 治疗子宫侵入性手术并发症提供一种基于干细胞的新型策略。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SD 大鼠雌性 64 只,雄性 30 只,SPF 级,6~7 周龄,体重(250±20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2019-0003]。于华兰生物工程股份有限公司[SYXK(豫)2018-0014]内饲养,室温为 23~25℃,相对湿度为 40%~60%,12 h/12 h 光/暗循环,所有大鼠均可自由进食和饮水,适应性饲养 1 周。每天上午 9:00 通过阴道涂片确定发情周期,仅选择具有连续 4 d 发情周期的雌性大鼠(共获得 58 只)。本实验过程遵循实验动物“3R”原则,经新乡医学院三全学院动物伦理学审批通过(XXSQ-20220115)。

1.1.2 细胞

hAECs 购自上海赛奥生物技术有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

HE 染色试剂盒(G1120)、Masson 染色试剂盒(G1340)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;角蛋白(ab8068)、整合素 β3(ab210515)、MMP-8(ab72897)、VEGFA(ab46154)抗体均购自美国 Abcam 公司。HistoStar 型组织包埋机、HM325 石蜡切片机、BI7500 实时荧光定量 PCR 仪均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DM750 生物显微镜购

自德国徕卡公司;DYCZ-24KS 型双板垂直电泳仪购自北京六一生物科技有限公司。

1.3　实验方法

1.3.1　造模、分组及干预

子宫瘢痕大鼠模型构建[8]:从具有连续发情周期的雌性大鼠中随机选取 40 只,腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行麻醉,下腹部中线作切口,并暴露子宫角,从每个子宫角切除约 1 cm 长和 0.5 cm 宽(总周长的 1/3~1/2 段)的子宫壁,并保留子宫系膜,6-0 尼龙缝线标记子宫伤口的四个边缘,盐水冲洗腹腔后,4-0 丝线以间断方式缝合直肌筋膜和皮肤,子宫壁全层切除 30 d 再次打开腹腔以确认瘢痕形成。假手术组不切除子宫角。大鼠术后均肌肉注射青霉素 3 d。共成模 36 只,随机分为模型组(18 只)和移植组(18 只)。剩余 18 只大鼠作为假手术组,假手术组及模型组大鼠子宫瘢痕处注射 50 μL PBS(不含 hAECs),移植组注射 50 μL PBS(含 10^6 个 hAECs)。

1.3.2　标本采集与处理

hAECs 移植后 4 周,戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射诱导麻醉,收集各组 8 只子宫瘢痕处内膜组织,分成两份,分别置于 4%多聚甲醛和液氮中保存。

1.3.3　HE 染色观察子宫内膜形态

4%多聚甲醛固定 48 h 后,石蜡包埋,切片(5 μm),脱蜡、水化,苏木精、伊红染色,封片后高倍视野下(200×)随机选择 5 个视野计数子宫内膜腺体数量,取平均值(位于黏膜下层和基底层,多呈圆形或椭圆形)。

1.3.4　Masson 染色观察子宫内膜纤维化情况

石蜡组织切片常规脱蜡、水化,依次采用 Weigert 氏铁苏木素液、酸性乙醇、Masson 蓝化液、丽春品红、弱酸工作液、磷钼酸、苯胺蓝处理后,脱水、透明、封片,镜下观察并采集图片。胶原纤维染色呈蓝色,用于评估子宫内膜纤维化。Image J 软件测量子宫内膜厚度(在子宫横截面上测量为子宫内膜-肌层界面与子宫内膜表面之间的垂直距离)。

1.3.5　免疫组化染色检测子宫内膜角蛋白及整合素 β3 阳性表达情况

取石蜡组织切片,加热进行抗原修复,3% H_2O_2 处理 15 min,PBS 洗涤,5%山羊血清 37℃封闭 30 min,于 1∶200 稀释的一抗(角蛋白、整合素 β3)中 4℃孵育过夜,PBS 洗涤,加入二抗(1∶1000 稀释)37℃孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染,脱水、封片。光镜下,角蛋白在细胞质中呈褐色颗粒状,整合素 β3 在细胞质和细胞膜中呈褐色颗粒状。每张切片随机取 5 个视野,使用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各个视野的平均光密度值(average optical density, AOD)。

1.3.6　RT-qPCR 检测子宫内膜组织中相关 mRNA 水平

TRIzol 试剂盒提取总 RNA,并测定纯度及浓度,逆转录为 cDNA,制备 RT-qPCR 反应体系并进行定量检测。PCR 热循环参数:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 60 s 40 个循环。mRNA 表达水平以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法量化。引物序列见表 1。

1.3.7　Western blot 法检测子宫内膜组织中相关蛋白表达水平

RIPA 裂解液加入到子宫组织中进行裂解,提取蛋白,BCA 法测定浓度。进行电泳转膜后,用含有 0.1% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制的 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,孵育 MMP-8、VEGFA 一抗(均 1∶1000 稀释)、二抗(1∶10 000 稀释),洗膜,滴加 ECL 显色,Image J 软件分析条带灰度值。

1.3.8　检测各组大鼠妊娠能力

通过保留胚胎以备怀孕的能力评估子宫功能。hAECs 移植后 8 周,取各组剩余 10 只雌性大鼠与性成熟雄性大鼠 1∶1 合笼交配,次日上午检查阴道塞,在存在阴道塞 10 d 后处死雌性大鼠进行子宫检查,记录妊娠率和胚胎数量。

1.4　统计学方法

SPSS 26.0 软件分析数据,以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示符合正态分布的计量资料,多组间和两组间比较分别采用单因素方差分析和 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1　引物序列(5'-3')
Table 1　Primer sequence(5'-3')

基因 Gene	引物 Primer
MMP-8	F:GATTCAGAAGAAACGTGGACTCAA
	R:GAAGACACAGTGGTGGAAGAAG
VEGFA	F:AAGACATGGCACCTCCAG
	R:ACAAGGTCCTCCTGAGCTATAC
GAPDH	F:GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG
	R:GGATGGAATTGTGAGGGAGATG

2 结果

2.1 大鼠子宫内膜形态

假手术组大鼠子宫内膜的上皮边界连续,表面光滑呈波浪状,腺上皮和管腔上皮细胞完整,排列紧密,腺体丰富;模型组大鼠子宫的内膜连续性差,腺体分散、边缘不完整,腺上皮和管腔上皮呈低柱状或扁平状;移植组大鼠子宫内膜的连续性相对良好,腺上皮和管腔上皮细胞排列紧密,腺体密度增加。见图 1。

2.2 大鼠子宫内膜纤维化

假手术组大鼠子宫内膜间质见少量胶原纤维;模型组大鼠子宫内膜间质胶原纤维呈蓝色大范围深染,纤维化严重;与模型组比较,移植组大鼠子宫内膜胶原纤维蓝染减弱,纤维化程度减轻。见图 2。

2.3 大鼠子宫内膜厚度及腺体数

经测定,与假手术组比较,模型组及移植组大鼠子宫内膜厚度、腺体数降低($P<0.05$);与模型组比较,移植组大鼠子宫内膜厚度、腺体数增加($P<0.05$)。见表 2。

2.4 大鼠子宫内膜中角蛋白、整合素 β3 表达

免疫组化结果显示,角蛋白在腺上皮或管腔上皮细胞的细胞质中呈褐色颗粒,整合素 β3 管腔和腺上皮细胞的细胞质和细胞膜中呈褐色颗粒状。与假手术组比较,模型组和移植组大鼠子宫内膜组织中角蛋白、整合素 β3 IOD 值降低($P<0.05$);与模型组比较,移植组大鼠子宫内膜组织中角蛋白、整合素 β3 IOD 值升高($P>0.05$)。见表 3,图 3。

2.5 大鼠子宫内膜 MMP-8、VEGFA mRNA 表达

与假手术组比较,模型组及移植组大鼠的子宫内膜组织中 MMP-8、VEGFA mRNA 相对表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,移植组大鼠 MMP-8、VEGFA mRNA 相对表达水平升高($P<0.05$)。见表 4。

2.6 大鼠子宫内膜 MMP-8、VEGFA 蛋白表达

与假手术组比较,模型组及移植组大鼠的子宫内膜组织中 MMP-8、VEGFA 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$);与模型组比较,移植组大鼠 MMP-8、VEGFA 蛋白相对表达水平升高($P<0.05$)。见图 4,表 5。

2.7 大鼠妊娠能力

如表 6 所示,经检测,假手术组大鼠妊娠率为 100%,模型组及移植组大鼠妊娠率分别为 60%、80%;与假手术组比较,模型组和移植组大鼠子宫胚胎数减少($P<0.05$);与模型组比较,移植组大鼠子宫胚胎数增加($P<0.05$)。

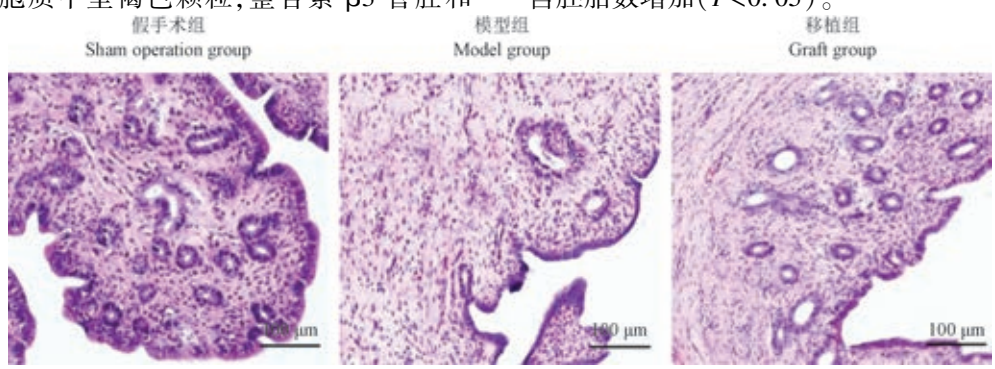


图 1 子宫内膜组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining results of endometrial tissue

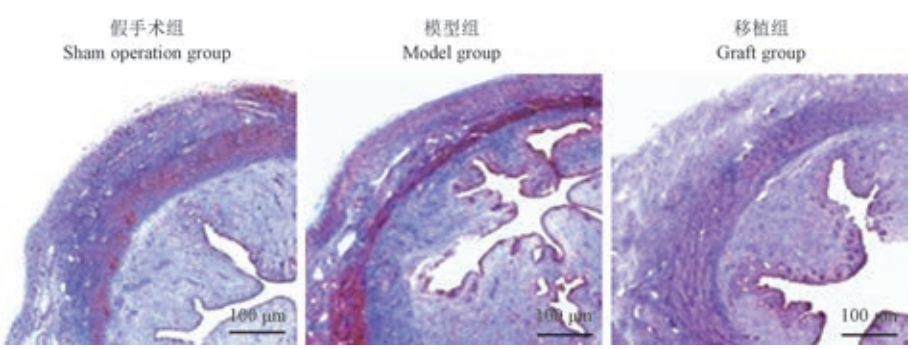


图 2 子宫内膜组织 Masson 染色结果

Figure 2 Masson staining results of endometrial tissue

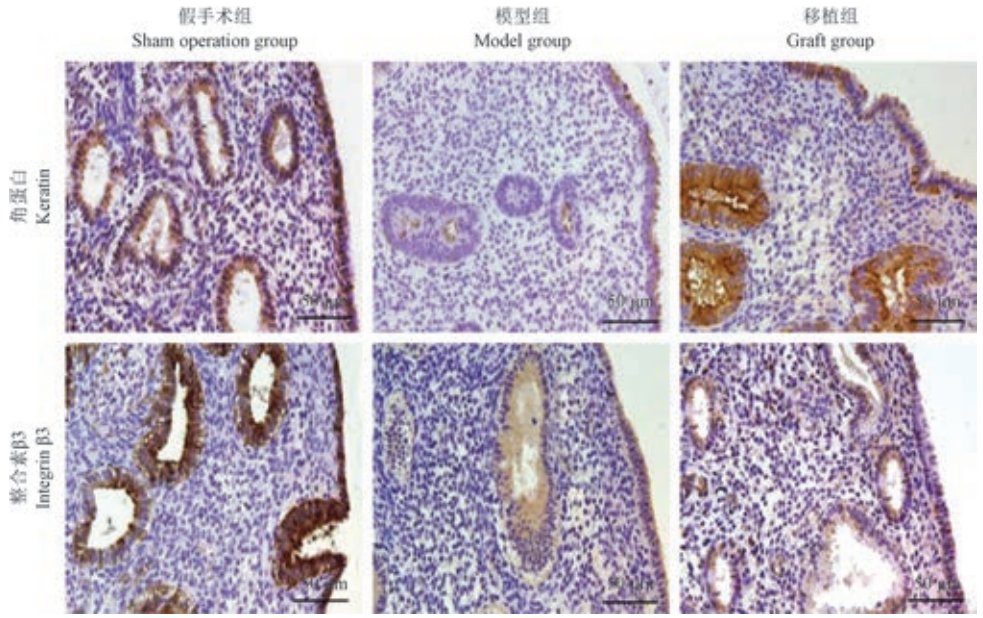


图 3　各组大鼠子宫内膜组织中角蛋白和整合素 β3 阳性表达及分布(免疫组化染色)

Figure 3　Keratin and integrin β3 positive expression and distribution in endometrium of rats in each group (immunohistochemical staining)

表 2　各组大鼠子宫内膜厚度及腺体数($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2　Endometrial thickness and gland number of rats in each group

组别 Groups	子宫内膜厚度(μm) Endometrial thickness	腺体数(n) Glands number
假手术组 Sham operation group	345.37±33.05	22.88±3.14
模型组 Model group	218.99±18.75*	4.38±1.41*
移植组 Graft group	290.17±26.50*※	15.75±1.49*※

注:与假手术组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,※$P<0.05$。

Note. Compared with sham operation group, *$P<0.05$. Compared with the model group, ※$P<0.05$.

表 3　各组大鼠子宫内膜组织中角蛋白、整合素 β3 IOD 值($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3　Keratin and integrin β3 IOD value in endometrial tissue of rats in each group

组别 Groups	角蛋白 Keratin	整合素 β3 Integrin β3
假手术组 Sham operation group	804.08±58.67	538.88±47.61
模型组 Model group	346.95±48.34*	290.98±36.99*
移植组 Graft group	667.25±58.35*※	445.13±37.21*※

注:与假手术组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,※$P<0.05$。

Note. Compared with sham operation group, *$P<0.05$. Compared with the model group, ※$P<0.05$.

表 4　各组大鼠子宫内膜中 MMP-8、VEGFA mRNA 相对表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 4　Relative expression level of MMP-8 and VEGFA mRNA in endometrium of rats in each group

组别 Groups	MMP-8	VEGFA
假手术组 Sham operation group	1.01±0.01	1.00±0.01
模型组 Model group	0.35±0.03*	0.41±0.03*
移植组 Graft group	0.76±0.05*※	0.84±0.05*※

注:与假手术组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,※$P<0.05$。

Note. Compared with sham operation group, *$P<0.05$. Compared with the model group, ※$P<0.05$.

表 5　各组大鼠子宫内膜中 MMP-8、VEGFA 蛋白相对表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 5　Relative expression level of MMP-8 and VEGFA protein in endometrium of rats in each group

组别 Groups	MMP-8/GAPDH	VEGFA/GAPDH
假手术组 Sham operation group	0.48±0.03	0.68±0.04
模型组 Model group	0.17±0.02*	0.26±0.02*
移植组 Graft group	0.34±0.03*※	0.51±0.05*※

注:与假手术组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,※$P<0.05$。

Note. Compared with sham operation group, *$P<0.05$. Compared with the model group, ※$P<0.05$.

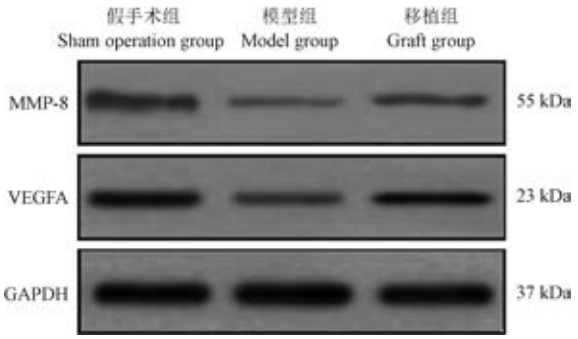


图 4 各组子宫内膜组织中 MMP-8、VEGFA 蛋白表达条带

Figure 4 Expression bands of MMP-8 and VEGFA protein in endometrial tissue of each group

表 6 各组大鼠妊娠率及胚胎数($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 6 Pregnancy rate and embryo number of rats in each group

组别 Groups	妊娠率(%) Pregnancy rate	胚胎数(n) Embryos number
假手术组 Sham operation group	100	10.10±0.74
模型组 Model group	60	3.90±3.41 *
移植组 Graft group	80	7.40±3.95 *※

注:与假手术组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, ※ $P<0.05$。

Note. Compared with sham operation group, * $P<0.05$. Compared with the model group, ※ $P<0.05$.

3 讨论

在包括结缔组织的所有软组织和器官中,手术后伤口愈合不良均可导致实质组织被过量的细胞外基质沉积所取代,最终导致组织纤维化、瘢痕形成和器官功能丧失[8],因此增强内源性组织再生和修复能力是减少瘢痕形成、恢复器官功能的有效策略。hAECs 具有增殖、分化能力以及免疫调节特性,此外,还具有易于分离、数量丰富、避免伦理争论以及非免疫原性、非致瘤性等优势[9],hAEC 移植已被证明可有助于通过不同的分子机制修复和重建受损组织和器官的功能[10],提示其应用于子宫伤口愈合的积极意义。

子宫为胚胎植入和妊娠维持提供必要的内部环境。在育龄妇女中,正常的子宫内膜会经历大约 400 个增殖、分化、脱落和再生周期而不会形成瘢痕,但当剖腹产、刮宫术、子宫肌瘤切除术或感染引起的严重子宫外伤损害子宫内膜基底时,就会引起组织纤维化和子宫瘢痕,子宫内膜进而可出现胶原性瘢痕,增大了不孕、反复流产、胎盘植入、宫内生长受限等的风险[11]。据报道,子宫内膜腺上皮细胞和管腔上皮细胞形态、数量与子宫内膜再生及修复相关[12],子宫内膜厚度可影响胚胎着床率[13],Ouyang 等[14]研究发现,通过 hAECs 移植可减轻刮宫和子宫内膜炎引起的子宫内膜损伤,增加子宫内膜厚度,促进腺体和血管增殖,减少子宫内膜纤维化区域。故本研究经切除子宫角构建子宫瘢痕大鼠模型,并应用 hAECs 移植介入以探讨其对子宫瘢痕大鼠受损子宫内膜的效果,结果显示,与模型组比较,hAECs 移植可有效改善子宫内膜上皮病理损伤,促进管腔和腺上皮形态恢复,增加内膜厚度及腺体数量,减轻内膜间质纤维化程度,同时提高妊娠率和胚胎数,提示其对减轻子宫内膜瘢痕形成及妊娠功能恢复具有一定促进作用。细胞角蛋白是上皮细胞中的主要结构蛋白,作为细胞骨架对维持细胞或组织结构完整性发挥了重要的作用,在子宫内膜腺上皮和管腔上皮内强表达,可用于评估子宫内膜损伤和修复情况[15];整合素是一类细胞黏附分子,为异二聚体糖蛋白,由非共价联系的 α 和 β 亚单位组成,整合素 β3 可在腺上皮和腔上皮表达呈周期性,常作为子宫内膜容受性的标志,据报道,大约 30% 的反复胚胎植入失败归因于子宫内膜容受性缺陷,整合素 β3 蛋白增加,子宫内膜血管生成增加均提示子宫内膜容受性改善,胚胎植入率因此可显著提高[16-17]。本研究结果显示,hAECs 移植可促进子宫瘢痕大鼠子宫内膜中角蛋白及整合素 β3 的阳性表达,提示 hAECs 移植可减少瘢痕形成,改善损伤,提高子宫内膜容受性及生育能力。

MMP 参与伤口愈合过程,包括伤口闭合、炎症和组织重塑[18]。Zhang 等[19]研究表明,hAECs 可分泌丰富的蛋白质,包括 MMP-8。另有研究结果显示,局部应用选择性 MMP-8 抑制剂会延缓伤口愈合,而局部使用活性重组 MMP-8 可促进伤口愈合,减少炎症并增强血管生成[20],提示 hAECs 改善子宫内膜损伤并减少瘢痕形成可能与提高 MMP-8 表达水平有关。在伤口愈合过程中,血管通过提供营养和氧气,促进伤口愈合,而局部血管生成不足,血运不良,则可导致创面愈合不良[21],据报道,hAECs 具有促血管生成作用[22]。VEGF 家族包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE、VEGFF 和胎盘生长因子,其中 VEGFA 是 VEGF 家族中最重要成员,是组织修复过程中参与新血管形成的重要生长因子,主要在月经期和增殖期表达,可参与微血管的维持和形成以及子宫内膜组织的重建[10]。另有研

究发现,在妊娠前 3 个月通过 VEGFA 通路刺激蜕膜血管生成可有利于提高妊娠成功机会[22]。此外,通过分析 MMP-8、VEGFA mRNA 和蛋白相表达结果推测,hAECs 促进子宫内膜组织血管生成与修复,很可能是与促进二者表达水平有关,进而改善子宫内膜损伤,减少瘢痕形成,提高子宫内膜容受性,并增强模型大鼠的妊娠功能。

综上所述,hAECs 移植可改善子宫瘢痕模型大鼠子宫内膜结构及功能,其作用机制可能与促进 MMP-8 和 VEGFA 表达有关。本研究实验对象单一,还需扩大实验动物种类及样本量以进一步验证。

参考文献:

[1] 刘星妤, 胡小芳, 徐广立, 等. 人脐带间充质干细胞修复子宫内膜损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(24): 3921-3927.

[2] Hua Q, Zhang Y, Li H, et al. Human umbilical cord blood-derived MSCs trans-differentiate into endometrial cells and regulate Th17/Treg balance through NF-κB signaling in rabbit intrauterine adhesions endometrium [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 301.

[3] Gao M, Yu Z, Yao D, et al. Mesenchymal stem cells therapy: a promising method for the treatment of uterine scars and premature ovarian failure [J]. Tissue Cell, 2022, 74: 101676.

[4] Nobuta Y, Tsuji S, Kitazawa J, et al. Decreased fertility in women with cesarean scar syndrome is associated with chronic inflammation in the uterine cavity [J]. Tohoku J Exp Med, 2022, 258(3): 237-242.

[5] 韦伟, 黄灵绣, 宋光辉, 等. 利用绿色荧光蛋白示踪干细胞在大鼠瘢痕子宫模型内分布的研究 [J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(5): 1164-1167.

[6] Fan Y, Sun J, Zhang Q, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells promotes morphological and functional regeneration in a rat uterine scar model [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 207.

[7] 孟宪宁, 李红霞, 吴亚男, 等. 血清及腹腔液中 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平在子宫内膜异位症中的诊断价值 [J]. 疑难病杂志, 2018, 17(8): 825-827, 832.

[8] Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(265): 265sr6.

[9] Zhang Q, Lai D. Application of human amniotic epithelial cells in regenerative medicine: a systematic review [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 439.

[10] Li B, Zhang Q, Sun J, et al. Human amniotic epithelial cells improve fertility in an intrauterine adhesion mouse model [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 257.

[11] Xu L, Ding L, Wang L, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on scaffolds facilitate collagen degradation via upregulation of MMP-9 in rat uterine scars [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 84.

[12] Tempest N, Hill CJ, MacLean A, et al. Novel microarchitecture of human endometrial glands: implications in endometrial regeneration and pathologies [J]. Hum Reprod Update, 2022, 28(2): 153-171.

[13] Zhang L, Li Y, Dong YC, et al. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promotes the recovery of thin endometrium in rats [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 412.

[14] Ouyang X, You S, Zhang Y, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells improves endometrial regeneration in rat model of intrauterine adhesions [J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(20): 1346-1362.

[15] 罗惠娟, 王宁, 周娟, 等. 脐带间充质干细胞移植治疗子宫切口瘢痕缺陷大鼠的疗效观察 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 2079-2084.

[16] Li R, Wu J, He J, et al. Mice endometrium receptivity in early pregnancy is impaired by maternal hyperinsulinemia [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5): 2503-2510.

[17] Koo HS, Yoon MJ, Hong SH, et al. CXCL12 enhances pregnancy outcome via improvement of endometrial receptivity in mice [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 7397.

[18] Chang M, Nguyen TT. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers [J]. Acc Chem Res, 2021, 54(5): 1080-1093.

[19] Zhang Q, Bu S, Sun J, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 270.

[20] Chang M. Restructuring of the extracellular matrix in diabetic wounds and healing: a perspective [J]. Pharmacol Res, 2016, 107: 243-248.

[21] 路明, 陈哲. 自制纳米银+重组人碱性成纤维细胞生长因子抗菌敷料对糖尿病足大鼠创面愈合及血管生成相关因子、炎症因子的影响 [J]. 中国现代医药杂志, 2022, 24(9): 17-22.

[22] Wei P, Zhong C, Yang X, et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing via PI3K-AKT-mTOR-mediated promotion in angiogenesis and fibroblast function [J]. Burns Trauma, 2020, 8: tkaa020.

〔收稿日期〕2023-01-04

邓绍友,赵玉兰,王佩锦,等. 恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠的降血糖和改善肠道菌群作用研究［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 28-33.
Deng SY, Zhao YL, Wang PJ, et al. Effect of Osteoking on lowering blood sugar and improving intestinal flora in db/db mice［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 28-33.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.005

恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠的降血糖和改善肠道菌群作用研究

邓绍友[1#],赵玉兰[2#],王佩锦[2],李　蓉[2],赵宏斌[3],角建林[4*],郑　红[2*]

(1.云南省执业药师注册中心,昆明　650101;2.昆明医科大学实验动物学部,昆明　650500;
3.云南省第一人民医院急诊创伤外科,昆明　650031;4.昆明医科大学技术转移中心,昆明　650500)

【摘要】　目的　探索恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠血糖和肠道微生物的影响。**方法**　将野生型小鼠作为对照组,db/db 小鼠随机分为模型组和恒古骨伤愈合剂治疗组;灌胃给药 12 周后,检测空腹血糖、血清糖化血红蛋白和胰岛素含量,使用 16S rDNA 技术分析小鼠肠内容物菌群变化及预测菌群功能。**结果**　与模型组比较,恒古骨伤愈合剂降低 db/db 小鼠空腹血糖($P<0.01$)、血清糖化血红蛋白($P<0.01$)、胰岛素抵抗指数($P<0.01$),升高胰岛素含量($P<0.01$);恒古骨伤愈合剂增加 db/db 小鼠盲结肠有益菌丰度,降低害菌丰度,其中马文氏菌属的丰度显著升高($P<0.01$);恒古骨伤愈合剂抑制了 db/db 小鼠菌群 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢、鞘脂代谢、半乳糖代谢的降低及赖氨酸降解、硫中继系统、丙酸代谢的升高($P<0.05$)。**结论**　恒古骨伤愈合剂具有降血糖功效和调节 db/db 小鼠肠道微生态平衡的作用。

【关键词】　恒古骨伤愈合剂;降血糖性能;肠道菌群;16S rDNA 技术;db/db 小鼠
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0028-06

Effect of Osteoking on lowering blood sugar and improving intestinal flora in db/db mice

DENG Shaoyou[1#], ZHAO Yulan[2#], WANG Peijin[2], LI Rong[2], ZHAO Hongbin[3], JIAO Jianlin[4*], ZHENG Hong[2*]

(1. Licensed Pharmacist Registration Center of Yunnan Province, Kunming 650101, China.
2. Laboratory Animal Science Department, Kunming Medial University, Kunming 650500.
3. Emergency Trauma Surgery, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650031.
4. Technology Transferring Center, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】　Objective　To investigate the effects of Osteoking on hyperglycemia and regulating gut microbiota in db/db mice. **Methods**　Wildtype mice were used as the control group, and db/db mice were randomly divided into model

[基金项目]云南省基础研究-昆医联合专项重点项目(202201AY070001-032);云南省创新引导与科技培育计划项目(202204AW050014)。
[作者简介]邓绍友(1964—),男,副主任药师,研究方向:药事管理和药理学。E-mail:452459377@qq.com
赵玉兰(1996—),女,硕士研究生,研究方向:2 型糖尿病性骨质疏松。E-mail:1009451857@qq.com　#共同第一作者
[通信作者]郑红(1969—),女,教授,研究方向:2 型糖尿病性骨质疏松。E-mail:847255170@qq.com
角建林(1966—),男,正高级实验师,研究方向:新型实验动物及疾病模型创制。E-mail:jiaojianlin66@163.com
*共同通信作者

and Osteoking groups. After intragastric administration for 12 weeks, fasting blood glucose and serum glycosylated hemoglobin and insulin levels were measured, changes in intestinal microflora were determined, and functional pathways related to intestinal microflora in mice were predicted by 16S rDNA sequencing. **Results** Compared with the model group, Osteoking decreased fasting blood glucose ($P<0.01$), serum glycosylated hemoglobin ($P<0.01$), and the insulin resistance index ($P<0.01$), and increased insulin content ($P<0.01$) in db/db mice. Osteoking increased the abundance of beneficial intestinal microflora and decreased the abundance of harmful bacteria. Moreover, the abundance of Marvinbryantia was increased. Osteoking alleviated the decrease in metabolism of D-arginine and D-ornithine, sphingolipid, and galactose metabolism ($P<0.05$) and inhibited lysine degradation, the sulfur relay system, and propanoate metabolism ($P<0.05$). **Conclusions** Osteoking has hypoglycemic properties and improves the intestinal microflora imbalance in db/db mice.

【Keywords】 Osteoking; hypoglycemic properties; gut microbiota; 16S rDNA sequencing technology; db/db mice
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellituss,T2DM)是一种以慢性血糖升高为主要临床表现的代谢性疾病,占糖尿病患者 90%。若血糖控制不佳,可引起多器官并发症,患者生存质量降低甚至死亡。肠道菌群在人和动物肠道中构成复杂生态系统,现有研究已证明,肠道菌群与 2 型糖尿病密切相关,有益菌和有害菌比例失调[1]。同时,肠道菌群产生如短链脂肪酸、胆汁酸、脂多糖、硫化氢等多种代谢产物,对 2 型糖尿病的发生发展至关重要[2]。db/db 小鼠瘦素受体缺陷、肥胖且患糖尿病,临床症状为糖、脂代谢异常及胰岛素抵抗等,是 2 型糖尿病及并发症,如糖尿病肾病、心血管病变、骨代谢异常等研究的良好动物模型[3]。恒古骨伤愈合剂为收录于药典的处方药,源于彝族民间古方,具有补肝肾、活血益气、消肿止、接骨续筋的功能。恒古骨伤愈合剂多用于骨折、骨关节炎、腰椎间盘突出症、骨质疏松症、股骨头坏死等骨伤科疾病的临床治疗,未见降血糖相关报道。

现代中医药认为糖尿病的病机特点为肝、脾、肾功能失调,三脏同调疗效满意[4]。这与恒古骨伤愈合剂补肝肾的功能相吻合。在现代中医临床药物中,恒古骨伤愈合剂是异病同治的典型代表[5],其君臣药红花、黄芪、杜仲、三七、人参、鳖甲常用于糖尿病的中医药临床治疗[6]。因此,本实验探讨恒古骨伤愈合剂对 2 型糖尿病 db/db 小鼠降血糖作用及其肠道菌群的影响,为扩大民族药恒古骨伤愈合剂药理学疗效提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/KsJ-db/db 小鼠 12 只,SPF 级野生型小鼠 6 只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010]、[SCXK(京)2019-0030]。小鼠饲养于昆明医科大学实验动物学部[SYXK(滇)2020-0006],室温(22±2)℃,相对湿度(50±10)%,明暗周期为 12 h/12 h,小鼠自由饮水和摄食全价颗粒饲料。实验操作符合动物福利伦理要求,经昆明医科大学动物实验伦理委员会批准(KMMU20220812),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

恒古骨伤愈合剂(批号:20201111)购自云南克雷斯制药股份有限公司;小鼠胰岛素(Fasting insulin, FINS)、糖化血红蛋白 A1c(Glycated hemoglobin A1c,GHbA1c)酶联免疫吸附测定试剂盒(齐一生物科技(上海)有限公司);胶回收试剂盒(德国 qiagen 公司);Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(英国 Biolabs 公司);TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒(四川瑞博特生物科技有限公司)。血糖仪器(三诺生物股份有限公司);电泳仪(Tanon-EPS300,中国);凝胶成像仪(Tanon-2500,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与样本采集

小鼠适应性饲养 4 周后,将野生型小鼠作为对照组(wt 组)($n=6$),12 只 db/db 小鼠随机分为模型组(db 组)和恒古骨伤愈合剂治疗组(ok 组);治疗组以临床成人常用剂量(按 60 kg 计算),并按人和动物体表面积换算法折算等效剂量为 15.3 g/(kg·2 d),wt 组和 db 组小鼠给予等体积生理盐水。连续灌胃 12 周。给药前和给药 12 周各检测空腹血糖(禁食 12 h)1 次。给药 12 周后,3%的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,心脏取血离心后取血清,将收集到的血清 1000 r/min 离心 20 min,取上清保存于

-80℃。脱颈椎处死小鼠。无菌取盲结肠,分离内容物分装至 2 mL 无菌 EP 管中,每管样品量 0.5~2.0 g,液氮速冻,-80℃保存。

1.3.2 db/db 小鼠治疗后血清酶联免疫吸附(ELISA)检测

根据 ELISA 试剂盒说明书检测血清中小鼠胰岛素(FINS)和糖化血红蛋白(GHbA1c)水平。

1.3.3 肠道菌群 16S rDNA 测序

使用 Hipure Stool DNA Kits 提取小鼠肠内容物 DNA,对 16S rDNA V3+V4 区扩增,引物序列 F:5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3'。PCR 扩增程序为 95℃预变性 2 min;98℃变性 10 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 35 s,30 个循环;72℃延伸 5 min,扩增体系为 50 μL:10× Buffer KOD 5 μL,2.5 mmol/L dNPS 5 μL,Primer F 1.5 μL,Primer R 1.5 μL,KOD 酶 1.0 μL,加 ddH_2O 至 50 μL,DNA 模板 100 ng;用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 纯化 PCR 产物,使用 ABI StepOnePlus System 定量,利用 Illumina NovaSeq 测序平台测序,原始数据提交到 SRA 数据库,获得最终的 ASVs[7],对每个 ASV 的代表序列做物种注释。同时,对 ASVs 进行菌群多样性分析、差异分析及功能预测等。

1.4 统计学方法

采用软件 SPSS 22.0 进行分析,使用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量数据,多组间差异比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 T 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 恒古骨伤愈合剂降血糖作用

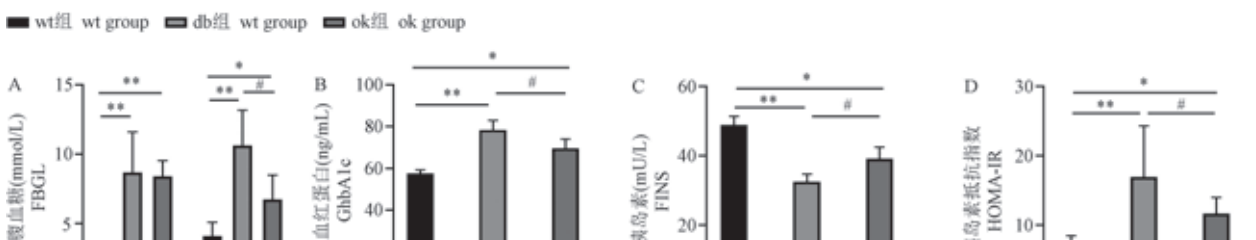
如图 1 所示,经恒古骨伤愈合剂治疗后,对小鼠空腹血糖(fasting blood glucose level,FBGL)、血清糖化血红蛋白、胰岛素含量进行检测,结果显示,给药前,db 组的空腹血糖显著高于 wt 组($P<0.01$)。提示 db 组小鼠为良好糖尿病模型。治疗后,db 组小鼠的空腹血糖显著高于 wt 组($P<0.01$)。ok 组空腹血糖显著低于 db 组($P<0.05$),但仍显著高于 wt 组($P<0.05$)。与 wt 组相比,db 组小鼠的 GHbA1c 和胰岛素抵抗指数(insulin resistance index,HOMA-IR)均极显著升高($P<0.01$),胰岛素水平显著降低,经恒古骨伤愈合剂治疗后,GHbA1c 和 HOMA-IR 均显著降低($P<0.05$),胰岛素水平显著升高($P<0.01$),但仍与 wt 组有显著差异($P<0.05$)。提示恒古骨伤愈合剂良好的降血糖及改善胰岛素抵抗作用。

2.2 肠道菌群测序(operational taxonomic units,OTU)和韦恩图

OTU 是对样本的有效序列以 97%的一致性聚类后进行物种注释的结果。3 组小鼠共有 1107 个 OTUs。韦恩图呈现小鼠间共有的、特有的 OTUs,其中 496 个 OTUs 为 3 组共有;ok 组与 wt 组共有的 OTUs 为 85 个,而与 db 组共有的 OTUs 仅为 55 个。

2.3 α 和 β 多样性分析

α 多样性体现菌群的丰富度和均匀性,其中 chao1/ACE 关注物种丰富度,值越大,物种越丰富。simpson/shannon/PD whole tree 表征物种分布的均



注:A:空腹血糖;B:糖化血红蛋白;C:胰岛素;D:胰岛素抵抗指数。与 wt 组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与 db 组比较,$^{\#}P<0.05$。

图 1 恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠血糖的治疗作用

Note. A, Fasting blood glucose level. B, Glycosylated hemoglobin. C, Fasting insulin. D, Insulin resistance index. Compared with wt group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with db group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 1 Therapeutic effect of Osteoking on blood glucose in db/db mice

匀度和多样性。Goods coverage 代表覆盖度，指数越大，测序覆盖度越高。稀释曲线表示测序数据的合理性，曲线趋平坦，数据趋合理。与 wt 组小鼠相比，db/db 小鼠菌群的丰富度和多样性均降低，治疗后有所增加（表 1）。各组 goods coverage 均大于 99.7%，稀释曲线平缓，表明样本中的物种均被检测到（图 2A）。

基于 OTU 水平的主坐标分析（principal coordinates analysis，PCoA）中，样本距离的远或近，分别对应物种组成结构的差异性或一致性。本研究中 3 组小鼠肠道菌群 PCoA 分析如图 2B，ok 组介于 db 组与 wt 组间，提示恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠肠道菌群物种组成结构有一定调节。

2.4　门与属水平的菌群丰度

门水平上，db 组 db/db 小鼠优势门为厚壁菌、拟杆菌、疣微菌、变形菌、脱铁杆菌、放线菌、黑色素杆菌等。属水平上，小鼠盲结肠以阿克曼菌（*Akkermansia*）、杜氏乳杆菌（*Dubosiella*）、螺杆菌（*Helicobacter*）、拟杆菌（*Bacteroides*）、乳酸杆菌（*Lactobacillus*）、经黏液真杆菌（*Blautia*）、副拟杆菌（*Parabacteroides*）、另枝菌（*Alistipes*）等为主。厚壁菌门和拟杆菌门的比值表明了代谢性疾病的状况，如糖脂代谢、骨质疏松[8]。变形菌门与炎性反应相关。与 wt 组比较，模型组厚壁菌门、脱铁杆菌门、放线菌门和阿克曼菌属、杜氏乳杆菌属丰度值降低，而疣微菌门、变形菌门、黑色素杆菌门和螺杆菌属、拟杆菌属、副拟杆菌属、另枝菌属丰度增加。在门和属水平，治疗均改善了以上情况，提示恒古骨伤愈合剂缓解 db/db 小鼠肠道菌群失调。

2.5　差异菌筛选

通过 *T*-test 分析组间菌群的差异，与 wt 组比较，db 组中有益微生物瘤胃菌科（*Unidentiled_Ruminococcaceae*）降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）（图 3A）。恒古骨伤愈合剂治疗后 db/db 小鼠的马文氏菌属（*Marvinbryantia*）升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）（图 3B）。

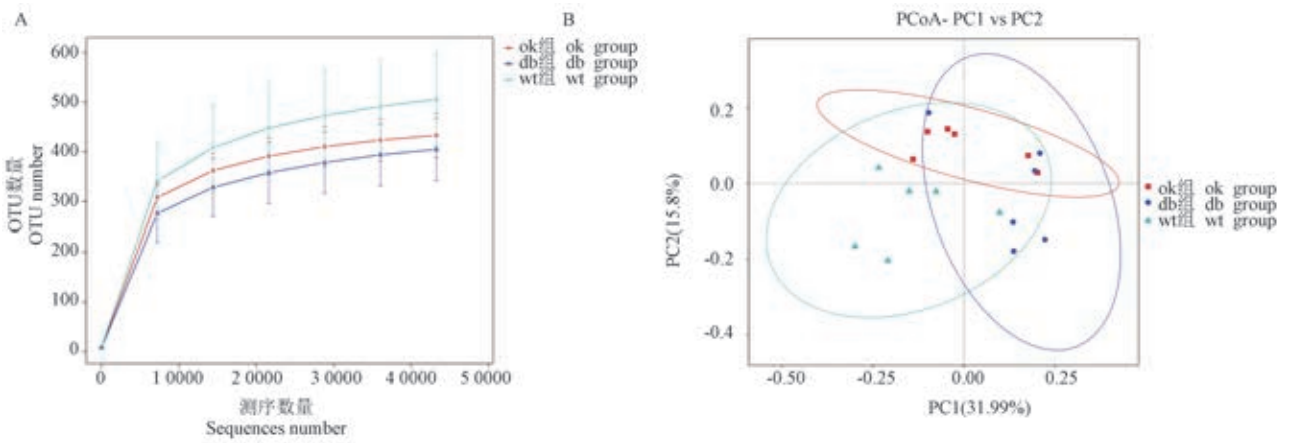
2.6　菌群功能预测

使用 PICRUSt 软件对小鼠样本进行 KEGG 通路功能注释，韦恩图显示 3 组小鼠共有 5028 个 OTUs；db 组 db/db 小鼠与 wt 组共有的 OTUs 仅为 64 个，ok 组与 wt 组共有的 OTUs 为 251 个。*T*-test 分析组间菌群功能的差异发现，小鼠菌群的功能差

表 1　3 组小鼠肠道菌群 α 多样性指数

Table 1　α diversity index of intestinal flora in the three groups of mice

组别 Groups	chao1	ACE	shannon	simpson	PD whole tree	Goods coverage
db 组 db group	438.65	446.06	5.71	0.93	28.41	0.999
wt 组 wt group	553.11	558.75	6.18	0.96	39.77	0.998
ok 组 ok group	457.69	461.59	6.03	0.94	31.19	0.999

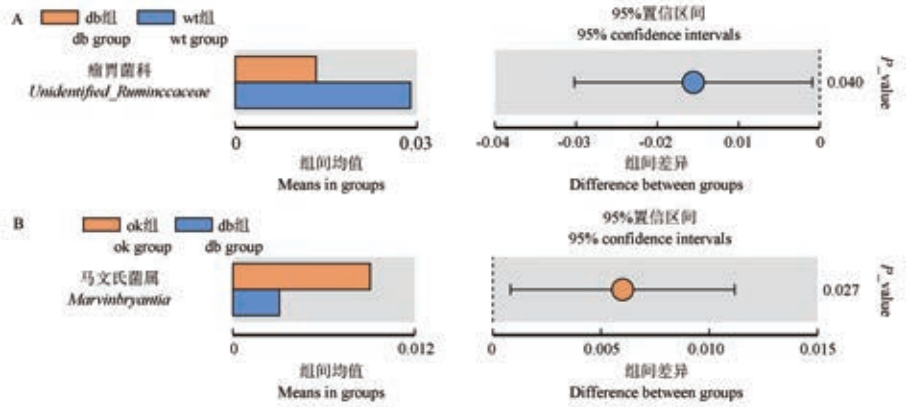


注：A：3 组小鼠肠道菌群稀释曲线；B：3 组小鼠肠道菌群主坐标分析。

图 2　α 和 β 多样性分析

Note. A, Dilution curve of intestinal flora of mice in 3 groups. B, Principal coordinate analysis of intestinal flora in the 3 groups of mice.

Figure 2　α and β diversity analysis



注：A：db 组与 wt 组的差异菌；B：ok 组与 db 组差异菌属。

图 3 差异菌筛选

Note. A, Different bacteria between db group and wt group. B, Different bacteria in ok group and db group.

Figure 3 Screening of different bacteria

异主要在脂类、碳水化合物和氨基酸代谢以及次生代谢产物合成、聚糖生物合成、代谢等方面。与 wt 组比较，db/db 小鼠菌群鞘脂代谢（sphingolipid metabolism）（$P=0.011$）、氰胺酸代谢（cyanoamino acid metabolism）（$P=0.016$）、半乳糖代谢（galactose metabolism）（$P=0.017$）、苯丙酸生物合成（phenylpropanoid biosynthesis）（$P=0.019$）、其他聚糖降解（other glycan degradation）（$P=0.020$）、肽酶（peptidases）（$P=0.040$）显著降低；而硫中继系统（sulfur relay system）（$P=0.007$）、丙酸代谢（propanoate metabolism）（$P=0.012$）、甘油磷脂代谢（glycerophospholipid metabolism）（$P=0.013$）、丙酮酸代谢（pyruvate metabolism）（$P=0.015$）、脂肪酸生物合成（fatty acid biosynthesis）（$P=0.021$）、四环素生物合成（tetracycline biosynthesis）（$P=0.026$）、赖氨酸降解（lysine degradation）（$P=0.028$）显著升高。恒古骨伤愈合剂治疗缓解了 db/db 小鼠菌群 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢（$P=0.014$）、鞘脂代谢（$P=0.031$）、半乳糖代谢（$P=0.046$）的降低；抑制了模型小鼠菌群赖氨酸降解（$P=0.039$）、硫中继系统（$P=0.043$）、丙酸代谢（$P=0.048$）的升高。

3 讨论

恒古骨伤愈合剂是由红花、黄芪、三七等 9 味单药组成的复方制剂，未见其对糖尿病作用的相关报道。但其 9 个组分药中的 8 个具有降糖的药理作用，如陈皮提取物抑制 α-葡萄糖苷酶[9]。红花羟基红花黄色素 A 和羟基山萘酚-葡萄糖苷是红花最主要的降糖活性成分[10]。杜仲多糖可通过提高免疫力与抗氧化能力降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖。三七和人参中的皂苷、多肽、多糖等，如人参皂苷 Rb3 降血糖、降血脂、调节胰岛素水平和抗氧化。黄芪甲苷通过抑制肝葡萄糖-6-磷酸酶降血糖[11]。洋金花中的萜类化合物，如倍半萜和黄酮类化合物，具有较强的抗氧化和降糖作用[12]。鳖甲煎丸通过基质金属蛋白酶 9 改善糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠血脂及内皮细胞功能[13]。本实验表明恒古骨伤愈合剂降低了 db/db 小鼠的空腹血糖、血清糖化血红蛋白和胰岛素抵抗指数，升高 db/db 小鼠血清胰岛素水平，这是首次报道恒古骨伤愈合剂的降血糖效应。

肠道微生物参与多种物质代谢，被称为第二基因组[14]。大量研究发现糖尿病患者肠道菌群发生改变。较高的微生物群 α 多样性，以及更多的丁酸产生肠道细菌，与较少的 2 型糖尿病和较低的胰岛素抵抗相关。饲喂高脂饲料的胖小鼠血清脂多糖增加，升高的肿瘤坏死因子与胰岛素抵抗和血脂正相关，肠变形菌门增加和放线菌门减少[15]。低能量食物降低小鼠体重和肠疣微菌门，增加放线菌门。将瘦小鼠粪菌移植于肥胖小鼠，显著降低其体脂和肠拟杆菌门，增加厚壁菌门和放线菌[16]。对 193 例 2 型糖尿病患者研究发现 12 组细菌与胰岛素抵抗指数或 2 型糖尿病相关，其中马文氏菌属（*Marvinbryantia*）与较低的胰岛素抵抗指数 HOMA-IR 相关[17]。与以上报道相似，本实验中观察到的 24 周龄 2 型糖尿病 db/db 小鼠肠道放线菌门、疣微菌门和厚壁菌门降低，变形菌门相对丰度增加。恒古骨伤愈合剂治疗后，小鼠肠道菌群失衡得到缓

解,其中马文氏菌属丰度显著升高($P<0.01$),推测恒古骨伤愈合剂通过改善 db/db 小鼠肠道菌群降低胰岛素抵抗发挥降血糖作用。

此外,菌群功能预测结果表明 db/db 小鼠菌群的功能差异主要为脂类、碳水化合物和氨基酸代谢,次生代谢物合成、聚糖生物合成、代谢等。恒古骨伤愈合剂抑制了 db/db 小鼠菌群 D-精氨酸和 D-鸟氨酸代谢、鞘脂代谢、半乳糖代谢的降低和赖氨酸降解、硫中继系统、丙酸代谢的升高。推测菌群失调引起相关功能变化,进而影响肠道微环境,增加菌群紊乱。恒古骨伤愈合剂可重塑 2 型糖尿病 db/db 小鼠肠道菌群,同时改善 2 型糖尿病引起的肠粪便代谢产物的异常表达,恢复糖脂代谢紊乱,实现降糖功效。这些发现有助于深入了解 2 型糖尿病的病因、发病机制和治疗。但相关机制仍需进一步研究验证。

综上,恒古骨伤愈合剂具有降血糖功效,可改善 2 型糖尿病 db/db 小鼠肠道微生态平衡,其中马文氏菌属丰度显著升高。本研究为拓展彝药恒古骨伤愈合剂药理疗效提供基础材料和新思路。

参考文献:

[1] Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults [J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9085.

[2] Wu Y, Zhou A, Tang L, et al. Bile acids: key regulators and novel treatment targets for type 2 diabetes [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 6138438.

[3] Guo M, Ricardo SD, Deane JA, et al. A stereological study of the renal glomerular vasculature in the db/db mouse model of diabetic nephropathy [J]. J Anat, 2005, 207(6): 813-821.

[4] 赵丹丹, 高思华, 穆倩倩, 等. 肝脾肾同调辨治 2 型糖尿病的理论依据与特色 [J]. 中医杂志, 2014, 55(3): 205-208.

[5] 王景霞, 陈卫衡, 陈绍红, 等. 基于“异病同治”理论探讨恒古骨伤愈合剂在 4 种骨伤科疾病治疗中的应用 [J]. 中医正骨, 2021, 33(3): 34-39.

[6] 赵静. 崔德芝教授治疗老年 2 型糖尿病及其常见血管并发症的用药规律探讨 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.

[7] Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis [J]. ISME J, 2017, 11(12): 2639-2643.

[8] Zhu Y, Liu S, Mei F, et al. *Tilapia nilotica* head lipids improved bone loss by regulating inflammation and serum metabolism through gut microbiota in ovariectomized rats [J]. Front Nutr, 2022, 8: 792793.

[9] 谭乾开, 李裕琳, 唐小文. 陈皮提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用研究 [J]. 云南化工, 2019, 46(5): 63-65.

[10] 武鹤婷, 赛那瓦尔·芒思尔, 高彦华, 等. 红花降糖活性成分谱效关系研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(2): 188-197, 255.

[11] 梁芳, 谢丽莎, 张小军, 等. 降血糖中药的研究进展 [J]. 海峡药学, 2015, 27(3): 15-17.

[12] 朱金莲, 邓颖嘉, 何燕珊, 等. 洋金花的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 201-209.

[13] 符宇, 余海滨, 李真, 等. 鳖甲煎丸对糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠血脂、血管内皮功能以及基质金属蛋白酶 9 的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(5): 1010-1013.

[14] Zeevi D, Korem T, Godneva A, et al. Structural variation in the gut microbiome associates with host health [J]. Nature, 2019, 568(7750): 43-48.

[15] Li S, Li JH, Mao GZ, et al. Effect of the sulfation pattern of sea cucumber-derived fucoidan oligosaccharides on modulating metabolic syndromes and gut microbiota dysbiosis caused by HFD in mice [J]. J Funct Foods, 2019, 55: 193-210.

[16] Wang S, Huang M, You X, et al. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 13037.

[17] Chen Z, Radjabzadeh D, Chen L, et al. Association of insulin resistance and type 2 diabetes with gut microbial diversity: a microbiome-wide analysis from population studies [J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(7): e2118811.

〔收稿日期〕2023-02-10

从美丽,刘涛,费璇,等. miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤中的作用研究初探[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 34-41.
Cong ML, Liu T, Fei X, et al. Role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33 (12): 34-41.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.006

miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤中的作用研究初探

从美丽[1,2],刘 涛[1*],费 璇[2],周 蓓[2],孙建新[2],赵效国[2]

(1.新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学动物实验中心, 乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 探讨 miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤病变过程中的作用及其机制。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分成模型组和对照组,模型组灌胃 56%白酒,对照组灌胃蒸馏水,连续 8 周;解剖取肝组织,采用大鼠 miRNA 芯片对肝中 miRNAs 进行检测,对其表达量进行分析,对差异 miRNA 进行靶基因预测,并采用 Gene Ontology(GO)和 KEGG Pathway 富集分析了解差异 miRNA 靶基因的功能,使用 Cytoscape 构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络进一步筛选调控关键 miRNA 与关键通路,RT-qPCR 对挑选的 miRNA 进行表达量验证分析。**结果** 通过比较分析模型组和对照组芯片数据,共筛选出差异表达 miRNA 12 个($P<0.05$, *Fold change*≥2),其中上调 2 个,下调 10 个。差异 miRNA 靶基因 GO 分类注释显示,差异 miRNA 与信号转导、代谢过程、抗氧化活性、细胞杀伤、酶调控活性、生物调控等生物功能密切相关。差异 miRNA 靶基因 KEGG Pathway 通路分析显示,AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、Hippo 信号通路、Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗、Ras 等信号通路可能在酒精性肝损伤病变过程中发挥着重要的调控作用。通过构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络筛选出的 Hub miRNA 和通路有 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297、Hippo 信号通路、癌症、PI3K-Akt 信号通路、AMPK 信号通路等。qRT-PCR 结果显示挑选验证 miRNA 表达变化趋势和基因芯片结果一致。**结论** 本研究建立了大鼠酒精性肝损伤 miRNA 表达谱,提示 miR-145-5p、miR-107-3p 及 miR-297 可能在肝酒精性病变过程中起着重要的作用。

【关键词】 酒精性肝损伤;miRNA;靶基因;信号通路
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0034-08

Role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats

CONG Meili[1,2], LIU Tao[1*], FEI Xuan[2], ZHOU Bei[2], SUN Jianxin[2], ZHAO Xiaoguo[2]
(1. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China.
2. Animal Laboratory Center of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into model and control groups. The model group was gavaged with 56% liquor and the control group was gavaged with distilled water for 8 weeks. Liver tissue was collected, miRNAs were analyzed, and target genes of differentially expressed miRNAs were predicted by a rat miRNA chip. Gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis were used to understand the function of differentially expressed miRNA target genes. A differentially expressed miRNA-mRNA-pathway regulatory network was constructed using Cytoscape to further screen important regulatory miRNAs versus important pathways. RT-qPCR was performed for selected miRNAs to validate the expression analysis. **Results** Twelve differentially expressed miRNAs ($P<0.05$, *Fold change*≥2) were screened out, including two upregulated and 10 downregulated miRNAs by comparative analysis of microarray data between model and

[**基金项目**]新疆维吾尔自治区自然科学基金联合基金项目(2021D01C247)。
[**作者简介**]从美丽(1987—),女,硕士,实验师,研究方向:医学实验动物模型及药理研究。E-mail:congmeili@126.com
[**通信作者**]刘涛(1974—),女,博士生导师,教授,研究方向:新疆特色药食兼用植物应用基础研究。E-mail:xjmult@163.com

control groups. GO classification annotation of differential miRNA target genes showed close associations between differentially expressed miRNAs and biological functions such as signal transduction, metabolic processes, antioxidant activity, cell killing, enzyme regulatory activity and biological regulation. Differentially expressed miRNA target genes in KEGG pathway analysis revealed that the AMPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Hippo signaling pathway, Wnt signaling pathway, cancer, autophagy, insulin resistance, Ras signaling pathway, and other signaling pathways might play major regulatory roles in alcoholic liver injury lesions. Hub miRNAs and pathways screened by constructing the differentially expressed miRNA-mRNA-pathway regulatory network were miR-145-5p, miR-107-3p, miR-297, Hippo signaling pathway, cancer, PI3K-Akt signaling pathway, and AMPK signaling pathway. qRT-PCR validated the gene expression trends, and gene chip result were consistent. **Conclusions** We established an miRNA profile of alcoholic liver injury in rats, which suggests that miR-145-5p, miR-107-3p, and miR-297 play major roles in the process of alcoholic liver pathology.

【**Keywords**】 alcoholic liver injury; miRNA; target genes; signaling pathways

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

酒精性肝损伤(alcoholic liver disease,ALD),通常是由长期大量饮酒引起的疾病,包括早期阶段的脂肪变性、酒精性肝炎、肝硬化,甚至晚期的肝癌[1-2]。酒精性肝病已成为全世界的一个主要公共卫生问题,也是全世界发病和死亡的主要原因,日益引起人民的高度重视[3]。大量饮酒是酒精性肝损伤的主要因素,也是全世界发病率和死亡率的主要危险因素,并且我国酒精消费量逐年呈上升趋势[4]。

miRNA 是一种短链非编码 RNA,可以通过抑制靶基因翻译或促进其降解来调控其表达[5-6]。在以往人的研究中,miRNA 几乎参与生命活动中所有的生理和病理过程,包括免疫进程、炎症反应、信号转导、代谢过程、肿瘤发生、细胞的分化和增殖等[7]。很多研究表明 miRNA 在各种疾病发生发展过程中有着十分重要的作用,并且作为关键分子成为疾病诊断和治疗的潜在生物标志物[8]。目前,miRNA 的作用研究较多应用于肝炎、肝硬化、肝纤维化以及肝癌等疾病中[9],但在大鼠酒精性肝损伤研究较少,本研究通过灌胃酒精构建大鼠酒精性肝损伤模型,检测分析肝中 miRNA 的表达变化情况,以探究酒精性肝损伤发生发展的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 30 只(SPF 级),7~8 周龄(体重 210~230 g),购自新疆医科大学动物实验中心[SCXK(新)2018-0002],所有实验在实验中心屏障环境中操作完成[SYXK(新)2018-0003],实验获得新疆医科大学实验动物伦理委员会的批准(IACUC20200407-02),饲养和实验过程中按实验动物 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

56°牛栏山二锅头(北京顺鑫农业股份有限公司,批号:20191126);miRNeasy Mini Kit(德国 QIAGEN 公司,批号:271004);miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit(南京诺唯赞公司,批号:MR201);GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix(北京金沙公司,批号:SQ410);Agilent Rat miRNA(8 * 15K)V21.0 芯片(design ID:070154)(Agilent,US)。NanoDrop ND-2000 分光光度计购自美国赛默飞公司;Agilent Bioanalyzer 2100 购自美国安捷伦公司;Real-time PCR 仪器购自美国 ABI 公司;高速低温离心仪器购自德国艾本德公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型构建

30 只雄性 SD 大鼠随机分成两组:模型组(model,M)和对照组(control,C),模型组大鼠白酒灌胃,剂量为 10 mL/(kg·d);对照组大鼠灌胃相同剂量的蒸馏水。连续 8 周后,禁食 12 h,处死解剖,采集肝组织,去除残留血液后液氮速冻保存。

1.3.2 肝 miRNA 的提取

参照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒流程与步骤,取 20 mg 肝组织,液氮研磨提取 miRNA。所得产物 miRNA 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计进行定量,Agilent Bioanalyzer 2100 进行完整性检测,以 RIN ≥7 且 28S/18S≥0.7 作为质量合格标准。

1.3.3 芯片实验

质控合格的 miRNA 产物采用 Agilent Rat miRNA(8 * 15K)V21.0 芯片检测肝组织中 miRNA 表达水平。对两组样本 miRNA 分子进行荧光标记,而后将荧光标记的 miRNA 样本置于杂交炉中进行

芯片杂交,杂交完成后放入洗片缸中洗片。

1.3.4 靶基因富集分析

GO 分析主要涉及生物学过程、细胞组分和分子功能,对差异表达 miRNA 靶基因进行 GO 条目注释分析和 KEGG 通路分析。对筛选出的差异 miRNA 靶基因,利用 GO 数据库和 KEGG Pathway 数据库展开分析。数据筛选标准均选择 $P<0.05$ 作为显著性富集条件,筛选后的数据纳入 GO 条目注释与 KEGG Pathway 展开分析。

1.3.5 构建差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络

差异 miRNA 数据导入 miRWalk 软件进行靶基因预测分析,以结合能>26 为标准条件,将过滤筛选出的靶基因导入 String 数据库,在线计算,得出靶蛋白间的互作关系(degree>1,置信度≥0.4 为筛选标准),使用 Cytoscape 软件对 KEGG Pathway 结果数据和 String 计算得出的结果数据进行综合分析,构建调控网络,获得可视化调控网络。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 实验

对筛选的差异 miRNA 进行 RT-qPCR 验证实验,使用 U6 为内参基因,按照 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书步骤操作,将抽提到的 RNA 反转录为 cDNA,反应体系为 20 μL,其中 GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,cDNA 2 μL,ddH_2O 补至 20 μL。实验采用两步法:95℃ 30 s,95℃ 10 s,60℃ 10 s,72℃ 30 s(40 个循环)。实验数据使用 ΔΔCt 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法

芯片数据处理采用 Microarray Scanner 进行数据扫描,使用 Feature Extraction software 11.5 软件,对上述扫描数据进行转换,转换之后的数据为原始数据,使用 R 语言程序包 Quantile 算法,导入质控合格的数据,进行归一化处理。最终所得数据处理均使用 t 检验统计学方法,统计学差异分析以 P 值和 *Fold change*(*FC*)值作为主要参照指标,以 $P<0.05$ 且 $FC\geq2$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 差异 miRNA 表达分析

分析模型组和对照组间差异表达 miRNA,以 $P<0.05$,差异倍数 $FC\geq2$ 或 $FC\leq0.5$ 为筛选差异标准;模型组显著差异表达 miRNA 有 12 个,其中上调表达的 miRNA 有 2 个,下调表达的有 10 个。差异表达变化较为显著的有 5 个:上调的 miR-107-3p,下调的 miR-292-5p、miR-295-5p、miR-297 和 miR-291b(表 1)。图 1 为两组间差异表达 miRNA 聚类热图。

2.2 差异 miRNA 靶基因 GO 富集结果

采用 miRWalk 2.0 预测差异表达 miRNA 靶基因,以结合能≥26 为标准阈值,共预测到 946 个靶基因。为了更深入地探讨差异 miRNA 可能发挥作用的生物学过程,将预测到的 miRNA 靶基因导入相关软件做进一步的 GO 富集分析。结果显示,分子功能、生物学过程与细胞组成 3 个分类被不同程度的富集,主要涉及代谢过程、抗氧化活性、信号转导、生物调控、细胞杀伤、酶调控活性等功能。图 2 列举了差异表达 miRNA 靶基因参与的部分主要 GO 条目。

2.3 差异 miRNA 靶基因 Pathway 富集分析

为进一步解析肝酒精性损伤病变过程中可能参与的生物学过程、信号通路等,将筛选出的显著差异表达的 miRNA 靶基因导入 KEGG Pathway 数据库,进行富集分析。结果显示,有 65 个信号通路被显著富集($P<0.05$),主要包括 Hippo 信号通路、

表 1 差异表达 miRNA 信息表

Table 1 Information of differentially miRNA

miRNA	*P* 值 *P* value	差异倍数 *Fold change*	表达 Expression
miR-107-3p	2.57E-02	2.42	上调 Up-regulation
miR-122-5p	1.85E-03	2.03	上调 Up-regulation
miR-295-5p	6.14E-04	7.62	下调 Up-regulation
miR-292-5p	4.28E-06	5.53	下调 Up-regulation
miR-297	1.35E-03	4.33	下调 Up-regulation
miR-291b	3.00E-07	3.46	下调 Up-regulation
miR-291a-5p	6.89E-04	2.81	下调 Up-regulation
miR-145-5p	5.90E-05	2.76	下调 Up-regulation
miR-29b-5p	2.54E-03	2.61	下调 Up-regulation
miR-294	3.71E-04	2.35	下调 Up-regulation
miR-505-3p	6.99E-08	2.25	下调 Up-regulation
miR-293-5p	6.79E-04	2.09	下调 Up-regulation

PI3K-Akt 通路、AMPK 通路、Wnt 通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗、Ras 通路等。图 3 展示了差异 miRNA 靶基因参与的排名前 20 的信号通路。

2.4　差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络构建

使用 String 蛋白互作在线软件，对差异表达 miRNA 靶蛋白间的互作关系进行分析，同时联合分析 Pathway 富集结果。分析结果表明，参与调控与肝损伤相关信号通路的 miRNA 9 个（图 4），从图 4 可以得出以下结论：miR-107-3p、miR-145-5p、miR-297 位于调控网络的 Hub 位置，提示 miR-107-3p、miR-145-5p、miR-297 为酒精性肝损伤过程中的重要 miRNA。同时，Hippo、PI3K-Akt、AMPK 通路、癌症、Wnt 通路为重要信号通路，有多个 miRNA 和靶基因参与调控。

2.5　荧光定量 PCR 分析

如图 5 所示，为检验 miRNA 芯片结果的准确

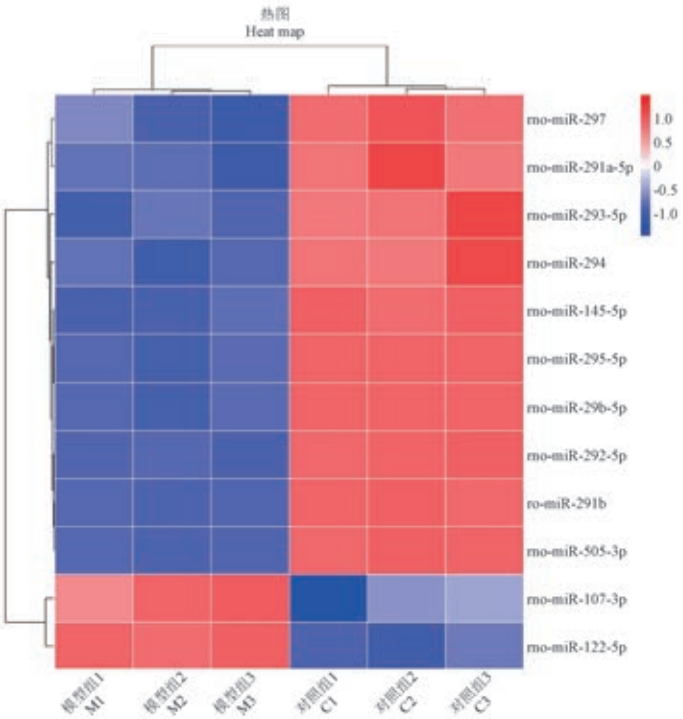


图 1　模型组与对照组差异 miRNA 的聚类热图

Figure 1　Cluster of the miRNAs in the model and the control group

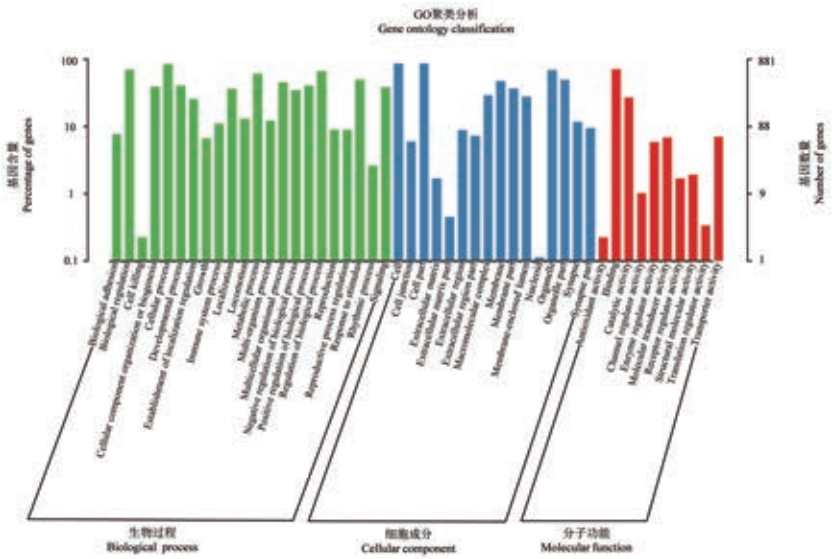


图 2　差异表达 miRNA 参与的 GO 条目

Figure 2　GO terms of differentially miRNA involved

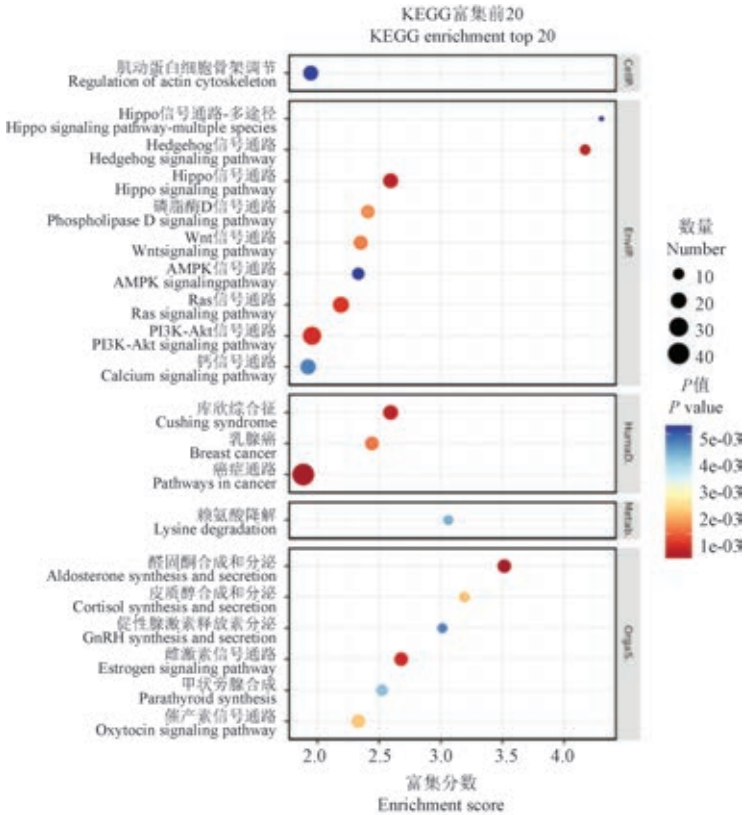


图 3 差异 miRNA 参与的部分信号通路

Figure 3 Part signal pathways of differentially miRNAs

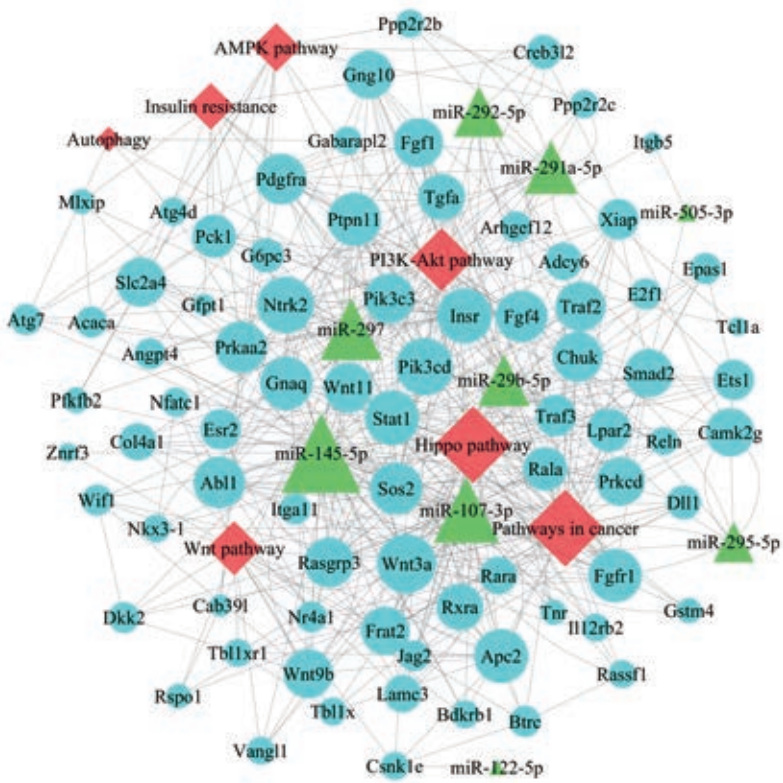


图 4 差异 miRNA-mRNA-Pathway 调控网络

Figure 4 Differentally miRNA-mRNA-Pathway interaction network

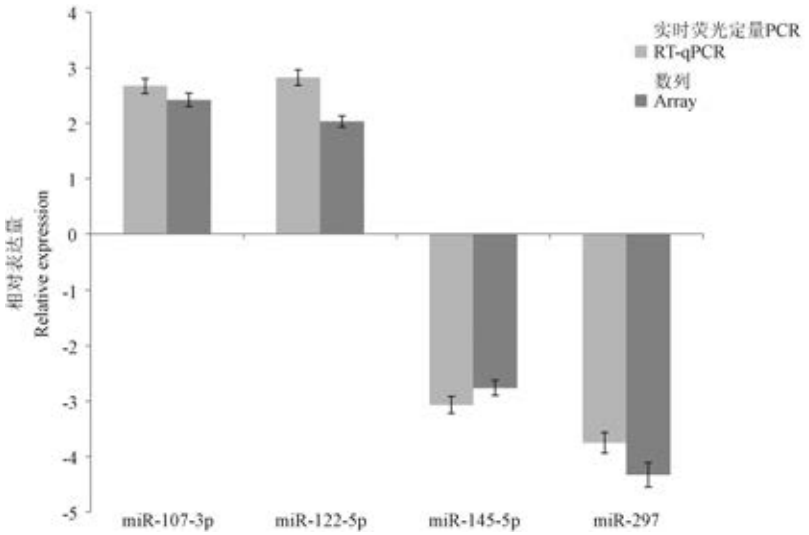


图 5 差异 miRNA 的 RT-qPCR 实验结果

Figure 5 RT-qPCR results of differentially expressed miRNAs

性,挑选了 4 个 miRNA,其中上调表达的 miR-107-3p 与 miR-122-5p;下调表达的 miR-145-5p 与 miR-297;使用 U6 为内参基因,进行 RT-qPCR 实验扩增这些 miRNA,验证芯片数据是否准确。结果显示两组间 miRNA 表达变化模式与芯片实验结果相符,证实本实验中使用 miRNA 芯片技术检测筛选出的差异 miRNA 是准确可靠的。

3 讨论

ALD 是全球慢性病的主要原因,更是我国严重的健康问题。从简单的脂肪变性到肝炎再到肝硬化和肝癌,饮酒是其主要危险因素[10]。酒精是一种真正的肝毒素,当酒精及中间代谢产物在肝内大量累积,会引起肝慢性损伤。已有研究表明,乙醇代谢相关的氧化应激、谷胱甘肽消耗、细胞损伤、炎症、再生、细菌易位在酒精性肝损伤的发病机制中具有重要作用[11-12]。尽管对酒精性肝病的发病机制进行了广泛研究,但仍然没有靶向疗法可用。本研究通过构建大鼠酒精性肝损伤模型,探讨 miRNAs 在酒精性肝损伤过程中的分子机制。

miRNAs 是一类长度约为 21~25 个核苷酸的非编码小 RNA,通过结合靶基因,调控靶基因降解或抑制翻译,在转录过程中对靶基因发挥抑制作用,并逐渐成为包括肝癌、肝纤维化、ALD 在内的多种疾病的潜在生物标志物,但 miRNA 作为 ALD 诊断或者治疗工具的临床应用尚未取得很好的研究[13-15]。已有研究证实了 ALD 发生与一些 miRNA 之间的关系,miR-34a 和 miR-200a 在 ALD 发展过程中诱导肝细胞凋亡[16-17],而 miR-26a 可以增加自噬,在 ALD 发挥保护作用[18];miR-21 可以抑制酒精诱导的细胞凋亡[19]。然而 miRNA 在大鼠酒精性肝损伤病变过程中发挥的潜在作用机制目前尚不明确,为了深入探讨 miRNA 的具体作用机制,寻找 miRNA 的作用靶点,开展本实验研究。实验中建立 ALD 大鼠动物模型,收集样本并用于相关检测,miRNA 芯片检测结果显示,与对照组相比,模型组差异表达 miRNA 有 12 个,提示大鼠酒精性肝损伤的发生发展是由多个表达异常的 miRNA 参与的复杂的生物学调控过程,研究差异表达 miRNAs 在肝损伤病理进展中的作用,能够为寻找明确的药物治疗作用靶点提供思路和参考。

差异表达的 miR-122 已经被证实与酒精性肝损伤有关,在酗酒后的健康个体和肝损伤的小鼠模型中,已经发现 miR-122 在血液中含量升高[20];另有研究表明,肝细胞中 miR-122 的恢复可能对酒精性肝病的发展具有保护作用[21]。此外,miR-122 与肝纤维化的发展和进展的关系已经在体外研究中得到证实,通过靶向 P4HA1 来调节肝星状细胞(HSC)增殖和胶原蛋白的产生[22]。先前的一项研究发现,ALD 患者肝中 miR-107 表达增加,但在病毒性肝炎受试者和健康对照中却没有上升[23]。miR-291b 通过负调控腺苷 5'-单磷酸(AMP)激活的蛋白激酶 α1 促进肝脂质生成[24];miR-291b 通过靶向调控 Tollip,进而抑制 TLR4-NF-κB 信号通路,从而诱发机体更多的肝炎症,此外,透明质酸使 miR-291b/Tollip 途径正常化,导致单核细胞/巨噬细胞通过

TLR4 对乙醇诱导的活化降低敏感性[25]。这些 miRNA 在酒精性肝损伤病变过程中的表达情况与我们 miRNA 芯片检测结果相符,说明他们在酒精性肝损伤病变过程中发挥着重要作用。

对差异表达 miRNA GO 富集分析结果显示,差异 miRNA 靶基因主要与抗氧化、信号转导、生物调控、代谢、酶活性调控、细胞杀伤等生物学功能相关。酒精能促使细胞的脂质过氧化发生,使细胞产生的 ROS 增加,同时使得肝中的氧化应激增强,损伤线粒体 DNA 进而诱导细胞凋亡,是酒精性肝损伤疾病的发生与发展中的关键诱因[26]。酒精进入机体,酒精会在酒精脱氢酶的作用下转化为乙醛,而后有毒代谢物乙醛会被线粒体脱氢酶进一步氧化成乙酸盐[27]。生物调控、信号转导也是肝损伤病变过程中的一个重要方面。KEGG 分析结果显示,酒精性肝损伤病变过程中 miRNA 主要调控 AMPK、PI3K-Akt、Hippo、Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗等信号通路。据报道,酒精通过以 AMPK 通路依赖性方式激活 SREBP-1c 上调 LIPIN1,导致肝细胞中脂质积累增加[28]。有研究证实,长期大量饮酒后,乙醇会对肝细胞内 IRS1/2、PI3K、AKT 等蛋白的表达或磷酸化产生影响,乙醇能激活 mTORC1 活性,进而抑制 PI3K-Akt 信号通路,从而引起下游相应信号因子的活化或抑制[29]。Hippo 信号通路在哺乳肝细胞命运、细胞凋亡、肝生长发育、肝癌发生发展以及肝再生等生理和病理过程中都发挥了很重要的作用[30]。Wnt 信号通路、癌症、自噬、胰岛素抵抗等机制在酒精性肝损伤病变过程中的作用均已被研究证明[31-33]。

酒精性肝损伤的发生发展牵涉到多个复杂基因网络调控的变化,本研究通过 KEGG Pathway 信号通路结合蛋白互作调控网络,多层次联合分析 miRNA 在酒精性肝损伤发生发展过程中的表达变化,探寻 miRNA 可能的作用机制,更好地揭示 miRNA、靶基因以及信号通路三者间的调控关系。通过分析筛选出 3 个关键 Hub miRNA,分别为 miR-145-5p、miR-107-3p 与 miR-297,以及相应的关键信号通路:Hippo 通路、癌症、PI3K-Akt AMPK、Wnt 通路,提示 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297 可通过这几个关键信号通路调控下游目标分子进而影响酒精性肝损伤发生发展。

本研究针对大鼠酒精性肝损伤模型 miRNAs 的表达变化进行初步探讨,通过实验及后期数据分析,筛选出了具有关键作用的 Hub miRNA 与信号通路,以期为酒精性肝损伤进一步的深入研究,包括后期靶标诊断、治疗研究等,提供重要的参考资料。提示 miR-145-5p、miR-107-3p、miR-297 可通过 Hippo、PI3K-Akt、AMPK、Wnt 等信号通路调控下游靶基因或靶蛋白,参与酒精性肝损伤的发生发展,但相关信号通路的的调控机制仍需更深入的研究和进一步的实验验证。

参考文献:

[1] 杨冬晗, 张文龙, 侯瑞丽, 等. Toll 样受体 4 信号途径在酒精性肝损伤中的作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 126-130.

[2] 林惠武, 林燕琼, 林志辉. 双歧杆菌对慢性酒精性肝损伤大鼠肝功能保护作用的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 760-765.

[3] Sharma P, Arora A. Clinical presentation of alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease: spectrum and diagnosis [J]. Transl Gastroenterol Hepatol, 2020, 5: 19.

[4] World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018 [M]. Geneva: World Health Organization; 2018.

[5] 梁紫君, 张雪儿, 黄健, 等. miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 132-137.

[6] 从美丽, 古丽拉莱·多力坤, 周蓓, 等. 应用基因芯片技术分析甘草酸改善大鼠酒精性肝损伤的作用机制 [J]. 医学动物防制, 2022, 38(4): 374-378.

[7] Hammond SM. An overview of microRNAs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14.

[8] Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(9): 542-552.

[9] Szabo G, Csak T. Role of microRNAs in NAFLD/NASH [J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(5): 1314-1324.

[10] Kong LZ, Chandimali N, Han YH, et al. Pathogenesis, early diagnosis, and therapeutic management of alcoholic liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2712.

[11] Wang WJ, Xiao P, Xu HQ, et al. Growing burden of alcoholic liver disease in China: a review [J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(12): 1445-1456.

[12] Chu H, Duan Y, Lang S, et al. The Candida albicans exotoxin candidalysin promotes alcohol-associated liver disease [J]. J Hepatol, 2020, 72(3): 391-400.

[13] 叶蓓, 李曼, 程翔, 等. miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经损伤中的保护作用与机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 31-37.

[14] Wang Y, Yu D, Tolleson WH, et al. A systematic evaluation of microRNAs in regulating human hepatic CYP2E1 [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 138: 174-184.

[15] Afonso MB, Rodrigues PM, Simão AL, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers in non-alcoholic fatty liver

disease and hepatocellular carcinoma [J]. J Clin Med, 2016, 5 (3): 30.

[16] 从美丽, 周蓓, 吕晓敏, 等. 大鼠酒精性肝损伤模型 RNA 可变剪切变化分析 [J]. 热带医学杂志, 2018, 18(8): 1023-1026.

[17] Zhao YX, Sun YY, Huang AL, et al. microRNA-200a induces apoptosis by targeting ZEB2 in alcoholic liver disease [J]. Cell Cycle, 2018, 17(2): 250-262.

[18] Han W, Fu X, Xie J, et al. MiR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury [J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(9): 1045-1055.

[19] Francis H, McDaniel K, Han Y, et al. Regulation of the extrinsic apoptotic pathway by microRNA-21 in alcoholic liver injury [J]. J Biol Chem, 2014, 289(40): 27526-27539.

[20] McCrae JC, Sharkey N, Webb DJ, et al. Ethanol consumption produces a small increase in circulating miR-122 in healthy individuals [J]. Clin Toxicol (Phila), 2016, 54(1): 53-55.

[21] Satishchandran A, Ambade A, Rao S, et al. microRNA 122, regulated by GRLH2, protects livers of mice and Patients from ethanol-induced liver disease [J]. Gastroenterology, 2018, 154 (1): 238-252.

[22] Li J, Ghazwani M, Zhang Y, et al. miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression [J]. J Hepatol, 2013, 58(3): 522-528.

[23] Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. microRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity [J]. Nature, 2011, 474 (7353): 649-653.

[24] Meng X, Guo J, Fang W, et al. Liver microRNA-291b-3p promotes hepatic lipogenesis through negative regulation of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase α1 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(20): 10625-10634.

[25] Saikia P, Roychowdhury S, Bellos D, et al. Hyaluronic acid 35 normalizes TLR4 signaling in Kupffer cells from ethanol-fed rats via regulation of microRNA291b and its target Tollip [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15671.

[26] 从美丽, 马依热·努尔买卖提, 周蓓等. 甘草酸介导 miRNAs 对大鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(8): 1374-1379.

[27] Setshedi M, Wands JR, Monte SM. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3 (3): 178-185.

[28] Bi L, Jiang Z, Zhou J. The role of lipin-1 in the pathogenesis of alcoholic fatty liver [J]. Alcohol Alcohol, 2015, 50(2): 146-151.

[29] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293.

[30] Yu FX, Guan KL. The Hippo pathway: regulators and regulations [J]. Genes Dev, 2013, 27(4): 355-371.

[31] Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, et al. Wnt-β-catenin signalling in liver development, health and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(2): 121-136.

[32] Ndoye A, Budina-Kolomets A, Kugel CH, et al. ATG5 mediates a positive feedback loop between Wnt signaling and autophagy in melanoma [J]. Cancer Res, 2017, 77(21): 5873-5885.

[33] Yazıcı D, Sezer H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 277-304.

〔收稿日期〕2022-12-29

董成海,澈力格尔,潮日雅,等.蒙药哈它各其-7 通过 HIF-1α 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的实验研究［J］.中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 42-48.
Dong CH, Che L, Chao RY, et al. Mongolian drug hatagaqi-7 promotes ulcer wound healing in diabetic rats via HIF-1α［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 42-48.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.007

蒙药哈它各其-7 通过 HIF-1α 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的实验研究

董成海#,澈力格尔#,潮日雅,满　柱*,包永林,龚利民

(内蒙古民族大学附属医院,手足显微外科,内蒙古 通辽　028000)

【摘要】　目的　研究蒙药哈它各其-7 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的治疗价值并初步探索其调控缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)的分子机制。**方法**　成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组、糖尿病组、蒙药组和细胞因子组,每组各 8 只。除对照组外、其余 3 组采用腹腔注射链脲佐菌素的方法建立糖尿病模型,4 组均在背部制备溃疡创面,1 周后蒙药组给予哈它各其-7 涂抹创面、细胞因子组给予重组牛碱性成纤维细胞生长因子喷洒创面,连续 2 周。检测空腹血糖(FBG)、创面面积、创面病理改变、创面中晚期糖基化终末产物(AGEs)、AGE 受体(RAGE)、HIF-1α、血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平及白介素-1β(IL-1β)、干扰素-γ(IFN-γ)、丙二醛(MDA)、总抗氧化力(T-AOC)水平。**结果**　糖尿病组、蒙药组、细胞因子组的 FBG 均高于对照组($P<0.05$),且三组间 FBG 无显著性差异($P>0.05$);与对照组比较,糖尿病组的溃疡创面面积、镜下未修复组织范围增大,创面组织中 AGEs、RAGE 的表达水平及 IL-1β、IFN-γ、MDA 水平增加,T-AOC 水平及 HIF-1α、VEGF 表达水平降低($P<0.05$);与糖尿病组比较,蒙药组、细胞因子组溃疡创面面积、镜下未修复组织范围缩小,创面组织中 AGEs、RAGE 的表达水平及 IL-1β、IFN-γ、MDA 水平降低,T-AOC 水平及 HIF-1α、VEGF 表达水平增加($P<0.05$)且蒙药组的各项指标优于细胞因子组。**结论**　蒙药哈它各其-7 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合,抑制 AGEs 及 RAGE 表达并激活 HIF-1α 是可能的分子机制。

【关键词】　糖尿病溃疡;哈它各其-7;晚期糖基化终末产物;缺氧诱导因子-1α
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0042-07

Mongolian drug hatagaqi-7 promotes ulcer wound healing in diabetic rats via HIF-1α

DONG Chenghai#, CHE Ligeer#, CHAO Riya, MAN Zhu*, BAO Yonglin, GONG Limin
(Hand and Foot Microsurgery, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China)

【Abstract】　Objective　To study the therapeutic value of Mongolian drug hatagaqi-7 for wound healing of diabetic ulcers in rats and preliminarily explore its molecular mechanism in regulating hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α). **Methods**　Adult male SD rats were randomly divided into control, diabetes, Mongolian drug, and cytokine groups. Except in the control group, the other three groups were treated with an intraperitoneal injection of streptozotocin to establish the diabetes model. Ulcer wounds were prepared in the mouse back of the four groups. One week later, the Mongolian drug group was treated with hatagaqi-7, and the cytokine group was treated with recombinant bovine basic fibroblast growth factor

[基金项目]内蒙古自治区自然科学基金(2021LHMS08033)。
[作者简介]董成海(1985—),男,硕士研究生,主治医师,研究方向:疮疡及糖尿病足。E-mail:dongchenghai1016@163.com
澈力格尔(1985—),男,硕士,研究方向:手足显微外科。E-mail:cheligeerclgr@163.com　#共同第一作者
[通信作者]满柱(1967—),男,主任医师,研究方向:手足显微外科。E-mail:yumanzhu@126.com

for 2 consecutive weeks. Fasting blood glucose (FBG), wound area, wound pathology, expression levels of advanced glycation end products (AGEs), receptor of AGE (RAGE), HIF-1α and vascular endothelial growth factor (VEGF), secreted levels of interleukin-1β (IL-1β), interferon-γ (IFN-γ), and malondialdehyde (MDA), and the total antioxidant capacity (T-AOC) were assessed. **Results** FBG of diabetes, Mongolian drug and cytokine groups was higher than that in the control group ($P<0.05$), and no significant difference was observed among the three groups ($P>0.05$). Compared with the control group, the ulcer wound area, scope of unrepaired tissue, expression levels of AGEs and RAGE, and secreted levels of IL-1β, IFN-γ, and MDA in wound tissue of the diabetes group were increased, and T-AOC and expression levels of HIF-1α and VEGF of the diabetes group were decreased ($P<0.05$). Compared with the diabetes group, the ulcer wound area, scope of unrepaired tissue, expression levels of AGEs and RAGE, and secreted levels of IL-1β, IFN-γ, and MDA in wound tissue of Mongolian drug and cytokine groups were decreased, T-AOC and expression levels of HIF-1α and VEGF in Mongolian drug and cytokine groups were increased ($P<0.05$), and indexes of the Mongolian drug group were better than those of the cytokine group. **Conclusions** Mongolian drug hatagaqi-7 promotes ulcer wound healing in diabetic rats, the inhibiton of AGE and RAGE expression and induction of HIF-1 α are the possible molecular mechanism.

【Keywords】 diabetic ulcer; hatagaqi-7; advanced glycation end products; hypoxia-inducible factor-1α
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2 型糖尿病及其并发症是危害我国居民健康的重大疾病,其中糖尿病溃疡是糖尿病的难治并发症,具有反复发作、迁延不愈的特点,病情严重时需截肢,甚至引发脓毒症并危及生命。因此,如何有效处理糖尿病溃疡、促进溃疡创面愈合是医患及社会共同面临的挑战。创面愈合是一个包括再生、修复、重建的复杂过程,糖尿病溃疡创面受到高糖、缺血缺氧、氧化应激等病理因素影响,容易发生延迟愈合或不愈合[1-2]。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)是在乏氧环境中维持细胞稳态的主要调节因子,对血管新生、氧化应激等均具有调控作用,增加 HIF-1α 表达对溃疡创面的愈合具有促进作用[3]。蒙药哈它各其-7 是蒙医传统疮疡病治疗药物,具有消肿、消炎、生肌等作用,临床实践中用于慢性难愈合性溃疡的治疗[4]。有动物实验报道,哈它各其-7 对大鼠压疮创面的愈合及 HIF-1α 表达均具有促进作用[5],但哈它各其-7 对糖尿病溃疡的治疗作用及相关机制尚不清楚。因此,本文将研究蒙药哈它各其-7 通过 HIF-1α 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠,SPF 级,共 32 只,购自北京唯尚立德生物科技有限公司[SCXK(京)2021-0010],饲养于内蒙古民族大学实验动物中心[SYXK(津)2021-0008]。饲养条件:温度 24~26℃、湿度 40%~60%。实验动物经内蒙古民族大学附属医院医学伦理委员会批准(NM-LL-2023-03-31-01),实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

哈它各其-7(内蒙古国际蒙医医院国家蒙药制剂中心);重组牛碱性成纤维细胞生长因子(珠海亿胜生物制药有限公司);链脲佐菌素(美国 Sigma 公司);白介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、干扰素-γ(interferon-γ,IFN-γ)检测试剂盒(上海西唐生物科技公司);丙二醛(malondialdehyde,MDA)、总抗氧化力(total antioxidant capacity,T-AOC)检测试剂盒(南京建成生物研究所);晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)、AGE 受体(receptor of AGE,RAGE)、HIF-1α、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)特异性一抗(美国 Abcam 公司)。

辅理善越佳型至新血糖测试仪购自雅培贸易(上海)有限公司;正置光学显微镜为日本尼康公司;凝胶电泳仪、凝胶成像系统购自上海天能仪器公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、造模及给药

实验动物随机分为对照组($n=8$)和造模组($n=26$)。造模组按照下列方法制备糖尿病模型:禁食不禁水 18 h,单次腹腔注射 1%链脲佐菌素 65 mg/kg,3 d 后经尾静脉取血、检测随机血糖,>16.7 mmol/L 判断为糖尿病造模成功;对照组给予与 1%链脲佐菌素等剂量的柠檬酸钠缓冲液腹腔注射。

共 26 只大鼠用于糖尿病造模,24 只造模成功,

将造模成功的 24 只大鼠随机分为糖尿病组、蒙药组和细胞因子组,每组各 8 只。除对照组外,其余 3 组均进行糖尿病造模;每组均在背部制备溃疡创面。造模成功当天进行背部溃疡创面制备,方法如下:剃去背部毛发,用硫酸钡脱毛,在大鼠背部正中直径约 3 cm 的圆形区域剪除表皮、真皮及皮下,直达深层筋膜后成功制备背部溃疡创面,创面用双层生理盐水浸润无菌纱布加双侧 2 层无菌干纱布固定,术后当天开始给予青霉素肌肉注射,每只 4000 U,每天 1 次,连续 4 d。

溃疡创面制备后 1 周开始进行治疗,对照组及糖尿病组每天对创面进行消毒、更换覆盖纱布;细胞因子组给予重组牛碱性成纤维细胞生长因子外用溶液喷洒创面、体积约 0.2 mL,蒙药物给予哈它各其-7 涂抹创面、厚度约 2 mm,连续治疗 14 d。

1.3.2 血糖水平的检测

治疗第 3、7、10、14 天时,空腹采集尾静脉血,采用血糖测试仪检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)水平。

1.3.3 溃疡创面面积的测量

治疗第 3、7、10、14 天时,观察溃疡创面并拍照记录,用 Image J 软件进行图像分析,测量溃疡创面面积。

1.3.4 溃疡创面病理变化的检测

治疗第 14 天时,取溃疡创面的肉芽组织作为标本,4%多聚甲醛固定后制作蜡块,用切片机将蜡块中的组织切成厚度 5 μm 的组织切片,经烤片、脱蜡、复水后进行苏木精-伊红染色,中性树胶封固后在显微镜下观察溃疡创面组织的病理变化。

1.3.5 溃疡创面组织中炎症及氧化应激指标的检测

取溃疡创面肉芽组织,剪成碎块,每 100 mg 组织加入 1 mL 磷酸盐缓冲液,匀浆后将匀浆悬液转移入 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清并采用试剂盒检测 IL-1β、IFN-γ、MDA、T-AOC 的水平。

1.3.6 溃疡创面组织中蛋白表达水平的检测

取溃疡创面肉芽组织,剪成碎块,每 100 mg 组织加入 1 mL 蛋白裂解液,匀浆提取蛋白后将匀浆悬液转移入 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清进行 Western blot 实验,得到 AGEs、RAGE、HIF-1α、VEGF、β-actin 的蛋白条带,扫描灰度值后以 β-actin 为内参,计算 AGEs、RAGE、HIF-1α、VEGF 的蛋白表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理,实验数据均为计量资料,采用单因素方差分析进行组间比较,有统计学差异的资料进一步采用 LSD-*t* 法进行两两比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 FBG 水平的比较

糖尿病组、蒙药组、生长因子组大鼠治疗过程中的 FBG 水平均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);糖尿病组、蒙药组、生长因子组大鼠的 FBG 水平比较无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠溃疡创面面积的比较

治疗前及治疗后不同时间点的溃疡创面图像见图 1。治疗第 3 天时,各组大鼠的溃疡创面面积比较无显著性差异($P>0.05$);治疗第 7、10、14 天时,糖尿病组大鼠的溃疡创面面积均高于对照组($P<0.05$),蒙药组、生长因子组大鼠的溃疡创面面积均低于糖尿病组($P<0.05$)且蒙药组大鼠的溃疡创面面积均低于生长因子组($P<0.05$)。见图 1、表 2。

表 1 各组大鼠 FBG 水平的比较(mmol/L, $n=8$)

Table 1 Comparison of FBG levels of rats in each group

组别 Groups	治疗第 3 天 3 d after treatment	治疗第 7 天 7 d after treatment	治疗第 10 天 10 d after treatment	治疗第 14 天 14 d after treatment
对照组 Control group	5.32±0.85	5.51±0.77	5.43±0.69	5.50±0.48
糖尿病组 Diabetes group	18.38±2.57*	17.17±2.21*	18.03±2.52*	18.44±2.81*
细胞因子组 Cytokine group	17.93±2.21*	18.15±1.94*	17.77±2.41*	18.09±2.41*
蒙药组 Mongolian drug group	18.14±2.45*	17.89±2.52*	18.23±2.23*	18.10±2.32*

注:与对照组比较, *$P<0.05$。

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

2.3　各组大鼠溃疡创面病理变化的比较

对照组、糖尿病溃疡组溃疡创面组织在镜下均可见大片未修复组织，糖尿病组的未修复组织范围较对照组大；蒙药组、生长因子组溃疡创面组织在镜下修复组织范围较糖尿病组增大且可见较多的成纤维细胞；蒙药组溃疡创面组织在镜下的修复程度优于生长因子组。见图 2。

2.4　各组大鼠溃疡创面组织中 AGEs、RAGE 表达的比较

糖尿病组大鼠溃疡创面组织中 AGEs、RAGE 的

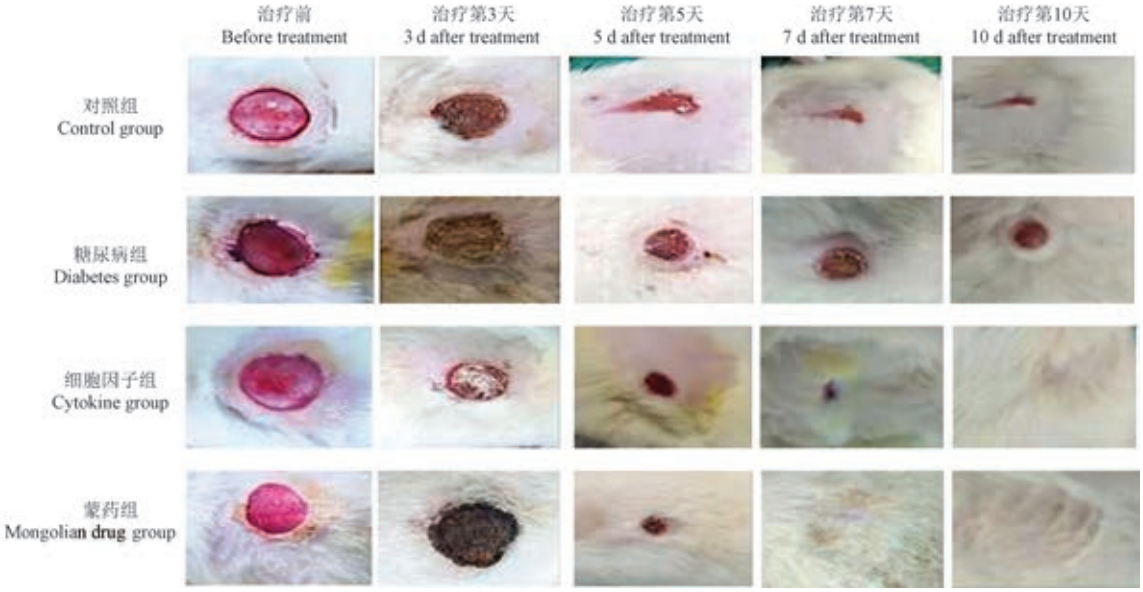


图 1　各组大鼠的背部溃疡创面

Figure 1　Back ulcer wounds of rats in each group

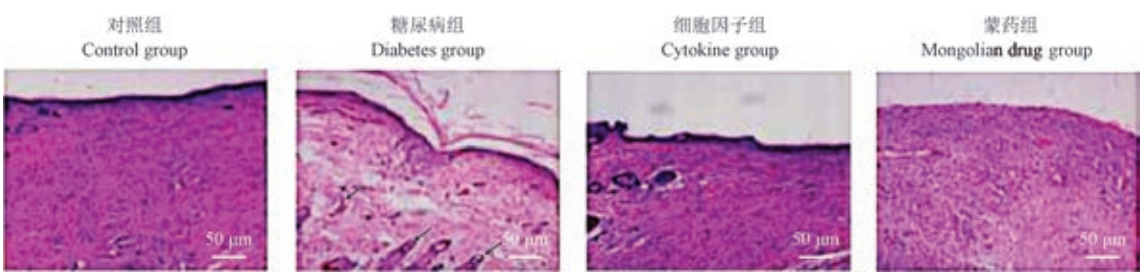
表 2　各组大鼠溃疡创面面积的比较($n=8$)

Table 2　Comparison of ulcer wound area of rats in each group

组别 Groups	治疗第 3 天 3 d after treatment	治疗第 7 天 7 d after treatment	治疗第 10 天 10 d after treatment	治疗第 14 天 14 d after treatment
对照组 Control group	3.23±0.52	1.14±0.25	0.85±0.10	0.37±0.05
糖尿病组 Diabetes group	3.30±0.61*	1.88±0.22*	1.46±0.15*	1.14±0.18*
细胞因子组 Cytokine group	3.01±0.56$^{\#}$	0.94±0.15$^{\#}$	0.40±0.05$^{\#}$	0.17±0.02$^{\#}$
蒙药组 Mongolian drug group	3.40±0.48$^{\#\&}$	0.68±0.11$^{\#\&}$	0.21±0.03$^{\#\&}$	0.08±0.01$^{\#\&}$

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与糖尿病组比较，$^{\#}P<0.05$；与细胞因子组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$. Compared with diabetes group, $^{\#}P<0.05$. Compared with cytokine group, $^{\&}P<0.05$.



注：箭头所指为未修复组织，排列疏松、混乱。

图 2　各组大鼠溃疡创面的病理变化(HE 染色)

Note. Arrow indicates unrepaired tissue, the arrangement is loose and chaotic.

Figure 2　Pathological changes of ulcer wounds in rats of each group (HE staining)

表达水平高于对照组($P<0.05$);蒙药组、生长因子组大鼠溃疡创面组织中 AGEs、RAGE 的表达水平低于糖尿病组($P<0.05$)且蒙药组大鼠溃疡创面组织中 AGEs、RAGE 的表达水平低于生长因子组($P<0.05$)。见图 3,表 3。

2.5 各组大鼠溃疡创面组织中炎症及氧化应激指标的比较

糖尿病组大鼠溃疡创面组织中 IL-1β、IFN-γ、MDA 的水平高于对照组,T-AOC 的水平低于对照组($P<0.05$);蒙药组、生长因子组大鼠溃疡创面组织中 IL-1β、IFN-γ、MDA 的水平低于糖尿病组,T-AOC 的水平高于糖尿病组($P<0.05$)且蒙药组大鼠溃疡创面组织中 IL-1β、IFN-γ、MDA 的水平低于生长因子组,T-AOC 的水平高于生长因子组($P<0.05$)。见表 4。

2.6 各组大鼠溃疡创面中 HIF-1α、VEGF 表达水平的比较

糖尿病组大鼠溃疡创面组织中 HIF-1α、VEGF 的表达水平低于对照组($P<0.05$);蒙药组、生长因子组大鼠溃疡创面组织中 HIF-1α、VEGF 的表达水平高于糖尿病组($P<0.05$)且蒙药组大鼠溃疡创面组织中 HIF-1α、VEGF 的表达水平高于生长因子组($P<0.05$)。见图 4,表 5。

表 3 各组大鼠溃疡创面组织中 AGEs、RAGE 表达的比较($n=8$)

Table 3 Comparison of AGEs and RAGE expression in ulcer wound tissue of rats in each group

组别 Groups	AGEs	RAGE
对照组 Control group	0.23±0.03	0.18±0.02
糖尿病组 Diabetes group	0.90±0.12*	0.84±0.10*
细胞因子组 Cytokine group	0.51±0.06$^{\#}$	0.44±0.05$^{\#}$
蒙药组 Mongolian drug group	0.32±0.05$^{\#\&}$	0.24±0.03$^{\#\&}$

注:与对照组比较,$^{*}P<0.05$;与糖尿病组比较,$^{\#}P<0.05$;与细胞因子组比较,$^{\&}P<0.05$。

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$. Compared with diabetes group, $^{\#}P<0.05$. Compared with cytokine group, $^{\&}P<0.05$.

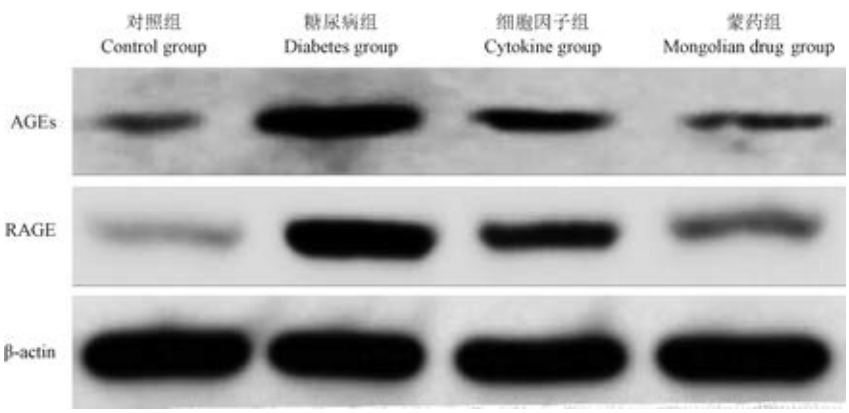


图 3 各组大鼠溃疡创面组织中 AGEs 和 RAGE 的电泳图

Figure 3 Electrophoresis of AGEs and RAGE in ulcer wound tissue of rats in each group

表 4 各组大鼠创面组织中炎症及氧化应激指标的比较($n=8$)

Table 4 Comparison of inflammatory and oxidative stress indicators in wound tissue of rats in each group

组别 Groups	IL-1β(ng/mL)	IFN-γ(ng/mL)	MDA(nmol/mL)	T-AOC(IU/mL)
对照组 Control group	0.76±0.09	1.32±0.16	1.76±0.20	4.41±0.72
糖尿病组 Diabetes group	3.29±0.52*	5.51±0.62*	7.35±0.94*	2.01±0.35*
细胞因子组 Cytokine group	2.21±0.32$^{\#}$	3.59±0.44$^{\#}$	5.09±0.72$^{\#}$	3.16±0.42$^{\#}$
蒙药组 Mongolian drug group	1.31±0.18$^{\#\&}$	2.02±0.32$^{\#\&}$	3.15±0.55$^{\#\&}$	3.86±0.36$^{\#\&}$

注:与对照组比较,$^{*}P<0.05$;与糖尿病组比较,$^{\#}P<0.05$;与细胞因子组比较,$^{\&}P<0.05$.

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$. Compared with diabetes group, $^{\#}P<0.05$. Compared with cytokine group, $^{\&}P<0.05$.

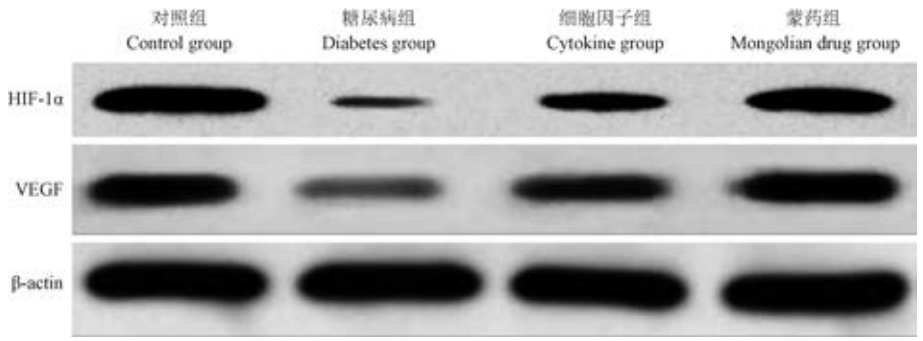


图 4　各组大鼠溃疡创面中 HIF-1α、VEGF 的电泳图

Figure 4　Electrophoresis of HIF-1α, VEGF in ulcer wound of rats in each group

表 5　各组大鼠溃疡创面组织中 HIF-1α、VEGF 表达的比较

Table 5　Comparison of HIF-1α, VEGF expressionin ulcer wound tissue of rats in each group

组别 Groups	HIF-1α	VEGF
对照组 Control group	0.91±0.12	0.83±0.10
糖尿病组 Diabetes group	0.15±0.02*	0.23±0.03*
细胞因子组 Cytokine group	0.40±0.05$^{\#}$	0.58±0.07$^{\#}$
蒙药组 Mongolian drug group	0.67±0.08$^{\#\&}$	0.79±0.10$^{\#\&}$

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与糖尿病组比较，$^{\#}P<0.05$；与细胞因子组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note. Compared with control group, $^{*}P<0.05$. Compared with diabetes group, $^{\#}P<0.05$. Compared with cytokine group, $^{\&}P<0.05$.

3　讨论

糖尿病溃疡是常见的糖尿病难治并发症，溃疡创面愈合慢、容易发生延迟愈合或不愈合[6-7]。目前研究认为影响糖尿病溃疡创面愈合的生物学因素包括局部氧化应激及炎症反应异常激活、生长因子表达不足、血管新生障碍等[8-9]。本研究的动物实验结果显示：与血糖正常的对照组大鼠比较，糖尿病大鼠背部溃疡创面的缩小较慢、镜下组织修复的范围较小，与目前相关研究中糖尿病溃疡创面愈合慢的特点吻合。

蒙医认为溃疡创面的形成与气血亏虚相关、属于“疮疡”病范围，应以调整赫依、协日、巴达干三素平衡，并活血通脉、清热解毒、防腐生肌为主要治疗方法[10]。哈它各其-7 是蒙医传统“疮疡”治疗药物，其药效为消炎止痛、清热解毒、活血消肿、生肌收敛，用于压疮治疗能够加速创面愈合且对皮肤无刺激、安全性理想[4,11]。新近的动物实验证实哈它各其-7 对炎症反应、氧化应激、血管新生均具有调控作用[5,12]。本研究的动物实验结果显示：哈它各其-7 用于糖尿病大鼠溃疡创面的治疗显著促进创面愈合且哈它各其-7 促进创面愈合的作用优于临床常用的药物重组牛碱性成纤维细胞生长因子。

炎症反应和氧化应激反应在多种糖尿病并发症的发生和进展过程中均发挥重要作用，而高糖环境下产生的 AGEs 与 RAGE 相互作用是刺激炎症和氧化应激的上游因素。AGEs 作用于受体 RAGE 并启动细胞内信号转导，增加 TNF-α、IFN-γ 的生成并介导炎症反应，促进氧自由基生成并增加脂质过氧化产物 MDA 的生成及抗氧化物的消耗[13-14]。本研究的实验结果显示：糖尿病大鼠的溃疡创面中 AGE、RAGE 的表达水平及炎症水平、氧化应激水平均高于对照大鼠，表明在糖尿病溃疡的发生发展过程中存在 AGEs/RAGE 介导的炎症反应、氧化应激反应过度激活。哈它各其-7 已经被证实具有抗炎和抗氧化活性，本研究关于哈它各其-7 促进糖尿病大鼠溃疡创面预后的实验结果显示，经哈它各其-7 治疗后，溃疡创面中 AGE、RAGE 的表达水平及炎症水平、氧化应激水平均降低且这一降低作用较重组牛碱性成纤维细胞生长因子更显著，表明哈它各其-7 用于糖尿病溃疡的治疗发挥抑制 AGEs、RAGE 表达及炎症反应、氧化应激反应的作用。

在糖尿病并发症的发生和进展过程中，HIF-1α 可能是 AGEs/RAGE 介导炎症反应、氧化应激反应的上游调控分子[15]。HIF-1α 是细胞内感受缺氧刺激的转录因子，直接调控 VEGF 的表达并促进血管新生，相关的多项研究证实 HIF-1α 在缺血缺氧、高糖高脂等环境下不仅直接调控血管新生，还对炎症反应、氧化应激反应发挥调控作用[16-17]；也有研究报道激活 HIF-1α 对创面修复具有促进作用。糖尿病溃疡相关的研究结果表明糖尿病溃疡患者外周血中 HIF-1α 的表达及糖尿病大鼠溃疡创面中 HIF-1α 的表达均降低[18-19]；本研究中，糖尿病大鼠溃疡

中 HIF-1α 的表达也呈降低趋势。以上结果提示 HIF-1α 表达降低与糖尿病溃疡的发生发展相关。在压疮动物模型中,哈它各其-7 促进创面预后的作用与激活 HIF-1α 的表达有关[3],但哈它各其-7 治疗糖尿病溃疡中的分子机制是否与调控 HIF-1α 表达相关尚不明确。因此,本研究以 HIF-1α 为靶点、对哈它各其-7 治疗糖尿病溃疡的机制进行了初步探索,结果显示使用哈它各其-7 治疗糖尿病大鼠溃疡创面后 HIF-1α、VEGF 的表达水平明显增加且这一调控作用较重组牛碱性成纤维细胞生长因子更显著。上述结果与哈它各其-7 在压疮治疗中增加 HIF-1α 表达的结果一致,表明哈它各其-7 对糖尿病溃疡创面中的 HIF-1α 具有激活作用,这可能是该药物促进创面愈合的相关分子机制。

以上实验结果表明蒙药哈它各其-7 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合,抑制 AGEs 及 RAGE 表达并激活 HIF-1α 是可能的分子机制,这也为今后使用蒙药哈它各其-7 治疗糖尿病溃疡提供了实验依据。

参考文献:

[1] Wang X, Yuan CX, Xu B, et al. Diabetic foot ulcers: classification, risk factors and management [J]. World J Diabetes, 2022, 13(12): 1049-1065.

[2] Ahmed ME, Mohammad KMK, Mahadi SI, et al. Management of diabetic ulcers of the dorsum of the foot and distal leg ulcers [J]. J Wound Care, 2022, 31(11): 941-945.

[3] Li G, Ko CN, Li D, et al. A small molecule HIF-1α stabilizer that accelerates diabetic wound healing [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3363.

[4] 包春华, 高哈斯宝力高. 蒙药哈它各其-7 治疗Ⅲ期压疮临床疗效 [J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(6): 1-2.

[5] 包苏布道, 韩巴特尔, 包满节. 蒙药哈它各其-7 散促进大鼠压疮创面愈合的实验研究 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2019, 41(4): 363-364.

[6] 毛水红, 张家鹏, 张勇超. 影响糖尿病足创面愈合的危险因素分析 [J]. 中国烧伤创疡杂志, 2022, 34(6): 404-407.

[7] 王宁, 鞠上. 糖尿病足溃疡难愈合机制研究进展 [J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022(11): 1085-1089.

[8] Feng J, Wang J, Wang Y, et al. Oxidative stress and lipid peroxidation: prospective associations between ferroptosis and delayed wound healing in diabetic ulcers [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 898657.

[9] Maryam S, Elnaz S, Reza F, et al. Macrophages as a therapeutic target to promote diabetic wound healing [J]. Mol Ther, 2022, 30(9): 2891-2908.

[10] Rayate AS, Nagoba BS, Mumbre SS, et al. Current scenario of traditional medicines in management of diabetic foot ulcers: a review [J]. World J Diabetes, 2023, 14(1): 1-16.

[11] 英俊, 巴虎山, 白福贵, 等. 蒙药哈它嘎其-7 联合 VSD 负压引流技术治疗糖尿病溃疡足 1 例 [J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(3): 29-31.

[12] 韩巴特尔, 包苏布道, 图娜拉. 蒙药哈它各其-7 散对压疮创面愈合作用的实验研究 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(2): 145-146, 159.

[13] Wan L, Bai X, Zhou Q, et al. The advanced glycation end-products (AGEs)/ROS/NLRP3 inflammasome axis contributes to delayed diabetic corneal wound healing and nerve regeneration [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 809-825.

[14] Abdelghany Rasha H, Nadia H, Waleed B. Targeting AGEs pathway in delayed diabetic wound healing [J]. Afr J Biol Sci, 2021, 3(1): 110-119.

[15] Carla I, Martina V, Giuseppe P, et al. Normalizing HIF-1α signaling improves cellular glucose metabolism and blocks the pathological pathways of hyperglycemic damage [J]. Biomedicines, 2021, 9(9): 1139.

[16] Li J, Lu X, Wei L, et al. PHD2 attenuates high-glucose-induced blood retinal barrier breakdown in human retinal microvascular endothelial cells by regulating the Hif-1α/VEGF pathway [J]. Inflamm Res, 2022, 71(1): 69-79.

[17] Chen F, Yi W, Wang S, et al. A long-term high-fat diet influences brain damage and is linked to the activation of HIF-1α/AMPK/mTOR/p70S6K signalling [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 978431.

[18] Lin CJ, Lan YM, Ou MQ, et al. Expression of miR-217 and HIF-1α/VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats [J]. J Endocrinol Invest, 2019, 42(11): 1307-1317.

[19] 韦积华, 罗富强, 谢康麒, 等. 舒洛地特对糖尿病足溃疡大鼠 HIF-1α/GPER/VEGF 通路及创面愈合的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(5): 1151-1155.

〔收稿日期〕2023-02-13

常拓,王洁,李楠,等. MNU 诱导 SD 大鼠下焦湿热证尿血(膀胱癌)模型研究［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 49-54.
Chang T, Wang J, Li N, et al. A model study of blood in urine (bladder cancer) during scorching humid fever in MNU-induced SD rats［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 49-54.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.008

MNU 诱导 SD 大鼠下焦湿热证尿血(膀胱癌)模型研究

常　拓[1,2],王　洁[3],李　楠[4],王天奇[4*]

(1.沈阳医学院中医药学院,沈阳　110034;2.辽宁中医药大学中医学院,沈阳　110847;
3.沈阳医学院基础医学院,沈阳　110034;4.国家卫生健康委科学技术研究所,北京　100081)

【摘要】　目的　探讨 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)诱导 SD 大鼠下焦湿热证尿血——膀胱癌(BC)模型的造模过程和成模率。**方法**　通过膀胱灌注 MNU 的方法在造模前、造模中、造模后共计 6 个时间点进行分批次样品采集,并对膀胱组织进行 HE 染色以了解膀胱原位癌的形成及发展过程。**结果**　实验过程顺利,在操作过程中大鼠未出现明显尿路损伤现象。通过本造模手法模型组大鼠膀胱内有明显的上皮增生、破损及大面积肿瘤形成和尿血现象。**结论**　MNU 可以成功诱导 SD 大鼠下焦湿热证尿血模型(膀胱癌),且成模明显,死亡率低,实验数据可为膀胱癌模型的建立、改良和应用提供一定的参考。

【关键词】　N-甲基-N-亚硝脲;SD 大鼠;膀胱癌;尿血
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0049-06

A model study of blood in urine (bladder cancer) during scorching humid fever in MNU-induced SD rats

CHANG Tuo[1,2], WANG Jie[3], LI Nan[4], WANG Tianqi[4*]

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China.
2. School of Traditional Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847.
3. School of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang 110034.
4. Institute of Science and Technology, National Health Commission, Beijing 100081)

【Abstract】　Objective　To investigate the modeling process and model establishment rate of the N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced lower jiao dampness-heat syndrome uremia bladder cancer (BC) model. **Methods**　Batch samples were collected by bladder perfusion (MNU). HE staining and pathological observation of pathological tissues were carried out at six time points before, during, and after modeling to understand the formation and development of bladder carcinoma *in situ*. **Results**　The experimental process was smooth, and no obvious urinary tract bleeding in rats occurred during the operation. Using this modeling technique, considerable bladder tumors were formed after week 8, and obvious epithelial hyperplasia, damage and large-scale tumor formation were observed in the bladder of rats in the model group. **Conclusions**　MNU induces an SD rat bladder cancer model with obvious model establishment and low mortality. The experimental data provide a reference to establish, improve and apply the bladder cancer model.

【Keywords】　N-methyl-N-nitrosourea; SD rats; bladder cancer; blood in the urine
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家重点研发计划项目(2022YFF0711001);辽宁省科协科技创新智库项目(LNKX2022FH02);辽宁中医药大学博士后启动基金(21601A2090)。

[**作者简介**]常拓(1989—),男,博士,在站博士后,副教授,硕士生导师,研究方向:中医基础理论及中药研究。E-mail:changtuotcm@163.com

[**通信作者**]王天奇(1968—),男,博士,副研究员,研究方向:实验动物。E-mail:2003wangtianqi@163.com

膀胱癌(bladder cancer,BC)是全球十大最常见的癌症之一[1],是目前人类泌尿系统的高发性肿瘤疾病[2]。在我国,膀胱癌的患病率在男性中是女性的 3.8 倍,并且男性的死亡率是女性的 4 倍,已成为威胁我国人民健康的重大恶性肿瘤之一[1]。目前治疗膀胱癌以手术为主,术前、术后常辅助以化疗[3]。但手术和化疗有严重的不良反应,术后复发率高,严重影响患者的生活质量[4]。动物试验是探讨疾病治疗手段的主要手段,建立可靠、稳定、可重复性好的动物模型是保证试验成功的关键。因此,动物模型为研究人类疾病发病机制、筛选、评价药物等提供了有力的体内研究工具[5]。其中原位模型优于其他类型的模型,主要是因为其提供了正常的微环境[6]。Hicks 首次通过膀胱灌注 N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea,MNU)诱导膀胱肿瘤,目前已是一种很成熟的造模技术[7]。MNU 诱癌 BC 方法简单,具有毒性反应小、潜伏期短、致癌率高等特点,且接近于人膀胱癌的病理学特征[8-11]。本研究为更加准确地了解 MNU 诱导大鼠成瘤的过程,观察不同时间阶段的大鼠肿瘤的病理学特征和差异以及分析其死亡率和成瘤率,从而明确 MNU 诱导大鼠 BC 发生发展的进展情况。以此为后续在临床上探寻治疗膀胱癌的新药物的开发奠定准确、可信的动物模型基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

33 只 SD 大鼠,雌性,SPF 级,年龄 6~8 周龄,体重 140~160 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006],饲养于清洁环境,相对湿度为 40%~70%,室温保持在 23~26℃,自由饮水和进食。实验动物饲养及观察于北京伽拓医药研究有限公司[SYXK(京)2023-0022],本实验由北京 JAT 生物有限公司实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee,IACUC,AP-18-0001)批准。本研究的目的及方式,应遵循人类之伦理及国际通行之规范,并依实验动物之 3R 原则,于动物之培育与试验中,予以人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

试剂材料如无水乙醇、二甲苯、盐酸等(国药集团化学试剂有限公司);苏木素染液(谷歌生物);MNU(MACKLIN,上海);DMSO(美国 Sigma 公司);DAB 显色套装(北京中杉金桥生物公司);0.9%生理盐水(石家庄四药有限公司);戊巴比妥钠(北京伽拓医药公司赠予);新洁尔灭(山东利尔康医疗公司);石蜡油(山东利尔康医疗公司)。

软夹(亿佳居日用品公司);一次性无菌的 RD(柔性型)直径 1.0 mm 的硬膜外导管(江苏宏达医疗器械集团有限公司);5 mL 注射器(江苏宏达医疗器械集团有限公司);载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司,型号:10212432C);电光子分析天平(瑞士 METTLIER 型号:AG285);超纯水仪(北京市六一仪器厂,型号:Ultraclearplus);漩涡混匀器(姜堰市健康医疗器具有限公司,型号:XH-B 型);倒置荧光显微镜(日本尼康,型号:Nikon Eclipse Ti-SR);高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司,型号:3K30);冻台(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-L5);恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机厂,型号:78HW-1);电热恒温水浴锅(长安医疗器械厂,型号:HHS21-4);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P);数码照相系统(日本 Olympus 公司,型号:C-5050);超声波清洗器(江苏省昆山超声仪器有限公司,型号:KQ-500DE);干燥箱(上海市跃进医疗器械厂,型号:101-1A 型);超低温冰箱(日本 SANYO 公司,型号:MDF-4086S);普通冰箱(青岛海尔电冰箱厂,型号:BCD-199);成像系统(日本尼康,型号:Nikon DS-U3);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12J);烤箱(上海福玛实验仪器有限公司,型号:DGX-9003B)。

1.3 实验方法

1.3.1 MNU 溶液的配制及用法

称取适量 MNU,溶解于适量 0.9%生理盐水中,配制成 10 mg/mL 的 MNU 溶液,60 min 内用完,每只 2 mg,1 次/2 周,共 5 次,总计每只 10 mg,从第 0 周开始灌注,至第 9 周。

1.3.2 分组

自由适应期为 5 d,第 6 天开始进行 MNU 造模。实验 1(造模探索实验):选取 13 只雌性 SD 大鼠,随机分成两组,造模组 10 只,空白对照组 3 只。实验 2(肿瘤进展实验):造模组选取 20 只雌性 SD 大鼠,无空白对照组。

1.3.3 造模

雌性 SD 大鼠腹部朝上,用 5 mL 注射器,以

0.6%戊巴比妥钠(30 mg/kg)注入腹腔,注射后大约 10 min 药物起效。用五根稍长结实棉线固定于解剖板上,由于过于紧绷会导致内部尿道不容易拉直,因此可以在术者外侧的棉线稍微松绑或者不绑,固定好后,用新洁尔灭及碘伏对大鼠外阴部及导尿管进行消毒,将无菌的 RD(柔性型)1.0 mm 直径的硬膜外导管蘸取适量无菌石蜡油,轻轻插入尿道口,插入 1 cm 左右会有阻力感,变换角度,左手用一把头部带有软胶头的镊子将大鼠外部尿道连同周围皮肤水平夹起,以保持体内尿道部分充分拉直,右手持导尿管延膀胱靠近阴道一侧垂直向下试探性变换角度插入,此时大鼠会偶尔出现躁动,此时可以缓缓调节角度插入,插入之前可能会出现顿挫感,此种感觉就像有东西突然弹跳一样,之后徐徐插入,此时顿挫感消失,会有落空感,此时导尿管会顺利进入膀胱,当总长度进入 3~5 cm 时,会出现明显阻力,继续插入会出现回弹,此时导尿管已进入膀胱。插管过程切忌用蛮力及暴力插管,容易导致尿道破裂及尿道出血。

将 MNU 液按照每只 0.2 mL 注入大鼠膀胱内,因导管中可能存在残留药液,在注射完药剂后,在相同注射器中加入适量生理盐水予以灌注。空白对照组以生理盐水每只注入 0.2 mL 代替。另外所制导管不宜过长,6 cm 左右为宜。选用一次性无菌的 RD(柔性型)直径为 1.0 mm 的硬膜外导管,此种导管头部光滑圆钝,硬度适宜。药物注入后,用头部带有橡胶的软夹夹闭 60 min,取下后放回笼中。

1.3.4　取材及处理

利用颈椎脱臼使大鼠死亡,然后对其膀胱进行完整解剖。在膀胱颈部切断尿道,同时紧贴膀胱壁切断双侧输尿管,完整取出膀胱。移除外部脂肪,并用冰生理盐水冲洗,用滤纸擦净膀胱表面液体。对膀胱进行总重量称量,然后在膀胱前壁剪开观察膀胱内部情况,并记录。记录膀胱内是否发生肿瘤以及是否有特殊情况发生。实验过程中,所有大鼠从实验开始(第 0 周)到实验结束(第 16 周)都被饲养。实验结束后,剩余的两只大鼠被安乐死处理。然后将新鲜组织用 4%甲醛固定,制备石蜡切片,用 HE 染色,通过显微镜观察形态并拍照。

1.4　统计学方法

死亡率:统计实验前及实验后大鼠数量,计算死亡率。

成瘤率:光镜下观察发现,未成瘤的大鼠膀胱壁上有 2~3 个迁移上皮细胞。细胞呈现扁平状,形态一致,结构规整,核为圆球形;核浆比在 1∶4~1∶6 之间,膀胱组织由内向外依次为黏膜层、固有层、肌肉层和浆膜肌肉层。成瘤大鼠膀胱黏膜上皮组织的细胞具有大小不一的形态差异,移行上皮细胞层数显著增加,排列无序,细胞极性现象消失,细胞核大,大小形状不规则,核染色呈现颗粒状,分布不规则,核膜明显增厚,核仁肥大,细胞质比例增加,核分裂现象明显。对各组大鼠膀胱组织肿瘤形成状况进行相关统计,确定肿瘤发生率,并对各组进行相互比较。

2　结果

2.1　大鼠状态

实验过程顺利,在操作过程中未出现因插管导致的状态不佳引起的大批量死亡现象。实验 1:模型组大鼠死亡 3 只(1 只死于实验后第 2 天,疑似麻醉过量;1 只在实验后第 10 天死亡,大鼠腹部肿胀,尸检显示腹腔肠道严重粘连,肠道部分梗阻。1 只在实验后第 23 天死亡,解剖结果显示腹腔肠道严重粘连),大鼠出现尿血、躁动现象;对照组未出现大鼠死亡及尿血、躁动现象。实验 2:未出现大鼠死亡现象,同样出现尿血、躁动现象。

2.2　造模效果

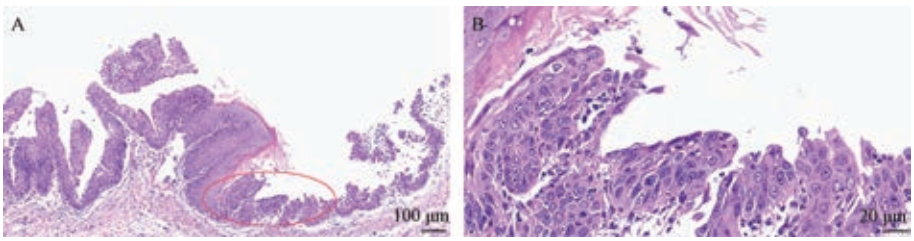
MNU 膀胱灌注建模 SD 大鼠 BC 模型,通过此建模技术第 9 周后的膀胱肿瘤清楚可见,模型组大鼠膀胱内存在明显的上皮组织增生、破裂及大面积肿瘤形成现象,膀胱黏膜上皮细胞形态各异,上皮细胞的移行层数量明显增加,排列不规则,极像消失。细胞核增生变大,形状不规则,核质肥大,核质大小比增大,核染色质大小呈颗粒状,无序分布,核膜显著增厚,核分裂明显,见图 1。

2.3　计算死亡率和成瘤率

在实验结束后分别统计模型组和对照组的成瘤率和死亡率。实验 1 组中的对照组的成瘤率和死亡率均为 0,模型组的成瘤率为 100%,死亡率则为 30%;实验 2 组的成瘤率为 100%,而死亡率为 0%。

2.4　尿血及膀胱情况

在 MNU 膀胱灌注第 4 周时,膀胱内开始有形成肿瘤的趋势;在第 8 周时肿瘤已经基本形成。并且在第 8 周时部分大鼠出现类似于 BC 患者显著的尿血病理现象,见图 2。在实验过程中,MNU 诱导 SD 大鼠膀胱癌在各阶段的成瘤情况,见图 3。

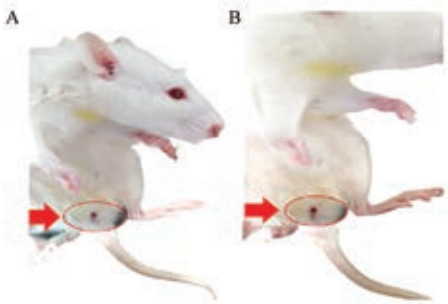


注:A:10 倍显微镜下观察大鼠膀胱内情况;B:40 倍显微镜下观察大鼠膀胱内情况。

图 1 第 9 周时模型组大鼠膀胱内情况

Note. A, Observation of the bladder of rats under a 10x microscope. B, Observation of the bladder of rats under a 40x microscope.

Figure 1 In the bladder of the model group at week 9

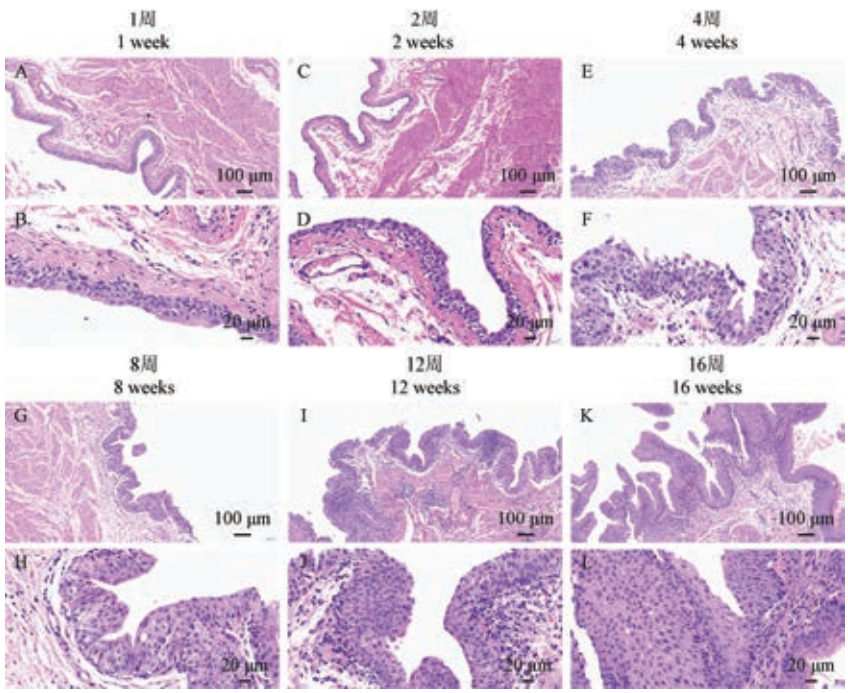


注:A:大鼠出现肉眼血尿现象(全景);B:大鼠出现肉眼血尿现象(近景)。

图 2 第 8 周时大鼠的尿血情况

Note. A, Rats showing carnal hematuria (panoramic view). B, Rats showing carnal hematuria (close-up view).

Figure 2 Blood in the urine of rats at the 8th week



注:A、B:膀胱未出现病变;C、D:膀胱内皮出现轻微毛糙状;E、F:膀胱细胞层增多,出现局部增生隆起;G、H:膀胱内出现大面积肿瘤;I、J:膀胱壁增生严重,出现较大肿瘤;K、L:膀胱内出现巨大肿瘤。

图 3 MNU 诱导 SD 大鼠膀胱原位癌各阶段成瘤情况展示图

Note. A/B, No lesions in the bladder. C/D, Slightly hairy appearance of the bladder endothelium. E/F, Increased bladder cell layer with localized hyperplastic bulges. G/H, Large tumor in the bladder. I/J, Severe hyperplasia of the bladder wall with the appearance of larger tumors. K/L, Giant tumor in the bladder.

Figure 3 MNU-induced bladder carcinoma *in situ* tumor formation in SD rats

3　讨论

中医没有“癌症”“膀胱癌”等病名,按照病理现象及实际症状可将膀胱癌归纳到中医血证中“血淋”“尿血”的范畴,临床上以无痛性尿血为早期表现[12]。在中医理论中,尿中带血是主要原因,其发病有多种原因。如六邪、风、热等外邪,从表面进入,侵入血供,造成灼烧经脉,逼血妄为;火热之邪,使太阳患病,经入内,热积于膀胱,损血管,引起外渗[13]。内伤脏腑,阴阳失衡,过度疲劳,情绪失衡,耗悲阴,心火过旺,热传小肠,迫血乱动所致[14];温病后,阴液消耗损伤,或心房、心室连接不畅,引起相火动过盛,肾阴虚,内生虚火,可损肾经络,使血随尿而出[15];忧劳,损脾土,中气无力,无力控制,血不经经络,多有血尿[16];肺结核和肾损害可导致气阴虚,肾阴虚,因阴虚而火过旺,逼血往下流,造成血尿[17];肝郁气滞,落落外伤,气滞,血瘀凝,左于下交,经络受阻,膀胱因经络破裂而漏血,而出现血尿[18]。下焦湿热证主要表现为尿黄灼热,尿血鲜红,心烦不安等症状,其证机概要为热伤阴络,血渗膀胱,治疗当以清热利湿、凉血止血为主[19]。本实验中,SD 大鼠在 MNU 诱导造模过程中出现尿血鲜红,躁动不安等类似于下焦湿热证表现,因此初步认为符合下焦湿热证中所述的尿血现象,并将此模型归结为下焦湿热证尿血模型。化学致癌物、物理因素和生物因素均可诱发各种动物形成肿瘤,其中化学致癌物最常诱发肿瘤,DNA 烷基化剂 N-甲基-N-亚硝基酰胺(MNU)是一种多器官致癌物质。为了满足不同专业人员的研究需要,它已被用于建立不同类型、不同生物特征以及不同部位的动物肿瘤模型[20]。MNU 是一种直接致癌物,是一种强大的致畸剂、诱变剂和致癌物,已被广泛应用于经膀胱灌注诱导膀胱肿瘤的动物模型中,其致病机制与胞内特定的烃化结构有关,该结构可使生物大分子(特别是核酸)发生甲基化[21]。自 Hicks 首次通过膀胱灌注 MNU 快速诱导膀胱肿瘤以来,使用化学制剂诱导 BC 在科研实验上已得到广泛推广和应用[7]。MNU 可通过膀胱灌注的方式,对部分上皮细胞进行诱导,从而诱导细胞癌变和膀胱癌的发生,此过程中不受酶代谢和肠道菌群转化的影响。与间接致癌物诱导的实验性 BC 相比,MNU 诱导的实验性 BC 操作方法简单快捷,具备毒性弱,潜伏期短,癌变部位固定、致癌率高、致癌效果明显等优势[7-9]。MNU 对所有啮齿动物都有致癌作用,但致癌程度不同,其中大鼠的致癌作用最强,不同种类大鼠的易感性也不相同,其中 SD 大鼠对其最敏感。大量研究结果表明,MNU 诱发的膀胱肿瘤为移行性上皮癌,其形态及病理特点与人膀胱癌有明显的相似性[9-11]。此外,相对于胃肠道给药,膀胱灌注具有更高的剂量控制精度,且能减少对其他脏器的损害。为此,本课题拟采用 MNU 诱导的方法,建立大鼠膀胱癌原位模型。虽然膀胱灌注 MNU 诱导大鼠膀胱肿瘤模型已经是一种很成熟的方法,相关文献报道也很多,且发生何种病理学改变都已经相当清楚,但为更加准确地了解及分析其成瘤过程为后续蛋白组学检测奠定瘤模基础,本实验再次分不同阶段观察及确认 BC 的病理学特征及改变和差异。按照 6 个不同时间点取材并分析,我们得到了以上不同时间大鼠膀胱肿瘤的病理结果。经过对肿瘤形成过程的探索实验研究,我们再次明确了 BC 的发生及发展情况,肿瘤可在第 4 周产生,在第 8~9 周后形成明显肿瘤,且肿瘤产生情况可观、可靠,这为我们后续进行蛋白组学检测及分析奠定良好的基础及提供了可靠依据。

血尿是膀胱癌重要且主要的临床症状之一,MNU 膀胱原位癌造模过程漫长且容易失败,主要原因是在造模过程中由于外部刺激及药物干预过程中的各种因素导致大鼠死亡率颇高,往往出现模型还未成功,实验大鼠已经所剩无几,因此本实验在经过多次尝试及文献查阅的基础上对造模方式进行了总结并加以改良,形成了一套相对完整且便捷、死亡率低的造模手术手法。通过本实验研究及技术改进,我们找到了一种更适合的插管给药造模手法,这种手法可以降低因经尿道插管不当导致的大鼠不适及其引起的提前死亡现象,这为后续膀胱灌注给药干预实验提供了先期的技术保障,也为膀胱癌治疗相关基础研究方面提供可靠依据。

参考文献:

[1] 孟庭瑞, 杨明莹, 刘玉芹, 等. 国外膀胱癌患者报告结局的研究进展[J]. 护士进修杂志, 2022, 37(12): 1094-1099.

[2] 吴金生, 王清明, 郑传秋, 等. 姜黄素对 N-甲基亚硝基脲诱发膀胱癌大鼠化学干预作用及机制分析[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(5): 567-571.

[3] Cheung G, Sahai A, Billia M, et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer[J]. BMC Med, 2013, 11: 13.

[4] 胡锦丹, 王宇. 中医药治疗膀胱癌临床研究进展及机制概述

[J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 91-95.
[5] 吴玥, 王珏, 冯婷婷, 等. 基于动物模型的药物筛选数据库的建立[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 778-786.
[6] Bitaraf M, Muhammadnejad S, Azimzadeh A, et al. Evaluation of direct intramural injection to the bladder wall as a method for developing orthotopic tumor models [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(6): 575-581.
[7] Hicks RM. Carcinogenesis in the urinary bladder in schistosomiasis[J]. Emirates Med J, 1980,1:267-271.
[8] 唐茂盛. MNU 灌肠诱导大鼠结肠癌模型的构建及 RNAi 干扰 CD133 基因对结肠癌的影响研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
[9] 唐小莹, 潘春武, 孙俊, 等. 大鼠原位膀胱癌模型的建立与 CT 诊断价值[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(1): 6-8, 彩 2.
[10] 吴志平, 石家齐, 由慧娟, 等. N-甲基亚硝基脲诱导大鼠膀胱肿瘤动物模型的实验研究[J]. 贵州医药, 2012, 36(3): 205-208.
[11] 张祥, 许天源, 夏磊磊, 等. 原位膀胱癌大鼠建模方法比较及超声鉴定方法[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2015, 7(2): 99-103.
[12] 王杰, 商建伟, 李诗梦, 等. 王沛论治膀胱癌经验[J]. 中医杂志, 2022, 63(12): 1118-1121.
[13] 蓝芳, 刘少会, 谢永祥, 等. 尿血消 1 号对湿热型肾性血尿大鼠氧化应激的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(1): 17-20.
[14] 何改丽, 翟文生, 倪锦玉, 等. 血尿的三维辨治[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(8): 封 3-封 4.
[15] 马筱璠, 吴竞, 陈扬荣. 陈扬荣教授从热虚瘀论治肾性血尿经验[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(3): 1-3.
[16] 李红, 贺娟, 刘丽霞, 等. 高继宁教授论治健脾补肾法与慢性肾脏病[J]. 光明中医, 2015, 30(1): 149-150.
[17] 李朝玲, 李锋. 肾性血尿的中医研究进展[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(12): 176-178.
[18] 刘奇峰. 清肾止血汤对慢性肾炎血尿(下焦湿热型)的临床研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2013.
[19] 崔鑫, 吕健, 邓跃毅, 等. 三金片治疗下焦湿热证急性单纯性下尿路感染的随机对照双盲多中心临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2681-2686.
[20] 钱立新, 刘训良, 丁鸿, 等. N-甲基亚硝基脲诱导大鼠膀胱肿瘤作用的动态观察[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(5): 563-564.
[21] Hicks RM, Wakefield JS. Rapid induction of bladder cancer in rats with *N*-methyl-*N*-nitrosourea I. Histology [J]. Chem Biol Interact, 1972, 5(2): 139-152.

〔收稿日期〕2023-07-22

(上接第 13 页)

[11] 王居平, 赵静, 周青宏, 等. 下调肿瘤源性免疫球蛋白 G 表达对胃癌细胞增殖的影响及其机制研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(1): 1-5, 16.
[12] Chu J, Li Y, Deng Z, et al. IGHG1 regulates prostate cancer growth via the MEK/ERK/c-myc pathway [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 7201562.
[13] Qian J, Ji F, Ye X, et al. IGHG1 promotes motility likely through epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer [J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(2): 282-290.
[14] 彭国茹, 张沄, 王宋平. 大蒜素抑制 TGF-β1/SMAD2 通路减轻哮喘小鼠气道炎症并调节气道重塑[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(5): 385-390.
[15] Yoshida K, Matsuzaki K, Murata M, et al. Clinico-pathological importance of TGF-β/phospho-smad signaling during human hepatic fibrocarcinogenesis [J]. Cancers (Basel), 2018, 10(6): 183.
[16] Dong H, Diao H, Zhao Y, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signalling [J]. Cell Prolif, 2019, 52(5): e12633.
[17] Xiong R, Gao J, Yin T. G3BP1 activates the TGF-β/Smad signaling pathway to promote gastric cancer [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 7149-7156.
[18] Zhao H, Gao Y, Chen Q, et al. RAD51AP1 promotes progression of ovarian cancer via TGF-β/Smad signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(4): 1927-1938.
[19] 刘波, 温陈, 李龙. TGF-β 通过激活 smad 通路促进肝细胞癌 Huh7 细胞增殖的机制研究[J]. 现代医学, 2019, 47(11): 1403-1406.
[20] Raz S, Stark M, Assaraf YG. Binding of a Smad4/Ets-1 complex to a novel intragenic regulatory element in exon12 of FPGS underlies decreased gene expression and antifolate resistance in leukemia [J]. Oncotarget, 2014, 5(19): 9183-9198.

〔收稿日期〕2023-02-03

王伟伟,席鑫. 定坤丹对子宫内膜异位症大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 55-61.
Wang WW, Xi X. Effect of Dingkun pill on the PI3K/AKT/mTOR signal pathway in rats with endometriosis［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 55-61.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.009

定坤丹对子宫内膜异位症大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响

王伟伟[1*],席　鑫[2]

(1.漯河医学高等专科学校第二附属医院妇产科,河南 漯河　462300;2.河南省中医药研究院附属医院妇科,郑州　450004)

【摘要】　目的　探索定坤丹对子宫内膜异位症(EMs)大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响。**方法**　通过异位移植子宫内膜组织,构建 EMs 大鼠模型,随机分为 5 组:模型组(M 组)、定坤丹低(1.13 g/kg)剂量组(DKP-L 组)、定坤丹中(2.26 g/kg)剂量组(DKP-M 组)、定坤丹高(4.52 g/kg)剂量组(DKP-H 组)、孕三烯酮(60 mg/kg)组(GES 组),每组 12 只,另取 12 只正常 SD 大鼠只开腹不异位移植子宫内膜组织,设为假手术组(Sham 组),以药物分组干预后处死大鼠,测定各组大鼠异位子宫内膜质量与体积,免疫组织化学染色检测大鼠异位子宫内膜微血管密度(CD31 阳性率)与 VEGF、MMP-9 表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血清 VEGF、MMP-9、iNOS、TNF-α 水平;蛋白免疫印迹实验检测大鼠异位子宫内膜 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达。**结果**　与 Sham 组相比,M 组大鼠异位子宫内膜微血管密度、VEGF 与 MMP-9 表达、血清 VEGF、MMP-9、iNOS 及 TNF-α 水平、异位子宫内膜织 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 明显升高($P<0.05$);与 M 组相比,DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠异位子宫内膜质量与体积、异位子宫内膜微血管密度、VEGF 与 MMP-9 表达、血清 VEGF、MMP-9、iNOS 及 TNF-α 水平、异位子宫内膜 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低,且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性($P<0.05$);DKP-H 组和 GES 组相比,大鼠各指标无明显差异($P>0.05$)。**结论**　定坤丹可减轻炎症,抑制 EMs 大鼠异位内膜生长,可能是通过阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号途径传导实现的。

【关键词】　定坤丹;子宫内膜异位症;PI3K/AKT/mTOR;信号通路
【中图分类号】R-33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0055-07

Effect of Dingkun pill on the PI3K/AKT/mTOR signal pathway in rats with endometriosis

WANG Weiwei[1*], XI Xin[2]

(1. Obstetrics and Gynecology of the Second Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462300, China.
2. Department of Gynecology of the Affiliated Hospital of Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004)

【Abstract】　Objective　To explore the effect of Dingkun pill on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with endometriosis (EM). **Methods**　EM rat models were established by heterotopic transplantation of endometrial tissue and randomly divided into five groups: model group (M group), Dingkun pill low (1.13 g/kg) dose group (DKP-L group), Dingkun pill medium (2.26 g/kg) dose group (DKP-M group), Dingkun pill high (4.52 g/kg) dose group (DKP-H group) and gestrinone (60 mg/kg) group (GES group) with 12 rats in each group. The abdomen was opened without transplantation of ectopic endometrial tissue in another 12 normal SD rats as sham operation group (Sham group).

[**作者简介**]王伟伟(1988—),女,副主任中医师,研究方向:不孕症与痛证。E-mail:wangww462300@163.com

The rats were sacrificed after drug treatments, The mass and volume of ectopic endometrium were measured. The microvessel density (CD31-positive rate) and expression of VEGF and MMP-9 in rat ectopic endometrial tissue were assessed by immunohistochemical staining. Rat serum VEGF, MMP-9, iNOS and TNF-α levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. Expression of PI3K/AKT/mTOR pathway-related proteins in rat ectopic endometrial tissue was detected by Western blot. **Results** Compared with those in the sham group, the microvessel density, VEGF and MMP-9 expression, serum VEGF, MMP-9, iNOS and TNF-α levels, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR in ectopic endometrial tissue were significantly increased in the M group ($P<0.05$). Compared with the findings in the M group, the ectopic endometrial volume, weight of the ectopic lesion, microvessel density of the ectopic endometrial tissue, VEGF and MMP-9 expression, serum VEGF, MMP-9, iNOS and TNF-α levels, p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR in ectopic endometrial tissue were all decreased in the DKP-L, DKP-M, DKP-H groups, and dose-dependent effects were observed in Dingkun pill low dose, Dingkun pill medium dose, and Dingkun pill high dose groups ($P<0.05$). Compared with DKP-H group and GES group, no significant difference was found in the indicators ($P>0.05$). **Conclusions** Dingkun Dan reduces inflammation and inhibits ectopic endometrial growth in EM rats, which may be achieved by blocking the PI3K/AKT/mTOR signal pathway.

【**Keywords**】 Dingkun pill; endometriosis; PI3K/AKT/mTOR; signaling pathway

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

子宫内膜异位症(endometriosis,EMs)是女性常见的妇科疑难病症,由子宫内膜组织转移侵袭到子宫之外部位生长引发,可造成患病妇女盆腔疼痛、性交困难、痛经及不孕不育,极大影响其生殖健康及生活质量[1-2]。EMs 发病的病理机制复杂,现有研究表明炎症和新生血管形成与其密切相关,清除活性氧自由基,抑制炎症及血管新生,对 EMs 的治疗显示出良好功效[3-4]。PI3K/AKT/mTOR 是机体调控细胞增殖、迁移和分化、炎症、血管形成等生理过程的重要信号,在 EMs 中被激活,与其病情发展密切相关,抑制其通路蛋白磷酸化,可减轻慢性炎症,改善 EMs 引发的疼痛症状[5-6]。定坤丹是始于清代的一种妇科综合调理方剂,具有养血健脾、调经舒郁、通阳活血之功,可减轻 EMs 患者卵巢内分泌功能损伤,降低血清 VEGF、MMP-9 水平,抑制血管生成,缓解其临床症状[7-8],而在关于前列腺癌的研究中发现,VEGF 可激活 PI3K/AKT/mTOR 信号,促进血管生成[9],因而推测定坤丹可能抑制 EMs 患者体内 PI3K/AKT/mTOR 信号,改善其临床症状,本文通过构建 EMs 模型大鼠,对此进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 72 只,体重 205~235 g,雌性,6~8 周龄,于北京维通利华实验动物技术有限公司购入[SCXK(京)2021-0006],大鼠饲养在河南省中医药研究院动物房中[SYXK(豫)2019-0001],温度 22~25℃,相对湿度 50%~60%,12 h/12 h 明暗周期循环,大鼠自由采食饮水,保持动物房中通风好、噪音小。本研究通过漯河医学高等专科学校第二附属医院实验伦理委员会的审批(20221115),符合动物伦理学标准,在实验过程中按照动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

定坤丹购自山西广誉远国药有限公司—国药准字 Z14020656,批号:20150928,规格:每颗 10.8 g;孕三烯酮胶囊(规格每粒 2.5 mg)购自英国罗素制药公司,批号:A20070002;兔源 Anti-CD31 一抗、兔源 Anti-VEGF 一抗、兔源 Anti-MMP-9 一抗均购自 abcam 公司,货号:ab282746、ab32152、ab76003;二步法免疫组化试剂盒(抗兔,带 DAB 显色液)购自广州晶欣生物科技有限公司,货号:IHK2021;大鼠 iNOS ELISA 试剂盒购自优利科(上海)生命科学有限公司,货号:YLK-EDS339;大鼠 MMP-9 ELISA 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司,货号:ER0139;兔抗大鼠 Anti-GAPDH、Anti-p-PI3K、Anti-p-AKT、Anti-PI3K 与 Anti-AKT 一抗、大鼠 VEGF 与 TNF-α ELISA 试剂盒、兔抗大鼠一抗、羊抗兔二抗(HRP 标记)均购自英国 Abcam 公司,货号:ab181602、ab138364、ab38449、ab151549、ab179463、ab100786、ab100785、ab150077。

酶标仪购自美国 BioTek 公司,型号:2010ELX-808,批号:20170520;显微镜购自日本 Nikon 公司,型号:Eclipse E100,批号:20190523;组织脱水机购自深圳市达科为医疗科技有限公司,型号:HP300,批号:20180924;包埋机、石蜡切片机均购自德国徕

卡公司，型号：EG1160、RM2016，批号：20160510、20170321；全自动化学发光图像分析系统、微型垂直转印电泳槽、微型垂直电泳槽、电泳仪均购自上海天能科技有限公司，型号：Tanon4600、VE186、VE180、EPS300，批号：20180923、20190520、20190726、20171203。

1.3　实验方法

1.3.1　EMs 模型制备及分组给药

参考文献[10]以自体移植法制备 EMs 模型大鼠：阴道涂片检查大鼠月经周期，选动情周期正常且持续 2 个周期，每个动情周期持续 4~5 d 的大鼠，给予每只 0.2 mg 的戊酸雌二醇灌胃干预，24 h 后向其腹腔内注入 40 mg/kg 的戊巴比妥钠（质量分数为 3%），大鼠进入深度麻醉装袋后，将其仰卧并固定在鼠板上，于其腹部剃毛、消毒，开腹后找到子宫，剪取部分子宫组织，获取子宫内膜后剪为小碎片（5 mm×5 mm），于每只大鼠腹壁内表面移植 3 块，缝合伤口后消毒，然后向造模大鼠腹腔内注入青霉素（连续注射 3 d），10 d 后以每只 0.2 mg 的戊酸雌二醇灌胃 5 d，自开始造模到第 4 周时，选处于动情期的大鼠开腹，发现其腹壁内表面移植的子宫内膜体积变大且表面覆有结缔组织及血管，整体呈现透明结节状或囊状，内部有液体聚集，提示 EMs 造模成功，将其随机分为模型组（M 组）、定坤丹低（1.13 g/kg）剂量组（DKP-L 组）、定坤丹中（2.26 g/kg）剂量组（DKP-M 组）、定坤丹高（4.52 g/kg）剂量组（DKP-H 组）、孕三烯酮（60 mg/kg）组（GES 组），另取 12 只 SD 大鼠只开腹不移植子宫内膜，设为假手术组（Sham 组）。

将定坤丹丸剂[11]研碎，以生理盐水溶解，制备 0.113、0.226、0.452 g/mL 的定坤丹药液，孕三烯酮[12]胶囊，取出胶囊中药物，溶于生理盐水，制成浓度 6 mg/mL 的孕三烯酮药液，DKP-L 组、DKP-M 组、DKP-H 组和 GES 组大鼠均灌胃 10 mg/kg 剂量相应药液，M 组和 Sham 组大鼠以 10 mg/kg 剂量生理盐水灌胃，各组大鼠均持续灌胃 14 d 且每天 1 次。

1.3.2　大鼠异位子宫内膜质量与体积测定及标本采集

末次给药干预后 24 h，以 1.3.1 中方法麻醉大鼠，采用注射器从腹主动脉取血，静置后离心（1000 r/min，4℃，15 min），吸出血清至干净 EP 管中，分组标记后，冻存在-80℃备用；开腹取出异位子宫内膜，称量其体积及重量；然后剪取 0.4 g 子宫内膜组织（Sham 组取正常子宫内膜组织），以 RIPA 裂解液通过匀浆、离心（3000 r/min，4℃，20 min）提取各组总蛋白后，以试剂盒通过 BCA 法测出其浓度并将其调至各组相同，分组标记后，冻存在-80℃；洗涤剩余的子宫内膜组织后在 10%甲醛中固定，于 30%蔗糖中脱水后用二甲苯透明，于热石蜡中包埋后用切片机做常规切片备用。

1.3.3　大鼠异位子宫内膜组织 MMP-9、VEGF 表达与微血管密度检测

将 1.3.2 中子宫内膜组织切片脱蜡、水化、0.3% H_2O_2 孵育、洗涤、5%血清封闭后，选出 3 张切片，分别以 MMP-9、VEGF、CD31 一抗孵育、洗涤后，采用试剂盒中试剂孵育二抗及进行 DAB 染色，最终完成免疫组化染色操作，具体参照制造商说明书中指导步骤进行，采用同样方法再次对切片做脱水、透明处理，接着分别铺展在载玻片上封片观察，使用 Image J 软件分析图像，计算出各蛋白阳性染色比例 = 视野中阳性染色面积/视野中切片总面积×100%。

1.3.4　大鼠血清中 MMP-9、VEGF、TNF-α、iNOS 水平检测

1.3.2 中存在-80℃备用的血清取出后提前放在 4℃冰箱中，缓慢解冻后通过 ELISA 法测量其中 MMP-9、VEGF、TNF-α、iNOS 水平，具体步骤按照各自 ELISA 试剂盒说明书指导进行。

1.3.5　大鼠子宫内膜组织 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达检测

将 1.3.2 中存在-80℃备用的子宫内膜组织蛋白液提前取出，置于 4℃解冻，分别取 20 μL 各组样品液，于沸水浴中加热来变性其中蛋白，上样跑电泳来使蛋白于分离胶中分离，然后取出凝胶通过湿转实验将蛋白转至硝酸纤维膜上，根据分子量将蛋白 p-AKT、p-PI3K、AKT、PI3K、p-mTOR、mTOR、GAPDH 自膜上裁下，置于小盒中分组标记，均加入 5%的脱脂奶粉溶液于摇床上孵育（室温，1.5 h），封闭蛋白非特异位点，4℃孵育一抗过夜，室温孵育二抗 2 h，经化学发光试剂对蛋白条带进行显色并在凝胶成像仪中采集其图像，用 Image J 软件定量上述蛋白灰度值，以内参 GAPDH 灰度值为准量化各组蛋白相对表达。

1.4　统计学方法

所得实验数据均用平均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）进行描述，并运用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，采用单因素方差分析比较多组间数据差异，组间两两数据

进一步差异比较行 LSD-t 检验，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 定坤丹对大鼠异位子宫内膜生长的影响

与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠异位子宫内膜质量与体积均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，异位子宫内膜质量与体积均无明显差异（$P>0.05$），见表 1。

2.2 定坤丹对大鼠异位子宫内膜微血管密度（即 CD31 阳性率）的影响

与 Sham 组正常子宫内膜相比，M 组大鼠异位子宫内膜 CD31 阳性率明显升高（$P<0.05$）；与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠异位子宫内膜 CD31 阳性率均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，大鼠异位子宫内膜 CD31 阳性率无明显差异（$P>0.05$），见图 1，表 2。

2.3 定坤丹对大鼠血清 MMP-9 和 VEGF 水平的影响

与 Sham 组相比，M 组大鼠血清 MMP-9 和 VEGF 的水平明显升高（$P<0.05$）；与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠血清 MMP-9 和 VEGF 的水平均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，血清 MMP-9 和 VEGF 的水平均无明显差异（$P>0.05$），见表 3。

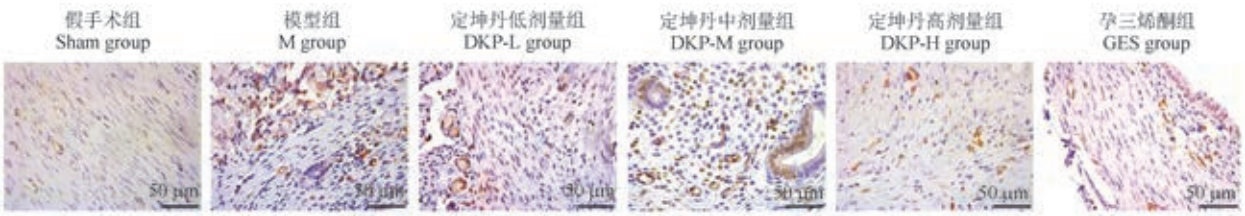


图 1 各组大鼠子宫内膜 CD31 表达

Figure 1 Expression of CD31 in endometrium of rats in each group

表 1 各组大鼠异位子宫内膜质量与体积（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Table 1 Volume of ectopic endometrium and the weight of ectopic lesions of rats in each group

组别 Groups	异位子宫内膜体积（mm^3） Volume of ectopic endometrium	异位子宫内膜质量（mg） Mass of ectopic endometrium
假手术组 Sham group	00.00±0.00	00.00±0.00
模型组 M group	118.76±15.09*	151.02±21.03*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	79.03±7.35$^{\#}$	101.78±12.32$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	36.42±6.01$^{\#\triangle}$	54.33±8.24$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	10.07±3.32$^{\#\triangle\blacktriangle}$	12.15±3.37$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	9.58±2.76$^{\#\triangle\blacktriangle}$	11.03±2.65$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注：与 Sham 组相比，$^{*}P<0.05$；与 M 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 DKP-L 组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与 DKP-M 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

表 2 各组大鼠异位子宫内膜 CD31 阳性率（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Table 2 Positive rate of CD31 in ectopic endometrium of rats in each group

组别 Groups	CD31 阳性率（%） CD31 positive rate
假手术组 Sham group	6.03±1.45
模型组 M group	51.64±7.12*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	37.32±4.31$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	23.45±2.74$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	9.78±3.12$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	8.45±2.68$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注：与 Sham 组相比，$^{*}P<0.05$；与 M 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 DKP-L 组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与 DKP-M 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

2.4　定坤丹对大鼠异位子宫内膜 MMP-9 和 VEGF 表达的影响

与 Sham 组相比，M 组大鼠异位子宫内膜 MMP-9 和 VEGF 阳性比例明显升高（$P<0.05$）；与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠异位子宫内膜 MMP-9 和 VEGF 阳性比例均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，异位子宫内膜 MMP-9 和 VEGF 阳性比例均无明显差异（$P>0.05$），见图 2，表 4。

2.5　定坤丹对大鼠血清炎性因子 TNF-α 和 iNOS 水平的影响

与 Sham 组相比，M 组大鼠血清炎性因子 TNF-α 和 iNOS 水平明显升高（$P<0.05$）；与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠血清炎性因子 TNF-α 和 iNOS 水平均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，血清炎性因子 TNF-α 和 iNOS 水平均无明显差异（$P>0.05$），见表 5。

2.6　定坤丹对大鼠异位子宫内膜 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

与 Sham 组相比，M 组大鼠异位子宫内膜 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 明显升高（$P<0.05$）；与 M 组相比，DKP-L、DKP-M、DKP-H 组大鼠异位子宫内膜 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 均降低，且 DKP-L、DKP-M、DKP-H 组之间呈剂量依赖性（$P<0.05$）；DKP-H 组和 GES 组相比，大鼠异位子宫内膜 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 无明显差异（$P>0.05$），见图 3，表 6。

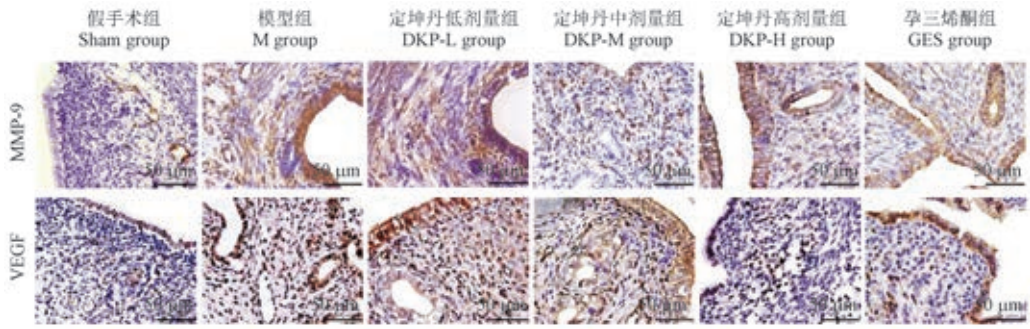


图 2　各组大鼠异位子宫内膜 VEGF 与 MMP-9 表达

Figure 2　Expression of VEGF and MMP-9 in ectopic endometrium of rats in each group

表 3　各组大鼠血清 MMP-9 和 VEGF 水平（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Table 3　Serum MMP-9 and VEGF levels of rats in each group

组别 Groups	VEGF（ng/L）	MMP-9（ng/mL）
假手术组 Sham group	13.54±1.56	10.57±0.92
模型组 M group	37.43±3.02*	35.23±2.40*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	29.85±2.14$^{\#}$	27.18±1.93$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	22.02±1.06$^{\#\triangle}$	20.01±1.14$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	14.37±1.23$^{\#\triangle\blacktriangle}$	12.02±1.27$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	13.22±1.47$^{\#\triangle\blacktriangle}$	11.43±1.58$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注：与 Sham 组相比，$^{*}P<0.05$；与 M 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 DKP-L 组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与 DKP-M 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

表 4　各组大鼠异位子宫内膜 VEGF 与 MMP-9 阳性染色比例（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Table 4　Positive staining ratio of VEGF and MMP-9 in ectopic endometrium of rats in each group

组别 Groups	VEGF 阳性染色比例（%） Proportion of VEGF positive staining	MMP-9 阳性染色比例（%） MMP-9 positive staining ratio
假手术组 Sham group	9.74±1.25	7.15±0.79
模型组 M group	56.38±4.02*	46.83±3.41*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	42.01±2.93$^{\#}$	34.07±1.82$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	27.42±1.86$^{\#\triangle}$	21.61±1.12$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	12.03±3.03$^{\#\triangle\blacktriangle}$	9.02±2.23$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	11.29±2.87$^{\#\triangle\blacktriangle}$	8.13±1.85$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注：与 Sham 组相比，$^{*}P<0.05$；与 M 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 DKP-L 组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与 DKP-M 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

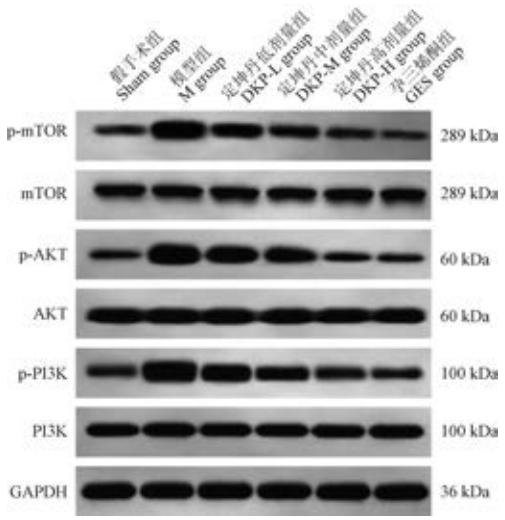


图 3 免疫印迹检测各组大鼠异位子宫内膜 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达

Figure 3 Immunoblotting detection of PI3K/AKT/mTOR pathway related protein expression in ectopic endometrium of rats in each group

表 5 各组大鼠血清 iNOS、TNF-α 水平($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 5 Serum iNOS and TNF-α level of rats in each group

组别 Groups	iNOS(U/mL)	TNF-α(ng/mL)
假手术组 Sham group	14.03±2.52	0.71±0.09
模型组 M group	67.17±5.36*	3.28±0.31*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	50.34±3.71$^{\#}$	2.35±0.14$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	31.05±2.59$^{\#\triangle}$	1.59±0.11$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	16.14±3.82$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.80±0.17$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	15.08±4.01$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.75±0.16$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注:与 Sham 组相比,$^{*}P<0.05$;与 M 组相比,$^{\#}P<0.05$;与 DKP-L 组相比,$^{\triangle}P<0.05$;与 DKP-M 组相比,$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

表 6 各组大鼠异位子宫内膜 PI3K/AKT/mTOR 通路相关蛋白表达($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 6 Expression of PI3K/AKT/mTOR pathway related proteins in ectopic endometrium of rats in each group

组别 Groups	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
假手术组 Sham group	0.14±0.04	0.17±0.05	0.21±0.06
模型组 M group	1.73±0.16*	1.86±0.17*	2.08±0.21*
定坤丹低剂量组 DKP-L group	1.24±0.11$^{\#}$	1.32±0.12$^{\#}$	1.47±0.17$^{\#}$
定坤丹中剂量组 DKP-M group	0.73±0.09$^{\#\triangle}$	0.79±0.14$^{\#\triangle}$	0.85±0.19$^{\#\triangle}$
定坤丹高剂量组 DKP-H group	0.20±0.07$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.23±0.07$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.25±0.08$^{\#\triangle\blacktriangle}$
孕三烯酮组 GES group	0.18±0.06$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.20±0.05$^{\#\triangle\blacktriangle}$	0.22±0.07$^{\#\triangle\blacktriangle}$

注:与 Sham 组相比,$^{*}P<0.05$;与 M 组相比,$^{\#}P<0.05$;与 DKP-L 组相比,$^{\triangle}P<0.05$;与 DKP-M 组相比,$^{\blacktriangle}P<0.05$。

Note. Compared with Sham group, $^{*}P<0.05$. Compared with M group, $^{\#}P<0.05$. Compared with DKP-L group, $^{\triangle}P<0.05$. Compared with DKP-M group, $^{\blacktriangle}P<0.05$.

3 讨论

EMs 作为一种常发生于育龄妇女的妇科疾病,有较高的发病率,易复发,且具有一定的恶变概率,不仅导致月经痛、盆腔痛、性交痛等各种疼痛,严重时还会影响生育功能,给患者带来很大身心痛苦,因此,如何有效地治疗 EMs 是当前临床研究的热点[13-14]。在 EMs 发病过程中,新生血管生成对子宫内膜的异位种植成功至关重要,机体免疫细胞的激活可诱导促炎因子与抑炎因子表达失衡,导致炎症发生,进一步促进异位子宫内膜病灶的生长,因而降低 VEGF、TGF-β 和 MMP-9 的表达,抑制炎症及血管新生,可有效延缓 EMs 进展[3-4,15]。定坤丹作为一种具有调经理气、补肾活血、健脾补血功效的传统方剂,可明显降低 VEGF 表达,减轻 EMs 引发的盆腔疼痛,改善其临床症状[16-17],本文通过异位移植子宫内膜组织,构建 EMs 大鼠模型,结果显示,造模大鼠子宫内膜组织在大鼠腹壁内表面生长,且血清 VEGF、MMP-9、iNOS 及 TNF-α 水平明显升高,表明子宫内膜组织的异位生长可引发炎症,上调促血管生长因子表达;CD31 是一种血小板-内皮细胞黏附分子,能作为微血管标记物[18],造模大鼠异位子宫内膜 CD31、VEGF 与 MMP-9 表达明显升高,表明 EMs 大鼠中新生血管在异位病灶大量生成,而以

定坤丹干预 EMs 大鼠，可降低其异位子宫内膜 VEGF 与 MMP-9 表达、微血管密度、血清 VEGF、MMP-9、iNOS 及 TNF-α 水平，减少炎性因子及促血管生长因子表达合成，抑制炎症及新生血管形成，最终降低大鼠异位子宫内膜体积与异位病灶重量，延缓 EMs 病情进展，进一步证实了定坤丹对 EMs 的治疗作用。

PI3K/AKT/mTOR 参与介导炎症及新生血管形成过程，在肿瘤、肺损伤、EMs 等疾病的病理过程中起到重要的调控作用，激活该通路，可通过抑制自噬来促进肺部炎症和纤维化[19]，阻碍其信号传导，可下调 VEGF 表达，通过抑制血管生成而延缓前列腺癌的进展[9]，并可减弱子宫内膜基质细胞增殖、迁移和侵袭能力，显著减轻 EMs 患者异位子宫内膜病灶的生长[20]，由此可知，PI3K/AKT/mTOR 是治疗 EMs 的一个重要靶点。本文结果显示，EMs 大鼠异位子宫内膜 PI3K、AKT、mTOR 磷酸化水平均明显升高，而以不同剂量定坤丹处理后，可减弱其磷酸化水平并呈剂量依赖性，表明定坤丹可阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号途径激活传导，减弱炎症及血管新生，改善 EMs 患者临床症状。

综上所述，定坤丹可下调 PI3K、AKT、mTOR 的磷酸化水平，减轻炎症，抑制新生血管生成，延缓异位子宫内膜病灶的生长及 EMs 进展，抑制 PI3K/AKT/mTOR 激活可能是其药理机制，本文为定坤丹治疗 EMs 的临床推广应用提供了新的参考依据，但还存在一定不足，后续还需通过激活与拮抗 PI3K/AKT/mTOR 信号做对照验证，以便深入阐释其药理机制。

参考文献：

[1] Arafah M, Rashid S, Akhtar M. Endometriosis: a comprehensive review [J]. Adv Anat Pathol, 2021, 28(1): 30-43.

[2] Moustafa S, Burn M, Mamillapalli R, et al. Accurate diagnosis of endometriosis using serum microRNAs [J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 223(4): 557.e1-557.e11.

[3] Hung SW, Zhang R, Tan Z, et al. Pharmaceuticals targeting signaling pathways of endometriosis as potential new medical treatment: a review [J]. Med Res Rev, 2021, 41(4): 2489-2564.

[4] Machairiotis N, Vasilakaki S, Thomakos N. Inflammatory mediators and pain in endometriosis: a systematic review [J]. Biomedicines, 2021, 9(1): 54.

[5] Bora G, Yaba A. The role of mitogen-activated protein kinase signaling pathway in endometriosis [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(5): 1610-1623.

[6] Liu Y, Qin X, Lu X, et al. Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat model [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(10): 963-970.

[7] 华玲玲，薛青，汤月萍，等. 定坤丹联合复宫宁颗粒治疗子宫内膜异位症的疗效及对血清 MCP-1、sICAM-1、CA125 水平的影响 [J]. 现代生物医学进展，2020，20(2)：329-332.

[8] 徐敏，季新梅，朱春仁. 定坤丹联合米非司酮治疗子宫内膜异位症 [J]. 中国临床研究，2019，32(4)：556-559.

[9] Cho HD, Kim JH, Park JK, et al. *Kochia scoparia* seed extract suppresses VEGF-induced angiogenesis via modulating VEGF receptor 2 and PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 684-693.

[10] 卢建军，戴晓怡，李响，等. 萝卜硫素对子宫内膜异位症模型大鼠在位内膜增殖、血管生成及 JAK2/STAT3 信号通路的影响 [J]. 中国免疫学杂志，2021，37(11)：1297-1301，1307.

[11] 郑娟，谈勇. 定坤丹联合西药对损伤性大鼠子宫内膜 β-catenin，VEGF，MMP-9 mRNA 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2020，45(15)：3713-3718.

[12] 陈帆，高扬，边文玲，等. 萝卜硫素对大鼠子宫内膜异位组织 Nrf2/Keap1/HO-1 信号通路影响 [J]. 中国计划生育学杂志，2021，29(4)：652-656.

[13] Gibbons WE. My Mama had endometriosis [J]. Fertil Steril, 2021, 115(2): 319-320.

[14] Chiaffarino F, Cipriani S, Ricci E, et al. Endometriosis and irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Arch Gynecol Obstet, 2021, 303(1): 17-25.

[15] Arablou T, Aryaeian N, Khodaverdi S, et al. The effects of resveratrol on the expression of VEGF, TGF-β, and MMP-9 in endometrial stromal cells of women with endometriosis [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6054.

[16] 黄明，孙芳梅. 定坤丹治疗轻中度子宫内膜异位症盆腔疼痛的疗效评价 [J]. 中国初级卫生保健，2019，33(5)：87-89.

[17] 刘刚英，谭丽. 定坤丹联合米非司酮对子宫内膜异位症患者疗效及相关血清指标水平的影响 [J]. 中国合理用药探索，2020，17(3)：43-46.

[18] Xing J, He W, Ding YW, et al. Correlation between Contrast-Enhanced Ultrasound and Microvessel Density via CD31 and CD34 in a rabbit VX2 lung peripheral tumor model [J]. Med Ultrason, 2018, 1(1): 37-42.

[19] Cong LH, Li T, Wang H, et al. IL-17A-producing T cells exacerbate fine particulate matter-induced lung inflammation and fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15): 8532-8544.

[20] Zhou X, Chen Z, Pei L, et al. microRNA miR-106a-5p targets forkhead box transcription factor FOXC1 to suppress the cell proliferation, migration, and invasion of ectopic endometrial stromal cells via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 2203-2213.

〔收稿日期〕2023-02-17

张倩,黄明生,蒋黎,等. 纳米二氧化铈亚急性染毒对雄性小鼠脏器结构和氧化还原指标的影响［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 62-67.
Zhang Q, Huang MS, Jiang L, et al. Subacute effect of CeO_2NPs on organ structures and redox indicators in male mice［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 62-67.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.010

纳米二氧化铈亚急性染毒对雄性小鼠脏器结构和氧化还原指标的影响

张 倩[1],黄明生[2],蒋 黎[1],顾冬梅[1],殷 俊[1*]

(1.扬州大学比较医学中心,江苏 扬州 225000;2.江苏大学比较医学中心,江苏 镇江 212013)

【摘要】 目的 探究纳米二氧化铈(CeO_2NPs)亚急性腹腔染毒对 ICR 小鼠体重、主要脏器以及血清氧化还原指标的影响。**方法** 将雄性 ICR 小鼠 35 只随机分成 5 组,每组 7 只。设生理盐水对照组和不同浓度的 CeO_2NPs(100、500、1000、5000 μg/kg)试验组。小鼠腹腔隔日注射 CeO_2NPs,28 d 后进行相关指标的检测。**结果** 与对照组相比,CeO_2NPs 各剂量组小鼠体重增长差异不显著($P>0.05$);5000 μg/kg 剂量组肝系数、附睾系数与精子存活率与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。5000 μg/kg 剂量组肝和脾内可见纳米氧化铈沉积,部分肝中可见肉芽肿。100 μg/kg 剂量组血清 SOD 和 GSH-Px 活力升高,MDA 含量降低,体现出 CeO_2NPs 的抗氧化作用,随着注射剂量的升高,CeO_2NPs 的氧化应激作用增强。**结论** 低剂量 CeO_2NPs 对机体较安全,并表现出一定的抗氧化作用,随着剂量增加,CeO_2NPs 对机体的毒性也逐渐增强。

【关键词】 纳米氧化铈;腹腔注射;组织病理;氧化还原指标
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0062-06

Subacute effect of CeO_2NPs on organ structures and redox indicators in male mice

ZHANG Qian[1], HUANG Mingsheng[2], JIANG Li[1], GU Dongmei[1], YIN Jun[1*]
(1. Comparative Medicine Center, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China.
2. Comparative Medicine Center, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of CeO_2NP subacute exposure on body weight, organ structures, and redox indicators in male mice. **Methods** Thirty-five male ICR mice were randomly divided into five groups with seven mice in each group. Normal control and CeO_2NP (100, 500, 1000 and 5000 μg/kg) groups were included. Mice were injected with CeO_2NPs intraperitoneally every other day for 28 days. **Results** Compared with the control group, no significant difference was found in weight gain ($P>0.05$), but significant differences were observed in the liver coefficient, epididymal coefficient, and sperm survival rate ($P<0.01$). In the 5000 μg/kg group, CeO_2NPs were deposited in the liver and spleen, and granuloma was found SOD and GSH-Px activities in serum of the 100 μg/kg group were increased, while MDA content was decreased, which indicated the antioxidant effect of CeO_2NPs. With the increase in dose, oxidative stress induced by CeO_2NPs was enhanced. **Conclusions** Low-dose-CeO_2NPs are safe and exert an antioxidant effect. With the increase in dose, the toxicity of CeO_2NPs also increases gradually.

【Keywords】 CeO_2NPs; intraperitoneal administration; histopathology; redox indicator
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[作者简介]张倩(1997—),女,硕士研究生,研究方向:比较医学、组织胚胎学。E-mail:1924711335@qq.com
[通信作者]殷俊(1973—),女,博士,副教授,研究方向:比较医学、组织胚胎学。E-mail:sy-yinjun@163.com

氧化铈(cerium oxide, CeO_2)是重要的镧系稀土氧化物,在机械、催化、光学、生物医学等领域具有很高的研究与应用价值[1-3]。CeO_2 的应用主要基于 CeO_2 的催化活性,铈原子既可呈现+3 价(全还原态),也可呈现+4 价(全氧化态),催化活性源自于 Ce^{4+}/Ce^{3+}之间的转换[4]。纳米材料具有体积小、比表面积大、吸附能力强等独特优势。纳米氧化铈(cerium oxide nanoparticles, CeO_2NPs)较 CeO_2 体相材料而言,Ce^{3+}/Ce^{4+}可逆转换能力更强,因此催化活性也更强[3]。相对于 Ce^{4+}而言,Ce^{3+}是不稳定的,它在遇到氧化剂,如活性氧(reactive oxygen, ROS)时,可通过氧化还原反应将 ROS 清除并转化为 Ce^{4+};当细胞内无过多的 ROS 时,CeO_2NPs 晶体的求稳特性又会使 Ce^{4+}转化为 Ce^{3+},如此循环往复。CeO_2NPs 具有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)模拟活性[5-6],当 Ce^{3+}/Ce^{4+}比率较高时,CeO_2NPs 表现出较强的 SOD 模拟活性,相反,当 Ce^{4+}/Ce^{3+}比率较高时,则 CAT 模拟活性较强。CeO_2NPs 的这种模拟天然抗氧化酶的特性使其在生物抗氧化方面具有重要应用前景,有望成为治疗氧化应激相关疾病的新型药物[7-8]。

纳米粒子可以通过吸入、摄入或皮肤渗透的方式进入体内,穿过生物膜进入细胞,引起可能的氧化应激、炎症、基因突变甚至细胞死亡,因此,根据体相材料得到的生物安全性评价结果并不完全适用于纳米材料[9]。目前,CeO_2NPs 的毒理学资料有限且不完整,已有研究者报道了 CeO_2NPs 的生物分布、生物累积以及对肺、肝等器官的毒性,但结果时有争议,且 CeO_2NPs 的亚急性毒性资料更需补充[10-12]。本研究旨在了解小鼠腹腔注射 CeO_2NPs 后主要脏器组织结构变化、附睾精子数量和形态变化、血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和 SOD 水平变化等生物学指标,其结果可为 CeO_2NPs 的进一步毒理研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究选用 8 周龄 ICR 雄性小鼠(SPF 级)共 35 只,体重 23~28 g,购自扬州大学比较医学中心[SCXK(苏)2022-0009],所有小鼠均饲养在扬州大学比较医学中心[SYXK(苏)2022-0044]屏障环境中,环境温度控制在 20~26℃,湿度控制在 40%~70%,12 h/12 h 光照黑暗交替,给予自由饮食和饮水。动物实验均由扬州大学伦理委员会审批通过(NSFC2020-SYXY-20),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氧化铈(CeO_2)分散体,纳米颗粒粒径<25 nm,购于 Sigma-Aldrich 公司,货号与规格:643009-100 ML,重量百分比浓度为 10%,分散于水中。超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:A003-1;丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:A001-3;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批号:A005-1;苏木精-伊红(HE)染液购自南京建成生物工程研究所,批号:D006-1;无水乙醇购自天津市津东天正精细化学试剂厂,批号:20210110;4%多聚甲醛购自索莱宝,批号:P1110。组织脱水机购自德国徕卡公司,型号:ASP200 S;石蜡包埋机购自德国徕卡公司,型号:EG1150 H;石蜡切片机购自德国徕卡公司,型号:RM2235。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及管理

健康雄性小鼠 35 只,按体重随机分为 5 组,对照组(control)、100 μg/kg 剂量组(CeO_2NPs 100 μg/kg)、500 μg/kg 剂量组(CeO_2NPs 500 μg/kg)、1000 μg/kg 剂量组(CeO_2NPs 1000 μg/kg)和 5000 μg/kg 剂量组(CeO_2NPs 5000 μg/kg),每组 7 只,自由采食饮水。分别按 0、100、500、1000、5000 μg/kg 体重隔日腹腔注射 CeO_2NPs 混悬液,共注射 14 次,计 28 d。给药后停饲 3 h,自由饮水。其间连续监测小鼠体重、呼吸、消化、皮肤、被毛等状态及死亡情况,直至实验结束。实验结束后小鼠禁食 13~15 h,第 2 天处死小鼠,检测各项指标。

1.3.2 器官系数测定

准确称量小鼠体重和肝、脾、肾、睾丸、附睾等脏器重量并计算器官系数。脏器系数(mg/g)=脏器重量(mg)/小鼠体重(g)。

1.3.3 附睾精子分析

(1)精子存活率:单侧附睾放入 35℃盛有 2 mL 生理盐水的平皿中,纵向剪开若干切口,35℃水浴 20 min,让精子游出。高倍镜下观察 200 条精子,计算精子存活率。(2)精子畸形率:制精子悬液推片,

甲醇固定后 HE 染色,高倍镜下观察 1000 条精子,计算精子畸变率。

1.3.4 组织病理观察

多聚甲醛固定器官,常规包埋,切 5 μm 厚的组织片,常规 HE 染色后,光学显微镜下观察。

1.3.5 血清 MDA、SOD、GSH-Px 水平测定

血清中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量的测定严格按照试剂盒说明进行。

1.4 统计学方法

应用 IBM SPSS statistics 22 软件对数据进行单因素方差统计学分析,组间两两比较采用配对双尾 t 检验,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并使用 Graphnad Prism 8 绘制统计图,当 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验鼠生物学观察和大体解剖变化

实验期间,对照组和 CeO_2NPs 各剂量组小鼠形态、行为和精神状况均正常,无死亡。于染毒第 2、8、14、20、26、32 天准确称取小鼠体重,结果显示,对照组与 CeO_2NPs 各剂量组小鼠体重均增长,组间差异不显著($P>0.05$,图 1),说明 CeO_2NPs 染毒并未对小鼠生长发育造成不良影响。剖解结果显示,5000 μg/kg 剂量组部分小鼠肝、脾明显肿大,单侧睾丸和附睾萎缩,其它器官大体结构无明显变化。

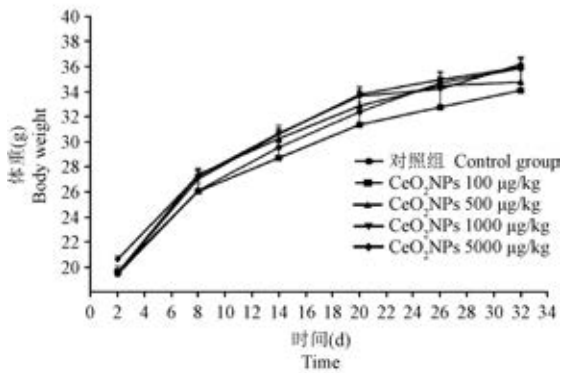


图 1 小鼠体重

Figure 1 Weight of CeO_2NPs treated mice

2.2 CeO_2NPs 对雄性小鼠脏器系数的影响

脏器系数在一定程度上反映了 CeO_2NPs 染毒对小鼠器官的影响,可对 CeO_2NPs 的安全性进行初步分析。如表 1 所示,与对照组相比,100 μg/kg 剂量组和 500 μg/kg 剂量组各脏器系数均无差异($P>0.05$);1000 μg/kg 剂量组肝系数升高显著($P<0.05$),肾、脾、睾丸和附睾系数无明显改变($P>0.05$);5000 μg/kg 剂量组睾丸和脾系数变化显著($P<0.05$),肝和附睾系数变化极显著($P<0.01$)。该结果说明大剂量 CeO_2NPs 染毒可对小鼠的肝、脾、睾丸和附睾会造成影响。

2.3 CeO_2NPs 对小鼠精子数量和质量的影响

与对照组相比,100 μg/kg 剂量组和 500 μg/kg 剂量组精子存活率和精子畸形率均无明显改变($P>0.05$);1000 μg/kg 剂量组精子存活率下降($P<0.05$),5000 μg/kg 剂量组精子存活率显著下降($P<0.01$);1000 μg/kg 剂量组和 5000 μg/kg 剂量组精子畸形率均显著升高($P<0.05$)。该结果表明低剂量 CeO_2NPs 染毒对精子存活率和畸形率无明显影响,但随着 CeO_2NPs 染毒剂量升高,小鼠精子存活率呈下降趋势,畸形率呈上升趋势(图 2)。

2.4 CeO_2NPs 对雄性小鼠脏器组织结构的影响

如图 3 所示,对照组肝结构正常,肝小叶轮廓清晰,肝索明显,肝窦内皮细胞清晰可见(图 3A1);1000 μg/kg 剂量组肝小叶结构基本清晰,肝内有大小不等的炎性灶,可见肝窦内皮细胞和巨噬细胞的细胞质里有大量的 CeO_2NPs 颗粒(图 3A2、A3);部分 5000 μg/kg 剂量组肝中出现肉芽肿,肉芽肿内有大量吞噬了 CeO_2NPs 的内皮细胞(图 3A4)。对照

表 1 CeO_2NPs 对雄性小鼠器官系数的影响($\bar{x} \pm s$, mg/g)

Table 1 Coefficients of organs after exposed to CeO_2NPs

脏器 Organ	对照组 Control group	CeO_2NPs			
		100 μg/kg	500 μg/kg	1000 μg/kg	5000 μg/kg
肝 Liver	52.25±1.00	56.81±1.86	52.25±0.46	60.75±1.94*	64.20±1.41**
脾 Spleen	3.21±0.24	3.76±0.16	3.78±0.19	3.89±0.20	4.13±0.20*
肾 Kidney	7.80±0.31	7.40±0.36	7.65±0.20	8.15±0.21	7.46±0.17
睾丸 Testis	4.19±0.21	3.91±0.16	4.12±0.13	4.01±0.11	3.65±1.15*
附睾 Epididymis	0.88±0.17	0.88±0.58	0.95±0.39	0.89±0.30	0.78±0.48**

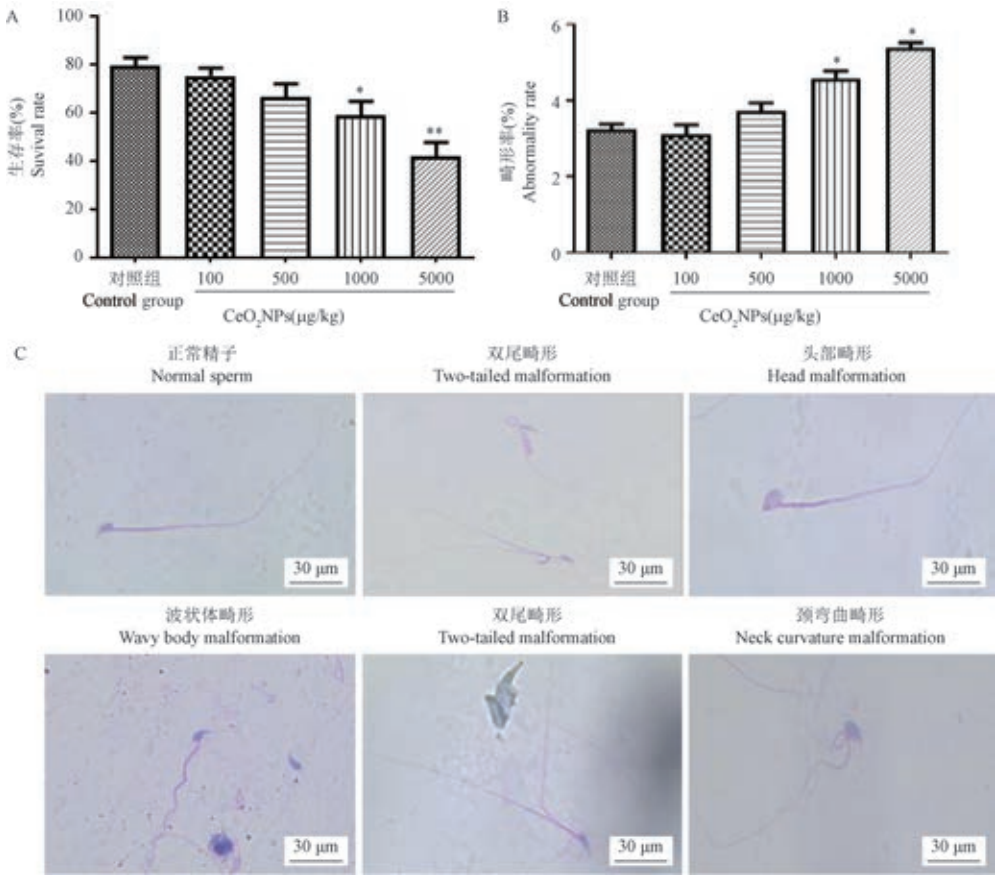
注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$。

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

组睾丸曲精小管和睾丸间质结构正常，曲精小管管壁细胞层次清晰，管腔内有大量的成熟的精子（图 3B1）；大于 1000 μg/kg 剂量组睾丸曲精小管管壁细胞脱落，充塞于管腔之中，管壁厚度变薄，部分曲精小管萎缩（图 3B2～B4）。对照组脾结构正常，白髓、红髓清晰（图 3C1）；大于 1000 μg/kg 剂量组脾结构基本正常，在脾内可见有吞噬了 CeO_2NPs 的巨噬细胞（图 3C2）。对照组和各剂量组肾组织结构正常，肾小体、肾小管结构清晰（图 3D1、D2）。

2.5　CeO_2NPs 对雄性小鼠血清 MDA，SOD，GSH-Px 水平的影响

由表 2 可见，与对照组相比，100 μg/kg 剂量组血清中 SOD（$P<0.05$）和 GSH-Px 活力提高，同时 MDA 降低，体现出一定的抗氧化效果。随着染毒剂量的升高，CeO_2NPs 的氧化应激作用越来越强，呈明显的剂量－效应关系，5000 μg/kg 剂量组血清中 SOD（$P<0.05$）和 GSH-Px 活力显著降低（$P<0.01$），同时 MDA 含量升高（$P<0.01$）。



注：A：CeO_2NPs 对小鼠精子存活率的影响；B：CeO_2NPs 对小鼠精子畸形率的影响；C：CeO_2NPs 染毒小鼠附睾尾精子形态改变。与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 2　CeO_2NPs 对小鼠精子数量和质量的影响

Note. A, Effect of CeO_2NPs on sperm survival rate in mice. B, Effect of CeO_2NPs on sperm abnormality rate in mice. C, Morphological changes of sperm in cauda epididymis of mice exposed to CeO_2NPs. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2　Effect of CeO_2NPs on the sperm quantity and quality of mice

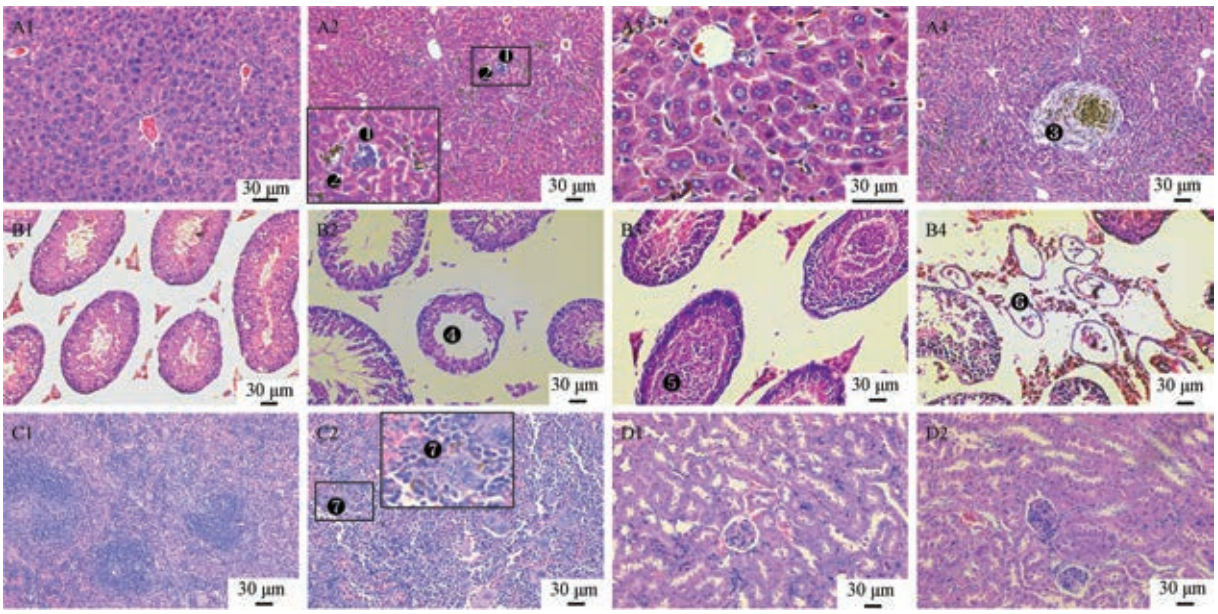
表 2　CeO_2NPs 对雄性小鼠血清 MDA，SOD，GSH-Px 水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 2　Effects of CeO_2NPs on MDA, SOD and GSH-Px levels in serum of male mice

项目 Item	对照组 Control group	CeO_2NPs			
		100 μg/kg	500 μg/kg	1000 μg/kg	5000 μg/kg
SOD（U/mL）	152.25±1.00	176.81±1.86*	142.25±0.46	135.05±1.94	127.20±1.41*
MDA（nmol/mL）	6.21±0.24	5.86±0.16	6.38±0.19	7.09±0.20	11.43±0.20**
GSH-Px（U/mL）	62.25±0.31	72.21±0.36	55.32±0.20	41.05±0.21*	29.46±0.17**

注：与对照组比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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



注：A1：对照组肝；A2～A4：实验组肝；B1：对照组睾丸；B2～B4：实验组睾丸；C1：对照组脾；C2：实验组脾；D1：对照组肾；D2：实验组肾。①肝内炎性灶；②肝窦内皮细胞和巨噬细胞的细胞质里有大量的氧化铈颗粒；③肝中出现了肉芽肿，肉芽肿内有大量的吞噬了氧化铈的内皮细胞；④曲精小管管壁厚度变薄；⑤曲精小管管壁细胞脱落，充塞于管腔之中；⑥曲精小管萎缩；⑦脾内吞噬氧化铈的巨噬细胞。

图 3 CeO_2NPs 对雄性小鼠脏器的组织病理学分析（HE）

Note. A1, Control group liver. A2～A4, Experimental group livers. B1, Control group testis. B2～B4, Experimental group testes. C1, Control group spleen. C2, Experimental group spleen. D1, Control group kidney. D2, Experimental kidney. ①Inflammatory lesion in the liver. ②Abundant cerium oxide particles in the cytoplasm of sinusoidal endothelial cells and macrophages. ③Granuloma in the liver, with a large number of endothelial cells that have ingested cerium oxide particles. ④Wall of the seminiferous tubule became thinner. ⑤Wall cells of the seminiferous tubule fall off and fill the lumen. ⑥Atrophied seminiferous tubule. ⑦Macrophage that have ingested cerium oxide particles in the spleen.

Figure 3 Histopathology of organs in male mice after exposed to CeO_2NPs (HE)

3 讨论

CeO_2 已广泛应用于化妆品制造、石油精炼、燃料电池等领域。因其混合价态不稳定而具有 SOD、CAT 拟酶活性[13]，可通过催化分解生物体内过量的自由基来维持机体氧化还原平衡，在生物抗氧化方面具有重要的应用前景，有望成为治疗氧化应激相关疾病的新型材料[14-16]。纳米材料与体相材料的理化性质不尽相同，因此，当 CeO_2 被制成纳米级颗粒时，其代谢和毒性机制也会有所变化[9]。本研究将 CeO_2NPs 分散体经腹腔注入小鼠，探讨 CeO_2NPs 对小鼠脏器组织结构、附睾精子质量以及血清氧化还原水平等指标的影响。

体重变化显著反映机体中毒效应，研究显示，CeO_2NPs 并未对小鼠体重、生长发育造成不良影响。5000 μg/kg 剂量组部分小鼠肝脾肿大，单侧睾丸和附睾萎缩，而对照组和低剂量组则未出现类似情况；同时，器官系数统计结果也证实高剂量 CeO_2NPs 染毒对小鼠的肝、脾、睾丸和附睾会造成影响。

正常小鼠精子形似蝌蚪，由头、体、尾三部分构成，头部略扁，呈卵圆形，轮廓规则，顶体清楚，顶体帽覆盖头部表面的 1/3 以上，在精子头部顶端呈透亮区。动物精液中正常存在少量畸形精子，当受到某些毒物影响时，精子畸形率可大大增加。研究结果表明，大剂量 CeO_2NPs 染毒可引起精子发生多种畸形，包括胞质脱落不完全、头部不定形、波状体畸形、双尾畸形、颈部折叠畸形等，推论 CeO_2NPs 能够通过睾丸屏障，影响精子发生过程，引起小鼠精子数量和质量降低，进而影响小鼠的生殖功能。

肝是机体重要的代谢器官，肝中存在大量具有吞噬功能的细胞，CeO_2NPs 经腹腔吸收后被肝窦内皮细胞和巨噬细胞所吞噬，低剂量 CeO_2NPs 腹腔染毒未见肝组织结构变化，高剂量染毒可见肝窦内皮细胞和巨噬细胞胞质内有 CeO_2NPs 沉积，肝实质出现大小不等的炎性灶，部分肝中出现肉芽肿，肉芽肿内有大量的吞噬了 CeO_2NPs 的内皮细胞。说明高剂量 CeO_2NPs 可引起肝炎症，部分被破坏的肝组织进行纤维性修复，形成肉芽组织增生。部分高剂

量染毒小鼠睾丸萎缩,病理观察可见睾丸曲精小管管壁细胞脱落,充塞于管腔之中,管壁厚度变薄。说明 CeO_2NPs 经腹腔吸收后进入睾丸作用于间质细胞,支持细胞和生精细胞,阻碍精子发生和成熟,造成睾丸实质萎缩,精子生成障碍,存活率降低、畸形率升高。

CeO_2NPs 通过模拟天然抗氧化酶的方式催化分解生物体内过量的 ROS 来维持机体氧化还原平衡;同时,纳米材料的大小与较大蛋白质的尺寸相当,可进入细胞内并与生物大分子相互作用,产生氧化应激等毒副作用[3,9]。本研究结果显示,低剂量 CeO_2NPs(100 μg/kg)可提高血清中抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 的活力并降低脂质过氧化产物 MDA 的含量,表明低剂量 CeO_2NPs 在体内有抗氧化作用。但随着剂量升高,CeO_2NPs 的氧化应激作用越来越明显,并呈剂量-效应关系。多数金属氧化物纳米粒子对细胞产生毒性的原因有两个:一是金属氧化物溶解产生的金属离子对细胞的毒性;二是纳米粒子对细胞产生的氧化应激毒性。CeO_2NPs 不溶于介质,所以 CeO_2NPs 的毒性仅来自纳米粒子,这也是 CeO_2NPs 毒性低,生物相容性高的重要原因[17-20]。

CeO_2NPs 生物相容性高,具有可再生的生物抗氧化作用,在能源、环境、生物医药等领域多有应用,因此,CeO_2NPs 将不可避免地进入环境和人体中,我们终将面对 CeO_2NPs 所引发的健康问题[1]。本文介绍了小鼠亚急性腹腔 CeO_2NPs 染毒后对主要脏器组织结构、附睾精子数量和结构、血清氧化还原指标等水平的影响。结果表明,低剂量 CeO_2NPs 对机体较安全,并表现出一定的抗氧化作用,随着剂量增加,CeO_2NPs 对机体的毒性也逐渐增强。如何科学地利用 CeO_2NPs,以期在其活性和毒性之间寻求最佳平衡,还有很长的路要走,这不仅要考虑到 CeO_2NPs 的使用剂量,还需考虑其颗粒大小、颗粒形状等诸多因素。

参考文献:

[1] Saifi MA, Seal S, Godugu C. Nanoceria, the versatile nanoparticles: promising biomedical applications [J]. J Control Release, 2021, 338: 164-189.

[2] Mortazavi Milani Z, Charbgoo F, Darroudi M. Impact of physicochemical properties of cerium oxide nanoparticles on their toxicity effects [J]. Ceram Int, 2017, 43(17): 14572-14581.

[3] Wang Z, Shen X, Gao X, et al. Simultaneous enzyme mimicking and chemical reduction mechanisms for nanoceria as a bio-antioxidant: a catalytic model bridging computations and experiments for nanozymes [J]. Nanoscale, 2019, 11(28): 13289-13299.

[4] Lord MS, Berret JF, Singh S, et al. Redox active cerium oxide nanoparticles: current status and burning issues [J]. Small, 2021, 17(51): e2102342.

[5] Shi X, Tian Y, Zhai S, et al. The progress of research on the application of redox nanomaterials in disease therapy [J]. Front Chem, 2023, 11: 1115440.

[6] Estevez AY, Ganesana M, Trentini JF, et al. Antioxidant enzyme-mimetic activity and neuroprotective effects of cerium oxide nanoparticles stabilized with various ratios of citric acid and EDTA [J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 562.

[7] Tang JLY, Moonshi SS, Ta HT. Nanoceria: an innovative strategy for cancer treatment [J]. Cell Mol Life Sci, 2023, 80(2): 46.

[8] 王腾, 孙迦楠, 施绮雯. 纳米氧化铈在肿瘤防治中的应用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(15): 1901-1906.

[9] 徐莺莺, 林晓影, 陈春英. 影响纳米材料毒性的关键因素 [J]. 科学通报, 2013, 58(24): 2466-2478.

[10] 赵金慧, 刘扬. 纳米氧化铈和炎症关系的研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37(12): 1239-1243.

[11] Wang M, He H, Liu D, et al. Preparation, characterization and multiple biological properties of peptide-modified cerium oxide nanoparticles [J]. Biomolecules, 2022, 12(9): 1277.

[12] Yokel RA, Tseng MT, Butterfield DA, et al. Nanoceria distribution and effects are mouse-strain dependent [J]. Nanotoxicology, 2020, 14(6): 827-846.

[13] Thao NTM, Do HDK, Nam NN, et al. Antioxidant nanozymes: mechanisms, activity manipulation, and applications [J]. Micromachines(Basel), 2023, 14(5): 1017.

[14] 吕广明, 王艳杰, 刘瑞, 等. 纳米氧化铈的抗氧化生物应用 [J]. 中国科学(化学), 2013, 43(10): 1309-1321.

[15] Hosseini M, Mozafari M. Cerium oxide nanoparticles: recent advances in tissue engineering [J]. Materials (Basel), 2020, 13(14): 3072.

[16] Wu H, Liao H, Li F, et al. Bioactive ROS-scavenging nanozymes for regenerative medicine: reestablishing the antioxidant firewall [J]. Nano Sel, 2020, 1(3): 285-297.

[17] Horie M, Nishio K, Fujita K, et al. Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity *in vitro* by cellular uptake and subsequent Ni(II) release [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22(8): 1415-1426.

[18] Egbuna C, Parmar VK, Jeevanandam J, et al. Toxicity of nanoparticles in biomedical application: nanotoxicology [J]. J Toxicol, 2021, 2021: 9954443.

[19] Kalyanaraman V, Naveen SV, Mohana N, et al. Biocompatibility studies on cerium oxide nanoparticles-combined study for local effects, systemic toxicity and genotoxicity *via* implantation route [J]. Toxicol Res(Camb), 2019, 8(1): 25-37.

[20] Li H, Xia P, Pan S, et al. The advances of ceria nanoparticles for biomedical applications in orthopaedics [J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 7199-7214.

〔收稿日期〕2022-04-26

马文萌,吴昊,闫昱彤,等. 小鼠肝枯否细胞和肝星状细胞分离提取方法的比较及优化［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 68-74.
Ma WM, Wu H, Yan YT, et al. Comparison and optimization of isolation and extraction methods for Kupffer and hepatic stellate cells from mouse liver［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 68-74.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.011

小鼠肝枯否细胞和肝星状细胞分离提取方法的比较及优化

马文萌#,吴　昊#,闫昱彤,孙　逊,郑倩倩*
(中国医科大学,沈阳　110122)

【摘要】　目的　探讨小鼠肝枯否细胞和肝星状细胞的提取及纯化方法,为小鼠原代肝非实质细胞分离提取方法学提供参考和建议。**方法**　以体内胶原酶灌注消化为基础,使用 Percoll、OptiPrep 等不同的试剂和浓度梯度分别提取 C57BL/6 小鼠的肝枯否细胞和肝星状细胞,并通过流式细胞仪、免疫荧光等方法验证纯化细胞的纯度。**结果**　两层 Percoll 法提取枯否细胞和两层 OptiPrep 法提取肝星状细胞可行,纯度可达 90%以上,细胞得率为 1~2×10^7/肝,细胞存活率在 90%以上。细胞原代培养 48 h 后,枯否细胞 F4/80 阳性细胞、肝星状细胞 α-SMA 阳性细胞均达 90%以上。**结论**　小鼠肝中枯否细胞和肝星状细胞的分离提取方法完善可靠且具有成本效益和可重复性。

【关键词】　枯否细胞;肝星状细胞;灌注;原代细胞;纯度
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2023) 12-0068-07

Comparison and optimization of isolation and extraction methods for Kupffer and hepatic stellate cells from mouse liver

MA Wenmeng#, WU Hao#, YAN Yutong, SUN Xun, ZHENG Qianqian*
(China Medical University, Shenyang 110122, China)

【Abstract】　Objective　To explore the extraction and purification method of Kupffer and hepatic stellate cells from mouse liver and provide references and suggestions for the separation and extraction method ology of primary non-parenchymal cells from mouse liver. **Methods**　After *in vivo* collagenase perfusion digestion, various reagents and method, such as Percoll and OptiPrep, were used to extract C57BL/6 mice Kupffer and hepatic stellate cells, and evaluate their purity by flow cytometry and immunofluorescence. **Results**　The two-layer Percoll method to extract Kupffer cells and the two-layer OptiPrep method to extract hepatic stellate cells were feasible, and purity reached >90%. The cell yield was 1~2×10^7/liver, and the cell survival rate was >90%. After 48 hours of primary cell culture, the number of F4/80-positive Kupffer cells and α-SMA-positive hepatic stellate cells reached >90%. **Conclusions**　The separation and extraction method of Kupffer and hepatic stellate cells from mouse liver are perfect, reliable, cost-effective, and reproducible.

【Keywords】　Kupffer cells; hepatic stellate cells; perfusion; primary cell; purity
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金青年基金(32200977);辽宁省自然科学基金(2022-MS-237);辽宁省教育厅科研项目(LJKMZ20221204)。
[作者简介]马文萌(2000—),女,硕士研究生,研究方向:肝免疫代谢及肿瘤免疫微环境。E-mail:17740048779@163.com
吴昊(1999—),女,硕士研究生,研究方向:肝免疫代谢及肿瘤免疫微环境。E-mail:wuhaoskylar@163.com
#共同第一作者
[通信作者]郑倩倩(1986—),女,副教授,博士,硕士生导师,研究方向:肝免疫代谢及肿瘤免疫微环境。
E-mail:qqzheng@cmu.edu.cn

肝由实质细胞和非实质细胞这两种主要的细胞类型组成,作为人体重要的免疫耐受器官,在代谢和免疫调节功能中起着至关重要的作用[1-4]。肝实质细胞占肝总细胞群的 60%,其中最丰富的是肝细胞[5]。肝细胞参与体内重要的代谢功能,包括调节甘油三酯水平以及胆固醇的生物合成和摄取[6-7]。此外,肝细胞参与调节碳水化合物的代谢和胆汁的产生,进而促进脂质物质在肠道中消化和摄取[8]。

非实质细胞是肝第二种主要细胞类型,在啮齿动物中包含 70% 的内皮细胞、20% 的枯否细胞(Kupffer cells,KCs)和 10% 的肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)[5,9]。KCs 是肝中的常驻巨噬细胞,占啮齿动物体内所有组织巨噬细胞的 80%~90%,位于肝血窦中,并通过肝血窦与肝系统运输的营养物质、微生物和有毒物质接触[10]。这些特殊的细胞负责清除异物,如细菌[11]。在脂肪性肝炎和代谢并发症所引发的肝损伤中,活化的 KCs 成为诱导肝毒性和肝代谢损害的关键炎症介质。因此,我们认为 KCs 是肝炎症的主要源泉[12-16]。

HSCs 作为肝合成细胞外基质的主要细胞群,不仅能分泌糖蛋白、蛋白多糖等细胞外基质成分,又能合成一定量的胶原酶以维持正常的基底膜结构,还能通过其突起的收缩参与肝窦的微循环调节[17]。肝的损伤将会导致肝星状细胞的激活、增殖及转化,因此,对于 HSCs 的研究将会是探究肝纤维化治疗的重要一环,对肝病的生存率及发生率有着不可估量的巨大意义。

鉴于 KCs 和 HSCs 在稳态中的重要作用,我们迫切地需要一套可靠完善的细胞分离技术。综合以往文献报道,我们从离心条件、提取试剂种类和浓度三个方面进行讨论并展开了相关实验,提出了两层 Percoll 法、两层 OptiPrep 法、单层 Percoll 法和三层 Percoll 法 4 种非常具有成本效益和可重复性的方案,以探究不同方法下小鼠 KCs 和 HSCs 的提取纯度差异,从而寻找最佳的小鼠 KCs 和 HSCs 提取方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 8 只,体重(20±0.5)g,由北京华阜康生科技股份有限公司提供[SCXK(京)2019-0008],小鼠饲养于中国医科大学实验动物中心[SCXK(辽)2018-0008],本研究经中国医科大学动物伦理委员会批准(CMU2023135),所有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。

1.2 主要试剂与仪器

Percoll(Cytiva,10306548);OptiPrep(SIGMA,D1556);流式抗体 AF488 F4/80(Biolegend,123120);F4/80(ABclonal,WH202652);α-SMA(CST,48938S);抗荧光衰减封片剂含 DAPI(Solarbio,S2110)。

恒温水浴槽(杭州米欧仪器有限公司,WT100-1);微流量调速型蠕动泵(保定雷弗流体科技有限公司,BQ80S+FZ10);超净工作台(Suzhou Antai Airtech Co, China);二氧化碳培养箱(Forma Scientific,USA);倒置荧光显微镜(IX71, Olympus, Japan);激光共聚焦显微镜(C2,Nicon,Japan);分析型流式细胞仪(FACSCelesta,BD,USA);高速离心机(Dopond, USA);精密电子天平(METTLER TOLEDO,Switzerland)。

1.3 实验方法

1.3.1 配制溶液

(1)浓缩灌注缓冲液:溶解 NaCl(103.75 g),KCl(6.25 g)和 Hepes(28.70 g)于超纯水中。当全部溶解后加 1 mol/L NaOH(75 mL)。加超纯水定容至 500 mL。用 0.22 μm 孔径滤头过滤液体至 50 mL 管中,每管 40 mL 冷冻至-20℃。

(2)灌注缓冲液:用超纯水溶解 40 mL 的浓缩灌注液至总量 1 L,调节 pH=7.4。

(3)保存液:每 250 mL 灌注液加 2.5 g 牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA),溶解。置于冰上或 4℃保存。

(4)消化液:于 59.4 mL 的灌注液中加入 0.6 mL 的 476 mmol/L $CaCl_2$。灌注开始前每 60 mL 消化液加 30 mg Ⅳ型胶原酶。

1.3.2 消化肝

(1)准备系统(图 1A)。40℃水浴锅预热灌注缓冲液,小鼠上方打开加热灯保证实验过程中小鼠温度适宜。

(2)麻醉动物。

(3)麻醉后,剃去小鼠腹部的毛发,严格消毒。置于无菌超净台,仰卧位固定,充分暴露动物腹腔,注意不要损伤到肝,用一次性无菌手术单遮盖腹腔其他位置保证术野无菌。

(4)开腹后门静脉插管灌注。具体操作:取大十字切口,上至剑突,下至耻骨联合,左右至两侧腋中线。皮瓣外翻,显露腹腔所有器。将小肠翻至鼠体左侧,可见肝门处门静脉由脾静脉和肠系膜静脉汇合而成。用小鼠动脉夹住肝上腔静脉(图 1B)。

(5)用静脉穿刺针从下腔静脉窦下方 2~5 mm 处进针,穿刺下腔静脉,进入约 5 mm 并同时用小鼠动脉夹固定住针。

(6)以 5 mL/min 速度持续灌注灌注缓冲液,同时剪断门静脉,轻轻按压肝至淤血全部排出。灌注至肝全部无血色(6 min 左右)(图 1C)。

(7)继续以 5 mL/min 速度灌注消化液,消化至轻按肝表面有压痕且无法复原时(10 min 左右),停止消化。

(8)小心地摘下肝并剔除胆囊。放入冰上含有保存液的 10 cm 皿中,轻轻撕开并抖动肝以释放细胞(图 1D)。

(9)用无菌 70 mm 的肝网过滤细胞悬液(图 1E、1F)。

(10)将细胞悬液转移到 50 mL 离心管中,并加入更多的冰上或 4℃保存的保存液。

1.3.3 两层 Percoll 法

(1)将消化肝后得到的细胞悬液离心:54 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(2)离心:54 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(3)离心:1350 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。弃上清,10 mL 保存液重悬沉淀。

(4)将细胞沉淀重悬液加入到两层 Percoll 的上层(20 mL 50% Percoll+20 mL 25% Percoll+10 mL 细胞重悬液)。

(5)离心:1350 r/min,30 min,4℃,最小升速和降速。

(6)轻柔收集 25%和 50% Percoll 中间层的非实质细胞。(如果想得到更多的非实质细胞同时也得到更多星状细胞,可以将 25% Percoll 改用 23% Percoll;如果小鼠非常胖,可以将 50% Percoll 改用 45% Percoll 来获得纯度更高的非实质细胞。)

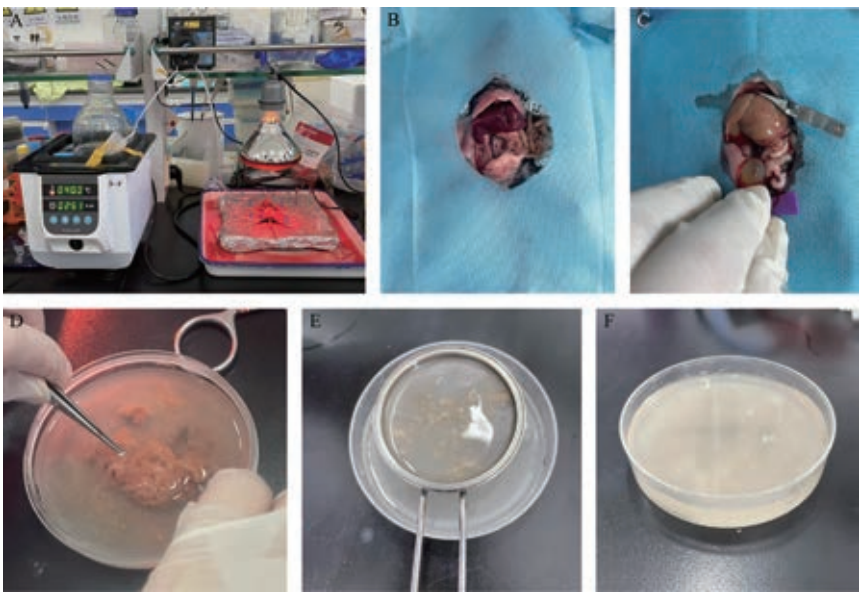
(7)用 50 mL 保存液重悬收集的非实质细胞。

(8)离心:1350 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。(图 2A)

(9)沉淀重悬于含 10%胎牛血清的培养基中。将细胞悬液铺在细胞培养板中,37℃的培养箱(5% CO_2/95%空气)培养 30 min,只有 KCs 贴壁,同时上清中含有大量的 HSCs。将上清移到其他新的孔板中继续培养,KCs 更换新的培养基。

1.3.4 两层 OptiPrep 法

(1)将消化肝后得到的细胞悬液离心:54 r/



注:A:准备系统;B:小鼠开腹准备灌流;C:灌注至肝无血色;D:撕开肝包膜释放细胞;E:肝网过滤;F:细胞悬液。

图 1 肝的消化

Note. A, Preparation system. B, Preparation for perfusion with open abdominal surgery in mice. C, Infusion of mouse liver until liver is colorless. D, Tearing open the liver capsule to release cells. E, Hepatic reticulum filtration. F, Cell suspension.

Figure 1 Digestion of the liver

min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(2)离心:54 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(3)离心:450 r/min,7 min,4℃,最大升速和降速。

(4)弃上清,细胞沉淀在 5 mL 的 15% OptiPrep 中重悬,在上层仔细加 5 mL 的 11.5% OptiPrep 和 2 mL Gey's 平衡盐溶液(Gey's balanced salt solution, GBSS)。

(5)离心:1400 r/min,17 min,4℃,最小升速和降速。(图 2B)

(6)分别轻柔收集 11.5% OptiPrep 上层的 KCs 和 11.5% OptiPrep 与 15% OptiPrep 中间的 HSCs 细胞层,用 5 mL GBSS 重悬,1400 r/min 离心 10 min,4℃,最大升速和降速。

(7)细胞沉淀重悬于 GBSS,450 r/min 离心 7 min,最大升速和降速。

(8)沉淀重悬于含 10%胎牛血清的培养基中,将细胞悬液铺在细胞培养板中,37℃的培养箱(5% CO_2/95%空气)培养。

1.3.5　单层 Percoll 法

(1)将消化肝后得到的细胞悬液离心:54 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(2)离心:54 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(3)离心:1350 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。

(4)弃上清,沉淀重悬于 10 mL 35% Percoll 溶液,于上层小心地加 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)。

(5)离心:1350 r/min,30 min,4℃,最小升速和降速。(图 2C)

(6)轻柔收集 PBS 与 Percoll 中间层细胞,此层细胞为肝星状细胞,补充 10 mL 保存液重悬。

(7)离心:1350 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。

(8)沉淀重悬于含 10%胎牛血清的培养基中,将细胞悬液铺在细胞培养板中,37℃的培养箱(5% CO_2/95%空气)培养。

1.3.6　三层 Percoll 法

(1)将消化肝后得到的细胞悬液离心:50 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(2)离心:50 r/min,2 min,4℃,最大升速和降速。收集上清。

(3)离心:1350 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。

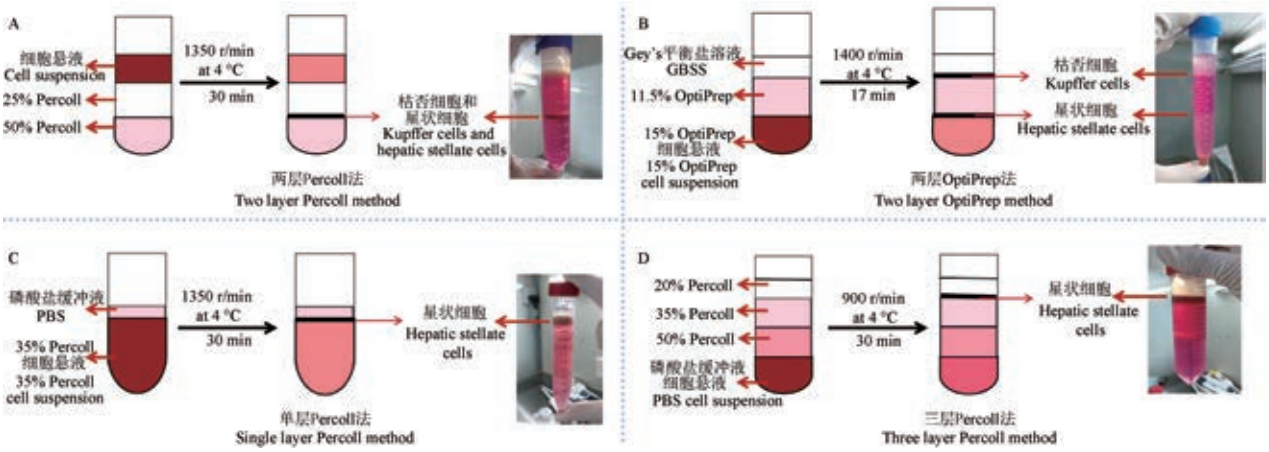
(4)沉淀重悬于 8 mL PBS 中,向上依次加入 10 mL 50% Percoll, 15 mL 35% Percoll, 20 mL 20% Percoll。

(5)离心:900 r/min,30 min,4℃,最小升速和降速。(图 2D)

(6)轻柔收集 20% Percoll 与 35% Percoll 中间层细胞 10 mL,此层细胞为肝星状细胞。补充培养基至 50 mL。

(7)离心:900 r/min,10 min,4℃,最大升速和降速。

(8)沉淀重悬于 10%胎牛血清的培养基中,将



注:A:两层 Percoll 法;B:两层 OptiPrep 法;C:单层 Percoll 法;D:三层 Percoll 法。

图 2　四种方法图示

Note. A, Two layer Percoll method. B, Two layer OptiPrep method. C, Single layer Percoll method. D, Three layer Percoll method.

Figure 2　Diagram of four methods

细胞悬液铺在细胞培养板中,37℃的培养箱(5% CO_2/95%空气)培养。

1.3.7 流式细胞术

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)洗两遍细胞沉淀(6000 r/min,1 min,4℃),50 μL PBS 重悬细胞沉淀,加入相应流式抗体,轻轻混匀,4℃避光孵育 30 min。1 mL PBS 洗两次,200 μL PBS 重悬细胞,过滤后上机。

1.3.8 免疫荧光染色

细胞爬片经 4%多聚甲醛固定、PBS 清洗、羊血清室温封闭 1 h 后,枯否细胞用兔源小鼠含生长因子样模体粘液样激素样受体(mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1,EMR1,又称 F4/80)一抗放入湿盒中 4℃孵育过夜,Alexa Fluor 594 荧光标记二抗在湿盒中室温孵育 1 h;肝星状细胞用兔源 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)一抗放入湿盒中 4℃孵育过夜,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)荧光标记二抗在湿盒中室温孵育 1 h,抗荧光衰减封片剂含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)封片后激光共聚焦显微镜下观察、采集图像。

1.3.9 细胞得率与存活率测定

吸取 10 μL 细胞悬液,加入 10 μL 4%的台盼蓝溶液混匀后取 10 μL 置于载玻片上并在显微镜下观察,细胞未被台盼蓝染色者为活细胞。光镜下观察细胞形态并进行细胞计数,计算细胞得率及存活率。

1.4 统计学方法

流式数据使用 FlowJo v10 进行分析。做图及统计分析在 Graphpad 5 软件中完成,实验结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据进行 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

为了进一步比较各个方法的细胞提取质量和纯度差异,我们对细胞的得率、存活率和纯度进行检测,以探寻最优的小鼠 KCs 和 HSCs 提取方法。

2.1 两层 Percoll 法

(1)沉淀重悬于 1 mL 的 10%胎牛血清的培养基中,取 10 μL 细胞悬液台盼蓝染色并用血细胞计数板计数,细胞得率约为(3~4)×10^7 个,细胞存活率 95%。

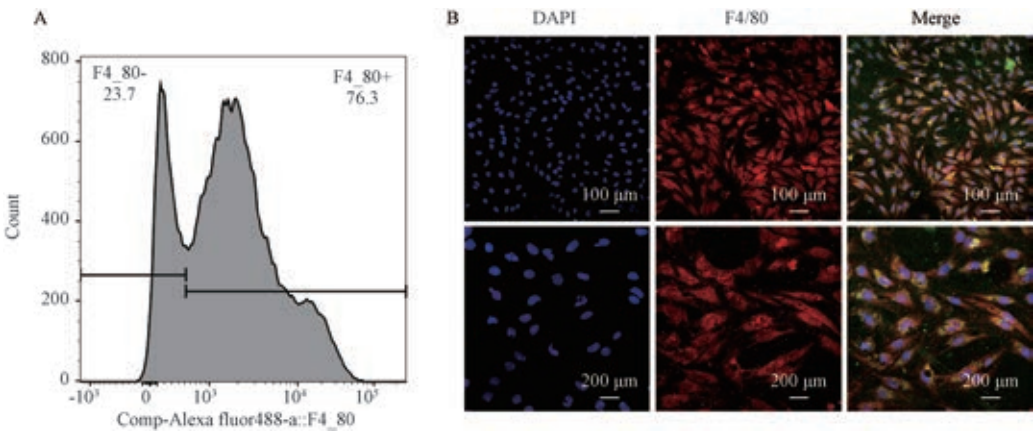
(2)流式检测细胞悬液中 F4/80 阳性细胞占比约为 76.3%(图 3A)。

(3)KCs 培养 48 h 后免疫荧光染色,F4/80 阳性细胞 90%以上(图 3B)。HSCs 培养 48 h 后贴壁细胞数量过少,应用价值较低。

2.2 两层 OptiPrep 法

(1)HSCs 沉淀重悬于 1 mL 的 10%胎牛血清的培养基中,取 10 μL 细胞悬液台盼蓝染色并用血细胞计数板计数,细胞得率约为(1~2)×10^7 个,细胞存活率 92%。KCs 沉淀重悬于 1 mL 的 10%胎牛血清的培养基中,取 10 μL 细胞悬液台盼蓝染色并用血细胞计数板计数,细胞得率约为(1~2)×10^4 个,细胞存活率 65%。KCs 得率和存活率均较低,应用价值较低。

(2)如图 4A 所示,HSCs 培养 48 h 后免疫荧光染色,α-SMA 阳性细胞 90%以上。

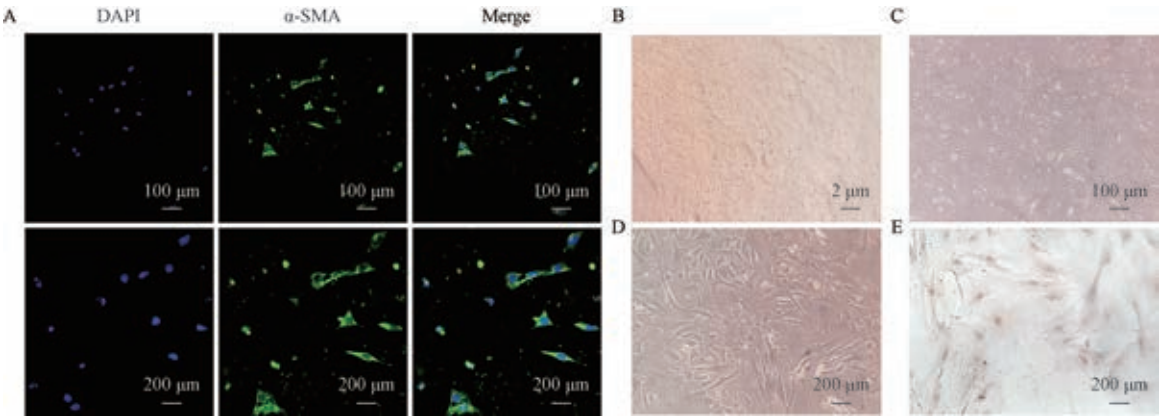


注:A:细胞悬液流式检测 $F4/80^+$细胞占比;B:枯否细胞免疫荧光染色结果。

图 3 肝枯否细胞鉴定

Note. A, Cell suspension flow cytometry detection of $F4/80^+$cell proportion. B, Immunofluorescence staining results of Kupffer cell.

Figure 3 Identification of Kupffer cells in the liver



注：A：肝星状细胞免疫荧光染色结果；B：培养 12 d 的原代肝星状细胞（100 倍）；C：培养 12 d 的原代肝星状细胞（200 倍）；D：培养 12 d 的原代肝星状细胞（400 倍）；D：培养 12 d 的原代肝星状细胞苏木素染色（400 倍）。

图 4　肝星状细胞鉴定

Note. A, Immunofluorescence staining results of hepatic stellate cells. B, Primary hepatic stellate cells cultured for 12 days (100x). C, Primary hepatic stellate cells cultured for 12 days (200x). D, Primary hepatic stellate cells cultured for 12 days (400x). E, Hematoxylin staining of primary hepatic stellate cells cultured for 14 days (400x).

Figure 4　Identification of hepatic stellate cells

（3）HSCs 培养 12 d 后光学显微镜观察细胞形态（图 4B~4E）。

2.3　单层 Percoll 法

沉淀重悬于 1 mL 的 10%胎牛血清的培养基中，取 10 μL 细胞悬液台盼蓝染色并用血细胞计数板计数，细胞得率约为（3~4）×10^7 个，细胞存活率 39%。细胞存活率较低，应用价值较低。

2.4　三层 Percoll 法

沉淀重悬于 1 mL 的 10%胎牛血清的培养基中，取 10 μL 细胞悬液台盼蓝染色并用血细胞计数板计数，细胞得率约为（1~2）×10^7 个，细胞存活率 43%。细胞存活率较低，应用价值较低。

综合考虑细胞纯度、细胞得率和细胞存活率，我们认为两层 Percoll 法提取枯否细胞和两层 OptiPrep 法提取肝星状细胞可行，纯度可达 90%以上，细胞得率为（1~2）×10^7/肝，细胞存活率在 90%以上。

3　讨论

近年来由于对 HSCs 在肝纤维化发病机制中的重要性的深入认识，HSCs 的功能特点及其激活调控机制的研究成为肝纤维化研究的热点[18-19]。肝纤维化的形成大致包括肝损伤、HSCs 活化并分泌细胞因子和胶原以及细胞外基质成分（extracellular matrix, ECM）代谢异常三个阶段[20]。其中，活化的 HSCs 是肝内产生大量细胞因子和 ECM 成分的主要细胞，也是导致肝纤维化的关键细胞[21]。KCs 除具有吞噬、消灭病原微生物、清除机体内的内毒素、调节免疫和炎症反应等功能外，还能调控组织和基质修复、调控肝细胞、HSCs 的增殖和合成细胞外基质等。肝内的 KCs 和 HSCs 等与肝纤维化的形成有密切关系。纤维化形成整个过程中 KCs 等炎症吞噬细胞可产生多种重要细胞因子如转化生长因子（transforming growth factor, TGF）、血小板衍生生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）、白介素-6（interleukin-6, IL-6）、白介素-1（interleukin-1, IL-1）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α, TNF-α）、干扰素（interferon, IFN）等，然后通过旁分泌形式和自分泌形式介导细胞与细胞间的相互作用，调节 HSCs 的激活并启动纤维化过程[22-23]。

目前国内外多种分离提取肝实质细胞的方案已经被开发出来，但提取非实质细胞的方法为数不多，主要有密度梯度离心法、离心淘析法及将两者相结合的方法[24-25]。然而，大多数的方法获取到的细胞数量少、纯度低、活性差、细胞形态难以较长时间维持便出现细胞凋亡的现象，所以尚未得出一套合理稳定的方法流程。因此，一套完善、可靠的原代小鼠 KCs 和 HSCs 提取体系对于开展肝炎症、纤维化课题的研究至关重要。

我们经过反复试验，最终形成几套经济、易操作、完善可靠的枯否细胞、肝星状细胞提取方法。我们采用体内与体外结合的消化方法主要有以下优点：肝局部容易实现温度控制。肝在 37℃水浴中进行灌注，使肝与肝内酶消化液保持在 37℃，可以

保证酶的活性,并减少原位酶消化法中由于肝侧支循环丰富导致的酶用量增加,降低成本。由于肝消化是否适度是影响细胞得率及活力的关键因素,因此在灌注过程中应避免空气进入门静脉,因气泡可栓塞肝内血管,导致灌注不充分。且需要掌握好合适的灌注压,灌注压过高,细胞易死亡;灌注压不够,延长灌注时间会影响细胞活力。总的来说,方法具有以下优点:(1)细胞得率、纯度相对较高;(2)灌注时间较短,污染机会较少;(3)操作方便,无需特殊设备。

在肝炎症和纤维化相关疾病的研究中,肝枯否细胞和肝星状细胞的分离培养能为肝炎症,纤维化的发病机制研究及其逆转治疗奠定基础[26]。本文对肝枯否细胞和肝星状细胞的分离提取方法的选择具有指导意义。

参考文献:

[1] Gao B, Jeong W, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity [J]. Hepatology, 2008, 47(2): 729-736.

[2] 邓艳, 刘洪, 吴新玉, 等. 虎杖苷的保肝作用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 136-140.

[3] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders [J]. Nature, 2006, 444(7121): 860-867.

[4] Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ [J]. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S54-S62.

[5] Su Q, Kim S Y, Adewale F, et al. Single-cell RNA transcriptome landscape of hepatocytes and non-parenchymal cells in healthy and NAFLD mouse liver [J]. iScience, 2021, 24(11): 103233.

[6] 张森, 洪芬芳, 杨树龙. 肝脂质代谢与动脉粥样硬化治疗 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 122-127.

[7] Lee H, Shin E, Kang H, et al. Soybean-derived peptides attenuate hyperlipidemia by regulating trans-intestinal cholesterol excretion and bile acid synthesis [J]. Nutrients, 2021, 14(1): 95.

[8] Rodrigues JS, Faria-Pereira A, Camões SP, et al. Improving human mesenchymal stem cell-derived hepatic cell energy metabolism by manipulating glucose homeostasis and glucocorticoid signaling [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 1043543.

[9] Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver [J]. Dev Cell, 2010, 18(2): 175-89.

[10] Gregory SH, Wing EJ. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections [J]. J Leukoc Biol, 2002, 72(2): 239-248.

[11] Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view [J]. J Hepatol, 2009, 51(1): 212-223.

[12] Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(46): 7413-7420.

[13] Ramadori G, Armbrust T. Cytokines in the liver [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001, 13(7): 777-784.

[14] Stienstra R, Saudale F, Duval C, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity [J]. Hepatology, 2010, 51(2): 511-522.

[15] Tencerova M, Aouadi M, Vangala P, et al. Activated Kupffer cells inhibit insulin sensitivity in obese mice [J]. FASEB J, 2015, 29(7): 2959-2969.

[16] Tosello-Trampont AC, Landes SG, Nguyen V, et al. Kuppfer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-α production [J]. J Biol Chem, 2012, 287(48): 40161-40172.

[17] Peng Y, Yin Q, Yuan M, et al. Role of hepatic stellate cells in liver ischemia-reperfusion injury [J]. Front Immunol, 2022, 13: 891868.

[18] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. Front Biosci, 2002, 7: d808 - d826.

[19] 王娟, 杨晶晶, 周仁鹏, 等. 肝纤维化小鼠模型研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 105-110.

[20] 庄子锐, 王明亮, 张婷, 等. 肝肾纤维化动物模型的研究进展及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 845-852.

[21] Tong G, Chen X, Lee J, et al. Fibroblast growth factor 18 attenuates liver fibrosis and HSCs activation via the SMO-LATS1-YAP pathway [J]. Pharmacol Res, 2022, 178: 106139.

[22] Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: roles of osteoblastic and vascular compartments [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2010, 90(4): 229-242.

[23] 孟妍芳, 申凤俊. NOX4/ROS/STAT3 通路对肝星状细胞活化增殖的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 90-95.

[24] Li S, Zhou B, Xue M, et al. Macrophage-specific FGF12 promotes liver fibrosis progression in mice [J]. Hepatology, 2023, 77(3): 816-33.

[25] Pretlow TG, Williams EE. Separation of hepatocytes from suspensions of mouse liver cells using programmed gradient sedimentation in gradients of ficoll in tissue culture medium [J]. Anal Biochem, 1973, 55(1): 114-122.

[26] 任晓楠, 周晓辉. 用于肝疾病研究的人源化小鼠模型概述 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 95-99.

〔收稿日期〕2023-08-30

宋元毓,陈英华,李俊峰,等. 血管性痴呆动物模型的研究概述［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 75-85.
Song YY, Chen YH, Li JF, et al. A review of animal models of vascular dementia［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 75-85.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.012

血管性痴呆动物模型的研究概述

宋元毓[1],陈英华[2*],李俊峰[2],孙　玮[1]

(1.黑龙江中医药大学,哈尔滨　150006;2.黑龙江中医药大学附属第一医院,哈尔滨　150006)

【摘要】 血管性痴呆(vascular dementia,VD)以脑血管病变为基础,即脑实质有出血性或缺血性病变,其中以缺血性较为多见。由于其导致的认知能力和记忆力的渐进性下降及日益上升的发病率已成为影响人们健康和生活质量的一个主要问题。因此,越来越多的学者开始着手研究 VD 的发病机制和防治措施。建立合适的动物模型以用于研究治疗 VD 各种方式的作用机制及其疗效评价,也成为本领域的研究重点。在常规建模方法,双侧血管阻断法(bilateral occlusion of the common carotid arteries,2VO)和四血管阻断法(four-vessel occlusion,4VO)的基础上,研究人员研发了其他改良方法,以期使 VD 模型更稳定、更贴近 VD 的临床表现。本文在列举现阶段研发的改良方法及其具体操作方法的基础上,介绍这些模型的优缺点和相关的细胞和分子机制。

【关键词】 血管性痴呆;动物模型;研究概述
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0075-11

A review of animal models of vascular dementia

SONG Yuanyu[1], CHEN Yinghua[2*], LI Junfeng[2], SUN Wei[1]
(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China.
2. the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006)

【Abstract】 Vascular dementia (VD) is caused by cerebrovascular diseases, either hemorrhage or ischemic damage in the brain, with ischemia being the most common. In recent years, increasing efforts have been made to study the etiology, pathogenesis, and prevention of VD. The establishment of appropriate animal models to study the mechanism of VD and explore the efficacy of VD treatments has become an important issue in this research field. On the basis of conventional method, such as bilateral occlusion of common carotid arteries (2VO) and four-vessel occlusion, researchers have modified these method to improve stability with better reflection of the clinical manifestations of VD. This review summarizes these modified method and discusses possible cellular and molecular mechanisms and their advantages and disadvantages.

【Keywords】 vascular dementia; animal model; research review
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种由脑血管疾病引起的智力和认知障碍临床综合征[1]。多发生在 60 岁以后,患者往往有中风病史,病程渐进且多变,表现为达到痴呆标准的明显认知障碍,有局灶性神经系统疾病的症状和体征[2]。VD 的研究表明,它是仅次于阿尔茨海默病的第二常见的痴

[基金项目]国家自然科学基金(82074530);黑龙江省自然科学基金(ZD2021H007)。
[作者简介]宋元毓(2000—),女,硕士研究生,研究方向:针刺治疗神经系统疾病。E-mail:370123368@qq.com
[通信作者]陈英华(1964—),女,博士生导师,主任医师,教授,研究方向:针刺治疗脑血管病的临床和基础研究。
E-mail:chyh9000@163.com

呆原因[3]。发病率随着年龄的增长而增加,VD 的风险每 3~5 年增加 1 倍。高血压病、高胆固醇、糖尿病都会增加 20%至 40%的痴呆风险[4]。随着人口老龄化,VD 发病率逐年上升,是老年人精神健康障碍的主要原因之一,并逐渐成为老年人健康的最重要威胁之一[5]。

1 造模方法

理想的动物模型应该模拟疾病的病理改变,尽可能接近 VD 患者的临床表现。目前,血管阻断法是 VD 大鼠模型制备最常用的方法。即采用夹闭或结扎动物颈动脉的方法,减少脑供血,造成脑组织慢性缺血缺氧损伤[6]。其中,最常见的是双侧血管阻断法(bilateral occlusion of the common carotid arteries, 2VO)和四血管阻断法(four-vessel occlusion,4VO)。除此之外,近年来研究人员发现多种改良的血管阻断法,具有明显的优势。大多数现有模型的共同点是均能模拟出认知能力的降低。

1.1 双侧血管阻断法(2VO)

2VO 是目前应用最广泛,建立最成熟的实验模型之一[7]。2VO 的优势在于手术结扎大鼠的双侧颈总动脉会产生慢性、整体低灌注状态。慢性低灌注引起的脑能量障碍[8]和氧化应激被认为是痴呆发病的主要危险因素[9]。研究表明,与 4VO 相比,2VO 大鼠认知变化主要由白质病理改变引起的,海马体积变小最为明显。血管源性脑白质高信号与认知功能障碍风险增加相关,是痴呆的神经影像学指标之一[10]。

Nanri 等[11]最开始建立了 2VO 造模法。其具体方法为:大鼠颈前部除毛处理后,颈正中切口暴露出颈动脉。为了不损伤迷走神经,剥离颈总动脉将双侧颈总动脉双重结扎。2VO 模型在缺血初期会产生脑循环障碍,接着产生的糖代谢低下会引起脑实质的障碍,表现为脑区低灌注。造模 1 周后大脑皮层、海马和白质的脑血流量虽然呈下降状态,但逐渐恢复。优点:(1)2VO 大鼠白质神经纤维受损明显,脑区多发性梗死但无运动障碍等症状,很好模拟了 VD 患者的临床表现,适合慢性脑缺血再灌注损伤的研究;(2)操作简便,诱导方式简单;(3)花费较少,费用仅与缝合相关。缺点:(1)造模大鼠的组织学脑损伤程度差异较大,不适合定量参照;(2)2VO 后动物死亡率也存在差异,与性别,年龄和手术技术均有相关性;(3)2VO 术后动物因视觉系统损伤而导致视觉障碍,无法认定 2VO 术后动物的认知障碍仅与海马体神经元缺血相关。

1.1.1 改良 2VO—血管阻断法(2VO)+硝普钠降压法

硝普钠是一种强效的血管扩张剂,对于阻力血管和容量血管,具有直接松弛的作用,导致外周阻力下降,从而使血压下降。王蕊等[12]在动物麻醉的前提下进行手术,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,模型组在夹闭双侧颈总动脉之前,腹腔注射硝普钠(北京制药工业研究所实验药厂;2.5 mg/kg,用无菌蒸馏水溶解),随即用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉 10 min,后再通 10 min,再夹闭 10 min,再通后缝合伤口。

跳台和水迷宫试验发现,大鼠在术后 7 d 显示出明显的学习和记忆障碍,在空间定向和识别方面的障碍更为严重。形态学观察显示,海马 CA1 区的锥体细胞有明显的变性、死亡甚至丧失,而 CA3 区的神经元没有发现异常。结合汪瑶等[13]发现硝普钠对全脑缺血引起的海马神经元的死亡有重要的保护作用。这说明注射硝普钠可在保护神经元的条件下复现 VD 模型。该实验研究结果还表明,在夹闭双侧颈总动脉之前腹腔注射硝普钠有以下五种优势:(1)可通过控制硝普钠的剂量达到控制降压时间的目的;(2)硝普钠降压可以克服放开血管开放血流后由于机体的代偿反应引起的血压回升;(3)动物没有明显的运动系统损伤表现,存活率较高,可重复性和稳定性较好;(4)手术操作简单,对动物创伤较小,易于恢复;(5)以学习记忆能力低下主要特点,与临床“血管性痴呆”的发病过程相似。但同时也需要注意:(1)本模型是通过腹腔注射硝普钠降压的,剂量的准确性和注射的可靠性十分重要;(2)硝普钠的降压原理是直接扩张外周血管,而环境温度对外周血管的舒缩状态影响很大。因此环境温度变化较大时,应适当调整药物的剂量。

窦金金等[14]在硝普钠降压的基础上进行改进,延长双侧颈动脉夹闭时间并增加夹闭次数:颈正中切口,分离颈总动脉,模型组在夹闭双侧颈总动脉之前,腹腔注射硝普钠(北京双鹤制药厂,2.5 mg/kg),随即用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉 20 min 后,再通 10 min,再夹闭 20 min,再通 10 min,再夹闭 20 min,再通后用缝合切口。实验发现只要硝普钠注射适量,适当延长双侧颈总动脉夹闭的时间和增加夹闭次数并不严重影响大鼠的存活率。术后通

过对 Morris 水迷宫检测，模型组大鼠逃避潜伏期明显延长，在规定时间内穿越平台的次数明显减少，空间记忆明显受损，成功建造了大鼠痴呆模型。

顾静等[15]在硝普钠降压的基础上增加夹闭次数并结扎一侧颈总动脉：采用颈正中切口，分离双侧颈总动脉，模型组及药物治疗组在夹闭双侧颈总动脉之前，腹腔注射硝普钠（2.0 mg/kg），之后用无创动脉夹闭合双侧颈总动脉 10 min，后再通 10 min，总共进行了 3 次间歇性血流阻断和双侧颈总动脉结扎。最后结扎一侧颈总动脉，缝合切口。该实验对硝普钠注射量、环境温度要求等问题进行改良。通过预实验测定硝普钠注射量与大鼠死亡率的相关性，得出最合适的硝普钠注射量为 2.0 mg/kg。同时确定手术时室温控制在 28℃，术后 24 h 内控制在 25℃时大鼠状态稳定，死亡率下降。在这个实验中，操作者直接永久结扎左侧颈总动脉，切断了大约 1/3 的脑供血，导致慢性脑灌注不足，与 VD 的发病机理更为相似。有效防止了“反复再灌注阻断引起的短暂性脑缺血方法引起的造模效果不佳”的问题。

1.1.2　改良 2VO—间隔一定时间分两次结扎双侧颈总动脉

传统 2VO 法对双侧颈总动脉进行同时结扎，这会导致脑部血流量突然减少，术后大鼠死亡率增高。改良方法采用间隔一定时间分两次结扎双侧颈总动脉的方法，可以诱导较温和的脑缺血状态，防止大鼠脑部急性缺血缺氧，降低大鼠死亡率。

郑敏等[16]采取间隔 3 d 分两次结扎双侧颈总动脉的改良方法，张浩浩等[17]采取间隔 5 d，分两次永久结扎双侧颈总动脉的改良方法。实验结果证明，改良模型组动物存活率明显高于传统模型组。然而，由于许多不确定因素，如手术中的意外麻醉、出血、感染、免疫力下降等，分次结扎法导致大鼠的术后死亡率较高。

1.1.3　改良 2VO—永久性结扎

谭洁等[18]采用小切口双重颈总动脉永久性结扎的手术方法，在斜方肌与气管夹角处剥离迷走神经后分离出，在近心端与远心端处分别以 4 号丝线进行双重结扎并剪断颈总动脉。术毕，再将颈正中线另一侧旁开 0.5 cm 处切开，进行重复操作。该实验模型有效避免了分次结扎法中多次麻醉所导致的免疫力降低和术后感染，降低了动物的死亡率。同时，这些动物表现出明显的学习和记忆障碍，使它们成为 VD 的一个改进模型。

Ohta 等[19]将永久性结扎血管改为颈内动脉。通过颈腹切口将双侧颈动脉与颈交感神经和迷走神经分离，结扎颈内动脉，位置高于翼腭动脉的起始点。对照组进行双侧颈总动脉双重结扎。颈总动脉不仅向大脑供血，还通过翼腭动脉向视神经供血。结扎双侧颈总动脉会阻碍血液流向视神经和大脑，视觉系统的损伤使大鼠表现出明显的学习障碍。颈内动脉结扎导致的学习障碍被认为是由基于慢性脑灌注不足的能量代谢缺陷引起的，而不是由大脑的器质性损伤或视觉系统功能障碍引起的。应该注意的是，该情形下的脑血流的减少没有诱发任何神经元坏死，亦即行为认知的改变不是神经元死亡导致的。在颈总动脉短暂夹闭的大鼠中也有类似的发现。优点：（1）颈总动脉结扎大鼠表现出视神经收缩和昼夜活动节律与光/暗周期不同步，而这些参数在颈内动脉结扎大鼠中未受影响，这表明永久性结扎颈内动脉不会损害视觉功能；（2）颈总动脉结扎后脑内观察到的主要病理变化是脑白质疏松和胶质增生以及海马 CA1 区神经元丢失[20]。与其他造模方法对比，颈内动脉结扎的大鼠没有明显的脑组织梗死。缺点：短期内，颈内动脉结扎大鼠的学习障碍程度低于颈总动脉结扎大鼠。值得注意的是，虽然其在短期内效果不明显，但在工作记忆任务中可造成持久的学习障碍。

1.2　四血管阻断法（4VO）

Pulsinelli 等[21]通过第一颈椎翼孔电灼大鼠双侧椎动脉，并在双侧椎动脉周围放置松放可调节的卡环。24 h 后，对清醒大鼠进行收紧颈动脉卡环从而产生 4 支血管（双侧椎动脉和双侧颈总动脉）闭塞。该方法模拟了急性脑缺血动物模型。研究表明，4VO 后大鼠空间学习记忆能力明显下降，可能与 CA1 区锥体神经元丢失有关。

该模型的优点是采用可调节的卡环方便控制动脉闭塞的时间，间接控制脑损伤程度，甚至可以通过控制时间变量使动物表现出不同的病理变化。该模型的缺点是：成功率不确定。因为椎动脉存在于第一颈椎翼孔下，电凝是盲法进行的，所以很难确定椎动脉是否完全电凝甚或过度电凝。完全电凝椎动脉是 4VO 模型成功的关键；不当或过度电凝可分别导致椎动脉破裂或脊髓损伤，从而影响实验数据。

虽然 4VO 过往因其高死亡率极少被应用，但是一些新研究证明：相较于 2VO，4VO 成功率较高，是

模拟血管性痴呆的可靠动物模型。王萍等[22]用 2VO 和 4VO 建立血管性痴呆模型,观察和比较两种方法在大鼠生存和空间学习能力方面的差异。他们发现 2VO 的死亡率低于 4VO,但动物反应能力和记忆能力明显低于 4VO,即 2VO 成功率低于 4VO。Jaspers 等[23]在随机对照实验中发现 4VO 大鼠海马 CA1 区出现神经元坏死,而 2VO 大鼠未出现。Ganesana 等[24]发现 4VO 是最严重的缺血性中风模型,4VO 闭塞在组织学上的损伤程度最为明显和严重,而大脑中动脉闭塞是一种较温和的中风模型,损伤程度较轻。

1.2.1 改良 4VO—改良椎动脉的结扎方法

由于常规 4VO 在椎动脉处理方面存在缺陷,改良方法主要致力于改良椎动脉的结扎方法。Lu 等[25]采用“可视化电凝结扎椎动脉+夹闭颈总动脉”的改良方法。通过背侧切口在第一和第二横突之间电灼椎动脉。24 h 后,用微血管夹暂时性夹闭双侧颈总动脉。四支血管闭塞 10、20 或 30 min 后取出血管夹。优点:常规 4VO 采取非可视化电凝法对双侧椎动脉进行结扎。非可视化电凝法易导致手术中椎动脉不完全闭塞,从而影响创建成功的模型。该改良方法规避了这一缺陷。缺点:建立这种模型需要熟悉操作显微外科设备的人员参与。

Sun 等[26]报告了“改良结扎椎动脉+夹闭颈总动脉”的改良方法。分离椎动脉,用 5-0 手术尼龙线永久结扎双侧椎动脉(不使用电凝)。24 h 后,用血管夹一过性夹取双侧颈总动脉 20 min 诱发全脑缺血。优点:(1)可视化缝合椎动脉,规避了因椎动脉结扎失误而导致的各种异常情况的发生;(2)通过明暗盒行为测试,并分析视觉功能和视网膜结构得出结论:改良的 4VO 诱导了严重的海马损伤,但没有导致明显的视觉感知变化。改良法所导致的认知障碍是海马损伤的结果,与视觉损伤无关,有效提高了实验数据可信度。

1.2.2 改良 4VO—改良操作血管

Pereira 等[27]将传统的操作血管(双侧椎动脉+颈总动脉)改为双侧椎动脉+双侧颈内动脉。要点是分 3 阶段进行四支血管永久性闭塞。双侧椎动脉几乎同时闭塞(2VO 期),随后逐步闭塞第一个颈内动脉(3VO 期)和另外一侧的颈内动脉(4VO 期)。从一个闭塞阶段到下一个闭塞阶段的时间间隔为 7、5、4 或 3 d。最终确定使用中老年大鼠,间隔 4 d 分 3 阶段进行四支血管永久闭塞是最优选择,实验效果最好。优点:实验评估表明永久性闭塞 4VO/(颈内动脉)保留了视网膜的完整性,不会影响视功能。缺点:(1)四血管完全闭塞会导致大鼠机体供血严重不足,使大鼠死亡率大大增加。(2)实验动物选择有要求,最好选择中年或老年大鼠。老龄大鼠比年轻大鼠更容易出现海马损伤,神经退行性改变和认知功能障碍。

1.2.3 改良 4VO—增加间隔时间

Plaschke 等[28]采用双侧颈总动脉和椎动脉交叉阻断的方法,进行阶梯式永久血管阻断。先通过结扎一侧颈总动脉,电凝对侧椎动脉进行两血管闭塞,1 周后进行另外两支血管闭塞。

急性脑缺血模型中,脑循环障碍与形态和代谢异常具有相关性[29]。即表现出能量代谢明显异常;脑组织能量负荷大幅下降;脑循环障碍明显加重。此改良方法尝试通过逐步减少脑供血建立一种脑灌注和能量代谢慢性恶化的动物模型,从而更准确地模拟慢性脑缺血。该模型的特点是,在两支血管闭塞 1 周后和四支血管闭塞 2 周后,血流动力学和呼吸参数没有显著变化。优点是死亡率较低。

1.3 三血管阻断法(3VO)

de la Torre 等[30]创建了一种通过闭塞锁骨下动脉阻断椎动脉血流的新方法。具体过程如下:大鼠经麻醉、插管、戴上呼吸器后开胸暴露左锁骨下动脉并结扎。暴露双侧颈总动脉在分叉下方,进行结扎。只有右侧锁骨下动脉(和椎支)保持开放,为大脑供血。遗憾的是在该实验中大鼠未表现出脑组织梗死,取而代之的是强烈的星形细胞增殖和 CA1 锥体神经元的选择性损伤,但无法证明该模型可以准确模拟 VD。

Horecký 等[31]通过改变血管闭塞位置进行 3VO 改良方法,采用颈前正中切口依次进行如下操作:(1)阻断头臂干以消除通过右侧椎动脉和右侧颈总动脉的血流;(2)闭塞左侧颈总动脉;(3)缝合皮肤。

最初的 Dela 三血管闭塞啮齿类动物模型的特点是胸腔内阻塞左锁骨下动脉,以消除通过左侧椎动脉的血流。然而,这样的外科手术较为耗时(45 min),且对动物进行过多操作(气管插管,人工通气,开胸手术)导致大鼠死亡率较高。Horecký 团队开发了这种新型、微创、经胸腔入路闭塞头臂干的手术方式,以消除流经右侧椎动脉和平行右侧颈总动脉的血流。

实验数据表明,该模型手术时间从 45 min 减少

到 7 min,围手术期生存率从 95%提高到 100%。此外,该模型对肌酸激酶系统的氧化修饰(酶的失活)和神经元细胞的氧化磷酸化非常敏感,从而导致认知障碍,是较为成功的 VD 模型。

1.4 大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)

为了建立一种简单和相对无创的可逆性局部脑缺血小动物模型,Longa 等[32]在大鼠颈部正中切口,暴露左侧颈总动脉 、左侧颈外动脉和颈内动脉。通过颈内动脉引入缝合线阻断左侧大脑中动脉,直至导管尖端到达大脑中动脉(18~22 mm)起始处,局灶性脑缺血状态开始。夹闭 120 min 后拔出缝合线实现再灌注,恢复大脑中动脉供血,结扎双侧椎动脉。整个手术过程中大鼠直肠温度维持在 37℃。缺点:该实验没有进行大鼠认知功能检测,无法确定该造模大鼠是否可以模拟血管性痴呆。但是,2020 年,Zheng 等[33]对大脑中动脉闭塞大鼠模型进行水迷宫测试发现实验组和对照组存在统计学差异,模型大鼠存在血脑屏障损伤及认知功能障碍。据不完全统计,在众多造模方法中大脑中动脉闭塞成功率最高[34]。

1.5 小鼠双侧颈总动脉狭窄(bilateral common carotid artery stenosis,BCAS)

Shibata 等[35]在 2004 年研创了双侧颈总动脉狭窄模型。他们首次提出用小鼠代替大鼠做实验对象,并在试验中发现对大鼠进行双侧颈总动脉闭塞,其存活率在可接受范围内。但对小鼠进行直接闭塞,死亡率极高。所以,通过在小鼠双侧颈总动脉周围放置部分闭塞的外部微线圈,建立双侧颈总动脉狭窄小鼠模型。以改变微线圈型号的方式改变颈总动脉的闭塞程度。实验过程:通过颈正中切口,暴露双侧颈总动脉,在右侧颈总动脉远端和近端周围放置两根缝合线。然后,用这些缝合线轻轻地提起动脉,并将其置于微线圈环之间。微线圈绕着颈总动脉旋转。30 min 后,将另一个相同大小的微线圈缠绕在左侧颈总动脉周围。小鼠特异性地表现出可归因于额叶-皮层下回路损伤的工作记忆缺陷,而不伴有明显的灰质变化,表明与皮层下缺血性 VD 相似。优点:改进了传统 2VO 方法,因脑血流量不足、眼动脉血流量不足、视觉通路损伤等,导致无法确认实验动物表现出来的认知障碍是因为海马体损伤还是视觉功能损伤。组织学检查发现,小鼠模型没有显示出对灰质结构的损伤,保留了视觉通路。原因可能是与大鼠模型相比,小鼠的双侧颈总动脉狭窄诱导了较轻微的脑血流减少,但维持了颈总动脉及其分支(如眼动脉)内的残余血流。微线圈型号确认为 0.18 mm,其重复性较高。缺点:(1)建模后小鼠 3 个月之内只有认知障碍而无运动功能障碍,需制备长期模型进一步检验;(2)需要在双侧颈总动脉上适当放置微线圈,以防止动脉损伤;(3)小鼠双侧颈总动脉狭窄只导致脑白质稀疏,不引起灰质梗死,且没有任何明显的大脑皮层或海马变化。脑血流的下降相对突然。与人类血管性认知障碍(vascular cognitive impairment,VCI)的正常模式不符。

Nishio 等[36]致力于研究双侧颈总动脉狭窄小鼠模型的长期影响,得出如下结论:在目前的较长期的双侧颈总动脉狭窄模型中,8 个月不仅记录到白质变化,而且记录到海马变化(萎缩和细胞死亡)[37]。长期的双侧颈总动脉狭窄模型复制了海马神经元丢失的晚期皮层下缺血性 VD。

1.6 小鼠不对称颈总动脉闭塞—右侧颈总动脉闭塞(right unilateral common carotid artery occlusion,rUCCAO)

2008 年 Yoshizaki 等[38]建立了一种新的 VD 伴缺血性白质损伤的小鼠模型。颈部正中切口,分离右侧颈总动脉用 6-0 丝线双结扎。研究表明:(1)手术后小鼠患侧大脑皮质[39]、纹状体、海马体平均脑血流量显著降低;(2)白质损伤与脑血流的慢性下降密切相关[40]。白质损伤顺序:胼胝体>纹状体>海马体。总之,在右侧颈总动脉闭塞手术小鼠纹状体和海马体白质损伤不明显。若想诱导纹状体明显的白质损伤,可能需要更严重的慢性脑缺血降低甚至双侧大脑半球脑血流量的降低;(3)在认知障碍中,右侧颈总动脉闭塞诱导的慢性脑缺血选择性地损害非空间工作记忆。该方法的优点是手术死亡率较低。

1.7 小鼠不对称颈总动脉狭窄(asymmetric common carotid artery surgery,ACAS)

2015 年,Hattori 等[41]报告了一种新型的脑梗死动物模型,通过在 C57BL/6J 小鼠的双侧颈总动脉植入不同的装置,可以产生脑梗死损伤和认知障碍。

在右侧颈总动脉植入类动脉收缩器可导致血管逐渐闭塞超过 28 d,而在左侧颈总动脉植入微线圈可导致约 50%的动脉狭窄。在该模型中观察到

脑血流逐渐减少,并诱导白质梗死、稀疏和胶质细胞增生,在最初表现出运动障碍(步态障碍和肌肉无力),然后出现执行功能障碍即模仿人类慢性脑灌注不足的神经临床状况(如颈动脉狭窄,房颤,心力衰竭)。优点:(1)该模型代表了一种新的动物模型,它准确地复制了主要的白质梗死伴运动缺陷和痴呆,与皮层下血管性认知障碍表现一致;(2)不对称颈总动脉狭窄模型的大脑半球之间的缺血深度不同,可以从右到左比较某些药物对缺血的疗效,有利于分析皮层下血管性认知障碍的病理生理,寻找针对皮层下血管性认知障碍的药物。

Mansour 等[42]通过进行单侧颈总动脉闭塞和对侧颈总动脉狭窄(modified common carotid artery occlusion,mCCAO)改良 ACAS 在大鼠颈腹侧部正中切口后,将两侧颈总动脉从颈动脉鞘中剥离并暴露出来。左侧颈总动脉用 6-0 丝线永久闭塞,右侧颈总动脉用 6-0 丝线轻轻扎紧,将 6-0 丝线绑在动脉周围和钝性 29 号针,然后迅速收回。在本研究中,这种钝针技术保留了部分血流,通过使用不同的量规方便不同程度的动脉狭窄。

该模型成功不仅模拟了慢性脑灌注不足,而且用钝性针替代了微线圈,既保留了微线圈的优点,即使用不同粗细的钝性针可以进行不同程度的动脉狭窄处理,同时也改进了微线圈缺点,即降低了血管内皮细胞的损伤程度,动物死亡率降低。

1.8 其他类型痴呆的造模方法

1.8.1 多发梗死性痴呆模型

Kaneko 等[43]建立了大鼠血栓栓塞症的可复制模型,具体操作如下:手术前 36 h,从一只雄性 Wistar 大鼠的股动脉中获取 10 mL 血液,并将其储存在 37℃培养箱中以形成凝块。用千分尺测量,血块碎裂平均大小为 100~200 μm。36 h 后,麻醉大鼠并暴露其右侧颈总动脉和颈外动脉的分叉,夹闭颈外动脉。60 只大鼠通过在 1~2 min 内向颈内动脉注射 0.3 mL 用生理盐水稀释的 3%凝块悬浮液来诱导栓塞损伤。

1.8.2 高血压-高血脂复合血管性痴呆模型

邵瑛等[44]采用“双肾一夹”法即阻断左肾动脉模拟高血压模型,用高脂饲料喂养大鼠,通过血压测量和血脂分析,筛选出高血压-高血脂(双高)模型大鼠,在此基础上采用 2VO 法夹闭双侧颈动脉,建立高血压-高血脂复合血管性痴呆(HH-VD)模型。

1.9 各造模方法的操作、特点及优缺点

目前,脑缺血动物实验对象大多为大鼠。针对血管性痴呆,2VO 和 4VO 是目前最常用的造模方法,两者各有优势。当前主流观点认为:2VO 存活率更高;4VO 成功率更高。改良造模方法大多从两个方面进行改良:(1)提高存活率;(2)提高成功率。

与 4VO 相比,2VO 大鼠认知变化主要由白质病理改变引起;2VO 可使大鼠维持慢性低灌注状态,降低死亡率。改良 2VO 方法:(1)提高存活率:间隔一定时间分两次结扎双侧颈总动脉:诱导较温和的脑缺血状态,有效避免大鼠因急性脑缺血而死亡。(2)提高成功率:① 硝普钠降压:避免机体代偿反应引起的血压回升;避免反复再灌注使大鼠自愈,恢复其正常生理功能。② 永久性结扎双侧颈内动脉:不会损害视觉功能,确保大鼠认知功能障碍与视觉损伤无关(表 1)。

与 2VO 相比,4VO 可以通过控制动脉闭塞的时间使大鼠表现出不同的病理变化,其适用范围更加广泛。改良 4VO 方法:(1)提高存活率:增加两次结扎的间隔时间:通过逐步减少脑供血模拟慢性脑缺血,有效控制了脑组织急性缺血缺氧所导致的高死亡率。(2)提高成功率:① 改良椎动脉结扎方法:精细操作可以降低实验失败率;② 将常规操作血管(双侧椎动脉+颈总动脉)改为双侧椎动脉+双侧颈内动脉:排除视觉损伤干扰实验结果(表 2)。

一些其他改良方法,虽然没有明确优点,但是为 VD 造模提供了新的想法(表 3)。

与大鼠相比,小鼠因其体积较小,手术操作难度较大,一般不作为造模首选。但是以小鼠为实验对象的造模方法可以模拟大鼠模型无法复制的 VD 特征。此外,实验用大鼠大多使用转基因动物的分子技术,技术可及性的有限会阻碍遗传学研究。

小鼠双侧颈总动脉狭窄可以诱导胼胝体白质疏松,小鼠不对称颈总动脉狭窄小鼠模型可以诱导白质梗死,改变了过往模型只表现出大脑皮层的灰质梗死和白质疏松的病理变化(表 4)。

建立合适的动物模型,对于研究 VD 的病理基础及各种治疗方式的作用机制和疗效至关重要。由于 VD 病因复杂,迄今为止并没有出现可完整精确复制 VD 病理状态的模型。针对出血性 VD,自体血注射脑出血模型是应用最多的脑出血动物模型之一。Kemper 等[45]和 Moore 等[46]分别在 1999 年和 2002 年建立了猴的高血压模型;Hainsworth 等[47]在 2008 年建立了易卒中的自发性高血压大鼠模型,模拟出血性认知功能下降。其缺点是难以控制出

表 1 以大鼠为研究对象的造模方法(2VO)

Table 1 Modeling method using rat as research object (2VO)

类型 Type	操作 Operation	特点 Characteristic
两血管阻断法 2VO	对大鼠的双侧颈总动脉进行同时结扎闭塞 Simultaneous ligation and occlusion of bilateral common carotid arteries were performed	是目前最常用的 VD 造模方法之一 It is one of the most commonly used VD molding methods
改良两血管阻断法: 两血管阻断法+硝普钠降压法 Modified 2VO: 2VO + sodium nitroprusside antihypertensive	延长双侧颈动脉夹闭时间并增加夹闭次数 Lengthen bilateral carotid artery occlusion time and increase the number of occlusions	检测发现适当延长双侧颈总动脉夹闭的时间并增加夹闭次数没有严重影响大鼠的成活率 It was found that extending the time of bilateral CCA clamping and increasing the number of clamping did not seriously affect the survival rate of rats
	增加夹闭次数并结扎一侧颈总动脉 Number of clamps was increased and unilateral CCA was ligated	更接近 VD 发病机制,避免反复再灌注导致大鼠恢复正常 It is closer to the pathogenesis of VD and avoids repeated reperfusion leading to normal rats
改良两血管阻断法: 间隔一定时间分 2 次结扎双侧颈总动脉 Modified 2VO: Bilateral CCA was ligated twice at a certain interval	间隔 5 d 分 2 次结扎双侧颈总动脉 Bilateral CCA was ligated twice in 5 days interval 间隔 3 d 天分 2 次结扎双侧颈总动脉 Bilateral CCA was ligated twice in 3 days interval	因急性脑缺血而死亡的大鼠数量减少,但因手术中出血感染而术后死亡的大鼠数量增多 Fewer rats died from acute cerebral ischemia, but the number of rats dying after operation due to bleeding infection increased
	小切口双重永久性结扎 Double permanent ligation with small incision	有效避免多次结扎导致死亡率升高,较理想 It effectively avoided the increase of mortality caused by multiple ligation, which was ideal
改良两血管阻断法: 永久性结扎 Modified 2VO: Permanent ligation	永久性结扎双侧颈内动脉 Permanent ligation of bilateral internal carotid arteries	会损伤工作记忆,但不会对脑组织和视觉系统造成病理损伤。短期内学习障碍不明显,(短期实验不适用)但适用于长期实验 It impairs working memory, but does not cause pathological damage to brain tissue or the visual system. Short term learning disabilities are not obvious, (short term experiments are not applic-able) but it's good for long-term experiments

表 2 以大鼠为研究对象的造模方法 (4VO)

Table 2 Modeling method using rat as research object (4VO)

类型 Type	操作 Operation	特点 Characteristic
四血管阻断法 4VO	盲法电凝椎动脉并在双侧颈总动脉安装可逆性卡环 Blind electrocoagulation of vertebral artery and reversible clamps were installed in bilateral CCA	可逆性卡环可间接控制脑损伤,得到动物的不同病理表现;虽然其死亡率高(电凝椎动脉是关键但实验中用盲法操作),但成功率高于 2VO,是目前最常用的 VD 造模方法之一 Reversible clasp can indirectly control the degree of brain injury and obtain different pathological manifestations of animals Although the mortality rate was higher (electro-coagulation of the vertebral artery was key but the experiment was done blind), the success rate was higher than that of 2VO, it is one of the most commonly used VD molding methods
改良四血管阻断法: 改良椎动脉结扎方法 Modified 4VO: Improved VA ligation method	可视化电凝结扎椎动脉+夹闭颈总动脉 Visual electrical coagulation of vertebral artery and clamping of common carotid artery	模型成功率提高,但对操作者要求较高,不适宜广泛应用 Model success rate increase, it is not suitable for wide application because of the high requirement for operators
	改良结扎椎动脉+夹闭颈总动脉 Improved ligation of vertebral artery and clamping of common carotid artery	模型成功率提高但缺血表现不明显 Model success rate increase, but ischemia was not obvious

续表2

类型 Type	操作 Operation	特点 Characteristic
改良四血管阻断法： 改良操作血管 Modified 4VO： Modified operating vessel	将传统的操作血管(双侧椎动脉+双侧颈总动脉)改为双侧椎动脉+双侧颈内动脉 Traditional operating vessel (bilateral VA and CCA) was changed to bilateral VA and bilateral ICA	无视觉损伤,排除其干扰,但死亡率较高 No visual damage, eliminate its interference, but the mortality rate is higher.
改良四血管阻断法： 增加间隔时间 Modified 4VO： Increase interval time	双侧颈总动脉和椎动脉阶梯式永久阻断 Bilateral CCA and VA step permanent blocking	死亡率较低,适用于慢性脑缺血 Low mortality, suitable for chronic cerebral ischemia

表 3 以大鼠为研究对象的造模方法(其他)

Table 3 Modeling method using rat as research object(other)

类型 Type	操作 Operation	特点 Characteristic
三血管阻断法 3VO	闭塞左锁骨下动脉和双侧颈总动脉 Occluded the left subclavian artery and bilateral CCA	3VO 模型表现出的病理损害和 VD 不完全相同,为 VD 造模提供新思路 Pathological damage of 3VO model is different from that of VD model, which provides a new idea for VD modeling
改良三血管阻断法： 改变血管闭塞位置 Modified 3VO： Change the location of vascular occlusion	闭塞头臂干和左侧颈总动脉 Occluded brachiocephalic trunk and left common carotid artery	死亡率相对较低,且模拟出了 VD Mortality rate was relatively low and VD was simulated
大脑中动脉闭塞 MCAO	通过颈内动脉对大脑中动脉进行闭塞和再灌注 Middle cerebral artery was occluded and reperfused via the internal carotid artery	MCAO 模型存在认知功能障碍,可能为 VD 造模提供新思路 Cognitive dysfunction exists in MCAO model, which may provide new ideas for VD modeling

表 4 以小鼠为研究对象的造模方法

Table 4 Modeling method using mice as research object

类型 Type	操作 Operation	特点 Characteristic
小鼠双侧颈总动脉狭窄 BCAS	在双侧颈总动脉放置微线圈 Microcoils were placed in bilateral common carotid arteries	复制了海马神经元丢失的晚期皮层下缺血性 VD Replicates late subcortical ischemic VD with hippocampal neuron loss
小鼠不对称颈总动脉闭塞——右侧颈总动脉闭塞 rUCCAO	结扎右侧颈总动脉和右迷走神经 Ligate the right common carotid artery and the right vagus nerve	建立此模型的初衷是建立一个伴有缺血性白质损伤的 VD 模型,但是实验中发现小鼠脑缺血程度不足导致白质损伤不明显 Original intention of establishing this model was to establish a transverse VD pattern with ischemic white matter injury, but it was found that insufficient cerebral ischemia in mice resulted in insignificant white matter injury
小鼠不对称颈总动脉狭窄 ACAS	右侧颈总动脉植入类动脉收缩器,左侧颈总动脉植入微线圈 Right CCA was implanted with an arterial-like contractile, and the left CCA was implanted with a microcoil	准确地复制了主要的白质梗死伴运动缺陷和痴呆,准确模拟了皮层下血管性认知障碍 It accurately replicates major white matter infarction with motor deficits and dementia and accurately simulates subcortical vascular cognitive impairment
改良 ACAS——单侧颈总动脉闭塞并诱导对侧颈总动脉狭窄 MCCAO	左侧颈总动脉永久闭塞,右侧颈总动脉与钝性针绑定 Left CCA was permanently occluded, and the right CCA was bound to the blunt needle	降低了血管内皮细胞的损伤程度,动物死亡率降低 Injury degree of vascular endothelial cells and the death rate of animals were reduced

血量和出血部位,不能完全取代出血性 VD 临床实验模型[48]。如何模拟出完全自然真实的脑出血,从而建立理想的出血性 VD 模型,这一问题仍有待解决。针对缺血性 VD,现有改良方法几乎都是与传统方法进行对比,缺乏改良方法之间的横向比较及实验对照。我们亟需确定一个可行度高,成功率相对较高,死亡率相对较低的改良方法,并在此基础上进一步探索夹闭血管时最合适的操作方法,确定最合适的夹闭与再通血的频率与间隔时间。

本课题组长期从事针刺治疗血管性痴呆的临床和基础研究,在长期临床实践基础上发现:中医在治疗 VD 及血管性认知功能障碍方面有独特优势。目前公认的血管性痴呆中医证型有三种,分别是:痰浊、血瘀和肾虚[49]。其中,使用高脂高糖饲料喂养大鼠可以模拟痰浊证型[50];通过对大鼠皮下注射肾上腺素可以改变血液流变性,是较为常用的血瘀证模型;采用肾上腺皮质激素氢化可的松,可使大鼠出现类似中医证候肾阳虚证的表现[51];甲状腺素灌胃法可以制备肾阴虚证型[52]。

针对不同的 VD 中医证型,是否可以在结扎血管之前施加预处理,使用现有的公认的中医证候的动物模型模拟不同体质,从而辨证论治,进而提高疗效,这是值得思考和探索的问题。

2 小结

上述 12 种模型各有其 VD 适应类型及优缺点,研究者可根据不同实验目的选择最合适的造模方法,同时,这也为研究人员进一步研发更准确的动物模型提供了实验基础。

根据病变特征和病理机制的不同,临床将 VD 分为多种亚型。定义 VD 亚型的因素包括血管病理的性质和范围、颅内外血管和颅内血管的受累程度、组织变化的解剖位置以及血管初始事件发生后的时间[53]。VD 的各种亚型各有其特异性临床表现,其造模方法也不尽相同。没有一个单一的动物模型可以将它们全部复制。如何准确模拟 VD 各种亚型的病理状态值得研究人员进行深入探索。也希望这些动物模型能在引领 VD 新治疗方法的开发上取得重要突破。

参考文献:

[1] Yang Y, Zhao X, Zhu Z, et al. Vascular dementia: a microglia's perspective [J]. Ageing Res Rev, 2022, 81: 101734.

[2] Bir SC, Khan MW, Javalkar V, et al. Emerging concepts in vascular dementia: a review [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2021, 30(8): 105864.

[3] 白桂芹, 肖如辉, 陈莉, 等. 阿尔茨海默病患者海马结构的断层影像学研究 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2020, 38(1): 29-34.

[4] Rundek T, Tolea M, Ariko T, et al. Vascular cognitive impairment (VCI) [J]. Neurotherapeutics, 2022, 19(1): 68-88.

[5] Rost NS, Brodtmann A, Pase MP, et al. Post-stroke cognitive impairment and dementia [J]. Circ Res, 2022, 130(8): 1252-1271.

[6] Korte N, Ilkan Z, Pearson CL, et al. The Ca^{2+}-gated channel TMEM16A amplifies capillary pericyte contraction and reduces cerebral blood flow after ischemia [J]. J Clin Invest, 2022, 132(9): e154118.

[7] 侯敏哲, 李婷, 倪敬年, 等. 针灸对血管性痴呆动物模型单胺类神经递质影响的 Meta 分析 [J]. 环球中医药, 2022, 15(12): 2401-2407.

[8] Han B, Jiang W, Liu H, et al. Upregulation of neuronal PGC-1α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. Theranostics, 2020, 10(6): 2832-2848.

[9] Bhatia P, Kaur G, Singh N. Ozagrel a thromboxane A2 synthase inhibitor extenuates endothelial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation in rat model of bilateral common carotid artery occlusion induced vascular dementia [J]. Vascul Pharmacol, 2021, 137: 106827.

[10] Hu HY, Ou YN, Shen XN, et al. White matter hyperintensities and risks of cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis of 36 prospective studies [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2021, 120: 16-27.

[11] Nanri M, Watanabe H. Availability of 2VO rats as a model for chronic cerebrovascular disease [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi, 1999, 113(2): 85-95.

[12] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(10): 914-916.

[13] 汪瑶, 关秋华. 硝普钠对成年大鼠全脑缺血后的海马神经元具有保护作用 [J]. 徐州医学院学报, 2008, 28(6): 351-353.

[14] 窦金金, 谢宁, 吴颂, 等. 血管性痴呆大鼠模型的改良 [J]. 中国临床保健杂志, 2012, 15(2): 167-168.

[15] 顾静, 李海龙, 杨长生, 等. 血管性痴呆大鼠模型制作方法的改良 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 634-638.

[16] 郑敏, 赵骥, 陈红光, 等. 大鼠血管性痴呆模型的改良 [J]. 咸宁学院学报(医学版), 2008, 22(4): 277-278, 284.

[17] 张浩浩, 姜岩, 杜成华, 等. 两血管改良法制备血管性痴呆大鼠模型 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(9): 141-146.

[18] 谭洁, 韩国栋, 张泓, 等. 改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(3): 264-268.

[19] Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, et al. Chronic cerebral

hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats [J]. Neuroscience, 1997, 79(4): 1039-1050.

[20] Mao M, Xu Y, Zhang XY, et al. microRNA-195 prevents hippocampal microglial/macrophage polarization towards the M1 phenotype induced by chronic brain hypoperfusion through regulating CX3CL1/CX3CR1 signaling [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 244.

[21] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10(3): 267-272.

[22] 王萍, 杨骏, 王频. 血管性痴呆两种动物模型的比较 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(2): 214, 236.

[23] Jaspers RM, Block F, Heim C, et al. Spatial learning is affected by transient occlusion of common carotid arteries (2VO): comparison of behavioural and histopathological changes after '2VO' and 'four-vessel-occlusion' in rats [J]. Neurosci Lett, 1990, 117(1-2): 149-153.

[24] Ganesana M, Venton BJ. Spontaneous, transient adenosine release is not enhanced in the CA1 region of hippocampus during severe ischemia models [J]. J Neurochem, 2021, 159(5): 887-900.

[25] Lu D, Wu Y, Qu Y, et al. A modified method to reduce variable outcomes in a rat model of four-vessel arterial occlusion [J]. Neurol Res, 2016, 38(12): 1102-1110.

[26] Sun W, Chen Y, Zhang Y, et al. A modified four vessel occlusion model of global cerebral ischemia in rats [J]. J Neurosci Methods, 2021, 352: 109090.

[27] Pereira FM, Ferreira ED, de Oliveira RM, et al. Time-course of neurodegeneration and memory impairment following the 4-vessel occlusion/internal carotid artery model of chronic cerebral hypoperfusion in middle-aged rats [J]. Behav Brain Res, 2012, 229(2): 340-348.

[28] Plaschke K, Bardenheuer HJ, Weigand MA, et al. Increased ATP production during long-term brain ischemia in rats in the presence of propentofylline [J]. Eur J Pharmacol, 1998, 349(1): 33-40.

[29] Schuhmann MK, Stoll G, Bieber M, et al. CD84 links T cell and platelet activity in cerebral thrombo-inflammation in acute stroke [J]. Circ Res, 2020, 127(8): 1023-1035.

[30] de la Torre JC, Fortin T, Park GA, et al. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats [J]. Brain Res, 1992, 582(2): 186-195.

[31] Horecký J, Baciak L, Kasparová S, et al. Minimally invasive surgical approach for three-vessel occlusion as a model of vascular dementia in the rat-brain bioenergetics assay [J]. J Neurol Sci, 2009, 283(1-2): 178-181.

[32] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[33] Zheng Y, Qin Z, Tsoi B, et al. Electroacupuncture on trigeminal nerve-innervated acupoints ameliorates poststroke cognitive impairment in rats with middle cerebral artery occlusion: involvement of neuroprotection and synaptic plasticity [J]. Neural Plast, 2020, 2020: 8818328.

[34] Li G, Shi Y, Zhang L, et al. Efficacy of acupuncture in animal models of vascular dementia: A systematic review and network meta-analysis [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 952181.

[35] Shibata M, Ohtani R, Ihara M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. Stroke, 2004, 35(11): 2598-2603.

[36] Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, et al. A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy [J]. Stroke, 2010, 41(6): 1278-1284.

[37] Poh L, Fann DY, Wong P, et al. AIM2 inflammasome mediates hallmark neuropathological alterations and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia [J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(8): 4544-4560.

[38] Yoshizaki K, Adachi K, Kataoka S, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induced by right unilateral common carotid artery occlusion causes delayed white matter lesions and cognitive impairment in adult mice [J]. Exp Neurol, 2008, 210(2): 585-591.

[39] Huuskonen MT, Wang Y, Nikolakopoulou AM, et al. Protection of ischemic white matter and oligodendrocytes in mice by 3K3A-activated protein C [J]. J Exp Med, 2022, 219(1): e20211372.

[40] Qin Y, Wu J, Chen T, et al. Long-term microstructure and cerebral blood flow changes in patients recovered from COVID-19 without neurological manifestations [J]. J Clin Invest, 2021, 131(8): e147329.

[41] Hattori Y, Enmi J, Kitamura A, et al. A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia [J]. J Neurosci, 2015, 35(9): 3915-3928.

[42] Mansour A, Niizuma K, Rashad S, et al. A refined model of chronic cerebral hypoperfusion resulting in cognitive impairment and a low mortality rate in rats [J]. J Neurosurg, 2018, 131(3): 892-902.

[43] Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: development of a new experimental model [J]. Stroke, 1985, 16(1): 76-84.

[44] 邵瑛, 赖新生, 关楚威, 等. "通督调神固本"电针法对高血压-高血脂复合血管性痴呆模型大鼠学习记忆干预的初步研究 [J]. 针刺研究, 2009, 34(6): 368-375.

[45] Kemper T, Moss MB, Hollander W, et al. Microinfarction as a result of hypertension in a primate model of cerebrovascular disease [J]. Acta Neuropathol, 1999, 98(3): 295-303.

[46] Moore TL, Killiany RJ, Rosene DL, et al. Impairment of executive function induced by hypertension in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) [J]. Behav Neurosci, 2002, 116(3): 387-396.

[47] Hainsworth AH, Markus HS. Do *in vivo* experimental models reflect human cerebral small vessel disease? A systematic review [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12): 1877-1891.

[48] 鲁华山, 于长义, 田志佳, 等. 脑出血实验动物模型研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2016, 15(2): 184-186.
[49] 胡卓瑶, 李梦兰, 李林昌, 等. 基于现代医学临床分型及中医证型的血管性痴呆模型研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(23): 132-135.
[50] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 141-146.
[51] 李磊, 刘建勋, 任钧国, 等. 中医药动物模型研究现状及展望[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 104-110.
[52] 陈晓阳, 陈容, 李晟, 等. 肾阴虚抑郁症大鼠模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 28-31.
[53] Kalaria RN. The pathology and pathophysiology of vascular dementia[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 226-239.

〔收稿日期〕2023-01-04

综述:构建临床癌症研究相关的人源肿瘤异种移植模型的进展

人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft,PDX)模型是从癌症患者手术切除肿瘤组织,随后移植到免疫缺陷小鼠体内,从而更好地保留了肿瘤的异质性。这是一种重要的转化医学研究方法,特别是在推动精准医学方面,这种方法已经崭露头角。本文从时间维度阐述了 PDX 模型在各个阶段的发展。作为 PDX 模型发展的第一阶段,人源肿瘤原位异种移植(patient-derived orthotopic xenograft,PDOX)模型将人源肿瘤组织植入小鼠体内,位置与患者的解剖位置相对应。PDOX 模型具有多个优势,包括高度保真地还原原始肿瘤、增强药物敏感性以及提高移植成功率。然而,PDOX 模型也存在严峻的挑战,它需要先进的手术技术和精密的成像技术,这限制了其应用。随后,人源化小鼠模型以及斑马鱼模型相继被开发应用。人源化小鼠模型具有类似肿瘤和免疫系统相互作用的人类免疫环境,它是 PDX 模型研究的热点话题。斑马鱼异种移植模型(zebrafish patient-derived tumor xenograft,zPDX)和患者源性类器官(patient-derived organoids,PDO)模型作为研究癌症和药物开发的新模型,zPDX 模型用于将肿瘤移植到斑马鱼体内,成为新型个性化动物疾病模型,具有缩短患者等待时间的优势。PDO 模型提供了一种新的药物测试方法。该方法可复制体内环境并保存重要的与患者相关的肿瘤信息。本综述突出了 PDX 模型每个新阶段的功能特征,并阐述了这一快速发展领域所面临的挑战以及未来的发展。

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(5): 381-398. https://doi.org/10.1002/ame2.12349)。

邬建飞,刘宇,魏岱旭,等. 单细胞转录组技术在神经退行性疾病上的应用研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 86-92.
Wu JF, Liu Y, Wei DX, et al. Application research progress of single cell RNA-sequencing technology in neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 86-92.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.013

单细胞转录组技术在神经退行性疾病上的应用研究进展

邬建飞[1],刘 宇[1],魏岱旭[1,2],蒲建林[1],蔡端芳[1],王丙龙[1*]
(1.自贡市精神卫生中心自贡市脑科学研究院,四川 自贡 643020;2.西北大学生命科学与医学部,西安 710069)

【摘要】 神经退行性疾病(neurodegenerative diseases,NDs)是一类与中枢神经系统密切相关的精神疾病,以特定神经元群的形态异常和功能进展性丧失为主要特征,神经退行性疾病主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)、帕金森病(Parkinson's disease,PD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)、多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)和亨廷顿病(Huntington's disease,HD),目前还没有发现有效预防或治愈神经退行性疾病的策略。近年来,单细胞转录组技术(single-cell RNA-sequencing,scRNA-seq)被广泛应用于各种神经退行性疾病研究,并发现神经退行性疾病发病机制与脑中免疫细胞状态密切相关,主要涉及线粒体功能、葡萄糖代谢途径、炎症和突触传递等生物学过程,诱导性多功能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSC)疗法是治疗神经退行性疾病的潜在方案。本文对单细胞转录组测序技术在各种神经退行性疾病上的研究进行综述,以期对将来神经退行性疾病的预防和治疗提供参考。

【关键词】 神经退行性疾病;单细胞转录组技术;中枢神经系统;发病机制
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0086-07

Application research progress of single cell RNA-sequencing technology in neurodegenerative diseases

WU Jianfei[1], LIU Yu[1], WEI Daixu[1,2], PU Jianlin[1], CAI Duanfang[1], WANG Binglong[1*]
(1. Zigong Psychiatric Research Center Zigong Institute of Brain Science, Zigong 643020, China.
2. Department of Life Sciences and Medicine, Northwest University, Xi'an 710069)

【Abstract】 Neurodegenerative diseases (NDs) are closely related to the central nervous system and characterized by morphological abnormalities and progressive loss of function in specific neuron groups. The main NDs include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis and Huntington's disease. However, no direct therapies for NDs exist. In recent years, single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) has been widely used in various NDs. The pathogenesis of NDs is closely related to morphology of immune cells, and the pathogenesis mainly involves mitochondrial function, glucose metabolism, inflammation, and synaptic transmission. Induced pluripotent stem cells are a potential therapy for NDs. Ultimately, we review the application of scRNA-seq to various NDs and provide a reference for prevention and treatment of NDs.

【Keywords】 neurodegenerative diseases; single cell RNA-sequencing; central nervous system; pathogenesis
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金(31900950);自贡市卫生健康委员会科研课题(22yb001,22yb002);自贡市科技计划项目(2023YKY11)。
[作者简介]邬建飞(1995—),男,硕士研究生,助理研究员,研究方向:神经发育生物学研究。E-mail:179507209@qq.com
[通信作者]王丙龙(1994—),男,硕士研究生,助理研究员,研究方向:神经发育生物学研究。E-mail:1179518349@qq.com

人类大约由 3.72×10^{13} 个活细胞组成,不同类型的细胞相互作用,形成了众多动态平衡的微环境,维持着人体各项生命代谢活动[1]。细胞是构成人体的基本结构单元和功能单位,各种细胞都由受精卵不断分裂和分化发育而来,几乎所有细胞都含有相同的遗传物质,但转录组信息的差异性决定了细胞功能的特异性,利用单细胞转录组测序(single-cell RNA-sequencing,scRNA-seq)技术探究单细胞的异质性,有利于进一步揭示细胞多样性、识别细胞分化轨迹和阐明细胞间通讯,目前逐渐兴起的 scRNA-seq 技术已被广泛应用于各项临床医学研究[2-4]。神经退行性疾病(neurodegenerative diseases,NDs)是与中枢神经系统密切相关的慢性进行性疾病,主要包括阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)、帕金森病(Parkinson's disease,PD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)、多发性硬化症(multiple sclerosis,MS)和亨廷顿病(Huntington's disease,HD)等,NDs 已成为威胁人类健康的重要原因之一[5]。NDs 主要由于大脑特定区域的细胞死亡所导致,从患者体细胞重编程的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSC)表现出良好的自我更新能力和具有分化成任何细胞类型的潜力,iPSC 的出现为 NDs 的治疗提供了全新的选择,目前 iPSC 已经应用于 AD、PD、ALS 等 NDs 的治疗研究[6]。但 iPSC 重编程引入的遗传修饰、iPSC 分化过程中的遗传稳定性及 NDs 致病机制的复杂性都深刻影响着 NDs 的治疗效果,因此,利用 scRNA-seq 技术深入探究 NDs 发病过程中相关神经元细胞的变化情况,掌握 NDs 的发病进程,可以为进一步探索潜在的治疗靶点和研发新的治疗药物提供支持。

1 基因测序技术的发展历程

基因是生命的"密码",1977 年,英国科学家弗雷德里克·桑格利用双脱氧链终止法(Sanger 法)完成了噬菌体 phi-X174 的完整基因组测序,开启了人类通过基因序列探索生命奥秘的新篇章[7]。2005 年,能够高通量并行测序的下一代测序(next-generation sequencing,NGS)技术成功问世,NGS 技术的出现极大地推动了基因测序技术革命,但 NGS 技术存在读取片段(reads)不足、试验耗时长、后续处理分析复杂等局限,因此以单分子实时测序(single-molecule real-time sequencing,SMRT)技术和纳米孔测序技术为代表的第三代测序(third-generation sequencing,TGS)技术应运而生,TGS 技术无需对模板进行 PCR 扩增即可实现核苷酸分子的测序,这有利于减少偏差和提供更均匀的基因组覆盖度,同时 TGS 技术操作简单,文库构建过程简化、reads 长度增加[8]。NGS 技术和 TGS 技术都是基于光信号的测序技术,测序成本相对较高,近年来兴起了依赖电信号的第四代测序技术,其根据 DNA 或 RNA 通过纳米孔时的电流畸变率来确定碱基序列,第四代测序技术的 reads 长度进一步增加,速度更快,性价比更高,已在基因修饰、表观遗传学研究、癌症诊断等相关领域表现出广阔的应用前景[9]。

scRNA-seq 技术在 NGS 技术的基础上衍生而来,2009 年,Tang 等[10]成功对小鼠的单个卵裂球和卵母细胞的转录组完成测序,实现了测序技术在单细胞水平上的重大突破。近十余年,越来越多的 scRNA-seq 技术被开发出来,科学家在单细胞分离、空间条形码逆转录、cDNA 扩增、文库制备、测序和数据分析等方面不断进行改进,目前已有 STRT-seq(2011 年)、Smart-seq(2012 年)、CEL-seq(2012 年)、Smart-seq2(2013 年)、Fluidigm C1(2013)、MARS-seq(2014 年)、Drop-seq(2015 年)、10X Chromium(2016 年)、MATQ-seq(2017 年)、Seq-well(2017 年)、Quartz-seq2(2018 年)和 DNBelab C4(2019 年)等十余种 scRNA-seq 技术成功问世,这些技术在细胞分离方法、cDNA 扩增方式、转录组覆盖度和独特的分子识别符等方面存在一定差异,其中 MARS-seq、Smart-seq2、Fluidigm C1 和 10X Chromium 等测序技术越趋成熟,生物公司基于这些方法开发了众多商业测序平台,如 10X Genomics Chromium™ 系统、BD Rhapsody™ 系统、Fluidigm C1 系统等,这些系统被广泛应用于神经生物学、癌症、血管生物学、生殖发育、免疫生物学等各领域研究[11-12]。

2 scRNA-seq 的基本流程

随着测序技术的不断发展,scRNA-seq 种类日趋多样,但 scRNA-seq 基本都包括五个步骤:(1)单细胞或单核样品制备;(2)逆转录;(3)cDNA 扩增;(4)测序;(5)数据分析。

2.1 单细胞或单核样品制备

单细胞分离是从单个细胞中获取转录组信息的第一步,通常先利用物理分离和酶解的组合方式获得细胞悬液,再根据细胞大小、细胞活力以及其

他特性分离单细胞。目前最常见的单细胞分离策略包括:极限稀释法、显微操作法、荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorting,FACS)、激光捕获显微切割(laser capture microdissection,LCM)、微流控和微滴[11-13]。

2.2 逆转录

逆转录是将单细胞 RNA 转化为 cDNA 的过程,是确保 scRNA-seq 灵敏度和提高测序准确度的重要步骤[11]。

2.3 cDNA 扩增

将单链 cDNA 利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)或体外转录(*in vitro* transcription,IVT)进行扩增的过程[13]。

2.4 测序

生成的单细胞条形码 cDNA 可以使用多种深度测序平台进行测序分析,目前已经开发出十余种测序技术,根据细胞特性和试验需求选择适合的测序技术有利于获得有效的数据和实现个性化分析[11-12]。

2.5 数据分析

scRNA-seq 数据的分析是呈现测序结果的关键步骤,scRNA-seq 数据分析主要包括数据预处理、一般性分析和探索性分析[14]。

3 scRNA-seq 在神经退行性疾病上的应用

3.1 scRNA-seq 在 AD 上的应用

AD 是最常见的神经退行性疾病,也是导致痴呆的主要原因,AD 患者通常出现记忆力下降、语言功能缺陷、运动和认知功能障碍等病症,这些病症主要是由病变神经元的不断累积所导致,其中包括细胞外 β 淀粉样蛋白斑块沉积和细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化而形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangle,NFT)[15-18]。小胶质细胞的状态与 AD 的进展密不可分,Keren-Shaul 等[19]利用 scRNA-seq 技术鉴定出一类新的与 AD 相关的小胶质细胞,这种激活的小胶质细胞能够有效吞噬 β 淀粉样蛋白沉积。Sierksma 等[20]也发现 AD 小鼠小胶质细胞激活数量显著增加,同时发现 β 淀粉样蛋白沉积将导致 AD 风险基因表达上调,证实 AD 遗传风险基因位于 β 淀粉样蛋白途径下游。小胶质细胞 TAM 受体酪氨酸激酶被证实与 AD 相关,Huang 等[21]发现 TAM 缺陷小鼠比正常 AD 小鼠出现更少的 β 淀粉样蛋白斑块,表明 TAM 受体是小胶质细胞识别和吞噬淀粉样斑块的重要介质,TAM 表达将促进 β 淀粉样蛋白斑块的形成。小胶质细胞免疫受体 TREM2 变异将增加 AD 风险,Zhou 等[22]通过单核转录组测序技术发现 AD 小鼠和 AD 人类的转录组特征存在差异,并发现 TREM2 R47H 和 R62H 携带者小胶质细胞反应性表型比非携带者更少,表明小鼠和人类的 AD 疾病都与 TREM2 密切相关,但同时也存在物种差异性。载脂蛋白 E(apolipoprotein E,APOE)是影响 AD 的另一遗传因素,Fitz 等[23]向 $Cx3cr1^{GFP}$ 小鼠注射 AβE3 或 AβE4,结果发现与注射 AβE4 相比,AβE3 注射小鼠的小胶质细胞的转录谱含有更丰富的天然免疫反应相关基因,说明 APOE3 脂蛋白能够诱导小胶质细胞更迅速地吞噬 β 淀粉样蛋白,以改善对认知功能的影响。上述研究提示单细胞转录组研究对小胶质细胞具有更敏感的分析,这为 AD 中小胶质细胞的异质性提供了新的认识,有利于进一步揭示小胶质细胞在 AD 中的重要作用。

除了小胶质细胞与 AD 进展密切相关外,其他多种细胞转录组变化也深刻影响着 AD 的进程,Habib 等[24]从 AD 小鼠海马体中鉴定出一类疾病相关星形胶质细胞(disease associated astrocytes,DAA),这类 DAA 出现于 AD 发病早期,主要与 β 淀粉样蛋白斑块相邻,其激活数量随着年龄增长而增加,因此抑制 DAA 的活性可能是治疗 AD 的新的治疗手段。AD 的发生还与海马区葡萄糖代谢异常有关,Choi 等[25]发现 AD 小鼠海马区小胶质细胞葡萄糖转运、糖酵解、氧化磷酸化等代谢途径与正常小鼠相比表达下调,代谢异常是小胶质细胞发生炎症的关键变化,而小胶质细胞炎症被认为是 AD 进展的重要病理生理学表现,因此改善 AD 患者海马区葡萄糖代谢成为治疗 AD 新方法。APOE4 是 AD 遗传风险因素,Blanchard 等[26]分别对 APOE4 携带者和正常人的脑组织进行 scRNA-seq 分析,结果发现携带 APOE4 会破坏胆固醇稳态,胆固醇异常沉积会阻碍神经元髓鞘形成,研究提示促进胆固醇转运可以增加轴突髓鞘形成,进而达到改善 APOE4 小鼠学习和记忆能力的目的。Wang 等[27]发现线粒体富集基因在 AD 患者大脑皮层兴奋性神经元、抑制性神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞、内皮细胞等细胞中表达上调,表明 AD 患者大脑线粒体功能出现障碍,揭示细胞能量代谢异常可能是影响 AD 进展的重要原因。上述研究利用 scRNA-seq 技术对 AD 患者的多种类型的单细胞进行了多维度的检测,发现

AD 与葡萄糖代谢、神经元髓鞘形成、线粒体功能障碍等存在密切联系,这些发现为深入探究 AD 的发病机制和探索新的治疗方案提供了思路。

3.2 scRNA-seq 在 PD 上的应用

PD 是第二常见的神经退行性疾病,PD 患者主要出现运动迟缓、肌肉僵硬、静止性震颤和姿势不稳等运动症状和认知障碍、感觉异常、焦虑、抑郁等非运动症状,PD 的病理特征主要包括黑质致密部(substantia nigra pars compacta,SNpc)多巴胺能神经元早期死亡造成纹状体多巴胺水平下降,以及神经元核内 α-突触核蛋白(α-synuclein,α-SYN)错误折叠和聚集形成路易体[28-30]。多巴胺能神经元主要存在于中脑腹侧被盖区(ventral tegmental area,VTA)和 SNpc,而 PD 患者的病理特征包括 VTA 退化和 SNpc 神经元失活,La Manno 等[31]发现人类和小鼠中脑腹侧发育过程中非神经细胞(内皮细胞、周细胞、小胶质细胞、红核等)和神经细胞(神经母细胞、多巴胺能神经元前体细胞)的总细胞类型高度保守,但在细胞增殖、发育时间轴和多巴胺能神经元发育方面又存在显著差异。*Pitx*3 是多巴胺能神经元的标志性基因,Tiklová 等[32]发现表达 *Pitx*3 的神经元发育成 7 种神经元亚型,其中包括 5 种多巴胺能神经元、1 种谷氨酸能神经元和 1 种 γ-氨基丁酸能神经元,这为阐明哺乳动物多巴胺能神经元亚群的发育和功能研究提供了启示。在另一项研究中,Agarwal 等[33]发现 PD 的遗传风险与多巴胺能神经元基因特异性表达密切相关,这些基因主要涉及线粒体功能、蛋白质折叠和泛素化等生物学过程,作者还发现 PD 与小胶质细胞关联并不紧密。Badanjak 等[34]发现炎症相关因子 IL10 与 IL1β 在特发性 PD 患者的小胶质细胞中表达上调,证实小胶质细胞在特发性 PD 的神经炎症过程中发挥重要作用,这与 Agarwal 发现的小胶质细胞不参与 PD 炎症过程存在差异,需要后续的相关研究进一步证实小胶质细胞在 PD 上发挥的作用[33]。

iPSC 诱导分化的神经元被应用于 PD 的治疗研究,Fernandes 等[35]鉴定出人 iPSC 分化的多巴胺神经元主要由 2 种祖细胞和 4 种多巴胺神经元组成,不同的细胞类型对毒性和遗传应激源表现出不同的敏感性和不同的转录特征,这为细胞替代疗法提供指导。*PINK*1 基因与 PD 密切相关,Novak 等[36]以携带 *PINK*1 基因的人类 iPSC 分化而来的多巴胺能神经元细胞为试验目标,利用 scRNA-seq 技术对 PINK1-ILE368ASN 细胞系进行测序分析,结果发现多巴胺能神经元在分化过程中存在大量差异表达基因(differential expressed genes,DEGs),这些基因形成了包括泛素化、蛋白质加工、RNA 代谢、囊泡转运等通路的核心网络,这在一定程度上解释了 PD 表型的异质性。上述研究利用 scRNA-seq 技术,从 SNpc、VTA、多巴胺能神经元等时空发育来揭示 PD 的疾病机制,同时还对 iPSC 衍生神经元治疗 PD 进行了深入研究,为将来的相关临床治疗提供了基础研究。

3.3 scRNA-seq 在 ALS 上的应用

ALS 又被称为运动神经元病,是一种复杂而又常见的多病因神经退行性疾病,以运动皮质的上运动神经元以及脑干和脊髓的下运动神经元的选择性丢失为主要特征[37]。ALS 的全球发病率约为 0.006%,患者表现为神经肌肉系统持续性退化,多数患者在发病 3 至 5 年后死于呼吸衰竭,目前还未发现治愈 ALS 的疗法[38]。超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1,SOD1)是第一个被证实与 ALS 相关的基因,*SOD*1 基因表达异常会导致 ALS,Liu 等[39]对 $SOD1^{G93A}$ 小鼠脑干中的 3199 个细胞进行 scRNA-seq 测序分析,结果发现 ALS 小鼠脑干中大多数细胞的转录组数据发生改变,其中 DEGs 主要涉及神经形成、应激反应、炎症、突触传递以及线粒体功能等生物学通路,揭示脑干基因表达异常是 ALS 发病的重要诱因。Mifflin 等[40]从 $SOD1^{G93A}$ 小鼠中鉴定出一类依赖受体相互作用蛋白激酶 1(receptor-interacting protein kinase 1,RIPK1)调节炎症的小胶质细胞亚型,抑制 *RIPK*1 的表达成为治疗 ALS 的潜在方案。在另一项研究中,Humphrey 等[41]发现 ALS 患者脊髓样本中小胶质细胞和星形胶质细胞的标记基因都表达上调,证实这两类细胞在 ALS 发病过程中将被大量激活。利用 iPSC 分化成运动神经元是治疗 ALS 的另一可能方案,Namboori 等[42]鉴定出 SOD-ALS-iPSC 来源运动神经元中神经变性的关键驱动因子是 Smad2,而 Smad2 是转化生长因子 β(transforming growth factor β,TGF-β)信号通路的下游基因,提示了 TGF-β 信号通路是 ALS 神经元病变的重要媒介。但是,iPSC 治疗过程中遗传变异引起的细胞异质性是临床应用的巨大障碍,Ho 等[43]发现家族性 ALS 和散发性 ALS 的 iPSC 诱导治疗神经元的早期发育具有共同特征,揭示相关转录组学活动发生在治疗早期并可能导

致后续的表型差异,这为明确治疗时间节点提供了参考。

3.4 scRNA-seq 在 MS 上的应用

MS 是一种影响中枢神经系统的慢性自身免疫性、炎症性和神经退行性疾病,其已成为全球范围内青少年非创伤性神经功能障碍的主要原因[44-45]。MS 患者会产生持续性的脱髓鞘和轴突变性,Absinta 等[46]发现脱髓鞘白质病变边缘的免疫细胞呈多样性表达,MS 患者小胶质细胞(microglia inflamed in MS,MIMS)的转录谱与其他神经退行性疾病中小胶质细胞的转录谱相似,说明小胶质细胞的激活是原发性和继发性神经退行性的共同特征,其中补体 C1q 是 MIMS 激活的关键媒介,抑制 C1q 的表达是解决慢性白质炎症的潜在方案。少突胶质细胞在形成髓鞘中必不可少,Jäkel 等[47]对 MS 患者和正常人的大脑白质进行 scRNA-seq 测序分析,结果作者在正常人的白质中发现了特异性少突胶质细胞亚群,这些亚型在 MS 患者相应组织表达不足,说明少突胶质细胞的异质性是 MS 发病的重要诱因。除小胶质细胞和少突胶质细胞会对 MS 的致病机制产生重要调控外,有研究表明巨噬细胞也会发挥重要作用,Miedema 等[48]发现 MS 患者正常表现白质(normal appearing white matter,NAWM)的巨噬细胞标记基因表达强烈,说明 NAWM 区域巨噬细胞的变化可能影响 MS 病程的进展。

脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)具有保护中枢神经系统的作用,分析 CSF 的变化有助于诊断 MS,Schafflick 等[49]发现 MS 患者 CSF 中细胞类型多样性增加,细胞毒性 $CD4^+$T 辅助细胞增多,并且发现 CSF 中 T 细胞和 B 细胞之间存在局部相互作用,这提示免疫细胞参与了 MS 发病过程。另一项研究发现 MS 患者 CSF 中 $CD14^+$和 $CD16^+$细胞的激活标志物(CD86、CD40)和抗炎细胞因子 IL10 的表达均显著上调,而 $CD14^+$和 $CD16^+$已被证实与多种自身免疫性疾病有关,这两类细胞表达增加会破坏血脑屏障,说明脑脊液微环境的改变是 MS 发病的另一诱因[50]。综合上述研究,我们发现小胶质细胞、少突胶质细胞和巨噬细胞的状态在 MS 发病过程中发生变化,CSF 发生异常,使针对这些变化探究新的治疗手段成为可能。

3.5 scRNA-seq 在 HD 上的应用

HD 是一种常见的显性遗传神经退行性疾病,由位于常染色体 4p16.3 上的亨廷顿(huntingtin,Htt)基因内的胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)三核苷酸重复扩增导致 Htt 蛋白突变,进而致使海马、皮质、纹状体和丘脑等部位神经元病变所引起的[51-52]。突变的 Htt 蛋白导致神经元死亡的机制尚未明确,Lee 等[53]发现 HD 患者纹状体棘突投射神经元中的线粒体 RNA(mitochondrial RNA,mtRNA)释放增加,释放的 mtRNA 直接与先天性免疫因子传感器蛋白激酶 R(protein kinases R,PKR)结合以激活先天性免疫通路,进而增加 HD 患者神经元脆弱性,导致纹状体神经元死亡加剧。Htt CAG 敲入小鼠模型表现出与人类 HD 相似的行为障碍,HD 小鼠 scRNA-seq 测序表明 *Cbx*4、*Tcf*7、*Cap*1 和 *Tmc*3 等基因在纹状体各细胞中均高度表达,这些基因主要与运动行为和学习记忆相关[54]。另一项研究发现扣带皮层中星胶质细胞的变化也与 HD 密切相关,Al-Dalahmah 等[55]发现 HD 患者扣带皮层中星胶质细胞中金属硫蛋白基因、热休克蛋白基因和胶质纤维状酸性蛋白基因显著上调,同时发现参与谷氨酸、γ-氨基丁酸、神经肽 Y 通路的相关基因表达下调,提示星形胶质细胞基因表达异常会改变扣带皮层的稳态,并导致神经元功能障碍,这有利于进一步探究 HD 的发病机制,为 HD 的治疗提供新的思路。

4 小结与展望

scRNA-seq 技术的问世促进了各项生物医学的研究,使得人类可以从单细胞转录组水平探究疾病发生机制。综上所述,scRNA-seq 技术已经广泛应用于各种 NDs 研究,并发现:(1)小胶质细胞、星形胶质细胞、巨噬细胞和 $CD4^+$T 细胞等免疫细胞在 NDs 发病过程中多发挥重要作用;(2)NDs 发病过程通常涉及线粒体功能、蛋白质折叠、葡萄糖代谢、神经发育、应激反应、炎症和突触传递等生物学通路;(3)iPSC 诱导分化治疗有望成为治愈部分 NDs 的新方法。scRNA-seq 技术的引入让 NDs 的相关研究有了突破性进展,但是 NDs 的疾病进展可能涉及多种细胞的共同作用,因此探究细胞间相互作用有利于进一步深入探索 NDs 发病机制,同时 iPSC 诱导治疗过程中的细胞异质性严重阻碍着临床应用,这些问题亟待在后续的相关研究中解决。随着 scRNA-seq 技术的不断发展和研究的不断深入,相信人类未来能够实现对 NDs 的有效预防和治疗。

参考文献:

[1] Sender R, Milo R. The distribution of cellular turnover in the

human body [J]. Nat Med, 2021, 27(1): 45-48.
[2] Haque A, Engel J, Teichmann SA, et al. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications [J]. Genome Med, 2017, 9(1): 75.
[3] Mostafa HKK. Different cells of the human body: categories and morphological characters [J]. J Microsc Ultrastruct, 2021, 10(2): 40-46.
[4] Xiang Y, Wang QQ, Lan XQ, et al. Function and treatment strategies of β-hydroxybutyrate in aging [J]. Smart Materials in Medicine, 2023, 4: 160-172.
[5] Chehimi SN, Crist RC, Reiner BC. Unraveling psychiatric disorders through neural single-cell transcriptomics approaches [J]. Genes (Basel), 2023, 14(3): 771.
[6] Luo HM, Xu J, Huang DX, et al. Mitochondrial dysfunction of induced pluripotent stem cells-based neurodegenerative disease modeling and therapeutic strategy [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1030390.
[7] Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA [J]. Nature, 1977, 265(5596): 687-695.
[8] Athanasopoulou K, Boti MA, Adamopoulos PG, et al. Third-generation sequencing: the spearhead towards the radical transformation of modern genomics [J]. Life (Basel), 2021, 12(1): 30.
[9] Lin B, Hui J, Mao H. Nanopore technology and its applications in gene sequencing [J]. Biosensors (Basel), 2021, 11(7): 214.
[10] Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 377-382.
[11] Jovic D, Liang X, Zeng H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview [J]. Clin Transl Med, 2022, 12(3): e694.
[12] Li Q, Wang M, Zhang S, et al. Single-cell RNA sequencing in atherosclerosis: mechanism and precision medicine [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 977490.
[13] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines [J]. Exp Mol Med, 2018, 50(8): 1-14.
[14] Rossin EJ, Sobrin L, Kim LA. Single-cell RNA sequencing: an overview for the ophthalmologist [J]. Semin Ophthalmol, 2021, 36(4): 191-197.
[15] 崔雨沙, 路欣, 李峰. 疾病相关小胶质细胞在阿尔兹海默症发病中的作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 132-136.
[16] Graff-Radford J, Yong KXX, Apostolova LG, et al. New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers [J]. Lancet Neurol, 2021, 20(3): 222-234.
[17] Ahmadi A, Gispert JD, Navarro A, et al. Single-cell transcriptional changes in neurodegenerative diseases [J]. Neuroscience, 2021, 479: 192-205.
[18] Wang BL, Wu JF, Xiao D, et al. 3-hydroxybutyrate in the brain: biosynthesis, function, and disease therapy [J]. Brain-X, 2023, 1(1): e6.
[19] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. Cell, 2017, 169(7): 1276-1290.
[20] Sierksma A, Lu A, Mancuso R, et al. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid-β but not to TAU pathology [J]. EMBO Mol Med, 2020, 12(3): e10606.
[21] Huang Y, Happonen KE, Burrola PG, et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques [J]. Nat Immunol, 2021, 22(5): 586-594.
[22] Zhou Y, Song WM, Andhey PS, et al. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 2020, 26(1): 131-142.
[23] Fitz NF, Nam KN, Wolfe CM, et al. Phospholipids of APOE lipoproteins activate microglia in an isoform-specific manner in preclinical models of Alzheimer's disease [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3416.
[24] Habib N, McCabe C, Medina S, et al. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging [J]. Nat Neurosci, 2020, 23(6): 701-706.
[25] Choi H, Choi Y, Lee EJ, et al. Hippocampal glucose uptake as a surrogate of metabolic change of microglia in Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 190.
[26] Blanchard JW, Akay LA, Davila-Velderrain J, et al. APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes [J]. Nature, 2022, 611(7937): 769-779.
[27] Wang XL, Li L. Cell type-specific potential pathogenic genes and functional pathways in Alzheimer's disease [J]. BMC Neurol, 2021, 21(1): 381.
[28] 杨东明, 杨利峰, 赵德明, 等. 帕金森病动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 397-404.
[29] Chia SJ, Tan EK, Chao YX. Historical perspective: models of Parkinson's disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2464.
[30] Dinter E, Saridaki T, Diederichs L, et al. Parkinson's disease and translational research [J]. Transl Neurodegener, 2020, 9(1): 43.
[31] La Manno G, Gyllborg D, Codeluppi S, et al. Molecular diversity of midbrain development in mouse, human, and stem cells [J]. Cell, 2016, 167(2): 566-580, e19.
[32] Tiklová K, Björklund ÅK, Lahti L, et al. Single-cell RNA sequencing reveals midbrain dopamine neuron diversity emerging during mouse brain development [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 581.
[33] Agarwal D, Sandor C, Volpato V, et al. A single-cell atlas of the human substantia nigra reveals cell-specific pathways associated with neurological disorders [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4183.
[34] Badanjak K, Mulica P, Smajic S, et al. iPSC-derived microglia as a model to study inflammation in idiopathic Parkinson's disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 740758.

[35] Fernandes HJR, Patikas N, Foskolou S, et al. Single-cell transcriptomics of Parkinson's disease human *in vitro* models reveals dopamine neuron-specific stress responses [J]. Cell Rep, 2020, 33(2): 108263.

[36] Novak G, Kyriakis D, Grzyb K, et al. Single-cell transcriptomics of human iPSC differentiation dynamics reveal a core molecular network of Parkinson's disease [J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 49.

[37] Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation [J]. Nat Rev Drug Discov, 2023, 22(3): 185-212.

[38] Zhao J, Wang X, Huo Z, et al. The impact of mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Cells, 2022, 11(13): 2049.

[39] Liu W, Venugopal S, Majid S, et al. Single-cell RNA-seq analysis of the brainstem of mutant SOD1 mice reveals perturbed cell types and pathways of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurobiol Dis, 2020, 141: 104877.

[40] Mifflin L, Hu Z, Dufort C, et al. A RIPK1-regulated inflammatory microglial state in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(13): e2025102118.

[41] Humphrey J, Venkatesh S, Hasan R, et al. Integrative transcriptomic analysis of the amyotrophic lateral sclerosis spinal cord implicates glial activation and suggests new risk genes [J]. Nat Neurosci, 2023, 26(1): 150-162.

[42] Namboori SC, Thomas P, Ames R, et al. Single-cell transcriptomics identifies master regulators of neurodegeneration in SOD1 ALS iPSC-derived motor neurons [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(12): 3020-3035.

[43] Ho R, Workman MJ, Mathkar P, et al. Cross-comparison of human iPSC motor neuron models of familial and sporadic ALS reveals early and convergent transcriptomic disease signatures [J]. Cell Syst, 2021, 12(2): 159-175, e9.

[44] Wang H. microRNAs, multiple sclerosis, and depression [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7802.

[45] Stoiloudis P, Kesidou E, Bakirtzis C, et al. The role of diet and interventions on multiple sclerosis: a review [J]. Nutrients, 2022, 14(6): 1150.

[46] Absinta M, Maric D, Gharagozloo M, et al. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis [J]. Nature, 2021, 597(7878): 709-714.

[47] Jäkel S, Agirre E, Mendanha Falcão A, et al. Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis [J]. Nature, 2019, 566(7745): 543-547.

[48] Miedema A, Gerrits E, Brouwer N, et al. Brain macrophages acquire distinct transcriptomes in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter [J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1): 8.

[49] Schafflick D, Xu CA, Hartlehnert M, et al. Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 247.

[50] Straeten F, Zhu J, Börsch AL, et al. Integrated single-cell transcriptomics of cerebrospinal fluid cells in treatment-naïve multiple sclerosis [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 306.

[51] Kim A, Lalonde K, Truesdell A, et al. New avenues for the treatment of Huntington's disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(16): 8363.

[52] Kumar A, Kumar V, Singh K, et al. Therapeutic advances for Huntington's disease [J]. Brain Sci, 2020, 10(1): 43.

[53] Lee H, Fenster RJ, Pineda SS, et al. Cell type-specific transcriptomics reveals that mutant huntingtin leads to mitochondrial RNA release and neuronal innate immune activation [J]. Neuron, 2020, 107(5): 891-908, e8.

[54] Huang L, Fang L, Liu Q, et al. Integrated analysis on transcriptome and behaviors defines HTT repeat-dependent network modules in Huntington's disease [J]. Genes Dis, 2021, 9(2): 479-493.

[55] Al-Dalahmah O, Sosunov AA, Shaik A, et al. Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 19.

〔收稿日期〕2023-03-15

王佳林,王重阳,李杨,等. 饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 93-96.
Wang JL, Wang CY, Li Y, et al. Advances in animal models of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 93-96.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.014

饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展

王佳林,王重阳,李 杨,陈贤玮,袁中楠,邹朝霞*,邹臣丹*
(哈尔滨医科大学,哈尔滨 150081)

【摘要】 建立科学有效的动物模型是完成疾病研究的关键步骤。饮食诱导是常见的建立非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)疾病动物模型的方法。常见饮食诱导 NAFLD 的动物模型主要包括高脂高糖饮食诱导模型、高脂高胆固醇饮食诱导模型和胆碱缺乏饮食诱导模型,由于不同造模方式摄入的营养成分不同,使得肝出现脂肪性变形、炎症及纤维化等病理特征不同。此外,不同动物模型的疾病进程、疾病严重程度以及适用的研究亦各有不同。本文通过分析比较常见的不同饮食诱导 NAFLD 动物模型在造模方式、造模时间、病理学特征、适用研究及相关优缺点,为 NAFLD 研究者选择动物模型提供参考。

【关键词】 非酒精性脂肪性肝病;啮齿类动物;动物模型
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2023)12-0093-04

Advances in animal models of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease

WANG Jialin, WANG Chongyang, LI Yang, CHEN Xianwei, YUAN Zhongnan, ZOU Chaoxia*, ZOU Chendan*
(Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

【Abstract】 The establishment of effective animal models is crucial for disease research. Dietary induction is a common method to establish animal models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). The common animal models of diet-induced NAFLD mainly include high fat and sugar, high fat and cholesterol, and choline-deficient diet-induced models. Because of the various nutrients ingested in different modeling method, pathological characteristics of the liver, such as fatty deformation, inflammation, and fibrosis, are different. Additionally, animal models vary in terms of disease progression, disease severity, and applicable studies. This study analyzed and compared the common animal models of NAFLD induced by various diets in terms of modeling method, modeling time, pathological characteristics, applicable research, and related advantages and disadvantages to provide a reference for NAFLD researchers to select animal models.

【Keywords】 non-alcoholic fatty liver disease; rodents; animal model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种连续进展、病程多变的疾病[1]。NAFLD 早期以非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)为主,若不加以有效干预,随着病程进程,可加重进展为肝纤维化、肝硬化甚至出现肝细胞癌[2]。NAFLD 的发生与多种因素密切相关,如肥胖、细胞凋亡、代谢综合征等均可能引起疾病发生。此外,免疫、肠道细菌和表观遗

[基金项目]国家自然科学基金青年科学基金(81900553)。
[作者简介]王佳林(1997—),女,硕士研究生,研究方向:非酒精性脂肪性肝病与不同的造模方式的研究。E-mail:wccghjun@163.com
[通信作者]邹臣丹(1987—),女,博士,讲师,硕士生导师,研究方向:转录后调控在肝疾病发生发展中的功能及机制研究。
E-mail:zouchendan1114@126.com
邹朝霞(1978—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:恶性肿瘤发生发展分子机制的研究。
E-mail:Zouchaoxia006@126.com
*共同通信作者

传改变也都是引起 NAFLD 发生的重要因素[3]。

NAFLD 一直是科学家关注的热点研究领域,但关于 NAFLD 的发病机制和药物开发的研究仍然充满巨大的挑战。目前尚无能够全面模拟人 NAFLD 的发病机制、多阶段疾病进展和全部病理生理指标的 NAFLD 动物模型[4]。肥胖、糖尿病、血脂异常及胰岛素抵抗等因素与人类 NAFLD 发生密切相关,现有的 NAFLD 模型多通过不同方式对营养摄入进行干预,在啮齿类动物中重现上述部分病理指标,以模拟 NAFLD 病理状态。但由于造模原理和方式不尽相同,导致不同模型表现出疾病进展阶段和病理生理指标并不一致。因此,其疾病相关的分子表达与调控机制也可能不同,利用不同动物模型所开展的研究可能会影响对研究结果的判断,因此开展 NAFLD 疾病动物模型评价与分析对 NAFLD 研究具有重要意义。

常见的 NAFLD 动物模型主要是高脂高糖饮食诱导模型、高脂高胆固醇饮食诱导模型以及蛋氨酸、胆碱缺乏饮食诱导模型等。本文对目前主流的饮食诱导 NAFLD 动物模型造模方法进行比较分析,以期为研究人员选择动物模型提供参考。

1 高脂高糖饮食诱导模型

1.1 反式脂肪联合果糖诱导 C57BL/6 小鼠建模

该模型又被称为美国生活方式诱导肥胖综合征(American lifestyle-induced obesity syndrome, ALIOS)模型。果糖会导致肥胖,而反式脂肪(部分氢化植物油)的摄入则会导致肝脂肪变性和肝损伤[5]。果糖是在肝葡萄糖的摄取和糖原合成过程中起调节作用的调节因子,它会干扰葡萄糖的代谢过程,过量的果糖水平会导致甘油三酯水平的升高,肝中脂肪的升高影响了糖原异生,从而引起了脂肪的变性[6-7]。

研究人员将 5~6 周龄 C57BL/6 雄鼠给予 45%高脂饲料(反式脂肪)和 4.2%果糖果冻喂食 16 周,果糖水可以增强食欲,提高进食量,加剧胰岛素抵抗。实验组的体重增长很快,到第 1 周时,ALIOS 小鼠的体重已比对照组小鼠增加 4.3%。到 8 周时,ALIOS 小鼠的体重增长开始放缓,随后的体重增长与对照组小鼠平行。16 周时,ALIOS 小鼠的体重比对照组小鼠重 42%,与 ALIOS 小鼠相比,高脂肪饮食中不含反式脂肪并没有显著体重增加。葡萄糖耐量在 2 周内降低,4 周时空腹血糖显著升高,8 周时胰岛素抵抗明显,16 周时,观察大多数肝细胞出现了脂肪空泡、小叶炎症等 NASH 早期病理特征,但没有出现纤维化[5]。

高脂高糖饮食诱导的小鼠 NASH 表现为肥胖、体重增加,伴有胰岛素抵抗。与人类饮食诱导的 NASH 模型类似,并且肝脂肪变性明显。一项研究发现反式脂肪诱导大鼠第三区肝脂肪变性,但是没有明显的纤维化,且造模时间相对较短[8]。该模型被认为是早期的 NAFLD 疾病研究的理想模型,但是在研究中晚期的 NAFLD 变化时,并非首选。

1.2 中链反式脂肪联合果糖诱导 C57BL/6 小鼠建模

研究人员将 6~8 周龄 C57BL/6 雄鼠给予 58%高脂饲料(氢化椰子油,一种中链反式脂肪)和 4.2%高果糖水喂食 16 周。12 周时空腹血糖和胰岛素显著升高,伴有胰岛素抵抗。在 16 周时,肝细胞可见微泡和大泡脂肪变性、炎症和细胞凋亡明显增多。50%的小鼠可见明显的纤维化[9]。虽然高脂饮食会产生代谢综合征等一系列症状,但是果糖的摄入可能是将单纯的肝脂质沉积转移为纤维化的必要条件,另外果糖的摄入形式也影响着纤维化的形成[9]。该模型出现了 NAFLD 中的肝脂肪变性、炎症、肝纤维化等一系列病理变化,可以作为研究 NAFLD 不同病理阶段及疾病进展的有力工具。

2 高脂高胆固醇饮食诱导模型

2.1 60%高脂(60% high Fat,HF60)联合 2.5%胆固醇诱导 C57BL/6 小鼠建模

营养过剩和久坐不动是 NASH 发生发展的重要因素,它可以引起体重的增加,进而导致肥胖[10]。高脂饮食诱导模型可以引起肥胖、胰岛素抵抗和肝细胞损伤[11]。大量研究证明,饮食中的胆固醇与非酒精性脂肪性肝炎发生发展密切相关[12-13],并且胆固醇已被证明通过多种病理机制参与 NASH 发展进程[14]。而且,研究已经证明在肥胖糖尿病小鼠和患者中肝游离的胆固醇累积,降低胆固醇水平的药物可以缓解伴有代谢综合征的小鼠肥胖和糖尿病症状[15-17]。

研究人员将 C57BL/6 雄鼠给予 HF60 鼠粮、2.5%胆固醇喂食 12 周,出现了肝脂肪变性、炎症和明显的纤维化[18]。高脂高胆固醇饮食诱导模型造模周期相对较短,可以作为短期内研究 NAFLD 病理变化和机制的首选模型。

2.2 高脂高胆固醇(high-fat/high-cholesterol, HFHC)诱导 ApoE 敲除小鼠建模

喂食西方饮食的 ApoE 敲除小鼠已经被广泛用做啮齿动物动脉粥样硬化模型[19]。许多研究表明,ApoE 敲除的小鼠在适当的代谢环境下可能发展出人类 NASH 特征的全谱肝病理[20-21]。

研究人员将 ApoE 敲除雄鼠给予 HFHC 喂食 12 周,小鼠模型出现典型的 NASH 病理特征,出现脂肪变性、炎细胞浸润,但是肝细胞纤维化不明显,伴随肥胖及相关代谢综合征的发展,包括体重增加、糖耐量受损和动脉粥样硬化。该模型显示了与人类 NASH 相似的肝表型,包括肝脂肪变性、氧化应激、促炎细胞因子产生增加和血清丙氨酸氨基转移酶(alanine amino transferase, ALT)水平升高。此外,这些肝症状与人类代谢综合征相似,包括肥胖、高胰岛素血症、葡萄糖不耐受和血脂异常[22]。因此,由 HFHC 饲料喂食的 ApoE 敲除小鼠适合作为研究肥胖和代谢综合征背景下单纯性脂肪变性向 NASH 的进展的动物模型。

3 胆碱缺乏饮食诱导模型

3.1 胆碱缺乏氨基酸饮食(choline deficient diet, CDAA)诱导 C57BL/6 小鼠建模

胆碱缺乏饮食诱导模型是研究 NASH 的经典模型。胆碱是磷脂酰胆碱的前体物质。胆碱缺乏导致肝不能以极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的形式转运甘油三酯,导致甘油三酯在肝中迅速堆积,引起肝脂肪变性[23]。将 8 周龄的 C57BL/6 雄鼠给予 CDAA 鼠粮喂食 22 周,除了产生脂肪性炎症,CDAA 诱导产生了体重增加、胰岛素抵抗、炎细胞浸润及纤维化,这些表现与人类 NASH 病理过程一致[24]。虽然此模型产生的病理变化与人类 NASH 类似,但是它造模周期较长,且没有同时出现肥胖、高血糖症和高甘油三酯血症等代谢综合征的特点,尚需进行进一步优化,以建立全面模拟人类 NASH 病理特征的动物模型。

3.2 蛋氨酸和胆碱缺乏饮食(methionine and choline deficient diet, MCDA)模型

MCD 是 NAFLD 研究中最常用饮食之一,它可以在最短时间内产生最严重的 NASH 表型。这种高蔗糖(40%)和高脂肪(10%)但缺乏蛋氨酸和胆碱的饮食可以在 2~4 周内迅速诱导小鼠和大鼠出现可测量的 NAFLD 特征,如肝脂肪变性(主要是大泡性),并在此后不久发展为炎症和纤维化[25-26]。此外,与其他饮食动物模型相比,MCD 饮食改变了葡萄糖代谢,但没有胰岛素抵抗,影响肝脂质代谢,导致脂肪酸摄取显著增加,VLDL 分泌减少,并诱导显著纤维化[27-29]。虽然 MCD 模型在相对较短的时间内复制了人类 NASH 的组织学表型,但相关体重减轻和缺乏全身性胰岛素抵抗使其与人类 NAFLD 有很大不同。因此,MCD 模型的使用受到其与人类 NASH 代谢参数差异的限制。重要的是,该模型中差异表达基因与人类 NASH 之间的一致性较差。

研究人员将 8~10 周龄 db/db 雌鼠给予 MCD 饲料喂食 4 周,小鼠出现了体重、血清 TC 及 TG 降低,ALT 升高。病理结构类似于人类 NASH,保留部分胰岛素抵抗,体重轻微降低,部分弥补了 MCD 饲料诱导 C57BL/6 小鼠 NASH 模型的不足[29]。

4 总结和展望

随着生活水平的提高和饮食结构的改变,NAFLD 的患病率不断提高,若不加以有效干预,将严重影响国民身体健康,是亟需解决的临床问题[2]。影响 NAFLD 疾病发生、发展的因素包含有很多种,其中脂质代谢紊乱引起肝脂沉积是 NAFLD 发生的关键环节,通过饮食诱导的方法建立理想的 NAFLD 研究动物模型以模仿上述病理特征,为研究疾病发病机制、疾病进展、生物标志物、治疗靶点和临床试验设计提供重要支撑[30-31]。本文比较了多种饮食诱导的 NAFLD 模型,其中在高脂高糖饮食诱导模型中,如果糖以果冻的形式摄入,小鼠肝脂肪变性明显,但是没有出现明显的纤维化;而若果糖以碳水化合物的形式摄入,则小鼠肝发生脂肪变性、炎症和纤维化[18];在高脂高胆固醇饮食诱导模型中,小鼠出现 NAFLD 病理变化的周期变短,可以作为短期内研究 NAFLD 发病机制的重要选择,但纤维化不明显[22];而在胆碱缺乏饮食诱导模型中,虽然它的造模周期长,但该模型与人的 NAFLD 的病理生理特征极为相似[24]。针对 NAFLD 不同的病理阶段及研究目的,选择合适的动物模型对科学研究成果的完成至关重要。本文希望基于对以上动物模型的比较分析,为研究人员针对不同研究目的选择适合的动物模型提供参考。

参考文献:

[1] Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies

[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-922.
[2] 马晓月, 李钦钦, 陆华贞, 等. 非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 120-127.
[3] Kanda T, Goto T, Hirotsu Y, et al. Molecular mechanisms: connections between nonalcoholic fatty liver disease, steatohepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1525.
[4] Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell, 2021, 184(10): 2537-2564.
[5] Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295(5): G987-G995.
[6] Armutcu F, Coskun O, Gürel A, et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats[J]. Clin Biochem, 2005, 38(6): 540-547.
[7] Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice[J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1094-1104.
[8] Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types[J]. J Mol Endocrinol, 2006, 36(3): 485-501.
[9] Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2010, 52(3): 934-944.
[10] 蔡江帆, 陈民利. 非酒精性脂肪肝炎动物模型的研究概况[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 128-136.
[11] 王芃芃, 黄磊, 伍晓雄, 等. 高脂饮食对小鼠脂质代谢和 leptin 基因表达水平的影响[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 40-44.
[12] Van Rooyen DM, Gan LT, Yeh MM, et al. Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome[J]. J Hepatol, 2013, 59(1): 144-152.
[13] Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, et al. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice[J]. J Lipid Res, 2011, 52(9): 1626-1635.
[14] Marí M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis[J]. Cell Metab, 2006, 4(3): 185-198.
[15] Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, et al. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2011, 141(4): 1393-1403.
[16] Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, et al. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH[J]. J Hepatol, 2009, 50(4): 789-796.
[17] Min HK, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Cell Metab, 2012, 15(5): 665-674.
[18] Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, et al. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis[J]. Hepatology, 2013, 57(1): 81-92.
[19] Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(8): 1706-1721.
[20] Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(11): 1635-1648.
[21] Tous M, Ferré N, Camps J, et al. Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 268(1-2): 53-58.
[22] Ye D, Li FY, Lam KS, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice[J]. Gut, 2012, 61(7): 1058-1067.
[23] Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice[J]. Gastroenterology, 2010, 139(1): 323-334.
[24] Yang L, Miura K, Zhang B, et al. TRIF differentially regulates hepatic steatosis and inflammation/fibrosis in mice[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3(3): 469-483.
[25] Sahai A, Malladi P, Melin-Aldana H, et al. Upregulation of osteopontin expression is involved in the development of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287(1): G264-G273.
[26] Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation[J]. Gastroenterology, 1996, 111(6): 1645-1653.
[27] Machado MV, Michelotti GA, Xie G, et al. Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127991.
[28] Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance[J]. J Hepatol, 2004, 40(1): 47-51.
[29] Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, et al. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet[J]. J Lipid Res, 2008, 49(5): 1068-1076.
[30] Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1836-1846.
[31] 姜慧玲, 关桥伟, 龚林, 等. 微量元素锶改善大鼠非酒精性脂肪肝的机制研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 7-14.

〔收稿日期〕2023-09-18

李鑫,孙晓林,王永福. 自噬在系统性硬化症发病机制中作用的研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 97-103.
Li X, Sun XL, Wang YF. Research progress on the role of autophagy in the pathogenesis of systemic sclerosis［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 97-103.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.015

自噬在系统性硬化症发病机制中作用的研究进展

李　鑫[1],孙晓林[3*],王永福[2,3*]

(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风湿免疫科,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)

【摘要】 系统性硬化症(systemic sclerosis,SSc)是一种以血管病变、皮肤纤维化为特征,可引起多器官结构和功能损害的自身免疫性疾病,SSc 发病机制复杂,可能与遗传、环境因素、免疫机制异常等有关。自噬是一种在进化上保守的机体内自降解过程,可通过多种途径参与机体免疫及自身免疫性疾病发病。本文主要综述自噬通过调节免疫细胞、介导信号通路调控 SSc 血管病变和纤维化的研究进展。

【关键词】 自噬;系统性硬化症;血管病变;纤维化;信号通路
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0097-07

Research progress on the role of autophagy in the pathogenesis of systemic sclerosis

LI Xin[1], SUN Xiaolin[3*], WANG Yongfu[2,3*]

(1. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China. 2. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010. 3. 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)

【Abstract】 Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by vascular lesions and skin fibrosis, which causes structural and functional damage to multiple organs. The pathogenesis of SSc is complex and may be related to genetic and environmental factors as well as abnormal immune mechanisms. Autophagy is an evolutionarily conserved process of self-degradation in the body and participates in the pathogenesis of autoimmune diseases through various pathways. This article reviews the research progress on the role of autophagy in the angiopathy and fibrosis of SSc by regulating immune cells and mediating signaling pathways.

【Keywords】 autophagy; systemic sclerosis; angiopathy; fibrosis; signaling pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金(81860294);内蒙古自治区自然科学基金(2019MS08055,2021MS08045);内蒙古自治区科技计划项目(201802089,2019GG052)。
[作者简介]李鑫(1996—),女,硕士研究生,研究方向:风湿免疫学。E-mail:13347094639@163.com
[通信作者]王永福(1968—),男,博士,教授,研究方向:风湿免疫学。E-mail:wyf5168@hoTmail.com
孙晓林(1989—),女,博士,主管检验师,研究方向:风湿免疫学。E-mail:yolo_1010@126.com
* 共同通信作者

系统性硬化症(systemic Sclerosis,SSc)是一种以局限性或弥漫性皮肤纤维化、血管病变为特征,可累及内脏器官结构和功能的慢性结缔组织病[1],临床表现也繁杂多样,这使诊断及治疗变得更加困难。SSc 发病可能与多种因素有关,如遗传、环境因素、免疫机制异常等[2],但目前尚无明确机制可解释其发病。近些年关于自噬的研究十分广泛,自噬通过降解衰老的、有缺陷的细胞器、病毒和错误折叠的蛋白质维持细胞和组织的稳态平衡[3],也可通过调节体内免疫细胞产生促炎因子发挥致病作用。研究发现,细胞自噬参与多种疾病的发病,且自噬的过度激活可能与自身免疫性疾病的发病相关,如系统性红斑狼疮(systemic lupuserythematosus,SLE)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)、干燥综合征(sjogren's syndrome,SS)和系统性硬化症(systemic sclerosis,SSc)等[3-5],本文主要介绍自噬在 SSc 发病机制中的作用,望通过调节自噬为 SSc 的临床治疗提供靶点。

1 自噬

1.1 自噬的类型及发生过程

自噬是一种通过降解体内受损衰老的细胞器、蛋白质、入侵病原体等物质以维持机体稳态平衡的降解机制,依据其降解机制的不同分为三种类型:巨自噬、微自噬、分子伴侣介导的自噬[6],见图 1。巨自噬是一种进化上高度保守的细胞内降解过程,具有独特的双层膜样囊泡结构,这种结构通过包绕降解底物形成自噬小体,并与溶酶体结合为自噬溶酶体进行降解[7]。微自噬是由溶酶体或液泡膜直接内陷包绕底物进行降解;而分子伴侣介导的自噬则是通过分子伴侣将待降解成分运送至溶酶体,然后通过溶酶体膜上的特定受体蛋白进入溶酶体内进行降解,微自噬与分子伴侣介导的自噬均无自噬小体的参与[7]。无论是以上哪种自噬类型均在维持细胞稳态和机体健康的过程中发挥重要作用,目前研究最为广泛的是巨自噬,以下简称自噬。自噬过程可大致分为 3 个阶段:自噬起始、自噬体膜延伸、自噬溶酶体形成,需由多种自噬相关基因(autophagy related genes,Atg)介导完成[8-9]。Atg1/ULK1 激酶复合物是自噬启动必不可少的部分,在自噬体形成过程中发挥关键作用[10];Ⅲ类磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositide3-kinase,PI3K)复合物主要负责招募自噬蛋白,并参与吞噬囊泡的形

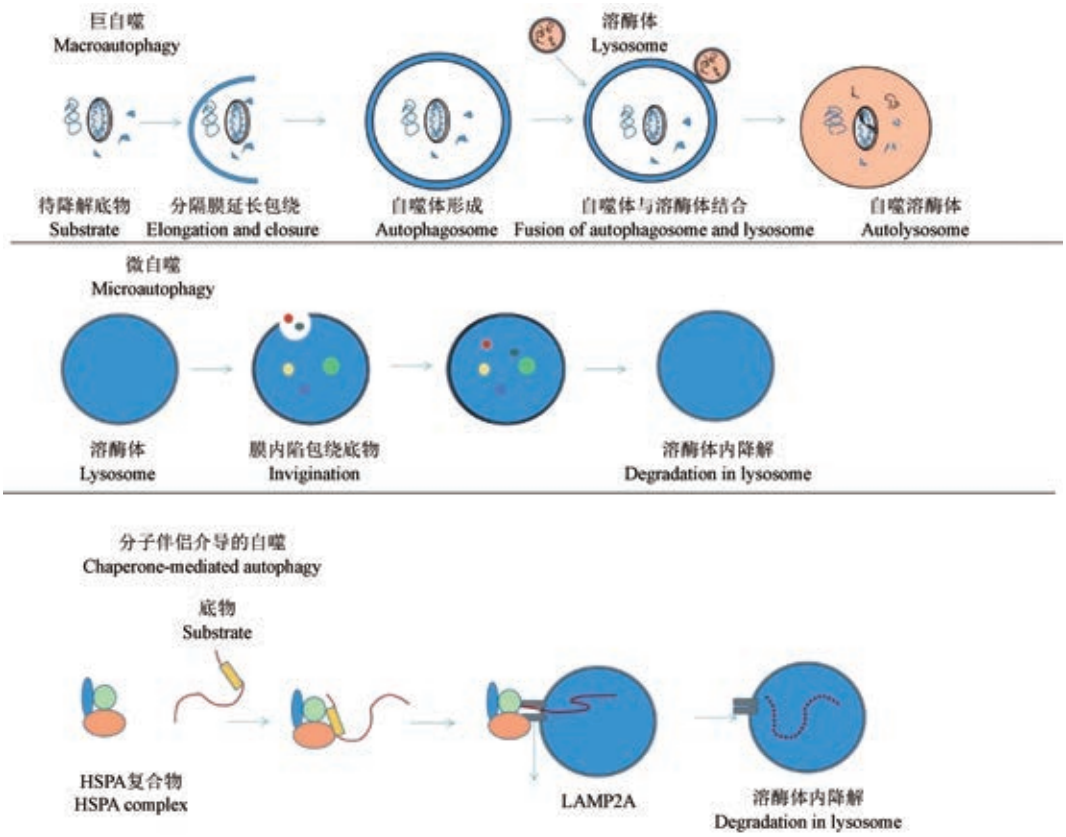


图 1 细胞自噬的三种类型

Figure 1 Three types of autophagy

成、成熟与运输[11]；两种泛素样结构参与吞噬囊泡膜的延伸及自噬体形成，即 Atg12-Atg5-Atg16 复合物和 Atg8/LC3 家族蛋白[12]。在多种 Atg 的共同作用下自噬体生成并与溶酶体融合，完成底物的最终降解[13]。

1.2 自噬受环境和信号通路的调节

自噬激活受环境因素的影响，如营养缺乏、生长因子的缺乏、缺氧等，且诱导的过程受不同的信号通路调控，如 PI3K-AKT-TSC1/2-RHEB-mTOR 途径、AMPK-TSC1/2-mTOR 途径[14-15]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）有 mTORC1 和 mTORC2 两种不同的亚型，其中 mTORC1 是负向调节自噬的关键分子[16]。在机体营养充足的条件下，mTORC1 通过介导 ULK1 磷酸化，导致 ULK1 失活，抑制 ULK1 复合物生成从而抑制自噬；当饥饿或营养缺乏时，mTORC1 失活并与 ULK1 解离，ULK1 去磷酸化以恢复 ULK1 复合物活性，启动自噬[15]。细胞内能量水平可通过 AMPK-TSC1/2-RHEB-mTOR 途径调节自噬，生长因子（如胰岛素等）则通过 PI3K-AKT-RHEB-mTOR 途径调节自噬[17]。结节性硬化症蛋白（tuberous sclerosis complex，TSC）1/2 复合物可通过负向调控小 Ras 相关 GTP 酶（Ras homolog enriched in brain，RHRB）从而间接抑制 mTOR 活性[17]；mTOR 也受到磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶（AMP-activated protein kinase，AMPK）调控，当机体受到刺激时，AMPK 被磷酸化激活并增强 TSC1/2 复合物介导的 mTORC1 抑制，从而增强自噬[18]。此外，AMPK 也可直接磷酸化 ULK1 的残基以激活自噬[15]。自噬激活过程中还有许多其他通路作用，包括但不仅限于钙离子通道、钾离子通道、钠离子通道等[19]。

2 自噬通过调节免疫细胞参与自身免疫性疾病发病

自身免疫性疾病多表现为机体免疫细胞的紊乱及功能障碍，在免疫细胞表达及发挥作用的过程中，自噬调节尤为重要，越来越多的研究表明自噬参与自身免疫性疾病的发病[14]。研究发现，在 SS 患者的小唾液腺中可观察到 T、B 淋巴细胞自噬的现象，且自噬水平与组织破坏的严重程度相关[20]；Colafrancesco 等[21]发现自噬能够促进 SS 患者唾液腺上皮细胞的存活和活化，并且抑制自噬可以有效地破坏这种作用并抑制上皮细胞炎症；Colasanti 等[22]在使用 B 细胞抑制剂治疗 SLE 后发现 SLE 患者体内自噬水平显著降低；Karabowicz 等[23]在银屑病患者的淋巴细胞中发现自噬通量的增加；Podestà 等[24]表示自噬缺陷可能会导致炎症因子生成增多，并减少凋亡细胞的清除，从而促进狼疮肾炎的发病。在 SSc 患者的皮肤、外周血等部位可发现大量的 T 细胞浸润[25-27]，还可观察到 TNF 配体家族 B 细胞激活剂（B-cell activating factor，BAFF）水平的升高[28]，此外，SSc 患者皮肤真皮层肥大细胞浸润及脱颗粒也十分明显[29]。以上研究表明自噬可能通过调节免疫细胞参与自身免疫性疾病的发病。

研究发现自噬在 T、B 淋巴细胞的发育、存活、分化、稳态、代谢、衰老等过程中起着重要作用[30-31]。溶酶体相关膜蛋白 2（lysosomal associated membrane protein 2，LAMP2）是自噬溶酶体成熟的关键介质，Rodrigues 等[32]发现 LAMP2 在皮质胸腺上皮细胞中高度表达，当 LAMP2 基因失活时会抑制 $CD4^+$T 细胞的发育成活。自噬缺陷型小鼠的外周 T 淋巴细胞无法有效地激活、增殖、产生抗体[33]。Atg3、Atg7 和 Atg5 缺乏的 T 淋巴细胞表现出存活率降低，并含有异常线粒体和内质网，自噬可能通过调节细胞器稳态促进 T 细胞存活[34-35]。Jang 等[36]发现，缺失 Ag7 会导致反应性记忆 B 细胞的显著损失，自身抗体产生减少。Pengo 等[37]在 Atg5 缺陷的浆细胞中观察到比正常浆细胞更大的内质网，这使免疫球蛋白表达更高，抗体分泌更多。

除淋巴细胞外，自噬还参与了巨噬细胞几乎所有的生物功能过程[38]。自噬激活可诱导单核细胞-巨噬细胞分化和巨噬细胞极化[38-40]，当自噬缺陷时单核细胞向巨噬细胞分化被阻断[41]。巨噬细胞可根据激活方式分为经典激活的 M1 型和替代激活的 M2 型，M1 型巨噬细胞通过分泌促炎因子参与炎症反应，但这种持续的促炎作用会导致组织损伤，这时 M2 型巨噬细胞会分泌白介素（interleukin，IL）10、转化生长因子（transforming growth factor-β，TGF-β）等抑制炎症，促进组织修复和重塑[42]。自噬激活可抑制 M1 型巨噬细胞增殖，促进 M2 型巨噬细胞极化，反之，自噬抑制可促进 M1 型巨噬细胞极化[39,43]。此外，在中性粒细胞的分化过程中需要自噬介导脂质降解产生游离脂肪酸，以支持其分化所需能量[44]；还有研究表明通过激活 PI3K/AKT 通路抑制自噬有助于肥大细胞激活及炎症介质的释放[45]。综上，自噬调节与机体免疫细胞表达和功能稳态关系密切，自噬功

能障碍可能是免疫细胞失调从而导致自身免疫性疾病发生的关键因素。

3 自噬与 SSc

3.1 自噬与 SSc 血管病变

SSc 主要有血管病变和皮肤纤维化两大特征,SSc 血管病变主要累及毛细血管和小血管,表现为雷诺综合征、外周血管病变、血管炎等[46]。组织长时间缺血、缺氧导致血管结构和功能损伤,并代偿性生成新血管[47],最终致使组织器官纤维化。研究发现,血管内皮细胞中适当的自噬水平可能是激活内皮细胞以修复血管损伤或恢复内皮细胞稳态的一种机制,但在长期营养缺乏、缺氧、缺血或氧化应激等条件下,过度自噬可能会损害内皮细胞功能,并导致内皮细胞死亡[48]。Zhao 等[49]建立了体外血管内皮细胞缺氧/复氧模型,在缺氧-复氧后发现细胞质内存在大量自噬体和自噬溶酶体,自噬通量的增加使内皮细胞损伤,由此可见血管内皮细胞中自噬水平的紊乱使血管发生病理性改变。

SSc 患者血管内皮细胞功能损伤与活性氧(reactive oxygen species,ROS)的过度产生有关[47],ROS 是氧化应激条件下诱导细胞自噬的主要物质,大量的 ROS 可通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活自噬[50]。有研究表明血流剪切应力是 ROS 产生的主要诱导因素,SSc 相关的血管病变可通过增加血流剪切应力刺激内皮细胞激活自噬[51],这种由血流剪切应力介导的自噬并不是通过经典的 mTOR 途径,而是与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD+)依赖性组蛋白去乙酰化酶 Sirtuin 家族中的 SIRT1 有关[52-53]。另外 Abdulle 等[54]研究提出血清中一氧化氮(nitric oxide,NO)在 SSc 中含量较低,且在血管病变中发挥重要作用,血液中 NO 参与调节血管张力、止血、血管重塑等,Bharath 等[55]发现血管内皮细胞中自噬功能障碍会抑制 ROS 的产生,同时抑制一氧化氮合成酶的生成,从而导致 NO 水平减低损伤血管。此外,血管内皮细胞相关黏附分子表达的改变会诱导炎症细胞浸润,这也是 SSc 血管病变的原因[47]。细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1,ICAM-1)表达增加可促进单核细胞迁移至血管内膜,Shadab 等[56]发现 Atg7 缺陷可显著抑制 ICAM-1 表达,从而减轻血管炎症。以上研究表明,内皮细胞中自噬水平过高或过低均有可能是导致血管损伤的原因。

细胞自噬不仅参与血管损伤,在新血管生成过程中也发挥重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是血管生成的重要刺激因子,VEGF 可通过刺激 AMPK 使 ULK1 磷酸化从而短暂的激活自噬[57],也可通过 PI3K/AKT/mTOR 途径启动自噬[58]。另外,环磷酸腺苷依赖性蛋白激酶 A(cyclic-AMP dependent protein kinase,PKA)是体内血管生成的关键调节剂,Zhao 等[59]发现 PKA 能够通过自噬相关基因 ATG16L1 磷酸化调节内皮细胞自噬,促进血管生成。SSc 血管病变是导致组织损伤纤维化的基础,调节自噬水平可能是预防 SSc 发病的新思路。

3.2 自噬与 SSc 纤维化

大部分 SSc 患者皮肤活检中可发现自噬体增加、自噬功能失调[4,37,60]。Mori 等[61]研究表明,在博莱霉素诱导的 SSc 模型小鼠皮肤组织中,细胞自噬的标志物(light chain 3,LC3)在水肿阶段与对照组无显著差异,但在硬化阶段却显著高于对照组,SSc 患者的皮肤组织中也观察到了 LC3 在硬化期较水肿期更显著。这些结果表明,SSc 患者体内自噬的异常激活与皮肤组织纤维化有关。

在 SSc 小鼠模型中,抑制 mTOR 信号通路可表现出显著抑制纤维化的作用[62]。Li 等[63]发现抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路可显著增强成纤维细胞中自噬通量,抑制成纤维细胞激活,从而发挥抗纤维化的作用,且抑制 mTOR 信号通路也可降低 SSc 患者的真皮细胞中缺氧诱导因子 1α、结缔组织生长因子及胶原蛋白的表达[64]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路还可通过调节 T 细胞生成、分化,在慢性炎症性疾病尤其是自身免疫性疾病中起关键作用[65-66]。一些 T 辅助细胞,如 Th17、Th2、Th9 通过分泌多种 IL-4、IL-13、IL-9、IL-17 等细胞因子在 SSc 中可发挥促纤维化作用[67],Th2 细胞不仅能够生成促炎、促纤维化因子,还可激活巨噬细胞从而发挥促炎、促纤维化作用[68-69]。此外,Forestier 等[70]在 SSc 患者外周血中发现,能够产生 IL-10 的 B 细胞中 mTOR 磷酸化显著受损。mTOR 通路的激活可抑制自噬,自噬水平的紊乱可能是 SSc 纤维化发生的重要原因。

TGF-β 是一种关键的促纤维化细胞因子,主要通过激活 Smad 途径传递信号。通过激活经典的 Smad3 途径可以诱导胶原蛋白产生,也可通过

Smad7 竞争性抑制 TGF-β-Smad 途径,促进 TGF-β 激活旁路[71-72]。细胞自噬与 TGF-β/Smad 信号通路相互调节,Pang 等[73]发现 TGF-β 可以激活细胞自噬,诱导内皮-间充质转换从而促进组织纤维化,Ghavami 等[74]研究也表明 TGF-β1 可以通过激活肺组织中成纤维细胞的细胞自噬,促进肺纤维化。反之干扰自噬的异常激活也可抑制 TGF-β 的促纤维化作用[59]。使用雷帕霉素诱导肝脂肪间充质干细胞自噬,可使 TGF-β1 和 Smad3 表达降低,Smad7 表达升高,TGF-β/Smad 信号传递减少[75]。此外,Pang 等[73]还在研究中发现,TGF-β1 诱导的细胞自噬将 β-catenin 和 Smad 信号通路联系起来,可通过一种新的 pY654-β-catenin/p-Smad2/ILK 通路促进上皮间充质转化。

SSc 纤维化与 JAK/ STAT3 信号通路相关,Pedroza 等[76]研究发现,在 SSc 患者的皮肤活检及 SSc 小鼠模型中观察到 STAT3 的表达增加,且通过选择性抑制 STAT3 可以改善纤维化。JAK/STAT3 信号通路在 SSc 伴肺间质病变中有参与炎症反应和促纤维化的作用[77]。自噬与 STAT3 信号通路之间的关系目前的观点尚不一致,在腹膜后纤维化小鼠模型中,抑制自噬可以显著降低 STAT3/NF-κB 的促炎作用[78];在心肌成纤维细胞中观察到,阻断 STAT3 可以显著抑制 TGF-β 诱导的自噬和纤维化[79],但与之相反的是,有研究表明 STAT3 信号通路可以负向调控自噬,Chen 等[80]观察到,阻断 STAT3 可以促进自噬水平的升高,从而促进心肌纤维化。SSc 患者自噬功能失调可能会导致 JAK/STAT3 信号通路的异常激活从而诱导纤维化,具体二者如何调节仍需更进一步的研究验证。

总之,自噬通过调节多种信号通路在 SSc 纤维化的进程中发挥了至关重要的作用,反之通过调节自噬能否发挥抗纤维化的作用仍需大量研究证实。

4 讨论

细胞自噬作为一种细胞内自降解的途径参与了多种疾病的发生发展过程,在 SSc 发病过程中,自噬与多种免疫细胞、细胞因子、信号通路相互调节,使组织器官等发生慢性炎症、血管病变及纤维化。本文总结了自噬在 SSc 发病机制中的研究进展。细胞自噬在 SSc 发病的不同进展中表现各不相同,既可以表现为抑制也可表现为过度激活,其机制还有待进一步的研究探索。SSc 作为一种可累及全身多脏器的自身免疫性疾病,其发病机制十分复杂,临床治疗十分困难,细胞自噬作为一个切入点逐渐引起人们的关注,研究自噬与 SSc 之间的关系可能为未来的治疗开辟新思路。

参考文献:

[1] Di Battista M, Barsotti S, Orlandi M, et al. One year in review 2021: systemic sclerosis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2021, 39 Suppl 131 (4): 3-12.

[2] Kowalska-Kępczyńska A. Systemic Scleroderma-definition, clinical picture and laboratory diagnostics [J]. J Clin Med, 2022, 11(9): 2299.

[3] Yin H, Wu H, Chen Y, et al. The therapeutic and pathogenic role of autophagy in autoimmune diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1512.

[4] Jin M, Zhang Y. Autophagy and autoimmune diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 405-408.

[5] Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases [J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.

[6] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. Cell, 2011, 147(4): 728-741.

[7] Fleming A, Bourdenx M, Fujimaki M, et al. The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration [J]. Neuron, 2022, 110(6): 935-966.

[8] Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(8): 439-458.

[9] Hu Y, Reggiori F. Molecular regulation of autophagosome formation [J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(1): 55-69.

[10] Cai YY, Li L, Zhu XM, et al. The crucial role of the regulatory mechanism of the Atg1/ULK1 complex in fungi [J]. Front Microbiol, 2022, 13: 1019543.

[11] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 12.

[12] Chen RH, Chen YH, Huang TY. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy [J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1): 80.

[13] Zhou XJ, Zhang H. Autophagy in immunity: implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases [J]. Autophagy, 2012, 8(9): 1286-1299.

[14] Feng Y, Li B, Li XY, et al. The role of autophagy in rheumatic disease [J]. Curr Drug Targets, 2018, 19(9): 1009-1017.

[15] Al-Bari MAA, Xu P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and-independent pathways [J]. Ann N Y Acad Sci, 2020, 1467(1): 3-20.

[16] Ballesteros-Álvarez J, Andersen JK. mTORC2: The other mTOR in autophagy regulation [J]. Aging Cell, 2021, 20 (8): e13431.

[17] Wang Y, Zhang H. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 67-83.

[18] Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9765.

[19] Zhang R, Kang R, Klionsky DJ, et al. Ion channels and

transporters in autophagy [J]. Autophagy, 2022, 18(1): 4-23.
[20] Colafrancesco S, Vomero M, Iannizzotto V, et al. Autophagy occurs in lymphocytes infiltrating Sjögren's syndrome minor salivary glands and correlates with histological severity of salivary gland lesions [J]. Arthritis Res Ther, 2020, 22(1): 238.
[21] Colafrancesco S, Barbati C, Priori R, et al. Maladaptive autophagy in the pathogenesis of autoimmune epithelitis in sjögren's syndrome [J]. Arthritis Rheumatol, 2022, 74(4): 654-664.
[22] Colasanti T, Spinelli FR, Barbati C, et al. Belimumab decreases autophagy and citrullination in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. Cells, 2022, 11(2): 262.
[23] Karabowicz P, Wroński A, Ostrowska H, et al. Reduced proteasome activity and enhanced autophagy in blood cells of psoriatic patients [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7608.
[24] Podestà MA, Faravelli I, Ponticelli C. Autophagy in lupus nephritis: a delicate balance between regulation and disease [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(8): 103132.
[25] Li T, Ortiz-Fernández L, Andrés-León E, et al. Epigenomics and transcriptomics of systemic sclerosis $CD4^+$ T cells reveal long-range dysregulation of key inflammatory pathways mediated by disease-associated susceptibility loci [J]. Genome Med, 2020, 12(1): 81.
[26] Gaydosik AM, Tabib T, Domsic R, et al. Single-cell transcriptome analysis identifies skin-specific T-cell responses in systemic sclerosis [J]. Ann Rheum Dis, 2021, 80(11): 1453-1460.
[27] Jin W, Zheng Y, Zhu P. T cell abnormalities in systemic sclerosis [J]. Autoimmun Rev, 2022, 21(11): 103185.
[28] Matsushita T, Kobayashi T, Mizumaki K, et al. BAFF inhibition attenuates fibrosis in scleroderma by modulating the regulatory and effector B cell balance [J]. Sci Adv, 2018, 4(7): eaas9944.
[29] Saigusa R, Asano Y, Yamashita T, et al. Systemic sclerosis complicated with localized scleroderma-like lesions induced by Köbner phenomenon [J]. J Dermatol Sci, 2018, 89(3): 282-289.
[30] Metur SP, Klionsky DJ. Adaptive immunity at the crossroads of autophagy and metabolism [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5): 1096-1105.
[31] Yang G, Song W, Postoak JL, et al. Autophagy-related protein PIK3C3/VPS34 controls T cell metabolism and function [J]. Autophagy, 2021, 17(5): 1193-1204.
[32] Rodrigues PM, Sousa LG, Perrod C, et al. LAMP2 regulates autophagy in the thymic epithelium and thymic stroma-dependent CD4 T cell development [J]. Autophagy, 2023, 19(2): 426-439.
[33] Cui B, Lin H, Yu J, et al. Autophagy and the immune response [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206: 595-634.
[34] Jia W, He YW. Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy [J]. J Immunol, 2011, 186(9): 5313-5322.
[35] Pua HH, Guo J, Komatsu M, et al. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes [J]. J Immunol, 2009, 182(7): 4046-4055.
[36] Jang A, Sharp R, Wang JM, et al. Dependence on autophagy for autoreactive memory B cells in the development of pristane-induced lupus [J]. Front Immunol, 2021, 12: 701066.
[37] Pengo N, Scolari M, Oliva L, et al. Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production [J]. Nat Immunol, 2013, 14(3): 298-305.
[38] Wu MY, Lu JH. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis [J]. Cells, 2019, 9(1): 70.
[39] Bhattacharya A, Ghosh P, Singh A, et al. Delineating the complex mechanistic interplay between NF-κB driven mTOR depedent autophagy and monocyte to macrophage differentiation: a functional perspective [J]. Cell Signal, 2021, 88: 110150.
[40] Wen JH, Li DY, Liang S, et al. Macrophage autophagy in macrophage polarization, chronic inflammation and organ fibrosis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 946832.
[41] Jacquel A, Obba S, Boyer L, et al. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions [J]. Blood, 2012, 119(19): 4527-4531.
[42] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-6440.
[43] Liu T, Wang L, Liang P, et al. USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(10): 2431-2442.
[44] Yu Y, Sun B. Autophagy-mediated regulation of neutrophils and clinical applications [J]. Burns Trauma, 2020, 8: tkz001.
[45] Tang Y, Su R, Gu Q, et al. PI3K/AKT-mediated autophagy inhibition facilitates mast cell activation to enhance severe inflammatory lung injury in influenza A virus- and secondary *Staphylococcus* aureus-infected mice [J]. Antiviral Res, 2023, 209: 105502.
[46] Jerjen R, Nikpour M, Krieg T, et al. Systemic sclerosis in adults. part I: clinical features and pathogenesis [J]. J Am Acad Dermatol, 2022, 87(5): 937-954.
[47] Asano Y, Sato S. Vasculopathy in scleroderma [J]. Semin Immunopathol, 2015, 37(5): 489-500.
[48] Mameli E, Martello A, Caporali A. Autophagy at the interface of endothelial cell homeostasis and vascular disease [J]. FEBS J, 2022, 289(11): 2976-2991.
[49] Zhao Y, Zhu M, Chen W, et al. TFPIα alleviated vascular endothelial cell injury by inhibiting autophagy and the class III PI3K/Beclin-1 pathway [J]. Thromb Res, 2020, 195: 151-157.
[50] Kma L, Baruah TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation [J]. Biotechnol Appl Biochem,

2022, 69(1): 248-264.
[51] Guo F, Li X, Peng J, et al. Autophagy regulates vascular endothelial cell eNOS and ET-1 expression induced by laminar shear stress in an *ex vivo* perfused system [J]. Ann Biomed Eng, 2014, 42(9): 1978-1988.
[52] Liu J, Bi X, Chen T, et al. Shear stress regulates endothelial cell autophagy via redox regulation and Sirt1 expression [J]. Cell Death Dis, 2015, 6(7): e1827.
[53] Schaaf MB, Houbaert D, Meçe O, et al. Autophagy in endothelial cells and tumor angiogenesis [J]. Cell Death Differ, 2019, 26(4): 665-679.
[54] Abdulle A, van Goor H, Mulder D. Hydrogen sulfide: a therapeutic option in systemic sclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 4121.
[55] Bharath LP, Mueller R, Li Y, et al. Impairment of autophagy in endothelial cells prevents shear-stress-induced increases in nitric oxide bioavailability [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2014, 92(7): 605-612.
[56] Shadab M, Millar MW, Slavin SA, et al. Autophagy protein ATG7 is a critical regulator of endothelial cell inflammation and permeability [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 13708.
[57] Spengler K, Kryeziu N, Große S, et al. VEGF triggers transient induction of autophagy in endothelial cells via AMPKα1 [J]. Cells, 2020, 9(3): 687.
[58] Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(10): 611-625.
[59] Zhao X, Nedvetsky P, Stanchi F, et al. Endothelial PKA activity regulates angiogenesis by limiting autophagy through phosphorylation of ATG16L1 [J]. Elife, 2019, 8: e46380.
[60] Zehender A, Li YN, Lin NY, et al. TGFβ promotes fibrosis by MYST1-dependent epigenetic regulation of autophagy [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4404.
[61] Mori T, Tamura N, Waguri S, et al. Autophagy is involved in the sclerotic phase of systemic sclerosis [J]. Fukushima J Med Sci, 2020, 66(1): 17-24.
[62] Liang M, Lv J, Chu H, et al. Vertical inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling demonstrates *in vitro* and *in vivo* anti-fibrotic activity [J]. J Dermatol Sci, 2014, 76(2): 104-111.
[63] Li R, Yin H, Wang J, et al. Dihydroartemisinin alleviates skin fibrosis and endothelial dysfunction in bleomycin-induced skin fibrosis models [J]. Clin Rheumatol, 2021, 40(10): 4269-4277.
[64] Zhou X, Liu C, Lu J, et al. 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-induced scleroderma fibroblast collagen synthesis by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signalling [J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(9): 1675-1684.
[65] Suto T, Karonitsch T. The immunobiology of mTOR in autoimmunity [J]. J Autoimmun, 2020, 110: 102373.
[66] Huang H, Long L, Zhou P, et al. mTOR signaling at the crossroads of environmental signals and T-cell fate decisions [J]. Immunol Rev, 2020, 295(1): 15-38.
[67] Zhang M, Zhang S. T cells in fibrosis and fibrotic diseases [J]. Front Immunol, 2020, 11: 1142.
[68] Wang X, Chen J, Xu J, et al. The role of macrophages in kidney fibrosis [J]. Front Physiol, 2021, 12: 705838.
[69] Bhandari R, Ball MS, Martyanov V, et al. Profibrotic activation of human macrophages in systemic sclerosis [J]. Arthritis Rheumatol, 2020, 72(7): 1160-1169.
[70] Forestier A, Guerrier T, Jouvray M, et al. Altered B lymphocyte homeostasis and functions in systemic sclerosis [J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(3): 244-255.
[71] Ayers NB, Sun CM, Chen SY. Transforming growth factor-β signaling in systemic sclerosis [J]. J Biomed Res, 2018, 32(1): 3-12.
[72] Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis [J]. Chem Biol Interact, 2018, 292: 76-83.
[73] Pang M, Wang H, Rao P, et al. Autophagy links β-catenin and Smad signaling to promote epithelial-mesenchymal transition via upregulation of integrin linked kinase [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 76: 123-134.
[74] Ghavami S, Yeganeh B, Zeki AA, et al. Autophagy and the unfolded protein response promote profibrotic effects of TGF-β_1 in human lung fibroblasts [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314(3): L493-L504.
[75] El Nashar EM, Alghamdi MA, Alasmari WA, et al. Autophagy promotes the survival of adipose mesenchymal stem/stromal cells and enhances their therapeutic effects in cisplatin-induced liver injury via modulating TGF-β1/smad and PI3K/AKT signaling pathways [J]. Cells, 2021, 10(9): 2475.
[76] Pedroza M, To S, Assassi S, et al. Role of STAT3 in skin fibrosis and transforming growth factor beta signalling [J]. Rheumatology (Oxford), 2018, 57(10): 1838-1850.
[77] Talotta R. The rationale for targeting the JAK/STATpathway in scleroderma-associated interstitial lung disease [J]. Immunotherapy, 2021, 13(3): 241-256.
[78] Shi Y, Hu Y, Wang Y, et al. Blockade of autophagy prevents the development and progression of peritoneal fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 724141.
[79] Yuan Y, Zhang Y, Han X, et al. Relaxin alleviates TGFβ1-induced cardiac fibrosis via inhibition of Stat3-dependent autophagy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(4): 1601-1607.
[80] Chen B, Yang Y, Wu J, et al. microRNA-17-5p downregulation inhibits autophagy and myocardial remodelling after myocardial infarction by targeting STAT3 [J]. Autoimmunity, 2022, 55(1): 43-51.

〔收稿日期〕2023-02-01

付雪琴,兰瑞,张勇,等. 基于表观遗传学调控的中医药治疗中风研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 104-111.
Fu XQ, Lan R, Zhang Y, et al. Research progress of traditional Chinese medicine for stroke on the basis of epigenetic regulation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 104-111.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.016

基于表观遗传学调控的中医药治疗中风研究进展

付雪琴[1],兰 瑞[2*],张 勇[3],王漫漫[1],邹旭欢[1],王玮玮[1]

(1.河南中医药大学,郑州 450000;2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450000;
3.郑州大学第三附属医院,郑州 450000)

【摘要】 表观遗传学是分子生物学的一个分支,表观遗传修饰在缺血性卒中病理学进展中起着核心作用。表观遗传机制参与调节中风后基因表达、细胞损伤反应、运动功能和认知能力的复杂而动态的过程,是阐释中医药治疗缺血性卒中的靶点及其作用机制的有效途径。目前,缺血性卒中的病因病机尚未完全明确,现代医学治疗尚有不足,而中药在治疗缺血性脑卒中方面具有独特的优势,具有多层次、多靶点的整体调节作用。最新研究发现,中医药能参与调控异常表观遗传修饰治疗中风。本文主要围绕中风病中医理论基础,从 DNA 甲基化、非编码 RNA 及组蛋白修饰三个方面在中风治疗及中医药研究中的应用入手,阐释中医药治疗中风的表观遗传作用,以期为今后抗脑缺血中药的研究开发提供参考依据。

【关键词】 表观遗传学;中风;中医药;DNA 甲基化;非编码 RNA;组蛋白修饰
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0104-08

Research progress of traditional Chinese medicine for stroke on the basis of epigenetic regulation

FU Xueqin[1], LAN Rui[2*], ZHANG Yong[3], WANG Manman[1], ZOU Xuhuan[1], WANG Weiwei[1]

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 Epigenetics, a branch of molecular biology, plays a pivotal role in the pathological progression of ischemic stroke. Epigenetic modifications are intricately involved in the complex and dynamic processes that regulate gene expression, cellular injury response, motor function, and cognitive ability following stroke. This provides an effective framework for elucidating the targets and mechanisms of action underlying traditional Chinese medicine's treatment of ischemic stroke. Currently, the etiology and pathogenesis of ischemic stroke remain incompletely understood, with modern medical treatments still lacking sufficient efficacy. Traditional Chinese medicine possesses a unique advantage in treating ischemic stroke through its multi-level and multi-target comprehensive regulation. Recent studies have discovered that traditional Chinese medicine can participate in regulating abnormal epigenetic modifications during stroke treatment. This article primarily focuses on the theoretical foundation of traditional Chinese medicine for strokes by exploring its application in DNA methylation, non-coding RNA, histone modification research as well as explaining the epigenetic effects it exerts when treating strokes. The aim is to provide insights for future research and development of traditional Chinese medicine for cerebral ischemia.

【Keywords】 epigenetics; stroke; traditional Chinese medicine; DNA methylation; non-coding RNA; histone modification

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

[基金项目]国家自然科学基金(81973618,81503422);河南省自然科学基金(202300410399)。

[作者简介]付雪琴(1994—),女,硕士研究生,研究方向:中西医神经内科学。E-mail:fxq1827@163.com
[通信作者]兰瑞(1984—),女,副主任医师,硕士生导师,博士后合作导师,研究方向:中西医神经内科学。E-mail:lanrui0312@163.com

中风是一种多因素多系统疾病,被认为是全球死亡和残疾的主要原因,每年约 500 万人死于中风,另外 500 万人永久残疾,给家庭和社会造成沉重的经济负担[1]。遗传学在中风病理生理学中起着重要作用,然而,基因组参与该疾病的机制尚不清楚。遗传和表观遗传机制都可能在中风疾病的发展中发挥作用。研究表明,表观遗传因素在导致中风风险升高的病理机制中具有重要作用[2]。表观遗传变化是可逆的,研究表观遗传因素可以作为疾病进展和诊断的标志物,以及治疗干预新靶点的发展。

随着分子生物学对疾病研究的深入,认为中风由表观遗传修饰的改变所导致。因此,针对表观遗传的调控已成为脑卒中研究领域的热点。表观遗传学的研究与难以逆转的遗传变化相反,表观遗传畸变在医学上是可逆的。新兴的表观遗传学工具可用作预防、诊断和治疗疾病的标志物。随着靶向基因表达调控中涉及的特定表观遗传机制的药物的发展,表观遗传工具的开发利用是一种适当而有效的方法,可以在临床上应用于各种疾病的治疗。表观遗传机制可以调节生物体中发生的不同生理过程,包括细胞增殖和分化。更深入地了解与中风及其危险因素相关的表观遗传修饰,可以为开发和治疗这种致残性疾病的创新方法提供基础[3-6]。近年来表观遗传学在中风方面研究日益增多。中医药研究发现,中医理论与表观遗传学不谋而合,二者均强调人体的生理、病理变化与外界因素的关系,明确中医药调控表观遗传学的具体作用机制,可为治疗中风提供有力证据[7]。

1 中医药治疗脑卒中相关理论的表观遗传学基础

1.1 中风中医证候与表观遗传学

中医证候学说,即疾病的证候,是对疾病过程中一定阶段的病因、病机、病位、病势等病机本质的概括,一般由一组相对固定的、有内在联系的、能揭示疾病某一阶段或某一类型病变本质的症状和体征构成。中医认为证候是内外环境与人体相互影响的阶段性病理概括,且可以通过对环境等因素的干预以及方药的运用,调整证候的表现,从而影响复杂疾病的发生和发展。这种观点符合表观遗传学可逆调控的观点,通过多靶点调节对改善人们体质的持久作用是基于中医理论的[8]。因此认为,中医的证候可能包含表观遗传学的内容,将表观遗传学与中医证候分析有机结合,则可能对疾病的本质了解更深入[7,9]。

1.2 中医整体观与表观遗传学

中医天人合一和形神一体的整体观念对疾病整体预防有重要指导作用,整体观念是治未病的基础和指导思想。整体观念认为,世界万物由气分化演变而来。注重人与自然、人与社会、人体内部各功能系统之间的相互联系、相互作用,强调整体大于部分之和。辩证论治,治贵权变,然其指导思想从整体出发,协调机体内部脏腑阴阳气血,顺应自然社会环境变化,《素问》:“阴阳逆从标本之为道也,小而大,言一而知百病之害,少而多,浅而博,可以言一而知百也。”中医学注重从整体出发的宏观认识,宏观考察生物人、自然人、社会人的总体功能变化规律,宏观认识人体自身,以及把握五脏系统与精气神、经络、体质间的相互联系和相互作用,构建“天人相应”的宏观认识。辩证的对待宏观与微观的关系。“辨证论治”“同病异治”“异病同治”思想与表观遗传学不改变 DNA 序列而使其功能改变如出一辙[10]。

中医理论认为,阴阳是不断运动变化的,在临床实践中,平衡阴阳,实现“阴平阳秘”是中医治病的最终目标。DNA 的甲基化和去甲基化也是动态变化的,与中医理论有着相似的联系。中药在治疗疾病的过程中具有明显的效果和优势。除了方剂的应用研究外,DNA 甲基化修饰还可以为现代方剂的合理性提供理论依据,如根据药物不同主要成分的不同表观遗传效应和偏好对处方进行合理优化。因此,我们可以根据表观遗传学的思想,为中医作为表观遗传药物的研发提供新的途径。

1.3 中药方剂与表观遗传学

中药方剂在中医文明历史上占据重要地位,经过数千年的积累和沉淀,由最初的单味药治病,到后来的数味药配合应用,逐渐形成了方剂。方剂学是中医学理、法、方、药体系的重要组成部分,推动中医药事业的发展,承载着中医药的发展史。近年来中药方剂的现代研究发展快速,已经在世界范围内用于预防和治疗不同疾病,通过多靶点和整体方法,方剂在治疗多因素全身复杂疾病方面显示出优势,随着生物药学技术的发展,组学分析等在中药方剂的应用越来越广,组学研究为中药方剂的潜在未来发展提供了新的机会,并从还原论转向整体主义,这些新方法呼应了方剂学的哲学和治疗方法。

表观遗传学研究对中草药非常有益,表观遗传

学是动态变化和可逆过程,具有遗传性和可变性特征。DNA 甲基化阐明中草药配方和化合物的药学机制,对促进中草药临床应用具有重要意义,DNA 甲基化提供了科学验证,证明中草药理论的临床可行性,特定 DNA 甲基化位点可以作为潜在的生物标志物,在分子水平上实现中草药的诊断和应用。此外,DNA 甲基化广泛分布在人体内,中草药以系统和多目标的方式工作。从这个角度来看,甲基化可能有助于揭示中草药分子机制和定位潜在的药物靶点,对于临床实践将具有极其重要的意义[11-13]。

2 中医药治疗缺血性卒中的表观遗传学机制

2.1 DNA 甲基化与中风

DNA 甲基化涉及胞嘧啶的 5-碳位置的化学共价修饰,以在 CpG 岛上产生 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine,5-mC),使染色质更紧密地闭合并导致基因表达沉默的转录机制。DNA 甲基转移酶家族(DNA methyltransferases,DNMTs)催化 DNA 甲基化,以在基因组上保存或产生 5-mCs。此外,甲基 CpG 结合结构域(methyl-CpG binding domain,MBD)家族成员,如 MBD1 和甲基化 CG 结合蛋白 2(methyl-CpG-binding protein 2,MeCP2),也可以结合启动子中的甲基化 CpG 并抑制基因表达[14]。研究表明,Dnmt1、Dnmt3a、MBD1 和 MeCP2 敲低,通过对神经基因的直接表观遗传调控,影响增殖的神经前体细胞(neural precursor cell,NPC)和分化神经元[15]。此外,在对小鼠(middle cerebral artery occlusion,MCAO)后表观遗传变化的研究显示,大脑内整体 DNA 甲基化上调,侧脑室注射甲基转移酶(methyltransferase,Mtase)抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷(5-aze-2-deoxycytidine,5-aze-dC)10 μg/d,连续注射 28 d 进行遗传学或药理学 DNMT 抑制,可降低 MCAO 损伤的严重程度,这表明 DNA 甲基转移酶有助于延迟缺血性脑损伤[16]。

近年来,启动子 DNA 甲基化在缺血性卒中发病机制中得到了很好的研究[3]。在中风动物模型中,DNA 甲基化的全局水平更高,并且与大脑中甲基转移酶(DNMT)的高活性有关。研究表明,DNMT 的药理学抑制被证明可以减少甲基化,减少大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠模型的梗死面积和脑缺血损伤[17],这表明控制 DNA 甲基化对脑卒中具有保护作用。在大脑中动脉闭塞模型中,钠-钾-氯协同转运蛋白 1(Na-K-Cl cotrasnporter1,NKCC1)的 DNA 甲基化水平降低与神经元损伤后脑 NKCC1 mRNA 和蛋白质的重新表达相关[18]。在疾病的病因研究当中,已发现高水平的血浆同型半胱氨酸是多种血管疾病的独立危险因素,同型半胱氨酸的代谢受膳食调节,饮食不良和同型半胱氨酸代谢的改变与较高卒中发生率有关,有研究表明,胱硫醚-β-合酶(cystathionine β synthase,CBS)启动子中的 DNA 高甲基化与中风风险增加具有相关性[19]。CBS 高甲基化导致酶活性低、血浆同型半胱氨酸积累对中风的易感性增加。同时,高水平的血浆同型半胱氨酸也与卒中患者血栓调节素(thrombomodulin,TM)的 DNA 高甲基化有关。TM 是在内皮表达的完整的膜蛋白,通过充当凝血酶受体来发挥抗凝特性,TM 的可溶性对血管内凝血调节发挥重要作用[20-22]。Hong 等[23]研究发现,脑缺血再灌损伤模型制备成功后,脑络欣通每天 2 次灌胃治疗,连续 14 d 可以降低 NogoA 途径在脑缺血后的 DNA 甲基化水平,从而抑制 NogoA/RhoA/ROCK 途径的表达产生抗脑缺血作用。

2.2 非编码 RNA 与中风

MicroRNA(miRNA)是小的内源性单链非编码的 RNA 分子,长度从 18~25 nt 不等,在临床和动物实验的研究中发现,miRNA 水平在高血压、血脂异常、动脉粥样硬化和炎症中会发生变化[18]。miRNA 的表达在许多生理和病理过程中起重要作用,包括表观遗传学和神经退行性疾病以及特定神经系统疾病的进展[24]。已经证明在中风的不同阶段发现了 miRNA 水平的修饰,表明 miRNA 可能用于诊断、预后和治疗[25-26]。

中风会改变人类以及动物的血液样本中的 miRNA 分布。神经干细胞(neural stem cell,NSC)表达 miRNA 和 miRNA 在卒中后神经发生功能已经显现。研究发现,大鼠 MCAO 模型中提取的缺血性脑室下区(subventricular,SVZ)NPC 中,神经元特异性 miR-124 在脑和血浆水平明显增加,在中风发展后 24 h 达到峰值。这些结果表明,miR-124 的血浆水平可用于监测脑缺血性损伤[27]。Stanzione 等[28]研究了 MCAO 模型中 238 个 miRNA 的大脑特征,并在不同的再灌注时间发现了几种上下调节的 miRNA。生物信息学分析显示,解除管制的 miRNA 靶向参与中风的几个基因的 mRNA。其中,有属于炎症途径,白细胞介素 1β(interleukin 1β,IL-1β)和白介素 6(interleukin 6,IL-6),细胞间粘附分子 1(intercellular

cell adhesion molecule-1, ICAM1), 环加氧酶 2 (recombinant cyclooxygenase 2,COX2),神经保护热休克蛋白 27(heat-shock protein 27,HSP27),外周型苯二氮卓类受体(peripheral benzodiazepine receptor, PTBR),锰超氧化物歧化酶(manganese-containing superoxide dismutas,Mn-SOD),胰岛素样生长因子结合蛋白 3(insulin like growth factor binding protein 3, IGF-BP3)的基因,转录调控,活化 B 细胞的核因子 kappa-轻链增强子(nuclear factor-κB,NF-κB),缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1,HIF1),早期生长抑制剂 1(early growth response 1,Egr1),激活转录因子 3(transcription Activation Factor 3, ATF3)。这些过程在缺血后大脑重塑过程中共同起着根本性的作用[29]。

局灶性和永久性缺血已被证明可以降低卒中患者血浆中以及啮齿动物血液和大脑中的 miR-424 表达[30]。miR-424 的过表达被证明可以通过增加 Nrf2 和 MnSOD 来减少缺血诱导的小鼠大脑中氧化应激和梗死。在永久性局灶性缺血小鼠模型中,miR-424 过表达通过抑制小胶质细胞活化来减少水肿和炎症过程。MiR-424 在缺氧作用下的人内皮细胞中的表达增加,并通过稳定 HIF-1α 促进血管生成。在脑卒中患者血浆中,淋巴细胞和中性粒细胞的 miR-424 水平上调,与 TNF-α、IL-10 和 IGF-1 表达以及梗死大小呈负相关[31]。研究表明,miR-124 在卒中后增加,并且在短暂 MCAO 和体外氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)模型中,miR-124 模拟物的递送可赋予神经保护[32-34]。MiR-155 被证明可以上调小鼠中的炎症细胞因子,如 IL-10、IL-4 和 IL-6 并通过大鼠的 Rheb/mTOR 途径增加细胞凋亡局灶性缺血性损伤后。通过增加一氧化氮(NO)的产生以及 Notch1 和内皮 NO 合酶的表达,抑制 miR-155 显著降低了短暂 MCAO 后小鼠的梗死。张洋等[35]研究发现,腹腔注射丹参酮ⅡA 注射液(24 mg/kg)连续 7 d,可以上调缺血缺氧性脑病大鼠海马组织中 miR-132 表达,改善大鼠神经功能和海马组织病理损伤,其机制可能与抑制海马神经元凋亡以及增加海马神经递质水平、树突棘密度、突触前蛋白、MAP-2 和 BDNF 蛋白表达有关。

2.3 组蛋白修饰与中风

组蛋白(Histone)是一组保守的 DNA 结合蛋白,形成染色质基本单位核小体。组蛋白包含 5 种成分:H1、H2A、H2B、H3 和 H4。除 H1 外,其余四种组蛋白分别作为异源二聚化组合形成核小体核心。组蛋白尾巴的这些修饰起至关重要的作用,例如通过调节组蛋白和 DNA 双链相互作用来影响染色质的结构和稳定性,并通过影响其他转录因子和结构基因启动子的亲和力来调节基因转录[36-38]。

抑制组蛋白脱乙酰被证明可以在中风后保护大脑。丙戊酸(valproic,VPA)腹腔注射给药可防止 H3 和 H4 的脱乙酰化,并改善成年大鼠缺血后海马 CA1(hippocampal CA1 region)神经元死亡[39]。用 VPA 或丁酸钠或曲古抑菌素(trichostatin,TSA)治疗被证明可以抑制小胶质细胞活化,下调一氧化氮合酶和上调热休克蛋白,从而改善行为结局并减少永久性 MCAO 后大鼠的梗死体积[40]。重要的是,VPA 和丁酸钠在啮齿动物局灶性缺血后 3~6 h 再灌注时最有益,这表明这些药物在卒中治疗中的转化潜力。在小鼠中短暂 MCAO 后施用伏立诺他(suberoylanilide hydroxamic acid,SAHA)被证明可以抑制缺血诱导的 H3 脱乙酰化,这导致细胞因子 IL-1β 的水平降低和伴侣 HSC70 的水平升高。SAHA 治疗也减少了短暂性 MCAO 后梗死的大小。在缺氧缺血小鼠模型中,用组蛋白乙酰乙酶(histone deacetylase,HDAC)抑制剂 4-PBA 进行中风前或中风后治疗也被证明可以显著减少梗死体积。一项使用从小鼠视神经分离的白质细胞的体外研究表明,在氧葡萄糖剥夺之前或之后,HDAC 抑制剂治疗(SAHA 或 MS-275)保留了白质结构并降低了兴奋性毒性[41-43]。

研究表明,HDAC 抑制减轻了中风后的损伤,相关机制可能是细胞外谷氨酸清除率的上调,抑制 p53 介导的细胞死亡和维持线粒体完整性[44]。姜黄素在 IC 中具有 HDAC 抑制电位,Yuan 等[45]发现 HDAC-1、HDAC-3、HDAC-8 蛋白的下调和组蛋白 H4 表达的上调调节 Raji 细胞增殖和凋亡。除作用于 HDAC 外,姜黄素以 20、40、60 mg/kg 腹腔注射给药,连续 7 d,通过抑制组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase,HAT)活性的 p300/CREB 结合蛋白(CBP)并调节 BDNF 以及 cox-2 在大鼠中的表达缓解神经性疼痛[46]。这些研究表明姜黄素可以控制乙酰化/脱乙酰化机制,这些过程可以改变染色质结构以控制基因表达,姜黄素作为潜在的 HDAC 抑制剂,可以通过调节中风发病机制中的重要机制来研究中风诱导的表观遗传机制[47](表 1)。

表 1 基于表观遗传学调控中医药治疗中风研究汇总表

Table 1 Summary of stroke treatment by TCM based on epigenetics

分类 Sort	名称 Name	来源/组成 Composition/source	作用靶点 Target	机制 Mechanism
单体[48-53,35] Monomer	鸡血藤总黄酮 Total flavonoids from blood thorn	鸡血藤 Spatholobus suberctu	ERK mRNA,ERK DNA	鸡血藤总黄酮通过调节肠道屏障功能、减轻海马组织氧化应激促进海马组织 ERK mRNA 表达、抑制 ERK 甲基化 DNA 甲基化水平 Total flavonoids of *P. alopecuroides* enhance the expression of ERK mRNA in the hippocampus and attenuate ERK methylated DNA methylation by modulating intestinal barrier function and reducing oxidative stress in the hippocampus
单体[48-53,35] Monomer	三七总皂苷 Panax Notoginsenosides	三七 Notoginseng	miRNA rno-miR-483 FIBIN, FOXERD2 NAAA	三七总皂苷可能通过 rno-miR-483 的靶基因和靶基因诱导的蛋白 FIBIN、FOXERD2 以及 NAAA 发挥脑保护作用 Potential neuroprotective effects of TSP may be mediated through the modulation of rno-miR-483 and its downstream target genes, including FIBIN, FOXERD2, and NAAA-induced proteins
单体[48-53,35] Monomer	人参皂苷 Rb1 Ginsenoside Rb1	人参 Ginseng	miR-145,SOD P300/CBP,AcH3, HDAC2	人参皂苷 Rb1 通过减少 miR-145 含量来上调脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 SOD 活性发挥脑保护作用,减轻脑缺血再灌注损伤模型小鼠缺血半暗带和海马神经元的凋亡,改善学习记忆能力 Administration of Ginsenoside Rb1 enhances superoxide dismutase (SOD) activity in the brain tissues of rats subjected to cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing the content of miR-145. This intervention exerts neuroprotective effects by attenuating apoptosis in the ischemic penumbra and hippocampal neurons, as well as improving learning and memory abilities
单体[48-53,35] Monomer	小檗碱 Berberine	黄连 Coptidis rhizoma	PPARγ,DNMT1, DNMT3a	小檗碱在缺血再灌损伤中可以上调 PPARγ 表达。抑制 PPARγ 可以减弱小檗碱对缺血再灌损伤神经细胞的保护作用 Expression of PPARγ is upregulated by Berberine during ischemia-reperfusion injury, and the protective effect of Berberine on ischemia-reperfusion injury is attenuated upon inhibition of PPARγ
单体[48-53,35] Monomer	姜黄素 Curcumin	姜黄 Radix curcuma	线粒体功能障碍, TIMP-2 高甲基化 Mitochondrial dysfunction, TIMP-2 hypermethylation	抑制缺血再灌注诱导损伤的小鼠的线粒体功能障碍和 TIMP-2 高甲基化。 Inhibition of mitochondrial dysfunction and hypermethylation of TIMP-2 in mice with ischemia-reperfusion-induced injury
单体[48-53,35] Monomer	丹参酮ⅡA Tanshinone ⅡA	丹参 Salvia miltiorrhiza	miR-132	抑制海马神经元凋亡以及增加海马神经递质水平、树突棘密度、突触前蛋白、MAP-2 和 BDNF 蛋白表达有关 Inhibitory effect on hippocampal neuronal apoptosis is enhanced, leading to an increase in hippocampal neurotransmitter levels, dendritic spine density, and protein expression of presynapse, MAP-2, and BDNF
复方[54-59,23] Compound	补阳还五汤 Buyang Huanwu Decoction	黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、桃仁 Astragalus, Angelica tail, Red peony root, Dilong, Chuanxiong, Persicae serren	Cav-1、m^6A 抑制线粒体凋亡和自噬,α-突触核蛋白降解,神经元生长,挽救 MPTP 受损神经元 Presence of Cav-1 and m^6A hinders mitochondrial apoptosis and autophagy, impedes α-synuclein degradation, inhibits neuronal growth, and facilitates the recovery of MPTP-damaged neurons	补阳还五汤可能通过 Cav-1 调控脑缺血小鼠 m^6A 甲基化水平和血管新生,从而发挥抗脑缺血损伤作用。补阳还五汤降低多巴胺能神经元的损伤,降低大脑中凋亡细胞数量,缓解 MPTP 诱导的运动障碍 Administration of Buyang Huanwu Decoction in cerebral ischemic mice may regulate the mRNA expression of Cav-1, N(6)-methyladenosine levels, and promote angiogenesis, thereby exerting a protective effect against cerebral ischemic injury. Additionally, Buyang Huanwu Decoction attenuates dopaminergic neuronal damage, reduces apoptotic cell numbers in the brain, and alleviates MPTP-induced movement disorders

续表1

分类 Sort	名称 Name	来源/组成 Composition/source	作用靶点 Target	机制 Mechanism
复方[54-59,23] Compound	温阳逐瘀汤 Wen Yang and Expelling Stasis Decoction	制附子、肉桂、杜仲、巴戟天、当归、熟地、桃仁、红花、水蛭、姜半夏、南山楂、红参 Prepare Aconite, Cinnamon, Eucommia, Morinda officinalis, Angelica, Rehmannia glutinosa, Persicae semen, Cartharnus tinctorius, Hirudo, Ginger Pinellia, Hawthorn, Red Ginseng	miR-210,Ephrin-A3	温阳逐瘀汤改善脑缺血神经功能缺损程度,上调脑缺血损伤后 miR-210 的表达,对其靶基因进行负调控,这有可能是脑缺血损伤后诱导血管生成的机制之一 Administration of Wenyang Zhuyu Decoction resulted in an improvement in the severity of cerebral ischemic neurological deficit, upregulation of miR-210 expression following cerebral ischemia, and subsequent negative regulation of its target gene. These findings suggest that this mechanism may contribute to the induction of angiogenesis after cerebral ischemia
复方[54-59,23] Compound	阳化汤 Yanghua Decoction	桂枝尖、苍术、陈皮、法半夏、茯苓、南山楂、田七、丹参、石菖蒲、生姜、炙甘草 Guizhi Jian, Cangzhu, Chenpi, Fabanxia, Fuling, Nanshanzha, Tianqi, Salvia miltiorrhiza, Shichangpu, Ginger and Baked Licorice	miR-9-3p/5p, miR-124-3p	阳化汤能改善急性缺血性中风患者神经功能缺损及提高日常生活能力;阳化汤可能通过下调患者血清外泌体 miR-9-3p/5p 、miR-124-3p 的表达,进一步影响 cGMP-PKG 等信号途径,发挥治疗作用 Administration of Yanghua Decoction has the potential to enhance neurological function deficits and daily life abilities in patients with acute ischemic stroke. This therapeutic effect may be attributed to the down-regulation of serum exosomes miR-9-3p/5p and miR-124-3p expression by Yanghua Decoction, subsequently influencing cGMP-PKG and other signaling pathways
复方[54-59,23] Compound	燥湿化痰饮 Zaoshi Huatan Decoction	胆南星、川芎、天麻、钩藤、石菖蒲、水蛭、僵蚕、红景天 Southern gall, Chuanxiong, Gastrodia, Hooker vine, Shichangpu, Hirudo, stiff silkworm, Rhodiola rosea	miRNA-124, mRNA-134	燥湿化痰饮可调节脑卒中后认知障碍患者外周血单个核细胞相关 miRNA 水平,减轻氧化应激损伤,改善认知功能,提高近期疗效 Zaoshi Huatan Decoction can effectively modulate the levels of miRNA associated with peripheral blood mononuclear cells in patients suffering from post-stroke cognitive impairment, thereby mitigating oxidative stress-induced injury, enhancing cognitive function, and improving short-term therapeutic outcomes
复方[54-59,23] Compound	和血生络方 Hexushengluo Decoction	黄芪、人参、川芎、当归、天麻、红景天、熟地、白芍、丹参、黄芩 Astragalus, Ginseng, Chuanxiong, Angelica, Gastrodia, Rhodiola rosea, Rehmannia glutinosa, Radix paeoniae alba, Salvia miltiorrhiza, and Radix scutellariae	miRNA-21, HIF-VEGF-Notch	和血生络方能够通过调节 miRNA-210 的表达,参与调控 HIF-VEGF-Notch 信号通路分子水平的变化,发挥缺血性脑卒中促血管新生的作用 Hexushengluo Decoction is capable of regulating the expression of miRNA-210, thereby participating in the molecular-level modulation of the HIF-VEGF-Notch signaling pathway and effectively promoting angiogenesis in ischemic stroke
复方[54-59,23] Compound	脑络欣通 Naoluoxintong	黄芪、三七、川芎、天麻、红花、当归、蜈蚣 Astragalus, Panax notoginseng, Ligusticum chuanxiong, Gastrodia elata, Carthamus tinctorius, Angelica dahurica, Centipede	NogoA/RhoA/ROCK	脑络欣通降低脑缺血再灌注损伤大鼠 NogoA 通路甲基化水平,抑制 NogoA/RhoA/ROCK 蛋白的表达,缓解神经胶质细胞的凋亡。 Administration of Naoluoxintong can effectively attenuate the methylation level of the NogoA pathway, suppress the expression of NogoA/RhoA/ROCK proteins, and ameliorate glial cell apoptosis in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

3 讨论

中医崇尚整体观念和辨证论治,表观遗传学的整体性、动态性、个体性、与环境相互作用的特点与中医的核心理念高度一致。中药能通过多靶点、全方位、和多途径干预表观遗传学。将表观遗传学与中医药结合是诊治中风病的新思路和新方法。研究表明,中风后表观遗传修饰涉及多个环节,中药通过调控异常表观遗传修饰治疗中风是新的研究方向[60]。目前中医药诊治中风表观遗传作用的研究尚未完全成熟,中药复方对表观遗传的调控在非编码 RNA 调控作用机制报道较多,DNA 甲基化和组蛋白修饰方面的研究较少。中医药治疗中风的研究应该利用现代科技,从分子生物学研究层面结

合临床研究,挖掘中医药的优势,形成中医药表观遗传医学知识网络,为中医药治疗中风提供科学依据及新的诊疗思路。

参考文献:

[1] Shakir R, Norrving B. Stroke in ICD-11: the end of a long exile [J]. Lancet, 2017, 389(10087): 2373.

[2] Cullell N, Soriano-TáRraga C, Gallego-FáBrega C, et al. DNA methylation and ischemic stroke risk: an epigenome-wide association study [J]. Thromb Haemost, 2022, 122(10): 1767-78.

[3] Tang J, Zhuang S. Histone acetylation and DNA methylation in ischemia/reperfusion injury [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(4): 597-609.

[4] Hu Z, Zhong B, Tan J, et al. The emerging role of epigenetics in cerebral ischemia [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(3): 1887-1905.

[5] Tuttolomondo A. Ischemic stroke pathogenesis: genetics, epigenetics and inflammation [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(34): 4207-4208.

[6] Kao MH, Lin TN. Histone deacetylases in stroke [J]. Chin J Physiol, 2019, 62(3): 95-107.

[7] 张宏亮, 蔡云, 朱冰梅. 表观遗传学在中医药研究中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2504-2506.

[8] Zhu D, Li A, Lv Y, et al. Traditional Chinese medicine: a class of potentially reliable epigenetic drugs [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 907031.

[9] 王萍, 杨海燕, 王丽萍, 等. 从表观遗传学开展复杂性疾病证候本质的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1208-1210.

[10] 刘敏, 刘喜德, 王安琪, 等. 中医药对表观遗传学影响的研究进展 [J]. 新中医, 2018, 50(1): 131-134.

[11] Hua M, Fan J, Dong H, et al. Integrating traditional Chinese medicine into Chinese medical education reform: issues and challenges [J]. Int J Med Educ, 2017, 8: 126-127.

[12] Zhao ZZ. Retrospect and prospect of higher education in Chinese medicine in Hong Kong, China [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(7): 494-495.

[13] Zhang SF, Mao XJ, Jiang WM, et al. Qian Yang Yu Yin Granule protects against hypertension-induced renal injury by epigenetic mechanism linked to Nicotinamide N-Methyltransferase (NNMT) expression [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 255: 112738.

[14] Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(10): 590-607.

[15] Jobe EM, Zhao X. DNA methylation and adult neurogenesis [J]. Brain Plast, 2017, 3(1): 5-26.

[16] Choi IA, Lee CS, Kim HY, et al. Effect of inhibition of DNA methylation combined with task-specific training on chronic stroke recovery [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 2019.

[17] Dock H, Theodorsson A, Theodorsson E. DNA methylation inhibitor zebularine confers stroke protection in ischemic rats [J]. Transl Stroke Res, 2015, 6(4): 296-300.

[18] Wang C, Xu G, Wen Q, et al. CBS promoter hypermethylation increases the risk of hypertension and stroke [J]. Clinics (Sao Paulo), 2019, 74: e630.

[19] Lee HA, Hong SH, Kim JW, et al. Possible involvement of DNA methylation in NKCC1 gene expression during postnatal development and in response to ischemia [J]. J Neurochem, 2010, 114(2): 520-529.

[20] van Meurs JB, Pare G, Schwartz SM, et al. Common genetic loci influencing plasma homocysteine concentrations and their effect on risk of coronary artery disease [J]. Am J Clin Nutr, 2013, 98(3): 668-676.

[21] Kadir RRA, Alwjwaj M, Bayraktutan U. MicroRNA: an emerging predictive, diagnostic, prognostic and therapeutic strategy in ischaemic stroke [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(5): 1301-1319.

[22] Yang Z, Wang L, Zhang W, et al. Plasma homocysteine involved in methylation and expression of thrombomodulin in cerebral infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 473(4): 1218-1222.

[23] Hong L, Chen W, He L, et al. Effect of Naoluoxintong on the NogoA/RhoA/ROCK pathway by down-regulating DNA methylation in MCAO rats [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114559.

[24] Eyileten C, Wicik Z, de Rosa S, et al. MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in ischemic stroke-a comprehensive review and bioinformatic analysis [J]. Cells, 2018, 7(12): 249.

[25] Mirzaei H, Momeni F, Saadatpour L, et al. MicroRNA: Relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 856-865.

[26] Liu X, Fan B, Chopp M, et al. Epigenetic mechanisms underlying adult post stroke neurogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(17): 6179.

[27] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4): 675-687.

[28] Stanzione R, Cotugno M, Bianchi F, et al. Pathogenesis of ischemic stroke: role of epigenetic mechanisms [J]. Genes (Basel), 2020, 11(1): 89.

[29] Liu P, Zhao H, Wang R, et al. MicroRNA-424 protects against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in mice by suppressing oxidative stress [J]. Stroke, 2015, 46(2): 513-519.

[30] Li G, Ma Q, Wang R, et al. Diagnostic and immunosuppressive potential of elevated mir-424 levels in circulating immune cells of ischemic stroke patients [J]. Aging Dis, 2018, 9(2): 172-181.

[31] Pena-Philippides JC, Caballero-Garrido E, Lordkipanidze T, et al. *In vivo* inhibition of miR-155 significantly alters post-stroke

inflammatory response [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 287.

[32] Xing G, Luo Z, Zhong C, et al. Influence of miR-155 on cell apoptosis in rats with ischemic stroke: role of the ras homolog enriched in brain (rheb)/mTOR pathway [J]. Med Sci Monit, 2016, 22: 5141-5153.

[33] Caballero-Garrido E, Pena-Philippides JC, Lordkipanidze T, et al. *In vivo* inhibition of miR-155 promotes recovery after experimental mouse stroke [J]. J Neurosci, 2015, 35(36): 12446-12464.

[34] Jiang T, Zhou S, Li X, et al. MicroRNA-155 induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury through regulation of the Notch pathway *in vivo* [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 605-613.

[35] 张洋, 陈美月, 崔莹, 等. 丹参酮ⅡA 对缺氧缺血性脑病新生大鼠海马组织中 miR-132 表达的调节作用及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(4): 905-914.

[36] Qiu M, Xu E, Zhan L. Epigenetic regulations of microglia/macrophage polarization in ischemic stroke [J]. Front Mol Neurosci, 2021, 14: 697416.

[37] Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(11): 703-708.

[38] Patnala R, Arumugam TV, Gupta N, et al. HDAC inhibitor sodium butyrate-mediated epigenetic regulation enhances neuroprotective function of microglia during ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(8): 6391-6411.

[39] Xuan A, Long D, Li J, et al. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats [J]. Life Sci, 2012, 90(11-12): 463-468.

[40] Kim HJ, Rowe M, Ren M, et al. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321(3): 892-901.

[41] Faraco G, Pancani T, Formentini L, et al. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(6): 1876-1884.

[42] Qi X, Hosoi T, Okuma Y, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 899-908.

[43] Baltan S, Murphy SP, Danilov CA, et al. Histone deacetylase inhibitors preserve white matter structure and function during ischemia by conserving ATP and reducing excitotoxicity [J]. J Neurosci, 2011, 31(11): 3990-3999.

[44] Baltan S, Morrison RS, Murphy SP. Novel protective effects of histone deacetylase inhibition on stroke and white matter ischemic injury [J]. Neurotherapeutics, 2013, 10(4): 798-807.

[45] Yuan Z, Syed MA, Panchal D, et al. Curcumin mediated epigenetic modulation inhibits TREM-1 expression in response to lipopolysaccharide [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(11): 2032-2043.

[46] Zhu X, Li Q, Cng R, et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/CBP histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and cox-2 in a rat model [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91303.

[47] Kalani A, Kamat PK, Kalani K, et al. Epigenetic impact of curcumin on stroke prevention [J]. Metab Brain Dis, 2015, 30(2): 427-435.

[48] 马敏儿, 黄浩华, 吴丽霞, 等. 鸡血藤总黄酮对急性缺血性脑卒中大鼠肠道屏障功能、氧化应激及 ERK 基因表达与 DNA 甲基化的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(2): 437-443.

[49] 杨鎏鑫. 三七总皂苷通过 miRNA 调控网络影响缺血性脑卒中大鼠脑神经血管单元超微结构的机制探讨 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2022.

[50] 万群. 人参皂苷 Rd 通过组蛋白乙酰化调控 BDNF 对低灌注脑损伤小鼠保护作用的研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.

[51] 徐慧, 张民远, 戴勤学. miR-145 通过调节 SOD 活性介导人参皂苷 Rb1 对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(11): 1215-1220.

[52] 庞雨浓, 梁英文, 王玉刚, 等. 小檗碱通过调节 PPARγ 启动子甲基化对缺血再灌注脑损伤的作用(英文) [J]. 中国药学(英文版), 2018, 27(3): 170-182.

[53] Zhang L, Li C, Wang S, et al. Tetrahydrocurcumin-related vascular protection: an overview of the findings from animal disease models [J]. Molecules, 2022, 27(16): 5100.

[54] Mo C, Lin S, Li Z, et al. Qilong capsule alleviated MPTP-induced neuronal defects by inhibiting apoptosis, regulating autophagy in zebrafish embryo model [J]. Chem Biodivers, 2023, 20(3): e202200926.

[55] 徐雅倩, 陈博威, 田丰铭, 等. 补阳还五汤对 Cav-1$^{-/-}$小鼠脑缺血后 m^{6}A 修饰和血管新生的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(7): 68-73.

[56] 孙诗杰. 温阳逐瘀汤对肾阳虚证大鼠局灶性脑缺血后微小 RNA-210 及其靶基因的影响 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.

[57] 陈梓焜. 阳化汤对缺血性中风急性期阳虚证患者血清外泌体 miRNA 调控机制研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.

[58] 郭艳平, 张赟, 张建刚, 等. 燥湿化痰饮辅助治疗脑卒中后认知障碍的效果研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 75-77.

[59] 梁策. 和血生络方通过 miRNA-210 调节 HIF-VEGF-Notch 信号通路干预脑缺血大鼠血管新生机制研究 [D]. 石家庄: 河北中医学院, 2019.

[60] 刘晶, 古联, 杨怡冰, 等. 基于表观遗传学探讨中医药治疗缺血性脑卒中的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(8): 3715-3718.

〔收稿日期〕2023-02-22

王智洋,郑斯阳,朱亮. HIF-1α 信号通路在离体器官冷保存中的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 112-117.
Wang ZY, Zheng SY, Zhu L. Protective effects of the HIF-1α pathway on cold storage of isolated organs [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 112-117.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.017

HIF-1α 信号通路在离体器官冷保存中的保护作用

王智洋#,郑斯阳#,朱 亮*

(大连医科大学基础医学院,辽宁 大连 116085)

【摘要】 器官移植是机体器官功能衰竭的主要治疗方法,而供体器官在离体运输过程中的功能保护是决定器官移植成功与否的关键,如何保护离体运输过程中的供体器官功能是当今器官移植研究领域的热点问题之一。在低氧环境下,组织细胞会激活一系列基因的转录活性,这些基因参与血管生成、铁代谢、葡萄糖代谢和细胞增殖/生存。在需氧生物体内,缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factors-1α,HIF-1α)参与多种基因表达的调控,以维持组织、细胞在缺氧条件下的内环境稳态,从而适应缺氧状态。多项研究表明,HIF-1α 信号通路在离体器官冷保存过程中,对其遭受的冷缺血损伤具有重要保护作用,是当前离体器官冷缺血损伤保护机制的研究热点,干预 HIF-1α 相关信号通路有望成为离体器官冷保存过程中维护器官功能的新策略。

【关键词】 缺氧诱导因子 1α;冷保存;器官移植;能量代谢;氧化应激
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0112-06

Protective effects of the HIF-1α pathway on cold storage of isolated organs

WANG Zhiyang#, ZHENG Siyang#, ZHU Liang*
(School of Basic Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116085, China)

【Abstract】 Organ transplantation is the main treatment for organ failure. Functional protection of donor organs during *ex vivo* transportation is critical for the success of organ transplantation. How to protect the functions of donor organs during *in vitro* transportation is an important issue in the field of organ transplantation research. In a hypoxic environment, transcriptional activity of a series of genes in cells is activated. These genes are mainly involved in angiogenesis, iron metabolism, glucose metabolism, and cell proliferation/survival. In aerobic organisms, hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) is involved in the regulation of the expression of various genes to maintain homeostasis of tissues and cells under hypoxic conditions, thereby adapting to the hypoxia. Many studies have shown that the HIF-1α pathway plays an important role in protecting isolated organs from cold ischemic injury during cold storage. HIF-1α has been a hot topic in research on the protective mechanism of cold ischemic injury of isolated organs. Regulating the HIF-1α-related signaling pathway is expected to be a new strategy to maintain organ functions during cold storage of isolated organs.

【Keywords】 hypoxia-inducible factor 1α; cold storage; organ transplantation; metabolism; oxidative stress
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

哺乳动物的生理功能需要充足的氧气供应以执行有氧代谢和能量产生[1]。在心脏病、器官移植冷保存过程中,人体组织由于急慢性缺血,细胞会进入到低氧水平。在这种恶劣的细胞环境中,缺氧

[基金项目]辽宁省教育厅重点攻关科研项目(LZ2020002);2023 辽宁省应用基础研究计划(2023JH2/1668150732551);国家重点实验室开放基金(BYSYSZKF2022003)。
[作者简介]王智洋(1994—),男,硕士研究生,研究方向:器官移植与重建基础研究。E-mail:243720589@qq.com
郑斯阳(1998—),女,硕士,研究方向:器官移植与重建基础研究。E-mail:396666828@qq.com #共同第一作者
[通信作者]朱亮(1974—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:器官移植与重建基础研究。E-mail:zhuliang@dmu.edu.cn

诱导因子-1α(hypoxia-inducible factors-1α,HIF-1α)的转录激活是公认的细胞适应缺氧环境的重要途径。离体器官冷保存过程中造成的冷缺血损伤,主要是由于低温、缺氧、氧自由基大量产生等一系列因素造成的。这种冷缺血损伤是影响器官移植成功率以及受体存活率的直接因素之一。本文将对器官移植、HIF-1、HIF-1α 的生物学特性以及其在离体器官冷保存过程中的研究现状加以综述。

1 器官移植现状及面临问题

器官移植是器官终末期疾病最有效的治疗方法。在 20 世纪随着科学技术的飞速发展,器官移植领域的相关技术亦随之发展起来,器官移植技术的建立与发展成为了 21 世纪以来生物医疗领域最重要进展之一,并成为世界医学范围内讨论的热点。伦理学是器官移植领域面临的首要问题。目前为止,器官移植仍然受到供体器官缺乏的限制,尽管我们在器官的采购以及器官的保存方面采取了多样性措施,也提高了“边缘性器官”(例如来自患有代谢性疾病比如糖尿病、高血压、轻度器官障碍等的老年人群捐赠的器官)的接受率,以及同一机体其他器官患病人群的捐赠(例如甲型肝炎等患者捐赠的心脏),又或者已经接受了因为其他原因的非正常死亡捐赠者的器官,但仍然无法满足临床需求[2]。在有限的供体范围内,我们还会经常遇到供体与受体因地域距离较远,无法保证在短时间内将供体的器官及时运送至受体,导致无法完成器官移植手术的情况。因此如何延长离体器官的有效保存时间,也是当前器官移植面临的一个现实问题。冷保存是目前被证明最行之有效的离体器官保存方法,而在冷保存过程中冷缺血损伤是导致离体器官功能损伤的主要原因,如何最大限度地降低冷缺血损伤、维护离体器官功能是决定器官移植成败的关键因素。

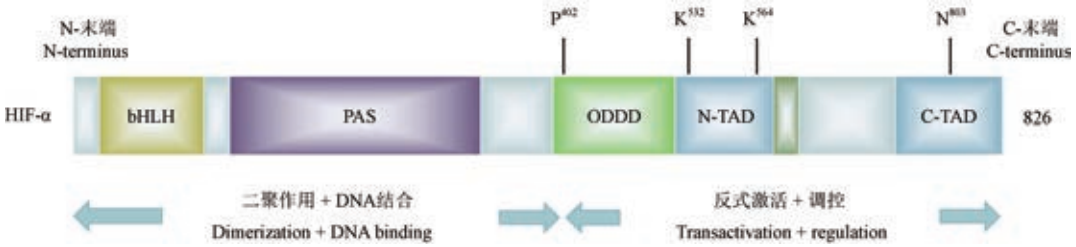
2 离体器官短期保存现状

器官移植中供体的保存方法一般包括低温保存和灌注保存。器官在保存液中浸润状态下保存,称为低温保存。一般情况下,器官温度下降至 0~10℃时,器官代谢率会减至正常水平的 5%~10%,可有效抑制器官热缺血损伤。目前,器官冷保存也在从单一性模式:将 4℃ 的 UW(the University of Wisconsin Solution)灌流液以一定高度借助重力或使用微量注射泵快速灌入冠状动脉系统内,使该器官的温度迅速而均匀地下降到 4℃左右,然后浸入 0~4℃保存液中直到移植,逐渐转变为最大限度地模拟体内生理微环境的复合型模式[3],该过程可以最大程度地减少器官热缺血期造成的损伤。通过降低缺血组织的温度抑制移植物新陈代谢,可以有效提高离体器官存活能力[4]。但是长期低温保存会使器官由于冷缺血、缺氧等因素导致细胞水肿、组织酵解和乳酸增多,产生的代谢产物不能排出,蓄积于微环境中造成一系列损伤等结果[5]。如何降低冷缺血损伤成了器官移植冷保存中亟待解决的问题。不同冷保存液的组分不同、功效不一,研究者们一直在尝试在冷保存液中通过能量底物的补给、渗透压的改变、pH 的调整等手段,使供体器官延长保存周期,减少冷缺血造成的伤害。

3 HIF-1 及 HIF-1α 生物学特点

HIF-1 是在鉴定促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)3’端增强子的缺氧反应元件(hypoxia response element,HRE)过程中被发现的,该蛋白质结构中含有两个亚基:缺氧诱导型亚基 α 和结构表达型亚基 β(也被称为芳烃核转位子)。HIF-1α 的转录和合成是连续的,并不受氧浓度的影响,但在常氧量状态下,HIF-1α 因其氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain,ODDD)的羟基化、乙酰化和泛素化而被 26S 蛋白酶迅速降解[6](图 1),低氧条件下 HIF-1α 的羟基化被抑制,因此结构会变得稳定并移入细胞核内,与核内 HIF-1β 形成异二聚体 HIF-1 复合物,同时激活转录活性。激活的 HIF1 复合物随后与靶基因调控区域的 HRE 结合,并结合转录共激活因子(如 CBP/p300)以诱导基因表达[7]。

在随后的研究中,研究人员又发现了缺氧诱导因子-2α(hypoxia inducible factors-1α,HIF-2α)和缺氧诱导因子-3α(hypoxia inducible factors-3α,HIF-3α),这两种蛋白亦能与 HIF-1β 形成异二聚体,与靶基因的缺氧反应调控序列(hypoxia-responsive element,HRE)结合。三者虽都属于 HIF 家族成员,但三者之间又有较大区别,如 HIF-2α 虽有 48%的氨基酸序列与 HIF-1α 相同[8],但并不像 HIF-1α 表达那么广泛,HIF-2α 主要表达在肺、内皮和颈动脉体;HIF-3α 的一种剪接体则可与 HIF-1α 氨基末端相互作用,阻止 HIF-1α 与靶基因 DNA 的结合,起到



注:HIF-1α 的结构域都含有碱性区域-螺旋环-螺旋环(bHLH)、Per-Arnt-SIM(PAS)、氧依赖降解结构域(ODDD),以及在 COOH 端的两个独立的反式激活结构域,氨基末端反式激活结构域(N-TAD)和 COOH 端反式激活结构域(C-TAD)。N-TAD 参与结构的稳定,C-TAD 参与调节缺氧条件下的转录激活,而氧依赖降解结构域(ODDD)是泛素-蛋白酶体途径在常氧条件下降解所必需的元件。

图 1 HIF-1α 的结构域

Note. Domains of HIF-1α all contain the basic region-helical ring-helical ring (bHLH), Per-Arnt-SIM (PAS), oxygen-dependent degradation domain (ODDD), and two independent trans-activation domains at the COOH terminal. The amino terminal trans-active domain (N-TAD) and the COOH terminal trans-active domain (C-TAD). N-TAD is involved in structural stabilization, C-TAD is involved in regulating transcriptional activation under hypoxic conditions, and the oxygen-dependent degradation domain (ODDD) is an element necessary for the degradation of the ubiquitin-proteasome pathway under normoxic conditions.

Figure 1 Domain of HIF-1α

了显性负调节 HIF-1 的作用。目前关于 HIF-1α 和 HIF-2α 的研究较为广泛,对于 HIF-3α 和其他亚型的研究较少。

4 HIF-1α 对离体器官的保护作用

HIF-1α 作为一种只有在缺氧状态下才可稳定表达的转录因子,在离体器官冷保存阶段,不仅可以通过对其下游一系列细胞内信号通路的调控,减少氧气的消耗,提高三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate,ATP)的生成,还可以抑制相关炎性通路,减少细胞凋亡,从多方面对离体器官冷保存阶段起到保护作用。

4.1 HIF-1α 与离体器官冷缺血损伤

HIF-1α 是细胞内非常重要的核转录因子,它所调控的下游靶基因与细胞增殖、能量代谢等有着非常密切的联系[6]。在离体器官冷保存过程中,HIF-1α 的表达对器官冷缺血损伤的调控起到重要作用。HIF-1α 转录活性的激活主要是由氧浓度调节,有研究结果表明,在器官冷缺血状态下,HIF-1α 可诱导己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)和丙酮酸脱氢酶激酶 1(pyruvate dehydrogenase kinase 1,PDK1)的表达增加,促进细胞对葡萄糖的摄取、乳酸生成以适应细胞无氧状态[9]。另一方面,相关研究表明,在缺氧条件下,细胞共济蛋白(Frataxin)会受到 HIF-1α 的调节[10],在冷缺血状态下,HIF-1α 可能会促进 Frataxin 的表达增加,激活功能性缺氧反应元件,减轻线粒体铁超载和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,从而保护细胞功能。目前研究发现,离体器官冷缺血条件下通过 HIF-1α 信号通路对抗损伤的过程不仅局限于心脏,还有肝、肾、小肠等多个组织器官。作为一种在缺氧环境下起到重要作用的转录因子,HIF-1α 已被证实在缺血性心脏病等重大疾病及离体器官冷保存过程中的冷缺血、器官缺血再灌注等移植损伤中发挥重要作用,它可在器官缺血缺氧条件下,在一定限度内促进糖原储备、提高 ATP 的合成,使细胞迅速适应缺氧环境并促进细胞修复[11]。

4.2 HIF-1α 与细胞凋亡

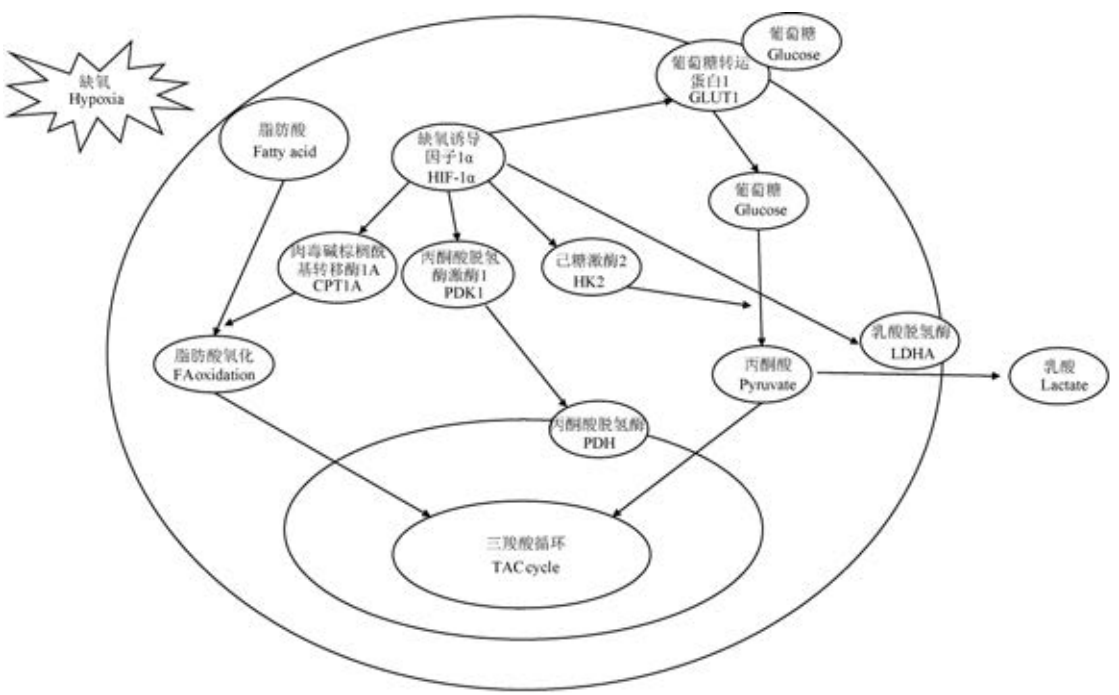
Liu 等[12]研究表明缺氧状态下细胞中的 HIF-1α 表达增加,通过与微小 RNA21(MicroRNA21, miR-21)启动子结合,在转录水平增强 miR-21 的表达。miR-21 一方面对磷酸酶基因(mutated in multiple advanced cancers 1,PTEN)产生抑制效应,另一方面又反馈刺激 HIF-1α 表达,最终产生激活 AKT 信号通路的作用,抑制细胞凋亡。同时,HIF-1α 亦为 AKT 信号通路的下游因子,AKT 的激活又会进一步刺激 HIF-1α 表达,通过反馈调节环路,使细胞迅速适应缺氧环境,产生细胞保护效应。但亦有研究显示,心肌梗塞导致的缺氧状态下,HIF-1α 表达增加可抑制 miR-10b-5p 的表达,导致 miR-10b-5p 对 PTEN 的抑制作用减弱,产生 AKT 信号通路的抑制效应,加速了细胞凋亡[13]。前者结论来源于离体细胞培养,后者结论来源于在体动物实验,说明 HIF-1α 在不同环境下对细胞凋亡的作用有所差异,那么在离体器官冷保存过程中 HIF-1α 在细胞凋亡中的作用还需深入研究。

4.3　HIF-1α 与离体器官能量代谢

离体器官冷保存过程中由于外环境温度过低，同时由于器官处于缺血、缺氧状态，有氧代谢无法进行，此时细胞的 ATP 水平、能量代谢水平、线粒体的功能等都受到极大的抑制。而 HIF-1α 可以通过增加糖酵解通量，将葡萄糖有氧氧化转化为无氧糖酵解，为细胞提供 ATP，进而在器官冷保存期间起到保护性作用[14]。HIF-1α 在离体器官冷保存阶段对器官的保护作用主要通过调节一系列 HIF-1α 下游能量代谢关键酶来进行，包括抑制脂肪酸氧化关键限速酶及促进糖酵解关键酶的表达等，从抑制脂肪酸氧化减少 ATP 的消耗和促进糖酵解生成 ATP 两方面，提高细胞内 ATP 的水平实现器官保护作用（图 2）。虽然 HIF-1α 在缺血、缺氧状态下，可通过促进糖酵解通路提高 ATP 的生成，从而保护细胞[15]，但是随着时间延长，细胞内乳酸堆积过多，则会造成细胞乳酸酸中毒，产生危害作用，导致细胞死亡[16]。所以对 HIF-1α 糖酵解通路的时间节点及副产物毒理作用的探究还需深入研究，以期为临床离体器官冷保存提供更为确切的实验数据支持。

4.4　HIF-1α 与细胞的氧化应激

氧化应激被认为是器官损伤的重要机制之一。缺氧状态下，HIF-1α 被激活。如图 3 所示，HIF-1α 可以通过促进 miR-21、PDK1、HK2、Frataxin、乳酸脱氢酶 A（lactate dehydrogenase A，LDHA）、葡萄糖转运体（glucose transporter type 1，GLUT1）等下游靶基因，以及抑制 microRNA-10b-5p（miR-10b-5p）等因子的表达，对离体器官冷缺血损伤起到了保护作用。目前的研究表明，HIF-1α 在对抗氧化应激中发挥着重要作用，增加 HIF-1α 的表达可使线粒体氧化应激减少并抑制线粒体通透性转换孔（mitochondrial permeability transition pore，MPTP）的开放，有效减少了细胞凋亡[17]；有相关研究表明，HIF-1α 可促进 Frataxin 的表达增加，激活功能性缺氧反应元件，减



注：HIF-1α 在离体器官冷保存过程中可以抑制肉毒碱棕榈酰基转移酶（CPT1A）来抑制心肌细胞中的 β 氧化，同时可以激活葡萄糖转运蛋白 1（GLUT1）进而提高心肌细胞对葡萄糖的利用，通过刺激己糖激酶 2（HK2）和丙酮酸脱氢酶激酶 1（PDK1）来促进丙酮酸的生成并抑制丙酮酸进入三羧酸循环，并且可以促进乳酸脱氢酶 A（LDHA）的表达来促进糖酵解终产物丙酮酸的进一步产物乳酸的生成。

图 2　HIF-1α 调控脂肪酸代谢及糖酵解代谢通路

Note. HIF-1α can inhibit carnitine palmitoyl transferase (CPT1A) to inhibit β oxidation in cardiomyocytes during cold preservation of isolated organs, and can activate glucose transporter 1 (GLUT1) to improve the utilization of glucose by cardiomyocytes. Stimulating hexokinase 2 (HK2) and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) promotes the production of pyruvate and inhibits the entry of pyruvate into the tricarboxylic acid cycle, and can promote the expression of lactate dehydrogenase A (LDHA) to promote the production of lactic acid, a further product of the glycolytic end product pyruvate.

Figure 2　HIF-1α regulates fatty acid metabolism and glycolytic metabolic pathways

图 3 HIF-1α 对器官冷缺血损伤拮抗通路机制总结

Figure 3 Antagonistic pathway mechanism of HIF-1α on organ cold ischemia injury

轻线粒体铁超载和 ROS 产生,保持线粒体膜的完整性和细胞活力[18]。在急性缺血状态下,HIF-1α 通过下游基因的蛋白产物,如:LDHA,丙酮酸脱氢酶激酶 3(pyruvate dehydrogenase kinase 3,PDK3),环氧化酶 4-2(cyclooxygenase 4-2,COX4-2)等抑制线粒体氧化代谢[19-20],也可诱导 miR-29c 上调,从而抑制钙泵-2(SERCA2)。一氧化氮在常氧状态下可以诱导 HIF-1α 的表达,相反的在缺氧状态下,其可以抑制缺氧诱导的 HIF-1α 的表达,这体现了一氧化氮(nitric-15n oxide,NO)影响 HIF-1α 的双面性[21]。缺氧诱导 HIF-1α 反式激活结构域与共激活剂会产生相互作用,相关研究明确表明此过程涉及活性氧的产生,但信号转导途径仍然不得而知,但 HIF-1α 通过调节相关下游靶点,对离体器官在冷保存过程中产生的冷缺血损伤起到积极作用,这种效应已经被广泛证实。

5 总结与展望

HIF-1α 在器官保存领域将会受到越来越多的关注[22]。已有多项研究证实,与静态冷保存等传统保存方法相比,通过对 HIF-1 相关通路的干预,可以有效地减少热缺血时段的伤害,延长冷缺血保存的时间,这些研究无疑不是在说明 HIF-1α 在器官冷保存领域有着很好的研究价值及探索前景[23]。

有趣的是,在器官移植缺血再灌注及氧化应激损伤方面,HIF-1α 的作用似乎与冷保存阶段恰恰相反。这提示我们 HIF-1α 的作用并不仅仅是单一的保护或损害,更多的可能与器官的生理状态、保存条件、热缺血时间、温度、pH 等外界因素的诱导或刺激有着密不可分的联系。目前关于 HIF-1α 与离体器官冷冻保存功能相关研究较少,根据现阶段的文献检索,HIF-1α 在心脏及肝移植冷保存过程中均起到了功能保护性作用,但相关机制并未被阐明。因此,无法确定 HIF-1α 在不同类型器官冷冻保存中的功能机制是否有差异。随着相关研究的进展,HIF-1α 在立体器官冷保存和缺血再灌注损伤中的作用逐渐被研究者深入了解,如何有效利用不同阶段 HIF-1α 的生物学效应以提高临床器官移植成功率,揭示 HIF-1α 生物学作用的分子机制并深入探讨 HIF-1α 在不同离体器官中的作用机制,以及如何在临床离体器官冷冻保存中应用这些机制,以提高器官的保存质量和保存时间是首要任务。这还需要研究者通过大量的实验研究提供更多数据支持。

参考文献:

[1] Squara P. Central venous oxygenation: when physiology explains apparent discrepancies [J]. Crit Care, 2014, 18(6): 579.

[2] Rudge C, Matesanz R, Delmonico FL, et al. International practices of organ donation [J]. Br J Anaesth, 2012, 108: i48-i55.

[3] Zhao L, Hu C, Han F, et al. Combination of mesenchymal stromal cells and machine perfusion is a novel strategy for organ preservation in solid organ transplantation [J]. Cell Tissue Res, 2021, 384(1): 13-23.

[4] Brenman-Suttner DB, Long SQ, Kamesan V, et al. Progeny of

old parents have increased social space in Drosophila melanogaster [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3673.
[5] Ma LN, Huang XB, Muyayalo KP, et al. Lactic acid: a novel signaling molecule in early pregnancy? [J]. Front Immunol, 2020, 11: 279.
[6] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(4): 207-214.
[7] Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2 [J]. Physiol Rev, 2012, 92(3): 967-1003.
[8] Luo D, Wang Z, Wu J, et al. The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 409272.
[9] Li B, Zhu Y, Sun Q, et al. Reversal of the Warburg effect with DCA in PDGF-treated human PASMC is potentiated by pyruvate dehydrogenase kinase-1 inhibition mediated through blocking Akt/GSK-3β signalling [J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1391-1400.
[10] Guccini I, Serio D, Condò I, et al. Frataxin participates to the hypoxia-induced response in tumors [J]. Cell Death Dis, 2011, 2(2): e123.
[11] Sun G, Zhou Y, Li H, et al. Over-expression of microRNA-494 up-regulates hypoxia-inducible factor-1α expression via PI3K/Akt pathway and protects against hypoxia-induced apoptosis [J]. J Biomed Sci, 2013, 20(1): 100.
[12] Liu Y, Nie H, Zhang K, et al. A feedback regulatory loop between HIF-1α and miR-21 in response to hypoxia in cardiomyocytes [J]. FEBS Lett, 2014, 588(17): 3137-3146.
[13] Wu L, Chen Y, Chen Y, et al. Effect of HIF-1α/miR-10b-5p/PTEN on hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(18): e011948.
[14] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandes MS, et al. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling [J]. Circ Res, 2018, 122(6): 877-902.
[15] Li L, Yang L, Fan Z, et al. Hypoxia-induced GBE1 expression promotes tumor progression through metabolic reprogramming in lung adenocarcinoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 54.
[16] Taylor MR, Hurley JB, van Epps HA, et al. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(13): 4584-4589.
[17] Ong SG, Lee WH, Theodorou L, et al. HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore [J]. Cardiovasc Res, 2014, 104(1): 24-36.
[18] Nanayakkara G, Alasmari A, Mouli S, et al. Cardioprotective HIF-1α-frataxin signaling against ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015, 309(5): H867-H879.
[19] Jha P, Das H. KLF2 in regulation of NF-κB-mediated immune cell function and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2383.
[20] Wang G, Li Y, Yang Z, et al. ROS mediated EGFR/MEK/ERK/HIF-1α loop regulates glucose metabolism in pancreatic cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(4): 873-878.
[21] Díez I, Calatayud S, Hernández C, et al. Nitric oxide, derived from inducible nitric oxide synthase, decreases hypoxia inducible factor-1alpha in macrophages during aspirin-induced mesenteric inflammation [J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(8): 1636-1645.
[22] Winder GS, Clifton EG. The 21st Century Cures Act and psychosocial electronic documentation in solid organ transplantation: Potential harms and practical strategies [J]. Am J Transplant, 2022, 22(12): 2781-2785.
[23] Lee P, Chandel NS, Simon MC. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(5): 268-283.

〔收稿日期〕2023-08-01

金剑,常慧,黄和缓,等. 大气污染物与部分不良妊娠结局的关系［J］. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 118-122.
Jin J, Chang H, Huang HH, et al. Relationship between atmospheric pollutants and some adverse pregnancy outcomes［J］. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 118-122.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.018

大气污染物与部分不良妊娠结局的关系

金 剑[1#],常 慧[1,2#],黄和缓[1],彭 瑞[1],赵 冰[1],张小安[1,3*]

(1.郑州大学第三附属医院,郑州 450000;2.西安交通大学公共卫生学院,西安 710000;
3.河南科技大学,河南 洛阳 471000)

【摘要】 随着中国经济的迅速发展和城市化进程的持续加速,大气污染问题日益凸显,对人类健康产生了极大的影响。最近几年来,国内外的研究工作大量涌现,研究结果显示,在妊娠期间接触大气污染物和不良妊娠结果之间存在一定的相关性,大气污染对孕妇和胎儿健康的影响随之受到更多的重视。本文主要就大气污染物对部分不良妊娠结局的影响及其可能的生物学机作一简要综述。

【关键词】 大气污染物;$PM_{2.5}$;早产;低出生体重;死胎;出生缺陷
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2023) 12-0118-05

Relationship between atmospheric pollutants and some adverse pregnancy outcomes

JIN Jian[1#], CHANG Hui[1,2#], HUANG Hehuan[1], PENG Rui[1], ZHAO Bing[1], ZHANG Xiaoan[1,3*]
(1. the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China.
2. School of Public Health, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000.
3. Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000)

【Abstract】 The rapid development of the Chinese economy and the continuous advancement of urbanization have made the problem of air pollution more prominent, which may have an impact on people's health. In recent years, a large number of studies have emerged in the academic community both domestically and internationally. Many cohort studies have shown that during pregnancy, the surrounding air pollutants are relatively high, which may increase the risk of adverse pregnancy outcomes. So now people are paying more attention to the impact of air pollutants on the health of pregnant women or fetuses. This article provides a brief review of the impact of atmospheric pollutants on some adverse pregnancy outcomes and their possible biological mechanisms.

【Keywords】 atmospheric pollutants; $PM_{2.5}$; premature birth; low birth weight; stillbirth; birth defect
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

大气污染[1]是指由于自然和人为的原因使大气中一些物质的含量远超其正常含量,因而对人、动植物和其他物体产生不良影响的大气状况。大气污染物由颗粒物以及氮氧化物、SO_2、臭氧等气体

[基金项目]河南省重大公益专项(201300310800);河南省重点研发与推广专项科技攻关项目(222102310418,212102310443)。
[作者简介]金剑(1986—),男,硕士,研究方向:神经药理研究。E-mail:jinjian86@zzu.edu.cn
常慧(1988—),女,博士研究生,研究方向:围产期疾病预防研究。E-mail:changhui@zzu.edu.cn #共同第一作者
[通信作者]张小安(1964—),男,博士,教授,研究方向:妇幼相关疾病早期诊断研究。E-mail:zxa@zzu.edu.cn

混合而成。大量国内外文献研究已证实,大气污染危害人类健康。妊娠期间,由于孕妇新陈代谢加快、呼吸运动增强,通过呼吸进入肺泡的气体增多,大气污染物对其影响也随之增大。若孕妇暴露于大气污染环境,大气污染物将更多经过肺泡进入血液,经胎盘进入胎儿体内,从而影响胎儿的生长发育,进而导致不良妊娠结局的发生。近年来,大气污染物对人类健康,尤其是孕妇和胎儿健康的影响备受关注,多项流行病学研究已经证实,妊娠期暴露于大气污染物与早产、低出生体重儿、死胎、出生缺陷等不良妊娠结局相关[2-4]。本文主要就大气污染物对部分不良妊娠结局的影响及其可能的生物学机作一简要综述。

1 大气污染物与早产

早产[5]是指妊娠满 28 周但不足 37 周时胎儿娩出的情况,这种情况下娩出的新生儿被称为早产儿,其体重范围通常在 1000~2499 g 之间。早产是新生儿死亡的重要因素之一,并与成年后多种慢性疾病的发生有着密切的相关性,例如冠心病、Ⅱ型糖尿病、高血压等。有国外研究表明,在妊娠期暴露于 $PM_{2.5}$、PM_{10} 等大气污染物与早产的发生存在相关性[6-8]。同时,北京、上海和广州等地也进行了相似的研究,这些结果提示了大气污染物浓度的升高与早产风险增加之间可能存在因果关系[9-11]。杨敏娟等[12]收集了上海市某区 2013 年 1 月 1 日~2013 年 12 月 31 日出生的新生儿数据,共纳入 38 083 名新生儿,其中 1782 例早产儿,通过环境监测系统获得了空气污染资料,控制早产的各类影响因素后,应用 Logistic 回归模型定量评价妊娠期大气污染物暴露对早产的影响,最终结果显示整个妊娠期大气中 SO_2、PM_{10} 浓度增加是早产的危险因素,只有当孕妇在怀孕的晚期接触 NO_2 时,才会增加早产的风险。

Ha 等[13]收集了 2004 年年初到 2005 年年底在佛罗里达州出生的 423 719 名新生儿的数据,空气污染数据为 $PM_{2.5}$ 和 O_3,研究显示,怀孕期间暴露于高浓度的 O_3 及 $PM_{2.5}$ 是早产发生的潜在风险因素,尤其是在孕中期,暴露于高浓度 $PM_{2.5}$($PM_{2.5} \geq 11.1\ \mu g/m^3$),孕妇未来将面临更高的早产风险(*OR* = 1.123, 95% *CI*: 1.109~1.138)。这项研究也将监测站数据作为暴露值,纳入了超过 100 000 名监测站方圆 8 km 内出生的新生儿,结果与前述一致。这提示,不同的大气污染物对早产的影响可能存在不同的敏感期,国内的相关研究也证实了这一推测[11,14-15]。

对于大气污染物与早产的关系,学术界也存在不同的观点。Hyder 等[16]分别利用大气监测和美国国家环保局的数据,观察了 2000 年~2006 年美国康涅狄格州和马萨诸塞州共计 834 332 名怀孕期间暴露于 $PM_{2.5}$ 的新生儿母亲的数据,他们发现,$PM_{2.5}$ 每增加 1 个四分位数(2.41 $\mu g/m^3$),早产的校正 *OR* 值分别为 1.00(95% *CI*: 0.99~1.02)、0.98(95% *CI*: 0.94~1.03)和 0.99(95% *CI*: 0.95~1.03),并没有发现 $PM_{2.5}$ 和早产之间具有相关性。这可能是污染物的组成和区域差异,以及气象因素的影响,致使全球各地的研究结果不一致。

目前关于妊娠期大气污染物暴露导致早产的机制尚无明确定论。有学者认为可能与污染物造成的胎膜损伤有关[13]。大气污染物通过直接或间接途径进入人体,引发广泛的炎症与氧化应激反应,激活蛋白酶,加速细胞外基质和胶原的分解,从而对胎膜的结构和抗张能力产生负面影响,最终导致胎膜破裂。此外,若氧化应激所引发的 DNA 损伤,不能得到有效的修复,便可能引发细胞凋亡,这也可能是胎膜变薄的原因之一[13]。

2 大气污染物与死胎

妊娠 20 周以后,胎儿在子宫内死亡,称为死胎[17]。据估计,2015 年国际上约有 260 万死胎。目前虽然大气污染物暴露与一些不良出生结局的研究受到关注,但重点关注死胎的研究为数不多。包竹青等[18]在对 1995 年~2013 年间开展的 12 个不同类型的关于大气污染物与死胎、死产关联强度的研究进行汇总后得出结论,SO_2、PM_{10} 等是造成死胎、死产的危险因素,但对于大气污染物造成死胎的敏感时期还没有定论。此外,少数研究评估了死胎与 $PM_{2.5}$ 之间的关系[19-20],然而相关文献研究结论并不一致。Green 等[19]在加利福尼亚进行的一项回顾性队列研究提示妊娠期 $PM_{2.5}$ 暴露与死胎风险增加有关。他们收集了 1999 年~2009 年间 13 999 例死产和 3 012 270 例活产的数据,使用回顾性队列设计和逻辑回归模型,计算了孕妇整个妊娠期间与 $PM_{2.5}$ 接触的死胎概率。得到的结论是:在整个妊娠期间,暴露于 $PM_{2.5}$ 的浓度每增加 10 $\mu g/m^3$,对应的死胎风险 *OR* 值为 1.06(95% *CI*: 0.99~1.13)。

Liang 等[21]以 2014 年至 2017 年间中国南方七个城市 1 273 924 名母亲和其娩出胎儿为研究对象,对出生队列的数据进行研究后,得出了一致的结论:他们发现整个妊娠期 $PM_{2.5}$ 的浓度每增加 10 μg/m^3,死胎的风险比(*HR*)为 1.52(95%*CI*:1.42~1.62);与妊娠早期(*HR*:1.44,95%*CI*:1.37~1.52)和妊娠晚期(*HR*:1.23,95%*CI*:1.16~1.30)相比,在妊娠中期(*HR*:1.67,95%*CI*:1.57~1.77)观察到的相关性相对更高,而且这种相关性与没有怀孕和分娩经历的孕妇对比更高,即妊娠中期母亲接触 $PM_{2.5}$,可能会增加死胎的风险,但母亲先前的妊娠和分娩经历可能会改变这种关联。而 DeFranco 等[22]在俄亥俄州进行的另一项研究表明,妊娠早期和妊娠中期高水平的 $PM_{2.5}$ 暴露对死胎的发生率没有显著的影响,妊娠晚期暴露于高水平的 $PM_{2.5}$ 与死胎风险的显著增加相关(*OR*:1.42,95%*CI*:1.06~1.91)。与此同时,Siddika 等[20]在对 13 篇文献进行 Meta 分析后发现死胎风险会随 $PM_{2.5}$ 暴露浓度有所增加。

然而,另一些研究报告得出了相反的结论。Zhu 等[23]在对 25 项观察性流行病学研究进行 meta 分析后发现,没有证据表明 $PM_{2.5}$ 暴露每增加 10 μg/m^3 对死胎风险有统计学显著影响(*OR*:1.18,95% *CI*:0.69~2.04)。$PM_{2.5}$ 在妊娠期间的暴露量的估计存在一定的困难,不同的研究人员所使用不同的研究方法可能导致研究结果不一致。

部分学者进行了大气污染物与死胎之间的机制研究。Mazzoli-Rocha 等[24]认为死胎的出现也许与大气污染物导致胎儿细胞的 DNA 损伤密切相关,一些污染物在体内代谢后的活化产物可能降低其 DNA 的修复效果,增加 DNA 突变率,或者污染物本身就具有致畸致突变的作用。另有研究提出氧化应激、炎症反应在死胎的发生中发挥了不可忽视的作用[25-26]。Mohorovic 等[27]研究则发现血液中的高铁血红蛋白水平可作为环境毒物对母亲和胎儿不利影响的一个有价值的生物标志物。

3 大气污染物与新生儿出生体重

出生时体重小于 2500 g 的新生儿称为低出生体重儿[28]。这种新生儿部分器官功能可能尚未发育完全,免疫力低下,易发生感染,病死率高。无论胎龄,胎儿大于 4000 g 即被认为是巨大胎儿[29]。大量研究表明,妊娠期暴露于大气污染物与新生儿出生体重有一定的相关性。一些可改变的因素,如吸烟、营养和孕前体重已被确定为胎儿出生时体重和胎龄降低的危险因素[30-31]。Khadka 等[32]研究表明,早产和低出生体重是成高度正相关的。Rangel 等[33]发现长期暴露于逆温环境会损害胎儿出生时的健康。所谓逆温,是指气温随高度增加而升高的反常气象现象。逆温存在时,空气垂直对流受阻,近地面污染物不能及时扩散,从而增加了居民的暴露。具体来说,在妊娠的最后 13 周内,每周增加 1 次逆温暴露会导致出生体重下降 23.3 g,低出生体重发生率增加 0.6 个百分点(或相对平均 7.3%)。一项关于智利新生儿体重与 $PM_{2.5}$ 和 PM_{10} 的研究结果显示,整个妊娠期接触 PM_{10} 与早产和低出生体重均相关,而 $PM_{2.5}$ 暴露仅在妊娠中期与出生体重降低相关[34]。Ghosh 等[35]的多元回归研究结果表明,环境中 $PM_{2.5}$ 的浓度每增加 10 μg/m^3,出生体重降低 22 g(95%*UI*:12~32),低出生体重风险增加 11%(95%*UI*:1.07~1.16)。此外,在 Luo 等[36]的研究中发现母亲妊娠期 $PM_{2.5}$ 暴露与二手烟暴露对巨大儿风险的交互作用具有统计学意义(交互作用 $P<0.05$),即在整个妊娠期和妊娠早期,暴露于 $PM_{2.5}$ 空气污染物的孕妇在妊娠期暴露于二手烟会增加巨大儿的发生风险,且二手烟的暴露频率越高,二者的交互作用越强。

有研究认为大气污染物可能导致胎盘损伤,从而出现低出生体重儿,污染物在体内产生的炎症和氧化应激反应,将对血管内皮细胞造成损伤,从而改变人体的血流动力学,增加血液黏度,甚至血栓形成,进而破坏胎盘微循环,影响母体与胎盘之间氧气和营养物质的运输,造成胎儿在母体内发育不良[22]。

4 大气污染物与出生缺陷

婴儿出生前发生身体结构、功能或代谢异常,称为出生缺陷[37]。据估算,在我国出生缺陷的总发生率在 5.6%左右[38]。近年来,有研究指出,妊娠期暴露于高水平 $PM_{2.5}$ 可能与某些出生缺陷的风险增加有关。Jiang 等[39]在中国长沙进行的一项包含了 921 例病例和 9210 例对照病例的对照研究显示:母亲在妊娠早期接触 $PM_{2.5}$ 会增加胎儿先天性心脏病的风险,且环境热暴露可能会增强这种影响。Yu 等[40]在对 30 篇文献进行 meta 分析后发现,妊娠期持续暴露于 $PM_{2.5}$ 可能增加罹患法洛四联症的风险,暴露于 $PM_{2.5}$ 的浓度每增加 10 μg/m^3,对应的法

洛四联症风险的 *OR* 值为 1.09(95% *CI*:1.00 ~ 1.18)。而妊娠期 $PM_{2.5}$ 暴露与其他先天性心脏病的发生率之间没有显著性差异。Zhou 等[41]对美国四个州的 470 万新生儿的研究结果表明,$PM_{2.5}$ 的浓度每增加 10 μg/m^3,患单纯性腭裂的风险显著增加 43%(*OR*:1.43,95% *CI*:1.11~1.86),而患唇裂的风险没有增加。Al Noaimi 等[37]在对 553 个病例和 10 214 个对照进行匹配病例对照研究和特征选择分析后发现母亲在妊娠早期接触 $PM_{2.5}$ 与较高的整体出生缺陷风险(*OR*:1.05,95% *CI*:1.01~1.09)以及较高的泌尿生殖系统缺陷(*OR*:1.06,95% *CI*:1.01~1.11)和神经管缺陷(*OR*:1.10,95% *CI*:1.03~1.17)风险显著相关。

目前对导致出生缺陷的机制研究主要在 DNA 的修饰及损伤上。Grevendonk 等[42]的研究指出,妊娠期大气颗粒污染物暴露会增加母体及胎儿线粒体 DNA 损伤;另一项研究显示,空气污染物会通过 DNA 甲基化等表观遗传修饰作用改变胎儿的基因组 DNA,从而在妊娠期影响胎儿基因表达模式[43]。Slama 等[44]认为,大气污染物还会通过导致氧化应激等方式,使胎儿发生遗传性状的改变,进而引发出生缺陷。

5 总结与展望

综上所述,过往证据证明,妊娠期间接触大气污染物和不良妊娠结局之间存在一定的关联,但具体的发病机制目前仍不清楚,相关研究也多停留在流行病学调查层面,缺乏分子生物层面的机制研究和病因探究。而且暴露是否存在敏感期,暴露剂量、暴露浓度等是否存在阈值也都没有定论。该领域未来的研究将集中于阐明大气污染物导致不良妊娠结局的生物学机制、准确测量妊娠期间各种污染物的暴露剂量,探索妊娠期间各种污染物质的关键暴露期。

我国空气污染状况严重,虽然其影响孕妇和胎儿的具体机制尚不清楚,但是推测大气污染物可能通过多种潜在的机制对人类健康产生持续性、发展性的威胁,我们应当充分认识到该问题的严重性以及急迫性。希望国内能够开展更多严谨可靠的相关研究,实现早期干预,减少或者避免不良妊娠结局的出现。

参考文献:

[1] 郭亚楠. 大气污染的形成及综合整治办法探析[J]. 化工管理, 2020, 30(15): 54-55.

[2] Basu R, Pearson D, Ebisu K, et al. Association between $PM_{2.5}$ and $PM_{2.5}$ constituents and preterm delivery in California, 2000-2006[J]. Paediatr Perinat Epidemiol, 2017, 31(5): 424-434.

[3] Balsa AI, Caffera M, Bloomfield J. Exposures to particulate matter from the eruptions of the puyehue volcano and birth outcomes in Montevideo, Uruguay[J]. Environ Health Perspect, 2016, 124(11): 1816-1822.

[4] 杨阳, 张华. 空气污染与不良妊娠结局的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2020, 20(26): 65-66.

[5] Li S, Peng L, Wu X, et al. Long-term impact of ambient air pollution on preterm birth in Xuzhou, China: a time series study[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(30): 41039-41050.

[6] Sagiv SK, Mendola P, Loomis D, et al. A time-series analysis of air pollution and preterm birth in Pennsylvania, 1997-2001[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(5): 602-606.

[7] Brauer M, Lencar C, Tamburic L, et al. A cohort study of traffic-related air pollution impacts on birth outcomes[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(5): 680-686.

[8] Hansen C, Neller A, Williams G, et al. Maternal exposure to low levels of ambient air pollution and preterm birth in Brisbane, Australia[J]. BJOG, 2006, 113(8): 935-941.

[9] Tsai SS, Yu HS, Chang CC, et al. Increased risk of preterm delivery in women residing near thermal power plants in Taiwan[J]. Arch Environ Health, 2004, 59(9): 478-483.

[10] Xu X, Ding H, Wang X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study[J]. Arch Environ Health, 1995, 50(6): 407-415.

[11] 张燕萍, 刘旭辉, 任展宏, 等. 太原市大气污染对妊娠结局的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(3): 128-131.

[12] 杨敏娟, 沈惠平, 黄云彪, 等. 妊娠期大气污染暴露对早产影响的流行病学研究[J]. 职业与健康, 2016, 32(2): 221-224.

[13] Ha S, Hu H, Roussos-Ross D, et al. The effects of air pollution on adverse birth outcomes[J]. Environ Res, 2014, 134: 198-204.

[14] 朱娟, 梁志江, 温济英, 等. 某市空气污染对早产影响的病例对照研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(2): 132-135.

[15] 亚库甫·艾麦尔, 王佳佳, 彭振耀, 等. 北京市大气污染对不良妊娠结局影响的病例对照研究[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(5): 389-393.

[16] Hyder A, Lee HJ, Ebisu K, et al. $PM_{2.5}$ exposure and birth outcomes: use of satellite- and monitor-based data[J]. Epidemiology, 2014, 25(1): 58-67.

[17] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学(第 9 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社; 2018.

[18] 包竹青, 余灿清, 曹卫华. 大气污染与死胎死产关系的研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(10): 1051-1056.

[19] Green R, Sarovar V, Malig B, et al. Association of stillbirth with

ambient air pollution in a California cohort study [J]. Am J Epidemiol, 2015, 181(11): 874-882.

[20] Siddika N, Balogun HA, Amegah AK, et al. Prenatal ambient air pollution exposure and the risk of stillbirth: systematic review and meta-analysis of the empirical evidence [J]. Occup Environ Med, 2016, 73(9): 573-581.

[21] Liang Z, Yang Y, Yi J, et al. Maternal $PM_{2.5}$ exposure associated with stillbirth: a large birth cohort study in seven Chinese cities [J]. Int J Hyg Environ Health, 2021, 236: 113795.

[22] DeFranco E, Hall E, Hossain M, et al. Air pollution and stillbirth risk: exposure to airborne particulate matter during pregnancy is associated with fetal death [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120594.

[23] Zhu X, Liu Y, Chen Y, et al. Maternal exposure to fine particulate matter ($PM_{2.5}$) and pregnancy outcomes: a meta-analysis [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(5): 3383-3396.

[24] Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, et al. Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter [J]. Cell Biol Toxicol, 2010, 26(5): 481-498.

[25] Lee PC, Talbott EO, Roberts JM, et al. Particulate air pollution exposure and C-reactive protein during early pregnancy [J]. Epidemiology, 2011, 22(4): 524-531.

[26] Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, et al. Nitrative and oxidative stress in toxicology and disease [J]. Toxicol Sci, 2009, 112(1): 4-16.

[27] Mohorovic L, Petrovic O, Haller H, et al. Pregnancy loss and maternal methemoglobin levels: an indirect explanation of the association of environmental toxics and their adverse effects on the mother and the fetus [J]. Int J Environ Res Public Health, 2010, 7(12): 4203-4212.

[28] Li C, Yang M, Zhu Z, et al. Maternal exposure to air pollution and the risk of low birth weight: a meta-analysis of cohort studies [J]. Environ Res, 2020, 190: 109970.

[29] Vitner D, Bleicher I, Kadour-Peero E, et al. Does prenatal identification of fetal macrosomia change management and outcome? [J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 299(3): 635-644.

[30] Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis [J]. Bull World Health Organ, 1987, 65(5): 663-737.

[31] Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth [J]. Epidemiol Rev, 1993, 15(2): 414-443.

[32] Khadka A, Canning D. Understanding the pathways from prenatal and post-birth $PM_{2.5}$ exposure to infant death: an observational analysis using US vital records (2011-2013) [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 19(1): 258.

[33] Rangel MA, Tomé R. Health and the megacity: urban congestion, air pollution, and birth outcomes in Brazil [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(3): 1151.

[34] Rodríguez-Fernández A, Ramos-Castillo N, Ruiz-De la Fuente M, et al. Association of prematurity and low birth weight with gestational exposure to $PM_{2.5}$ and PM_{10} particulate matter in chileans newborns [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(10): 6133.

[35] Ghosh R, Causey K, Burkart K, et al. Ambient and household $PM_{2.5}$ pollution and adverse perinatal outcomes: a meta-regression and analysis of attributable global burden for 204 countries and territories [J]. PLoS Med, 2021, 18(9): e1003718.

[36] Luo Y, Zhang Y, Pan H, et al. Maternal secondhand smoke exposure enhances macrosomia risk among pregnant women exposed to $PM_{2.5}$: a new interaction of two air pollutants in a nationwide cohort [J]. Front Public Health, 2021, 9: 735699.

[37] Al Noaimi G, Yunis K, El Asmar K, et al. Prenatal exposure to criteria air pollutants and associations with congenital anomalies: a Lebanese national study [J]. Environ Pollut, 2021, 281: 117022.

[38] 中华人民共和国卫生部. 中国出生缺陷防治报告(2012)[EB/OL]. (2012-09-12). https://www.gov.cn/gzdt/2012-09/12/content_2223371.html.

[39] Jiang W, Liu Z, Ni B, et al. Independent and interactive effects of air pollutants and ambient heat exposure on congenital heart defects [J]. Reprod Toxicol, 2021, 104: 106-113.

[40] Yu G, Chen Y, Tang J, et al. Meta-analyses of maternal exposure to atmospheric particulate matter and risk of congenital anomalies in offspring [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(40): 55869-55887.

[41] Zhou Y, Gilboa SM, Herdt ML, et al. Maternal exposure to ozone and $PM_{2.5}$ and the prevalence of orofacial clefts in four U.S. states [J]. Environ Res, 2017, 153: 35-40.

[42] Grevendonk L, Janssen BG, Vanpoucke C, et al. Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs [J]. Environ Health, 2016, 15: 10.

[43] Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Ramezani M, et al. Epigenetic alterations and exposure to air pollutants: protocol for a birth cohort study to evaluate the association between adverse birth outcomes and global DNA methylation [J]. JMIR Res Protoc, 2017, 6(2): e29.

[44] Slama R, Darrow L, Parker J, et al. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction [J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(6): 791-798.

〔收稿日期〕2023-07-19

兰爱琳,黄春华,夏铭,等. 斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(12): 123-126.
Lan AL, Huang CH, Xia M, et al. Research progress on modeling methods and evaluation indexes of kidney injury in zebrafish [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(12): 123-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.12.019

斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标的研究进展

兰爱琳,黄春华,夏 铭,李茂娟,汪思齐,楼迪栋*

(贵州省法医中药毒理学特色重点实验室,贵州中医药大学司法鉴定所,贵阳 550000)

【摘要】 肾容易受到体内外各种物理、化学和生物因素的影响,致使肾功能损害,造成急慢性肾疾病。预防和治疗各种因素引起的肾功能损害是泌尿系统研究的重要内容。斑马鱼幼鱼通体透明、产卵量大、易于基因编辑,在肾的形态、生理、功能等方面以及对化合物的反应也与人类具有很高的相似性,是理想的动物模型。本文将对斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标进行综述。

【关键词】 斑马鱼;肾损伤;动物模型
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 12-0123-04

Research progress on modeling methods and evaluation indexes of kidney injury in zebrafish

LAN Ailin, HUANG Chunhua, XIA Ming, LI Maojuan, WANG Siqi, LOU Didong*
(Guizhou Provincial Key Laboratory of Forensic Medicine Toxicology, Judicial Appraisal Center, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China)

【Abstract】 Kidneys filter bloodand regulate fluid and electrolyte balances. However, the kidney is susceptible to toxicity of various compounds, Resulting in renal damage. Hence, prevention and treatment of renal injury is a hot research topic. Zebrafish is an ideal animal model, because it is closely related to humans in terms of morphology, physiology, and kidney functions and its response to compounds. In this article, we review the method and evaluation indexes of zebrafish kidney injury modeling.

【Keywords】 zebrafish; kidney injury; animal models
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肾疾病是一个全球性的问题,其发病率高、个人以及社会医疗压力大。临床前的实验动物研究有助于更好地理解各种肾疾病机制,并筛选治疗方法。斑马鱼具有与哺乳动物肾相当的基本解剖结构[1],且功能上非常相似,因其体型小、产卵量大、易于基因操控、胚胎通体透明等优势使研究者可以对研究目标进行特异标记和实时观察[2],本文就其在肾病研究的造模方法和观察指标做一综述。

1 造模方法

1.1 抗生素

嘌呤霉素(Puromycin)和阿霉素(Adriamycin, ADR)是斑马鱼急性足细胞损伤造模常用药物,会破坏其肾小球滤过屏障(glomerular fltration barrier, GFB)[3]。Rider 等[1]利用嘌呤霉素使斑马鱼足细胞损伤、肾小球滤过通透性增加,镜下可见足细胞消失。但是,与啮齿类动物模型相比,嘌呤霉素会影

[基金项目]贵州省法医中药毒理学特色重点实验室(黔教合 KY 字[2021]004)。
[作者简介]兰爱琳(1998—),硕士研究生,研究方向:AAI 肾病毒理学。E-mail:chenandlin@yeah.net
[通信作者]楼迪栋(1977—),博士,教授,研究方向:AAI 肾病毒理学。E-mail:15761879@qq.com

响斑马鱼中枢血流,可能是水肿原因之一,需要进一步评估水肿和 GFB 变化之间的相关性[1]。ADR 主要靶向哺乳动物肾小管,常诱导斑马鱼肾的退行性变化。Kato 等[4]对成年斑马鱼连续 4 d 腹腔注射 40 mg/kg ADR,引起肾小球足细胞足突融合。但由于 ADR 的心血管毒性可能干扰葡聚糖清除率,不适合用于 3 日龄以上斑马鱼的肾小球损伤造模[1]。

庆大霉素也是斑马鱼肾损伤的常用造模药物。Shao 等[5]用 750 ppm 的庆大霉素处理斑马鱼胚胎即可引起明显的心包水肿。Kato 等[4]对成年斑马鱼腹腔注射或口服庆大霉素处理 4 d 导致其肾小管坏死,肾小管上皮细胞中溶酶体和髓样小体增多。Gorgulho 等[6]使用 10%的幼鱼致死浓度庆大霉素导致其肾清除率降低,并出现线粒体变形、肿胀,嵴破坏、基粒受损。Cernaro 等[7]对斑马鱼腹腔注射 0.8 μL 的庆大霉素,细胞顶端刷状缘消失,细胞坏死和透明滴包涵体形成,小管间可见小的、浓缩的嗜碱性细胞团簇(间充质凝析物),其他区域可见具有清晰细胞质边界的多边形细胞以及梭形嗜碱性细胞成群出现。然而,氨基糖苷类对斑马鱼幼体的毒性过大,在研究中有一定的局限性。

1.2 合成药物和天然产物

顺铂常用于抗癌治疗,但易在肾中累积,导致肾小管细胞凋亡,并诱发急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),其特征在于肾功能快速下降、组织损伤和免疫细胞浸润。Morales Fénero 等[8]对成年斑马鱼腹腔注射 120 μg/g 的顺铂,注射 24 h 后斑马鱼存活率降低、肾小管结构丧失、炎性浸润和细胞凋亡增加。

马兜铃酸 I(aristolochic acid I, AAI)对多种动物均具有肾毒性。0.5×10^{-6} mol/L AAI 下暴露 8 d 的 15 dpf 幼鱼身体弯曲、体长缩短、GFB 功能相对丧失[9]。谌晶晶等[10]利用 1.7 μg/mL AAI 处理 72 hpf 斑马鱼,11.1%的斑马鱼出现严重的肾包膜水肿。王雪等[11]发现 AAI 处理 30 h 后,幼鱼出现水肿的同时肾 *Kim*-1 基因(早期肾病的重要分子指标)转录及蛋白水平升高。

1.3 基因修饰斑马鱼

斑马鱼作为重要的模式动物,基因修饰技术十分完善[12]。Nphs2/podocin 可能是浆膜和细胞骨架之间的一种连接剂,在调控肾小球过滤功能方面起着重要作用,而 Podocin 是足细胞特异性标志物,且足细胞特异性高表达硝基还原酶(nitroreductase, NTR)。利用 nphs2/podocin 启动子在足细胞中表达 NTR,可将甲硝唑(metronidazole, MTZ)转化为细胞毒素。Wang 等[13]构建了 *Tg*(*pod*:*Gal*4)/*Tg*(*UAS*:*NTR-mCherry*)转基因斑马鱼品系,*GAL4/UAS* 基因表达调控系统相结合可诱导足细胞中 *NTR-mCherry* 更强的特异性基因表达,提高了 NTR 将 MTZ 转化为细胞毒素致足细胞损伤的效率。MTZ 处理此种转基因斑马鱼可致眶周水肿,足细胞完整性被破坏,电镜下肾小球中广泛的足突消失,GFB 受损,免疫染色可见足细胞凋亡[13],在 *Tg*(*pod*:*gal*4;*UAS*:*NTR-mCherry*)转基因斑马鱼基础上使足细胞特异性过表达 *Gadd*45*b* 会使足细胞易受损伤,加重水肿、蛋白尿和足突消失[13],表明 *Gadd*45*b* 基因在足细胞损伤中起重要作用。

斑马鱼 *Kim*-1 蛋白与哺乳动物 *Kim*-1 具有高度的结构和功能同源性,哺乳动物的肾损伤与近端肾小管细胞中 *Kim*-1 表达上调相关。Yin 等[14]利用钙粘蛋白 17(Cadherin-17, CDH17)启动子表达 *kim*1-*RFP* 融合蛋白生成 *pTol-cdh*17:*kim*1-*RFP* 斑马鱼使肾小管上皮细胞中过表达 *Kim*-1,导致其肾小管刷状缘丧失、肾小球滤过率(glomeruar filtration rate, GFR)降低、心包水肿和死亡率增加。因为斑马鱼肾小球屏障在 72~96 hpf 形成,*Kim*-1 表达的转基因鱼可能导致其吸收在肾小球完全成熟后通常不会出现在小管腔中的有害因子。Yin 等[14]创建了 Cre/Loxp 介导的组织特异性 *Kim*-1 过表达斑马鱼,*Kim*-1 在 GFB 成熟后的肾小管上皮细胞中表达。与对照组相比,Cre/Loxp 介导的 *Kim*-1 在两个肾前小管中的过表达($Kim1^{kt+/+}$)导致较高的死亡率和水肿,而仅在一个肾前肾小管中过表达 *Kim*-1 的鱼水肿和死亡率较低。

1.4 基因敲降

酪氨酸蛋白激酶受体 *Tyro*3 mRNA 在人肾小球中高表达,是肾小球疾病中的足细胞保护因子。Zhong 等[15]利用吗啉基(Morpholino)敲低 *Tyro*3 生成 *tyro*3-*MO* 斑马鱼,与对照组相比 55%的 *tyro*3-*MO* 在 72 hpf 出现心包和眶周水肿,注射 FITC-葡聚糖瞳孔荧光强度迅速减弱,且足突消失和足突之间的特殊细胞连接狭缝隔膜破裂。由此可知,敲低 *Tyro*3 会损伤斑马鱼 GFB。

*Tmem*63*c* 基因在 GFB 完整性中起着重要作用,Schulz 等[16]利用 Morpholino 敲降斑马鱼 *Tmem*63*c*,*Tmem*63*c* 有缺陷的胚胎电镜下显示严重的形态学缺

陷,足细胞损伤、足突消失以致 GFB 受损产生蛋白尿。

1.5 物理/手术造模

Johnson 等[17]通过脉冲微点激光系统对近端小管荧光标记的斑马鱼靶向细胞消融使其上皮损伤,此种方法可以基于形态位置、功能甚至特定细胞表型来靶向细胞的不同区域,增强了研究的特异性,可广泛应用于斑马鱼胚胎中各种器官的细胞群。Datta 等[18]认为前者未考虑损伤的分级,选择使用较脉冲激光系统相比低能量的紫色激光(405 nm)靶向消融特异性绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)标记的肾单位片段,此过程中可调节针孔尺寸、激光强度功率等。通过观察荧光变化来研究其损伤和修复过程。这种方法能够调节活体动物模型损伤水平,并达到精确的时空控制。

1.6 其他

脓毒症发生过程中常见并发症也包括 AKI。脓毒症急性肾损伤(septic-acute kidney injury,S-AKI),发病快、肾损伤程度高。Wen 等[19]在幼鱼 78~82 hpf 时静脉注射 1 nL 迟缓爱德华氏菌,成年斑马鱼在 1 岁腹腔注射 20 μL,出现明显心包水肿,表明肾功能障碍以致液体潴留。王壮[20]以致死剂量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)浸泡幼鱼,也可见心包腔水肿和尾鳍溃烂等。

2 评价指标

2.1 形态学、行为学

斑马鱼幼鱼体积小、通体透明,研究者可在镜下实时观察其整体或局部的形态变化[2]。可以通过对比身长、大小、瞳距体长之比、体轴弯曲、进食情况、局部或全身水肿、活跃程度、应激反应等[9],评估药物的毒性作用、斑马鱼的病变程度等。

斑马鱼的光学透明性加上基因操控技术的发展,使得学者可以对研究目标进行特异性标记,通过荧光强度、面积等实时观察各段肾小管。Yin 等[14]利用莲藕凝集素(lotustetragonolobus lectin, LTL)标记近端小管、双花扁豆凝集素(double flowers lentil lectin, DBA)标记远端小管和集合管;Wen 等[19]使用转基因斑马鱼品系 *Tg*(*PT*:*eGFP*)、*Tg*(*cdh*17:*eGFP*),分别荧光标记近端前肾小管或全长前肾小管中的细胞;同时对目标蛋白进行共定位染色,观察目标蛋白在肾小管各节段上的表达情况。

2.2 肾小球滤过等功能学

肾滤过功能正常时只有小分子蛋白可通过,当 GFB 受损,可滤过大分子蛋白[21]。Kamei Caramai 等[22]通过观察水中由死亡上皮组织形成的白色管型物质目测庆大霉素是否造成斑马鱼肾损伤。Lee 等[23]利用接近人白蛋白分子量、表达 GFP 的维生素 D 结合蛋白(vitamin D binding protein,VDBP)转基因斑马鱼,其近端小管重吸收并积累 VDBP-GFP,通过荧光成像示踪蛋白尿。Wang 等[9]利用同种转基因斑马鱼经 AAI 处理后,眼周荧光强度降低推测 AAI 造成其肾小球滤过通透性增加。GFP 还可用 ELISA 检测,灵敏度高,特异性强,Chen 等[24]用 GFP ELISA 试剂盒测定的转基因斑马鱼蛋白尿。

为动态观察肾小球通透性,Rider 等[1]开发了右旋糖酐(Dextran)排泄测定法,经心窦静脉注射,通过背主动脉的荧光强度测定 Dextran 清除率,观察肾小球损伤和修复过程中的蛋白质排泄,其清除率与 GFR 呈正相关。

甘露醇通过调整体液和水环境之间的渗透梯度,能够减轻由于皮肤或鳃衰竭引起的心包水肿[25]。为了区分心包水肿是由于肾小球损伤还是其他水屏障改变,可使用甘露醇处理肾损伤后的斑马鱼胚胎,观察其心包水肿是否减轻,如并未改善可排除皮肤和鳃的参与。

2.3 病理学

HE 染色是病理学最常用的方法,Wang 等[9]对 AAI 处理后的野生型斑马鱼进行 HE 染色,可见增大的肾小管、浓缩的细胞,AAI 处理端粒酶缺失斑马鱼可见空泡细胞和结构紊乱的肾小球。对 AAI 处理的斑马鱼进行 Masson 染色观察胶原蛋白,未见阳性反应。Morales Fénero 等[8]通过流式细胞术和 TUNEL 染色来评估细胞凋亡状况。

为了进一步观察斑马鱼肾损伤后细胞形态及结构改变,Gorgulho 等[6]通过双光子显微镜观察近曲小管三维形态,并使用 Amira 软件对近曲小管进行三维重建,观察管状形态、上皮组织和管腔面积。

2.4 分子生物学

Kato 等[4]使用 DNA 芯片数据分析斑马鱼肾基因表达,挑选出早期 *Egr*1、*Atf*3 和 *Fos* 作为成年斑马鱼药物性肾损伤(drug-induced kidney injury,DIKI)的候选标记。Wen 等[19]对转基因斑马鱼 *Tg*(*PT*:*eGFP*)和 *Tg*(*cdh*17:*eGFP*)进行 AKI 生物标记物(*Kim*-1、*Timp*-2 和 *Igfbp*7)共定位染色,以此观察上述标记物在肾小管局部表达情况,结果显示 *Timp*-2 主要存在于远端小管,*Igfbp*7 主要存在于近端小管,

脓毒症幼鱼肾小管全长中 *Kim*-1 表达上调。

3 总结

斑马鱼作为新兴模式生物,兼具了传统动物及细胞模型的优点[26],其肾的分子组成、结构和功能与高等哺乳动物相似[27],胚胎透明、体外受精、基因编辑较其他模式动物更易于操作[27-28],给学者们提供了一个简单、价廉、高效的研究平台[27]。但是如何构建理想的疾病模型,筛选肾疾病的治疗方法[27],以及肾功能检测方面还需要进一步探索,从而在肾疾病机制与治疗研究中更好地应用[25]。

参考文献:

[1] Rider SA, Bruton FA, Collins RG, et al. The efficacy of puromycin and adriamycin for induction of glomerular failure in larval zebrafish validated by an assay of glomerular permeability dynamics [J]. Zebrafish, 2018, 15(3): 234-242.

[2] Coppola A, Lombari P, Mazzella E, et al. Zebrafish as a model of cardiac pathology and toxicity: spotlight on uremic toxins [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(6): 5656.

[3] Zhai X, Wang L, Xu C, et al. Triptolide preserves glomerular barrier function via the inhibition of p53-mediated increase of GADD45B [J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 671: 210-217.

[4] Kato Y, Tonomura Y, Hanafusa H, et al. Adult zebrafish model for screening drug-induced kidney injury [J]. Toxicol Sci, 2020, 174(2): 241-253.

[5] Shao W, Zhong D, Jiang H, et al. A new aminoglycoside etimicin shows low nephrotoxicity and ototoxicity in zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2021, 41(7): 1063-1075.

[6] Gorgulho R, Jacinto R, Lopes SS, et al. Usefulness of zebrafish larvae to evaluate drug-induced functional and morphological renal tubular alterations [J]. Arch Toxicol, 2018, 92(1): 411-423.

[7] Cernaro V, Sfacteria A, Rifici C, et al. Renoprotective effect of erythropoietin in zebrafish after administration of gentamicin: an immunohistochemical study for β-catenin and c-kit expression [J]. J Nephrol, 2017, 30(3): 385-391.

[8] Morales Fénero C, Padovani BN, do Amaral MA, et al. Acute kidney injury model induced by cisplatin in adult zebrafish [J]. J Vis Exp, 2021, 16(171): e61575.

[9] Wang X, Giusti A, Ny A, et al. Nephrotoxic effects in zebrafish after prolonged exposure to aristolochic acid [J]. Toxins (Basel), 2020, 12(4): 217.

[10] 谌晶晶, 唐旭霞, 徐慧芳, 等. 马兜铃酸对斑马鱼的耳毒性及肾毒性研究 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2020, 28(1): 57-61.

[11] 王雪, 韩利文, 何秋霞, 等. 马兜铃酸对斑马鱼肾损伤因子(KIM-1)表达的影响 [J]. 动物学杂志, 2018, 53(4): 622-627.

[12] Simone BW, Martínez-Gálvez G, WareJoncas Z, et al. Fishing for understanding: Unlocking the zebrafish gene editor's toolbox [J]. Methods, 2018, 150: 3-10.

[13] Wang L, Zhang L, Hou Q, et al. Triptolide attenuates proteinuria and podocyte apoptosis via inhibition of NF-κB/GADD45B [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10843.

[14] Yin W, Naini SM, Chen G, et al. Mammalian target of rapamycin mediates kidney injury molecule 1-dependent tubule injury in a surrogate model [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(7): 1943-1957.

[15] Zhong F, Chen Z, Zhang L, et al. Tyro3 is a podocyte protective factor in glomerular disease [J]. JCI Insight, 2018, 3(22): e123482.

[16] Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, et al. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage [J]. Elife, 2019, 8: e42068.

[17] Johnson CS, Holzemer NF, Wingert RA. Laser ablation of the zebrafish pronephros to study renal epithelial regeneration [J]. J Vis Exp, 2011(54): 2845.

[18] Datta R, Wong A, Camarata T, et al. Precise cellular ablation approach for modeling acute kidney injury in developing zebrafish [J]. J Vis Exp, 2017(124): 55606.

[19] Wen X, Cui L, Morrisroe S, et al. A zebrafish model of infection-associated acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(2): F291-F299.

[20] 王壮. 斑马鱼细胞焦亡介导脓毒症急性肾损伤的分子机制 [D]. 上海: 华东理工大学, 2020.

[21] 侯庆, 陈朝红. 斑马鱼在足细胞研究中的应用及其进展 [J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 976-981.

[22] Kamei Caramai N, Yan L, Drummond Iain A. Kidney regeneration in adult zebrafish by gentamicin induced injury [J]. J Vis Exp, 2015, 10(102): e51912.

[23] Lee MS, Devi S, He JC, et al. A zebrafish model of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 976043.

[24] Chen Z, Luciani A, Mateos JM, et al. Transgenic zebrafish modeling low-molecular-weight proteinuria and lysosomal storage diseases [J]. Kidney Int, 2020, 97(6): 1150-1163.

[25] Wiegand J, Cheng V, Reddam A, et al. Triphenyl phosphate-induced pericardial edema is associated with elevated epidermal ionocytes within zebrafish embryos [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2022, 89: 103776.

[26] 王雪, 夏青, 王荣春, 等. 斑马鱼幼鱼模型在急性肾损伤研究中的适用性 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 857-860.

[27] 陈朝红, 刘志红. 模式动物斑马鱼在肾脏疾病研究中的应用 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(2): 159-164.

[28] 马田田, 施潇潇, 陈丽萌. 斑马鱼在急性肾损伤研究中的应用进展 [J]. 基础医学与临床, 2021, 41(2): 257-261.

〔收稿日期〕2023-03-14

中国比较医学杂志目次索引

2023 年第 33 卷 1~12 期

第 1 期

研究报告

蛹虫草提取物对肾阳虚模型大鼠睾丸 CYP19/CaM/CaMKⅡ信号的影响 …… 陈思源,王思雨,祁明媛,李垄坡,徐仪昕,张婷,姚紫研,赵洪庆(1)
雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤 … 张慧宇,白振军,李亮,张金锋,解佳伟,邓亮,孟燕,郭敏芳(9)
酒精性脂肪肝小鼠肝组织蛋白表达谱检测及白藜芦醇干预作用机制的探讨 …… 韩敏,易旭,游绍伟(16)
基于脂代谢和炎症反应探讨两种湿热证痛风性关节炎大鼠模型的构建 …… 甘斌,李华南,李松,章晓云,陈宇,顾兵,张云开,刘永乾,邵子晨(26)
两种造模方法建立小鼠先兆子痫模型比较研究 …… 许佳欢,别亚男,陈千晴,陈柏羽,欧宝芳,谢水林,吴少瑜(34)
线粒体铁蛋白调控上皮-间质转化对非小细胞肺癌细胞顺铂耐药的影响 …… 赵峻秀,霍明洋,陈振宇,白雪松,马洪波,郝艳丽(42)
自噬在慢性肾病血管钙化中的作用研究 …… 康婷,毛海霞,林佳如,朱婷婷,张丽玲,张冬梅,吴蔚桦,欧三桃(51)
环境雌激素壬基酚通过 SRXN1 促进结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用研究 …… 黎凯恺,张远威,张念杰,尹硕,何念,万磊,陈旭,杨雪峰(61)
2017~2021 年陕西省实验动物使用单位 SPF 级大、小鼠质量监测结果分析与评估 …… 吴朋朋,张彩勤,赵勇,谭邓旭,师长宏,白冰(70)
超声影像在评价大鼠结节性甲状腺肿的应用 …… 高祥举,高冬梅,陈宪梅,宋婷婷,高占,高杰,王杰琼(78)
巨噬细胞 AMPKα1 敲除对非酒精性脂肪肝小鼠模型的影响 …… 王顺意,陈思烁,于天力,林彩霞,王丽京,郑凌云(85)
基于文献数据库的 6-OHDA 帕金森病大鼠模型特点分析及在中药研究中的应用 …… 王孟迪,张秋梅,范蓓,Alberto Carlos Pires Dias,王凤忠,王琼(93)

研究进展

中药调控缺血性脑卒中后紧密连接的研究进展 …… 陈婷玉,苏凯奇,阮晓迪,房璐,张钰涵,刘昊,冯晓东(103)
岩藻糖基化与肿瘤多药耐药 …… 冯博,刘姿宇,李月,刘立琨,岳丽玲(113)
GLAST 与神经系统疾病的研究进展 …… 吴芳杉,马科锋,崔博(119)
NR2B 亚基磷酸化在缺血/低氧神经保护中的作用…… 刘晓蕾,姜树原,邵国,谢雅彬,贾小娥,谢伟(125)
过敏性哮喘大鼠模型的建立方法与评价 …… 楼金成,苗镡允,苏嘉琪,胡情,翟春涛,吕玉娥(130)
出血性休克动物选择与并发其它疾病模型的研究进展 …… 刘洪刚,卓美娟,聂洪鑫,孟辉(138)
Siglec-15 抗体在非小细胞肺癌中的调控机制研究 …… 李延康,贺钢枫(144)

简讯 …… (41)

第 2 期

研究报告

针刺对 SHR 颈内动脉顺应性及 JNK/MCP1 通路的影响 …… 董爱爱,武荣林,郭继龙,金晓飞,来晓云,崔依依,王维峰,王盛隆,冀来喜(1)

小鼠主动脉缩窄模型早期压力阶差与心肌肥厚程度的关系 …… 李秋林,唐婧,赵翎,阿曼古丽·如则,高晓明(9)

中国地鼠 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13 的表达鉴定及生物信息学分析 …… 郭民,原梦,秦轲茹,霍怡彤,王文桃,杜凯艳,张瑞虎,王海龙,陈朝阳(15)

lncRNA KTN1-AS1 调节 miR-153-3p/NFAT5 轴对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 …… 崔文洁,袁杰清,施海,吴思燕,韩玉,陈云峰(22)

热量限制缓解血管紧张素Ⅱ诱导的心肌细胞肥大作用 …… 孙思雨,贺忠梅,钟祺,杨瑞瑞,燕子,高丽娟,曹济民(31)

银屑病小鼠行为学、血液及皮肤组织病理学指标检测与分析 …… 热比姑丽·伊斯拉木,开丽比努尔·阿布来提,阿布都帕塔尔·阿布迪热扎克,尤力都孜·买买提,玉素甫江·艾力,买买提·艾力(39)

小鼠脑缺血再灌注损伤与线粒体自噬的关系研究 …… 杨鑫勇,王凯华,刘丹宁(48)

LncRNA SNHG16 通过 miR-106b-5p/PHF1 轴调节结直肠癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭 …… 赵建刚,赵光远,鲍双振,刘义粉(56)

狼毒大戟配伍大枣水煎液体外抗乳腺癌作用及机制研究 …… 马立威,陈哲,陈颂,倪世宇,李京,葛鹏玲,刘吉成(66)

技术方法

一种微创制备巴马小型猪急性心肌梗塞模型的技术及评价方法 …… 姜文阳,崔永春,李晓松,胡梦巾,岳广新,杨跃进(76)

实验大小鼠心脏固定方法的优化 …… 马嘉昕,王亚恒,董伟,张连峰,吕丹(84)

设施设备

实验动物智能化综合管理系统开发及应用 …… 袁进,田雨光,吴清洪,于奎,张庆岩(91)

经验交流

医学研究中动物实验样本量的确定方法 …… 曹策,李玲美,訾明杰,付建华,任钧国,李磊,刘建勋(99)

研究进展

乳铁蛋白在中枢神经系统疾病中的作用机制及其研究进展 …… 赵楠,蒋瑞,熊柳林(106)

血液系统肿瘤中化疗相关血小板减少的机制研究进展 …… 李亮,孔春芳,金成豪(113)

T 细胞在 1 型发作性睡病发病机制中的作用研究进展 …… 杜姝姝,刘文慧,赵黎丽,刘熔增(119)

血管化类器官的构建思路与技术挑战 …… 孙珂,王婷,李静颐,李红梅(126)

靶向 DNA 损伤应答在肿瘤放射增敏治疗的研究进展 …… 李明君,李佳霖,杨波(134)

局灶性缺血性卒中动物模型制作研究进展 …… 席娅琳,王慧瑜,鹿树军(140)

简讯 …… (133)

第 3 期

研究报告

*Trim*44 敲除导致老年大鼠神经元凋亡和学习记忆能力下降 …… 张丽,马元武,张旭,丁登峰,陈炜,盛瀚萱,高祥,董伟,张连峰(1)

羟基红花黄色素 A 对缺氧缺糖/复氧复糖损伤的大鼠 H9C2 心肌细胞氧化应激和细胞凋亡的影响 …… 李玲美,曹策,韩笑,付建华,李磊,张琼,辛高杰,刘子馨,任钧国(9)

基于 AngII-NOx-ROS 信号通路探索黄杨宁对心房颤动犬氧化应激的影响 …… 冯光玲,毛文锋,郅强,王贺,解金红(17)

虾源达卡气单胞菌全基因组分析和致病性研究 …… 渠凤甜,周海健,薛佳琦,杜小莉,胡锦瑞,崔志刚,谢桂林,刘辰庚,孟双(24)

两种大鼠高脂血症模型的特点及性别差异研究 …… 田时秋,左泽平,李依林,田颖颖,裴海鸾,于尚玥,赵新月,刘闯,王志斌(37)

快速革兰氏染色法对大、小鼠动情周期的鉴别 …… 张蕾,张若乾,秦秀云,李宏林,张建伟(45)

肾周白色脂肪组织源外泌体远距调控大鼠血压 …… 张培森,梁沥文,施真(51)

姜黄素通过调控 Trx-1/TXNIP/NLRP3 通路减轻对乙酰氨基酚诱导的大鼠急性肾损伤 …… 雷欢,桂颖,邓琴,刘子源,张维,梅之南,徐凌云(59)

树鼩眼球组织形态学结构特征与比较分析 …… 邱敏,陈柳,霍姝汭,丁相荣,仝品芬,李娜,代解杰,郝佩琪,高家红,陆彩霞(66)

心脏病动物模型比较转录组学数据库的构建 …… 吴玥,王珏,薛婧,魏强,杨志伟,孔琪(75)

3R

实验动物非麻醉安乐死技术的伦理学探讨 …… 张道涵,邵红霞(82)

研究进展

铁死亡与免疫细胞关系的研究进展 …… 张桂洪,唐旭东(90)

基因修饰兔的发展及其在人类疾病研究中的应用 …… 陶源,刘忠华,宋军(98)

星形胶质细胞参与肝性脑病发病机制的研究* …… 吴锐,丁珺,程翅,喻田(110)

星形胶质细胞外囊泡在缺血性脑卒中的保护作用* …… 王玮玮,兰瑞,付雪琴,王漫漫,邹旭欢,张勇(116)

脑内星形胶质细胞-神经元相互作用参与抑郁症发病研究进展* …… 刘燕,彭梦薇,张文娴,杨铁柱,吴耀松,刘俊,任闪闪,陈玉龙(124)

中医药辅助癌症免疫治疗的研究进展 …… 王荟荟,李惠,张延英,汪永锋,师长宏(130)

D-半乳糖诱导衰老小鼠模型研究进展 …… 洪晶,张娅俐,闫莎莎,李雪,田晓静,曹竑,张福梅,丁功涛(136)

简讯 …… (16)

*“星型胶质细胞:多种神经疾病的关键靶点”专题

第 4 期

研究报告

*Tmem*72 对小鼠神经干细胞体外增殖和分化的影响 …… 侯丽雅,雷雪裴,黄艺滢,石桂英,王凯瑜,乐涵薇,汤家鸣,白琳(1)

两种致敏途径诱导的过敏性气道炎症小鼠模型的免疫应答比较 …… 汤敏丹,李旭,张考苑,杨婷,卓凡,唐思怡,窦侠,陈小帆(11)
益肺灸及其联合调补肺肾三方对 COPD 稳定期大鼠气道 MUC5AC 和 MUC5B 的影响 …… 李景梅,沈婷婷,范正媛,李亚,李建生,李素云(20)
慢性高原低氧暴露对小鼠神经行为学的影响 …… 张梦雅,赵名,江亚群,史子毕,成祥,李云峰,朱玲玲(28)
国家病原微生物资源库对一株嗜肺啮齿杆菌的标准化鉴定与收录 …… 苏磊,熊莉娟,张丽芳,李夏,李雪,石伟雄,肖芳平,鲍琳琳,周银平,向志光(36)
后肢静脉性溃疡大鼠模型的构建与分析 …… 张筱茜,范琦琛,王艮一,王雁南(43)
柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠动物模型建立 …… 李咏洁,张伟,杨凤梅,李艳艳,段素琴,唐洁,孙文亭,靳玮华,邓自君,李明学,张名,马绍辉,和占龙(50)
表皮干细胞对小鼠皮肤创面愈合的作用 …… 王海珊,林逢源,刘小瑜,刘馨竹,闫宇宁,郭笑,安丽萍(57)
荧光 RAA 检测小鼠微小病毒的研究和应用 …… 赵晓瑜,佟巍,郭智,向志光,魏强(63)
醒脾养儿颗粒对正常大鼠排尿功能的影响 …… 李磊,王奥奥,王紫艳,杨丽丽,史跃,马彦雷,孟红旭,刘建勋(69)
医学实验手术中仔猪麻醉及保留自主呼吸的气管插管技术的应用 …… 孙赳,杨雪,屈金权,杨欣悦,沈才福,李佳佳,刘江伟(76)
慢性肾病微炎症大鼠肠源性外泌体携带 miR-146a 表达特性研究 …… 刘琳娜,王宏,江茜,袁玲,崔晓雪,徐娟,潘钰榕,王蕾,李燕林(83)
NOX4/ROS/STAT3 通路对肝星状细胞活化增殖的影响 …… 孟妍芳,申风俊(90)
miR-141 基因干扰靶向 *PTEN* 影响小鼠 BMSCs 成骨分化的实验研究 …… 鲍运平,朱正荣,田丰,易洋,程帆(96)

技术方法

大鼠颌下静脉丛采血技术方法及其效果比较 …… 韩穆轩,邢影,王岳睿,张家钰,张浩,李自发,耿希文,魏盛(104)

调查报告

我国实验动物福利伦理审查质量评价指标体系构建研究 …… 苏美洋伊,陈昱君,陈星,王杨杨,高苒,邓巍(109)

研究进展

太阴调胃汤组方及药理作用研究进展 …… 左荣妹,安英美,王会,兰晓琪,郑光浩,吴艳玲,南极星,廉丽花(118)
动物实验的人道干预点 …… 邓少嫦,杨锦淳,林丹荣,丛锋,赵维波(128)
筛选镇静催眠药物的动物实验评价 …… 胡金,韦姗姗,邱祥玉,徐磊,蒋艳,曹蓓苓,陈文丽(133)
蛋白质二硫键异构酶 A3 在消化系统肿瘤中的研究进展 …… 樊建春,荀敬,朱梓嫣,王紫婷,武雪亮(141)
宫颈上皮内瘤变小鼠模型构建的研究进展 …… 亓丁,艾文霞,韩布威,门昊,梁铭阁,张明书,刘宁,刘丽,孙一鸣(147)
大鼠皮瓣模型的种类及其皮瓣成活的策略 …… 吴涛,杨英才,程千纲,梁志峰(153)
简讯 …… (117)

第 5 期

研究报告

FEM1B 促进 TRAIL 诱导的 HIV 潜伏库细胞 ACH-2 的细胞凋亡 …… 杨晨波,陆佳涵,丛喆,薛婧(1)
LGALS3BP 3’UTR 荧光素酶报告基因载体构建及鉴定 …… 刘翠华,邓林林,赵方新,红梅,武建强,张烜,李奕君,温琪,郭冉,刘奕彤,马启豪(8)
高同型半胱氨酸血症慢性肾病大鼠模型的建立和评价 …… 孟红旭,林力,马彦雷,史跃,刘建勋,李磊(15)
基于 UPLC-MS 技术探究糖脂代谢病的血清代谢谱特征 …… 赵亚茹,韩怡,朴婧羽,罗朵生(24)
1 日龄乳鼠心肌梗死模型制备及标准化评估 …… 郝琰琰,布威麦热姆·热杰普,向晨莹,韩国玲,刘维静,刘俊,聂宇,廉虹,王玉瑶(36)
基于 IKKβ/NF-κB 通路探究捏脊疗法对颈椎病模型大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡的作用 …… 梁立超,吴春芳,夏玲,李君(44)
基于 VEGF 途径探究丹参素对大鼠视网膜静脉阻塞及对视网膜功能的改善作用机制 …… 刘志强,李亚坤,白玫,郭向东,梁春利(52)
黄芩素对 TBHP 诱导小鼠髓核细胞衰老的保护作用 …… 甘延池,何嘉辉,尚奇,陈桂锋,陈弘林,张学来,张友,颜先伟,刘慧雯,梁德,任辉,江晓兵(61)
炭疽 Pasteur II 株芽孢气溶胶感染小鼠模型的构建与评价 …… 翟丽娜,宋晓琳,张丽丽,杨文慧,周冬生,房彤宇,吕蒙(69)

研究进展

程序性细胞死亡受体 1 与妊娠及相关疾病的研究进展 …… 陈碗,任雪,姜天悦,冯晓玲(77)
围绝经期抑郁症的研究进展* …… 杨艳青,赵伟田,李灿委,尹爱武,范孟然,杨自忠,高鹏飞(85)
抑郁症啮齿动物模型的建立及评价* …… 吕金芝,向玉仙,王丹,李俊霞,高耀,杜鑫哲,李忻蓉,刘莎(93)
与抑郁的抗争:运动介导免疫炎性系统改善抑郁的作用研究* …… 陆鹏程,金圣杰,陈祥和(104)
FEM1B 的结构与功能及在肿瘤和 HIV 感染中的作用 …… 杨晨波,丛喆,薛婧(112)
烟雾刺激法诱导呼吸系统疾病动物模型的研究及应用进展 …… 邓亚胜,林江,黄慧,梁天薇,荣娜,郑艺清,范燕萍(118)
滋养层细胞在先兆流产合并宫腔积血中的研究进展 …… 霍艳,陈萍,朱俊楠,付雅琪,徐广立(127)
基于文献数据库的药物诱导的抑郁动物模型的研究进展* …… 陈侯祯,姜宁,裴海月,陈芳,袁志鹰,谢梦洲(134)
注意缺陷多动障碍模型及其病理机制研究进展 …… 李雪军,王淑敏,姜之炎,肖臻(145)
简讯 …… (7)

*“抑郁症临床前研究:模型与指标”专题

第 6 期

研究报告

2 型糖尿病 db/db 小鼠骨强度和肠道内容物菌群的变化* …… 赵玉兰,杨艺,李进涛,王佩锦,角建林,郑红(1)

参附注射液经 NOS/NO 通路改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍的实验研究 …… 饶思静,张森,邵亚兰,洪芬芳,杨树龙(8)
电针足三里、内关穴对大鼠缺血性损伤后神经可塑性相关因子 GAP-43 和 SYN 的影响 …… 张游,靳子言,尹亚龙,王嘉仪,吴新贵(16)
基于线粒体质量控制系统观察六味地黄丸对老龄小鼠的神经保护作用 …… 王世界,杨晶,马贺,王璐瑶,张紫娟,苏运芳,张振强(24)
*Marcksl*1 基因敲除对小鼠成年造血的影响…… 高丽娟,李博,于磊,齐晓龙,张旭,高珊,刘宁,马元武(35)
LINC00662 通过 miR-144/COX-2 调控胶质瘤细胞替莫唑胺耐药性的作用研究 …… 严威,靳情,孙锐,水波,余涵,段鹏(46)
Long Evans 大鼠视网膜缺血再灌注损伤模型的特征及其造模前后谷氨酸的含量 …… 熊亚妮,孟永,钱仪敏,张鹏,张慧,李华(54)
外源性八肽胆囊收缩素对谷氨酸诱导大鼠大脑皮层神经元凋亡的保护作用研究 …… 王衍,陈玲,庞胤,张海峰,李贺扬(62)
虫草素通过调控 miR-135b-5p 表达抑制宫颈癌 Hela 细胞侵袭、转移的实验研究 …… 魏杏茹,王翠,庞旭娇,杜婷婷(68)
JAK2/STAT3 信号通路调控急性肺损伤过程中 Th17/Treg 失衡机制的研究…… 周斌,万少兵,王瑛,余平,典万康,周莹,周琴(75)
基于转录组学探讨阿比朵尔对 HCoV-OC43 感染诱导神经营养因子信号通路活化的影响 …… 陈琪敏,周红霞,谢佩芳,李润峰,杨子峰,邱敏珊,沈利汉(81)

教学管理

基于“新三中心”的医学实验动物学教学模式创新 …… 孟寒,张兆南,杨子豪,张彩勤,赵亚,秦靖,白冰,赵勇,师长宏(90)

研究进展

肠道菌群失调与自闭症谱系障碍的相关性研究进展* …… 董丽仙,尹爱武,李灿委,范孟然,巫秀美,杨自忠,张成桂,高鹏飞(95)
肠道菌群代谢产物在心血管疾病中的作用及机制研究* …… 王泽坤,徐欣,周学东,荣书玲(102)
外泌体对骨组织细胞的影响及应用的研究进展 …… 吴西,王中琪,宋慕格,杨世超,高玉海,陈克明(108)
肠道微生物群改善免疫检查点抑制剂耐药的研究进展* …… 顾家博,刘建磊,张春霞,金黑鹰,韦平,孟君,徐小龙(114)
非酒精性脂肪肝动物模型及细胞模型研究进展 …… 马晓月,李钦钦,陆华贞,马继艳,林宇宁,陈婉君,陈永欣(120)
中药纳米技术靶向治疗脑部疾病研究进展 …… 范容晖,阳志强,李勃深,张宇轩,李晓琳,李茂星(128)
简讯 …… (94)

*“动物模型与疾病微生物组”专题

第 7 期

研究报告

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(1)
大鼠腺样体肥大实验动物模型建立的探讨 …… 张奕星,姜之炎,刘安琪,王淑敏,孙程辉(9)
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,刘庚鑫,罗富里,晏子友(17)
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(26)

SHIV KU-1 感染恒河猴颞叶皮层中 IMPDH2 的表达 …… 赵长城,丁华明,鹿伦山,张千,杨静,董颖,薛群山,庄柯(34)
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,梅显运,杨慧雅,李艺康,冯佩,孙芳云(41)
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,杨威,戴锦龙,郭健敏(48)
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,魏丕喜,任双双,吕桂雪,魏雯雯(55)
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,王霞,彭心华(67)
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(78)
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,朱婷婷,毛海霞,康婷,张丽玲,吴蔚桦,欧三桃(85)
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,韩磊,范围,李红旗,郑福增(92)
骨痹散通过调节 TGF-β/Smad 信号通路减轻兔膝骨关节炎损伤* …… 李东东,李晓明,吴雪莲,易露,陈光友(100)
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,杨坤,李佩甲,唐顺,杨思禹,陈晖(108)

设施设备

实验动物屏障设施微生物污染防控管理要点 …… 张薇,王牧孜,邓少嫦(117)

研究进展

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(123)
血管内皮功能障碍及其评估技术 …… 田静,马英杰,王鹏,李阳,曾露,李彬,苏国海(130)
长链非编码 RNA 在系统性硬化症中的研究进展 …… 王宝玥,王永福,孙晓林(141)
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(149)
简讯 …… (66)

*“中药与骨科疾病”专题

第 8 期

研究报告

卵巢切除与老龄两种动物模型在研究 GPR30 心肌保护机制中的比较…… 王晓武,李子林,马继鹏,张帅帅,王晓亚,洪紫薇,刘金成(1)
氟化钠亚慢性染毒致雄性大鼠多脏器损伤效应的初步研究 …… 黄大敏,曾维德,苏建伟,庞雅琴,郭蕊,邓树嵩(8)
雷帕霉素通过抑制 mTOR 活性降低铝引起的磷酸化 tau 蛋白沉积 …… 徐义荣,纪晶晶,张广衡,田晓爱,卜凡,张叶平(15)
调元散对孤独症大鼠行为和脑内生化指标的影响 …… 梁志健,张建军,陈润红,严家荣,邝少松(22)
不同缺血时间对中国小型猪心肌缺血再灌注损伤的影响研究 …… 杨丽丽,康静,任建勋,郭浩,孟红旭,马彦雷,史跃,刘建勋,李磊(28)
METTL3 介导的 m6A 修饰对 ox-LDL 诱导的巨噬细胞焦亡的影响 …… 张昕怡,郭敏,高慧,刘宇(38)
甘草泻心汤对溃疡性结肠炎大鼠水通道蛋白 3、4 的影响 …… 雷娜,雷兰平,吴容,权娜娜,唐学贵(47)
MiR-100 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 … 王幸幸,黄珍,周浇,李桂玲,阚晨,郑红,汪思应(55)

葫芦巴碱对妊娠期糖尿病大鼠血脂代谢及胰岛素抵抗的影响* …… 张艳红,王柯静,李丽娟,李果(68)
改良消化富集法提高小鼠精原细胞染色体制备效率的研究及应用 …… 张静,程东,姚文环,杨非,唐慧,孙昌华,颜燕,周雯,李慧(75)
田基黄对大鼠高尿酸血症模型干预效果的分析 …… 高萍,李晓娟,许宁,李瑞生,李兴杰,李爱民(80)
*circTLK*1 通过 *miR*-26*a*-5*p*/*YES*1 轴减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤 …… 蒋先训,张凯,张鹰(86)
基于线粒体氧化呼吸链相关调节基因探讨二甲双胍对皮质酮致小鼠抑郁样行为的作用 …… 李俊,余冬,王木兰,冯育林,杜力军,龚琴(95)
苗药地锦草对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞相关蛋白表达的影响* …… 李晓颖,田娅飞,刘畅,陈松,樊丰夷,张春,吴欣(105)
Penetratin 复合神经生长因子治疗中度创伤性颅脑损伤小鼠 …… 尤丽丽,付文亮,裴洁,俞昶乐,邢微微,蔡贵玲,张超,徐东刚(114)

设施设备

小鼠生物净化技术平台的设计、运行及维护 …… 王芊芊,刘迪文,洪胜辉,汪洌(122)

研究进展

钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂(SGLT2-抑制剂)对糖尿病的机制和治疗研究综述* …… 李萌,庞立香,马茜茜,包书茵,付丹妮,白雪(127)
miRNAs 在代谢综合征中的作用研究进展 …… 郭入嫣,韩宇博,邹国良,隋艳波,王钰,刘莉(133)
围绝经期综合征细胞模型的建立及评价方法研究进展 …… 康梦娇,张伟,赵林华(139)
肝纤维化的发病机理及相关信号转导机制研究进展 …… 李明芳,李曹飞,左东泽,赵营莉,余士贝,谢耀辉,彭家志,刘建军(147)
简讯 …… (132)

*“糖尿病性肾病发病与治疗机制”专题

第 9 期

研究报告

基于 UPLC-TQ-MS 探究野鸦椿酸在 Caco-2 细胞单层模型上的吸收转运研究 …… 王宁,谢莉,丁文欢,田莉(1)
川芎嗪-丹参配伍前后在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布差异研究 …… 李容,勾健,刘亭,巩仔鹏,陆苑,刘春花,黄勇,孙佳(8)
IBS-D 大鼠肠道菌群-短链脂肪酸代谢轴变化特点及丁酸钠干预作用研究 …… 占凯,吴皓萌,郑欢,秦书敏,杨元明,黄绍刚(16)
基于 SYRCLE 工具与 ARRIVE 指南评价针刺干预高血压动物实验研究的质量 …… 唐文静,张月,李雨谿,钟冬灵,金荣疆,张丽丽,李涓(25)
补肾健脾开心方对 AD 大鼠自噬及凋亡相关蛋白的影响 …… 李莹,王莹,孔明望(38)
PI3K/Akt/mTOR 信号通路在 TRALI 大鼠发病机制中的作用研究 …… 刘双春,张细江,王璐倩,陈再欢,林荣海(47)
花旗松素调控内质网应激 PERK-ATF4 通路减轻高血压大鼠心肌肥厚的机制研究 …… 余金玉,韩静,张营,侯亮,余稳(54)

3R

实验动物福利伦理审查发现问题之思考 …… 刘丽艳,张宏馨,边佳悦,廉海晨,韩艳梅,袁广富(63)

研究进展

重度哮喘动物模型构建的研究进展* …… 魏丹丹,汪丽婷,龙洁,陈艳焦,王宇,杨永清,徐玉东(69)
肺动脉高压实验模型的研究进展* …… 谢锦程,肖梦媛,邓少东,陈建英(79)
啮齿类动物实验性经前烦躁症模型研究进展* …… 许佳玲,刘坤,邢影,胡明会,张浩,李自发,耿希文,魏盛(90)
咳嗽动物模型国内外研究进展* …… 罗景舒,马建岭,罗敬月,史利卿,温绍惠,李扭扭,王丽云(99)
基于中西医临床病症特点的角膜炎动物模型分析 …… 南硕,宫欢欢,李秀敏,苗明三(113)
基于铁死亡治疗衰老及衰老相关疾病的研究进展 …… 周永昌,陶思曼,陈胜强,蒲秀瑛(121)
Cuprizone 诱导的多发性硬化疾病动物模型的特点及应用 …… 李琳,王异民,王伟,王珊,盘美良,孙伟强,樊卫平,石建云(132)
关于炎症性肠病发病机制的研究进展 …… 侯晓婷,孟欢,薛佳辰,张华敏,王旭德,王科斯(138)
骨髓间充质干细胞的分离、培养、鉴定及其在关节软骨损伤修复中的相关应用 …… 刘少斐,许冰冰(149)
简讯 …… (46)

*“慢性疾病动物模型”专题

第 10 期

研究报告

左向右分流减缓肺动脉高压大鼠心脏重构 …… 纪爽,潘慧,李天骐,叶梦婷,马铭婕,张学佳,王晓建,杨晓敏(1)
穴位埋线通过 PD-1/OX40 信号通路影响类风湿关节炎的炎症水平 …… 陈丽川,段波,喻昭,马志毅,孟倩文(8)
柴胡桂枝汤加减通过调节 Wnt/β-catenin 信号通路对骨质疏松大鼠的改善作用及机制研究 …… 郭中华,史栋梁,曹玉举,王云飞,杨少祥,秦合伟,张仲博,任博文,周松林,王俊杰,王莉莎,万小冠(15)
ADAM10 在骨髓间充质干细胞成骨分化及胫骨骨折愈合中的作用及可能机制 …… 唐晓旭,张志乾,李福琴,王楠(23)
骨髓骨片法体外培养大鼠骨髓间充质干细胞和 PKH26 标记 …… 陈爽,谢燕燕,徐菊菊,闫振宇(32)
低剂量 BPA 和 DEHP 对成年大鼠前列腺 AKR1C3 的影响 …… 黄冬妍,吴双双,邵丛丛,苏欣,杨荣富,王凯玥,周萍,吴建辉(38)
黄芩素介导自噬经由 miR-449a/HDAC1 轴抑制喉癌细胞增殖及迁移的机制研究 …… 王剑,孙永东,周兴玮,刘雷,童兴科,陈龙,何娴(45)
角蛋白 17 基因敲除加剧糖尿病小鼠的创面愈合障碍 …… 鲍丹,郭蕊,侯道荣(54)
LAMC2 通过 PI3K/Akt 信号通路调控胃癌细胞增殖的研究 …… 王文博,汪清云,郭卫,夏泠(61)
HDAC6 抑制剂通过保护肾小球内皮细胞线粒体稳态和 EMT 改善糖尿病肾病 …… 陈小丽,罗富里,童梦瑶(71)

经验交流

中国实验动物许可证管理现状比对分析及对策建议 …… 李会萍,陈梅丽,赵维波(81)

研究进展

气虚湿瘀型肾纤维化动物模型的研究进展 …… 高冉冉,申振,连梦慧,韩聪,李伟(91)
环状 RNA 在缺血性脑卒中领域的研究进展 …… 唐琛,兰瑞,付雪琴,王玮玮,邹旭欢,王漫漫,李泓宇,刘双(100)

高原对线粒体功能及能量代谢影响研究进展 …… 李勃深,张宇轩,范容晖,李茂星,刘天龙(106)
病证结合 COPD 动物模型研究进展 …… 把得婷,郝彬彬,李娟(114)
模式生物斑马鱼在神经退行性疾病中的研究进展 …… 黄孔丽,苏世杰,王玉婷,刘壮壮,曹丹丹,汪沛,陈冠林,王奇(121)
自噬:运动改善神经退行性疾病的关键机制 …… 陈祥和,仇啸,刘驰,沈梓铭,周香香(132)
外泌体 miRNA 在早期筛查与治疗阿尔茨海默病的相关研究进展 …… 张俊峰,郝丽亚,高红艳,刘光甫,张祖源,郭永刚(140)
肠道微生物菌群与肥胖相关代谢性疾病的研究进展 …… 苏黑艳·帕尔哈提,张姣姣,马壮,王俊人,李艳红(146)
简讯 …… (22)

第 11 期

研究报告

中等强度和高强度间歇运动对非酒精性脂肪肝小鼠心肌线粒体自噬的影响 …… 何苗,李佳航,刘鑫,杨威,吴良文,范晶晶(1)
基于 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路探讨高尿酸血症合并非酒精性脂肪肝机制 …… 龚晓红,李松伟,李桓,武上雯,陆超群,陈一鸣(10)
六君子汤乙酸乙酯提取物干预 CAFs 条件培养基下 EC9706 细胞能量代谢的机制研究 …… 陈星,娄翔宇,尚艺婉,周哲旭,刘洋,刘娅茹,胡啸博,陈玉龙(17)
黄芩苷对注意缺陷多动障碍动物模型 SHR 大鼠核心症状影响研究 …… 张永婷,周荣易,马丙祥,吴晨蕾,谢新月,丁雪颖(25)
基于 HIF-1α/自噬途径探讨二氯化钴调控 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应及胰岛素抵抗的机制 …… 岳欣欣,付洋,李怡然,尹晓燕,于飞,傅全威(33)
大蒜素通过 JAK2/STAT3 信号通路改善高糖诱导的人腹膜间皮细胞-间充质转化 …… 甘林望,李乾程,高利超,刘琦,李莹,王玉洁,欧三桃(39)
抑制线粒体内膜蛋白 OMA1 对 Rot 诱导帕金森病细胞模型凋亡的影响 …… 石瑾,吕玥,徐婷,宣婷婷,杨娟,杜丹丹,张俊梅,李海宁(48)
基于数据挖掘的骨肉瘤动物模型应用分析 …… 喻帅克,罗茂丽,王连睿,周天豹,苗明三,白莉(55)
lncRNA SNHG16 通过调控 miR-570 对肝癌细胞索拉非尼耐药的机制研究 …… 柳扬,范伟,丁洁(63)
小鼠慢性酒精中毒性脑损伤模型的建立 …… 蔡瑜,王璐婉,谢冬琳,高大鹏(71)
LncRNA FGD5-AS1 对口腔鳞状细胞癌细胞恶性表型的影响 …… 杨锋,刘广龙,王艳卿(78)
金丝桃苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对肾病综合征大鼠自噬反应的影响 …… 孔露娇,王心,刘静,郭晓阳,薛明伟(88)

研究进展

非人灵长类帕金森动物模型中的行为学评估 …… 刘书一,王正波(96)
CREB 通过调节突触可塑性调节记忆及与阿尔茨海默病的联系 …… 罗卓慧,庞硕,张连峰(104)
miRNA 在缺血性脑卒中神经保护领域的研究进展 …… 李泓宇,兰瑞, 付雪琴,王玮玮,邹旭欢,王漫漫,张勇,唐琛,刘双(110)
miRNAs 对消化系统肿瘤肝转移影响的研究进展 …… 杨斯棋,邹亲玲,金明(118)
淋巴管生成的调节及其在心肌梗死中的作用研究进展 …… 杜清,岳彤彤,王贺(126)
猴痘病毒的感染与猴痘的动物模型 …… 包容(133)
小胶质细胞-星形胶质细胞的交互作用及其介导的神经炎症在阿尔茨海默病中的研究进展 …… 胡鑫,汪蒨,张晨曦,郑慧慧,李鹏洋,赵红晔,邓凤春(142)

HBV 感染 DLBCL 患者的分子机制及预后研究 …… 袁和锐,郭鹏翔(150)
简讯 …… (125)

第 12 期

研究报告

不同月龄 C57BL/6 小鼠大脑皮质功能区的微血管形态计量学分析 …… 郭民,郭永昌,张瑞虎,张引红,王海龙,陈朝阳(1)
*IGHG*1 对急性髓系白血病 THP-1 细胞增殖、凋亡和侵袭的机制研究 …… 李长美,金亚,孙寅,刘建,姜道亮,张教国,杨瑞,杨勇,邱立(7)
京尼平苷通过 PI3K/Akt 通路促进糖尿病大鼠皮肤溃疡创面愈合 …… 姜雯雯,刘欢,陈晓燕,荣小娟,刘燕玲,曾威(14)
人羊膜上皮细胞移植对子宫瘢痕模型大鼠子宫内膜的影响及机制 …… 王静,路成吉,臧建新,衣志爽,彭家晟,张峰(21)
恒古骨伤愈合剂对 db/db 小鼠的降血糖和改善肠道菌群作用研究 …… 邓绍友,赵玉兰,王佩锦,李蓉,赵宏斌,角建林,郑红(28)
miRNAs 在大鼠酒精性肝损伤中的作用研究初探 …… 从美丽,刘涛,费璇,周蓓,孙建新,赵效国(34)
蒙药哈它各其-7 通过 HIF-1α 促进糖尿病大鼠溃疡创面愈合的实验研究 …… 董成海,澈力格尔,潮日雅,满柱,包永林,龚利民(42)
MNU 诱导 SD 大鼠下焦湿热证尿血(膀胱癌)模型研究 …… 常拓,王洁,李楠,王天奇(49)
定坤丹对子宫内膜异位症大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的影响 …… 王伟伟,席鑫(55)
纳米二氧化铈亚急性染毒对雄性小鼠脏器结构和氧化还原指标的影响 …… 张倩,黄明生,蒋黎,顾冬梅,殷俊(62)

技术方法

小鼠肝枯否细胞和肝星状细胞分离提取方法的比较及优化* …… 马文萌,吴昊,闫昱彤,孙逊,郑倩倩(68)

研究进展

血管性痴呆动物模型的研究概述 …… 宋元毓,陈英华,李俊峰,孙玮(75)
单细胞转录组技术在神经退行性疾病上的应用研究进展 …… 邬建飞,刘宇,魏岱旭,蒲建林,蔡端芳,王丙龙(86)
饮食诱导非酒精性脂肪性肝病动物模型的研究进展* …… 王佳林,王重阳,李杨,陈贤玮,袁中楠,邹朝霞,邹臣丹(93)
自噬在系统性硬化症发病机制中作用的研究进展 …… 李鑫,孙晓林,王永福(97)
基于表观遗传学调控的中医药治疗中风研究进展 …… 付雪琴,兰瑞,张勇,王漫漫,邹旭欢,王玮玮(104)
HIF-1α 信号通路在离体器官冷保存中的保护作用* …… 王智洋,郑斯阳,朱亮(112)
大气污染物与部分不良妊娠结局的关系 …… 金剑,常慧,黄和缓,彭瑞,赵冰,张小安(118)
斑马鱼肾损伤造模方法及评价指标的研究进展 …… 兰爱琳,黄春华,夏铭,李茂娟,汪思齐,楼迪栋(123)
简讯 …… (85)

*“东北三省高校学生优秀实验动物论文评选大赛”专题

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE
INDEX OF CONTENTS
Vol. 33 **No.** 1~12,2023

Issue 1

Effect of *Cordyceps militaris* extract on CYP19/CaM/CaMK Ⅱ signaling in testes of kidney yang deficiency model rats …… *CHEN Siyuan*, *WANG Siyu*, *QI Mingyuan*, *LI Longpo*, *XU Yixin*, *ZHANG Ting*, *YAO Ziyan*, *ZHAO Hongqing*(1)
Triptolide attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway …… *ZHANG Huiyu*, *BAI Zhenjun*, *LI Liang*, *ZHANG Jinfeng*, *XIE Jiawei*, *DENG Liang*, *MENG Yan*, *GUO Minfang*(9)
Liver protein expression profile of AFLD mice determined by four-dimensional label-free quantitative proteomics and the therapeutic effect of resveratrol …… *HAN Min*, *YI Xu*, *YOU Shaowei*(16)
Establishment of two rat models of gouty arthritis with damp-heat syndrome based on lipid metabolism and proinflammatory factors …… *GAN Bin*, *LI Huanan*, *LI Song*, *ZHANG Xiaoyun*, *CHEN Yu*, *GU Bing*, *ZHANG Yunkai*, *LIU Yongqian*, *SHAO Zichen*(26)
A comparative study of the establishment of mouse pre-eclampsia models …… *XU Jiahuan*, *BIE Yanan*, *CHEN Qianqing*, *CHEN Baiyu*, *OU Baofang*, *XIE Shuilin*, *WU Shaoyu*(34)
Cisplatin resistance in non-small lung cancer cells is affected by ferritin mitochondrial through EMT regulation …… *ZHAO Junxiu*, *HUO Mingyang*, *CHEN Zhenyu*, *BAI Xuesong*, *MA Hongbo*, *XI Yanli*(42)
Effects of autophagy on vascular calcification in chronic kidney disease …… *KANG Ting*, *MAO Haixia*, *LIN Jiaru*, *ZHU Tingting*, *ZHANG Liling*, *ZHANG Dongmei*, *WU Weihua*, *OU Santao*(51)
Effects of xenoestrogen nonylphenol on proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells by SRXN1 *LI Kaikai*, *ZHANG Yuanwei*, *ZHANG Nianjie*, *YIN Shuo*, *HE Nian*, *WAN Lei*, *CHEN Xu*, *YANG Xuefeng*(61)
Analysis and evaluation of quality monitoring results of SPF rats and mice in Shaanxi province from 2017 to 2021 …… *WU Pengpeng*, *ZHANG Caiqin*, *ZHAO Yong*, *TAN Dengxu*, *SHI Changhong*, *BAI Bing*(70)
Ultrasound imaging for evaluation of nodular goiter in rats …… *GAO Xiangju*, *GAO Dongmei*, *CHEN Xianmei*, *SONG Tingting*, *GAO Zhan*, *GAO Jie*, *WANG Jieqiong*(78)
Effect of macrophage AMPKα1 knockout on a non-alcoholic fatty liver model in mice …… *WANG Shunyi*, *CHEN Sishuo*, *YU Tianli*, *LIN Caixia*, *WANG Lijing*, *ZHENG Lingyun*(85)
Analysis on the characteristics of 6-OHDA induced rat model of Parkinson's disease based on literature data base and the application in the study of traditional Chinese medicine …… *WANG Mengdi*, *Zhang Qiumei*, *Fan Bei*, *Alberto Carlos Pires Dias*, *WANG Fengzhong*, *WANG Qiong*(93)
Research progress of Chinese medicine in regulating tight junction after ischemic stroke …… *CHEN Tingyu*, *SU Kaiqi*, *RUAN Xiaodi*, *FANG Lu*, *ZHANG Yuhan*, *LIU Hao*, *FENG Xiaodong*(103)
Fucosylation and multidrug resistance of tumors … *FENG Bo*, *LIU Ziyu*, *LI Yue*, *LIU Likun*, *YUE Liling*(113)
Research progress of GLAST and nervous system diseases …… *WU Fangshan*, *MA Kefeng*, *CUI Bo*(119)
Effects of N-methyl-D-aspartate receptor NR2B phosphorylation on ischemic/hypoxic neuroprotection …… *LIU Xiaolei*, *JIANG Shuyuan*, *SHAO Guo*, *XIE Yabin*, *JIA Xiaoe*, *XIE Wei*(125)
Establishment and evaluation of rat model of allergic asthma …… *LOU Jincheng*, *MIAO Xinyun*, *SU Jiaqi*, *HU Qing*, *ZHAI Chuntao*, *LYU Yue*(130)

Progress in selection of animals for hemorrhagic shock and models of other concurrent diseases ····· *LIU Honggang*, *ZHUO Meijuan*, *NIE Hongxin*, *MENG Hui*(138)
Role of anti-Siglec-15 in non-small cell lung cancer ····· *LI Yankang*, *HE Gangfeng*(144)

Issue 2

Effects of acupuncture on internal carotid artery compliance and c-Jun N-terminal kinase/monocyte chemoattractant protein-1 pathway in spontaneous hypertension rats ····· *DONG Aiai*, *WU Ronglin*, *GUO Jilong*, *JIN Xiaofei*, *LAI Xiaoyun*, *CUI Yiyi*, *WANG Weifeng*, *WANG Shenglong*, *JI Laixi*(1)
Relationship between early pressure gradient and the degree of myocardial hypertrophy in a mouse model of transverse aortic constriction ····· *LI Qiulin*, *TANG Jing*, *ZHAO Ling*, *AMANGULI Ruze*, *GAO Xiaoming*(9)
Identification and bioinformatics analysis of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 in Chinese hamsters ····· *GUO Min*, *YUAN Meng*, *QIN Keru*, *HUO Yitong*, *WANG Wentao*, *DU Kaiyan*, *ZHANG Ruihu*, *WANG Hailong*, *CHEN Zhaoyang*(15)
Long non-coding RNA KTN1-AS1 affects proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by regulating miR-153-3p/NFAT5 axis ····· *CUI Wenjie*, *YUAN Jieqing*, *SHI Hai*, *WU Siyan*, *HAN Yu*, *CHEN Yunfeng*(22)
Caloric restriction alleviates angiotensin-Ⅱ-induced cardiomyocyte hypertrophy ····· *SUN Siyu*, *HE Zhongmei*, *ZHONG Qi*, *YANG Ruirui*, *YAN Zi*, *GAO Lijuan*, *CAO Jimin*(31)
Analysis of behavioral, serum, and skin histology tests in experimental psoriasis mice ····· *RABIGUL Islam*, *KALBINUR Ablat*, *ABDUPATTAR Abdurazak*, *YULTUZ Mamat*, *YUSUPJAN Ali*, *MAMAT Ali*(39)
Relationship between cerebral ischemia-reperfusion injury and mitochondrial autophagy in mice ····· *YANG Xinyong*, *WANG Kaihua*, *LIU Danning*(48)
LncRNA SNHG16 regulates the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of colorectal cancer cells via the miR-106b-5p/PHF1 axis ····· *ZHAO Jiangang*, *ZHAO Guangyuan*, *BAO Shuangzhen*, *LIU Yifen*(56)
Study of the anti-breast cancer effects and mechanisms of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba *in vitro* ····· *MA Liwei*, *CHEN Zhe*, *CHEN Song*, *NI Shiyu*, *LI Jing*, *GE Pengling*, *LIU Jicheng*(66)
A technique and evaluation method for minimally invasive preparation of an acute myocardial infarction model in Bama mini-pigs ····· *JIANG Wenyang*, *CUI Yongchun*, *LI Xiaosong*, *HU Mengjin*, *YUE Guangxin*, *YANG Yuejin*(76)
Optimization of cardiac fixation methods in experimental rats and mice ····· *MA Jiaxin*, *WANG Yaheng*, *DONG Wei*, *ZHANG Lianfeng*, *LYU Dan*(84)
Development and application of intelligent comprehensive management system for laboratory animals ····· *YUAN Jin*, *TIAN Yuguang*, *WU Qinghong*,*YU Kui*, *ZHANG Qingyan*(91)
Methods for determining animal sample sizes in medical experimental studies ····· *CAO Ce*, *LI Lingmei*, *ZI Mingjie*, *FU Jianhua*, *REN Junguo*, *LI Lei*, *LIU Jianxun*(99)
Mechanism of action and progress of research into lactoferrin in central nervous system diseases ····· *ZHAO Nan*, *JIANG Rui*, *XIONG Liulin*(106)
Mechanism of chemotherapy-induced thrombocytopenia in hematological malignant tumors ····· *LI Liang*, *KONG Chunfang*, *JIN Chenghao*(113)

Research progress on the role of T cells in the pathogenesis of narcolepsy type 1 ····· *DU Shushu*, *LIU Wenhui*, *ZHAO Lili*, *LIU Rongzeng*(119)
Ideas and technical challenges of vascularized organoid construction ····· *SUN Ke*, *WANG Ting*, *LI Jingyi*, *LI Hongmei*(126)
Recent advances in radiosensitization therapy of cancer by targeting the DNA damage response ····· *LI Mingjun*, *LI Jialin*, *YANG Bo*(134)
Research progress of focal ischemic stroke in production of animal models ····· *XI Yalin*, *WANG Huiyu*, *LU Shujun*(140)

Issue 3

*Trim*44 knockout promotes neuronal apoptosis and decreases learning and memory abilities in aged rats ····· *ZHANG Li*, *MA Yuanwu*, *ZHANG Xu*, *DING Dengfeng*, *CHEN Wei*, *SHENG Hanxuan*, *GAO Xiang*, *DONG Wei*, *ZHANG Lianfeng*(1)
Effects of hydroxysafflor yellow A on oxidative stress and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion ····· *LI Lingmei*, *CAO Ce*, *HAN Xiao*, *FU Jianhua*, *LI Lei*, *ZHANG Qiong*, *XIN Gaojie*, *LIU Zixin*, *REN Junguo*(9)
Effect of Huangyangning on oxidative stress in dogs with atrial fibrillation via the AngII-NOx-ROS signaling pathway ····· *FENG Guangling*, *MAO Wenfeng*, *ZHI Qiang*, *WANG He*, *XIE Jinhong*(17)
Whole-genome analysis and pathogenicity of *Aeromonas dhakensis* isolated from shrimps ····· *QU Fengtian*, *ZHOU Haijian*, *XUE Jiaqi*, *DU Xiaoli*, *HU Jinrui*, *CUI Zhigang*, *XIE Guilin*, *LIU Chengeng*, *MENG Shuang*(24)
Characteristics and sex differences of two kinds of hyperlipidemia models in rats ··· *TIAN Shiqiu*, *ZUO Zeping*, *LI Yilin*, *TIAN Yingying*, *PEI Hailuan*, *YU Shangyue*, *ZHAO Xinyue*, *LIU Chuang*, *WANG Zhibin*(37)
Identification of estrous cycles in rats and mice by rapid Gram staining ····· *ZHANG Lei*, *ZHANG Ruoqian*, *QIN Xiuyun*, *LI Honglin*, *ZHANG Jianwei*(45)
Perirenal adipose tissue derived exosomes regulate blood pressure in rats ····· *ZHANG Peisen*, *LIANG Liwen*, *SHI Zhen*(51)
Curcumin alleviates acetaminophen-induced acute kidney injury by regulating the Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in rats ····· *LEI Huan*, *GUI Ying*, *DENG Qin*, *LIU Ziyuan*, *ZHANG Wei*, *MEI Zhinan*, *XU Lingyun*(59)
Comparative analysis of the morphological characteristics of tree shrew eyes ····· *QIU Min*, *CHEN Liu*, *HUO Shurui*, *DING Xiangrong*, *TONG Pinfen*, *LI Na*, *DAI Jiejie*, *HAO Peiqi*, *GAO Jiahong*, *LU Caixia*(66)
Establishment of a comparative transcriptomics database of heart disease animal models ····· *WU Yue*, *WANG Jue*, *XUE Jing*, *WEI Qiang*, *YANG Zhiwei*, *KONG Qi*(75)
Ethical analysis of non-anesthetic euthanasia for experimental animals ··· *ZHANG Daohan*, *SHAO Hongxia*(82)
Research progress on the relationship between ferroptosis and immune cells ····· *ZHANG Guihong*, *TANG Xudong*(90)
Development of genetically modified rabbits and their applications in human disease research ····· *TAO Yuan*, *LIU Zhonghua*, *SONG Jun*(98)
Astrocytes play a major role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy ····· *WU Rui*, *DING Jun*, *CHENG Chi*, *YU Tian*(110)

Protective effect of astrocyte extracellular vesicles against ischemic stroke ····· *WANG Weiwei*, *LAN Rui*, *FU Xueqin*, *WANG Manman*, *ZOU Xuhuan*, *ZHANG Yong*(116)
Research progress of brain astrocyte-neuron interactions involved in the pathogenesis of depression ··· *LIU Yan*, *PENG Mengwei*, *ZHANG Wenxian*, *YANG Tiezhu*, *WU Yaosong*, *LIU Jun*, *REN Shanshan*, *CHEN Yulong*(124)
Research progress of Traditional Chinese Medicine adjuvant immunotherapy for cancer ····· *WANG Huihui*, *LI Hui*, *ZHANG Yanying*, *WANG Yongfeng*, *SHI Changhong*(130)
Research progress of the D-galactose-induced aging mouse model ····· *HONG Jing*, *ZHANG Yali*, *YAN Shasha*, *LI Xue*, *TIAN Xiaojing*, *CAO Hong*, *ZHANG Fumei*, *DING Gongtao*(136)

Issue 4

Effects of *Tmem*72 on proliferation and differentiation of mouse neural stem cells *in vitro* ····· *HOU Liya*, *LEI Xuepei*, *HUANG Yiying*, *SHI Guiying*, *WANG Kaiyu*, *YUE Hanwei*, *TANG Jiaming*, *BAI Lin*(1)
Influence of two routes of sensitization of immune responses in allergic airway inflammation mouse model ····· *TANG Mindan*, *LI Xu*, *ZHANG Kaoyuan*, *YANG Ting*, *ZHUO Fan*, *TANG Siyi*, *DOU Xia*, *CHEN Xiaofan*(11)
Effects of Yifei moxibustion and its combination with Tiao bu-Fei shen formulas on MUC5AC and MUC5B in the airways of stable COPD rats ····· *LI Jingmei*, *SHEN Tingting*, *FAN Zhengyuan*, *LI Ya*, *LI Jiansheng*, *LI Suyun*(20)
Effects of chronic high-altitude hypoxia exposure on neurobehavior in mice ····· *ZHANG Mengya*, *ZHAO Ming*, *JIANG Yaqun*, *SHI Zibi*, *CHENG Xiang*, *LI Yunfeng*, *ZHU Lingling*(28)
Standardized identification and inclusion of a strain of *Rodentibacter pneumotropicus* in a national pathogenic microorganism resource database ····· *SU Lei*, *XIONG Lijuan*, *ZHANG Lifang*, *LI Xia*, *LI Xue*, *SHI Weixiong*, *XIAO Fangping*, *BAO Linlin*, *ZHOU Yinping*, *XIANG Zhiguang*(36)
Construction and analysis of rat model of hindlimb venous ulcer ····· *ZHANG Xiaoqian*, *FAN Qichen*, *WANG Genyi*, *WANG Yannan*(43)
Establishment of an animal model of Coxsackievirus B1 infecting Syrian golden hamster ····· *LI Yongjie*, *ZHANG Wei*, *YANG Fengmei*, *LI Yanyan*, *DUAN Suqin*, *TANG Jie*, *SUN Wenting*, *JIN Weihua*, *Deng Zijun*, *LI Mingxue*, *ZHANG Ming*, *MA Shaohui*, *HE Zhanlong*(50)
Effect of epidermal stem cells on skin wound healing in mice ····· *WANG Haishan*, *LIN Fengyuan*, *LIU Xiaoyu*, *LIU Xinzhu*, *YAN Yuning*, *GUO Xiao*, *AN Liping*(57)
Application of recombinase-aid nucletic acid amplification for detection of minute virus of mice ····· *ZHAO Xiaoyu*, *TONG Wei*, *GUO Zhi*, *XIANG Zhiguang*, *WEI Qiang*(63)
Effects of Xingpi Yanger granules on urination function in normal rats ····· *LI Lei*, *WANG Aoao*, *WANG Ziyan*, *YANG Lili*, *SHI Yue*, *MA Yanlei*, *MENG Hongxu*, *LIU Jianxun*(69)
Anesthesia and application of tracheal intubation technique for preserving spontaneous breathing in medical experimental operation on piglets ····· *SUN Jiu*, *YANG Xue*, *QU Jinquan*, *YANG Xinyue*, *SHEN Caifu*, *LI Jiajia*, *LIU Jiangwei*(76)
Characterization of intestine-derived exosomes carrying miR-146a in rats with chronic kidney disease microinflammation ····· *LIU Linna*, *WANG Hong*, *JIANG Qian*, *YUAN Ling*, *CUI Xiaoxue*, *XU Juan*, *PAN Yurong*, *WANG Lei*, *LI Yanlin*(83)
Effect of NOX4/ROS/STAT3 pathway on the activation and proliferation of hepatic stellate cells ····· *MENG Yanfang*, *SHEN Fengjun*(90)

Effect of *miR*-141 gene interference targeting *PTEN* on osteogenic differentiation of mouse BMSCs ····· *BAO Yunping*, *ZHU Zhengrong*, *TIAN Feng*, *YI Yang*, *CHENG Fan*(96)

Localization of blood collection points in the submandibular venous plexus and blood collection method of rats ··· *HAN Muxuan*, *XING Ying*, *WANG Yuerui*, *ZHANG Jiayu*, *ZHANG Hao*, *LI Zifa*, *GENG Xiwen*, *WEI Sheng*(104)

Development of an indicator system of quality evaluation for welfare ethical review of laboratory animal care and use in China ····· *SU Meiyangyi*, *CHEN Yujun*, *CHEN Xing*, *WANG Yangyang*, *GAO Ran*, *DENG Wei*(109)

Research progress on prescription and pharmacological action of Taiyin Tiaowei-Tang ····· *ZUO Rongmei*, *AN Yingmei*, *WANG Hui*, *LAN Xiaoqi*, *ZHENG Guanghao*, *WU Yanling*, *NAN Jixing*, *LIAN Lihua*(118)

Humane intervention points of animal experiments ····· *DENG Shaochang*, *YANG Jinchun*, *LIN Danrong*, *CONG Feng*, *ZHAO Weibo*(128)

A review of animal experiments used for sedative-hypnotic drug screening ····· *HU Jin*, *WEI Shanshan*, *QIU Xiangyu*, *XU Lei*, *JIANG Yan*, *CAO Beiling*, *CHEN Wenli*(133)

Research progress into protein disulfide isomerase A3 in digestive system tumors ····· *FAN Jianchun*, *XUN Jing*, *ZHU Ziyan*, *WANG Ziting*, *WU Xueliang*(141)

Research progress in the establishment of mouse models of cervical intraepithelial neoplasia ····· *QI Ding*, *AI Wenxia*, *HAN Buwei*, *MEN Hao*, *LIANG Mingge*, *ZHANG Mingshu*, *LIU Ning*, *LIU Li*, *SUN Yiming*(147)

Types of rat flap models and strategies for flap survival ····· *WU Tao*, *YANG Yingcai*, *CHENG Qiangang*, *LIANG Zhifeng*(153)

Issue 5

FEM1B promotes cell apoptosis induced by TRAIL in HIV reservoir ACH-2 cell lines ····· *YANG Chenbo*, *LU Jiahan*, *CONG Zhe*, *XUE Jing*(1)

Construction of a luciferase reporter gene vector for the LGALS3BP 3'UTR ····· *LIU Cuihua*, *DENG Linlin*, *ZHAO Fangxin*, *HONG Mei*, *WU Jianqiang*, *ZHANG Xuan*, *LI Yijun*, *WEN Qi*, *GUO Ran*, *LIU Yitong*, *MA Qihao*(8)

Establishment and evaluation of a rat model of chronic kidney disease with hyperhomocysteinemia ····· *MENG Hongxu*, *LIN Li*, *MA Yanlei*, *SHI Yue*, *LIU Jianxun*, *LI Lei*(15)

Characteristics of the serum metabolic spectrum of glucolipid metabolic disease by UPLC-MS ····· *ZHAO Yaru*, *HAN Yi*, *PIAO Jingyu*, *LUO Duosheng*(24)

Preparation and standardized assessment of a myocardial infarction model in 1-day-old suckling mice ····· *HAO Yanyan*, *BUWEIMAIREMU·Rejiepu*, *XIANG Chenying*, *HAN Guoling*, *LIU Weijing*, *LIU Jun*, *NIE Yu*, *LIAN Hong*, *WANG Yuyao*(36)

Effect of chiropractic therapy on inflammatory response and apoptosis of intervertebral disc cells in rats with cervical spondylosis based on the IKKβ/NF-κB pathway ····· *LIANG Lichao*, *WU Chunfang*, *XIA Ling*, *LI Jun*(44)

Mechanism of Danshensu in retinal vein occlusion and retinal functions in rats *via* the VEGF pathway ····· *LIU Zhiqiang*, *LI Yakun*, *BAI Mei*, *GUO Xiangdong*, *LIANG Chunli*(52)

Baicalein protects mouse nucleus pulposus cells from TBHP-induced senescence ····· *GAN Yanchi*, *HE Jiahui*, *SHANG Qi*, *CHEN Guifeng*, *CHEN Honglin*, *ZHANG Xuelai*, *ZHANG You*, *YAN Xianwei*, *LIU Huiwen*, *LIANG De*, *REN Hui*, *JIANG Xiaobing*(61)

Establishment and evaluation of mouse model of *Bacillus anthracis* Pasteur II strain infection *via* aerosolized

intratracheal inoculation ……
ZHAI Lina, *SONG Xiaolin*, *ZHANG Lili*, *YANG Wenhui*, *ZHOU Dongsheng*, *FANG Tongyu*, *LYU Meng*(69)
Research progress of programmed cell death receptor 1 in pregnancy and related diseases ……
…… *CHEN Wan*, *REN Xue*, *JIANG Tianyue*, *FENG Xiaoling*(77)
Research progress of perimenopausal depression ……
YANG Yanqing, *ZHAO Weitian*, *LI Canwei*, *YIN Aiwu*, *FAN Mengran*, *YANG Zizhong*, *GAO Pengfei*(85)
Establishment and evaluation of rodent models of depression ……
… *LYU Jinzhi*, *XIANG Yuxian*, *WANG Dan*, *LI Junxia*, *GAO Yao*, *DU Xinzhe*, *LI Xinrong*, *LIU Sha*(93)
Fighting depression: research on the effect of exercise-mediated immunoinflammatory system to improve depression
…… *LU Pengcheng*, *JIN Shengjie*, *CHEN Xianghe*(104)
Structure and function of FEM1B in cancer and HIV infection …… *YANG Chenbo*, *CONG Zhe*, *XUE Jing*(112)
Research and application progress of animal models of respiratory diseases induced by the smoke stimulation method
…*DENG Yasheng*, *LIN Jiang*, *HUANG Hui*, *LIANG Tianwei*, *RONG Na*, *ZHENG Yiqing*, *FAN Yanping*(118)
Research advances of trophoblast cells in threatened abortion complicated with intrauterine hemorrhage ……
…… *HUO Yan*, *CHEN Ping*, *ZHU Junnan*, *FU Yaqi*, *XU Guangli*(127)
Literature review of animal models of depression induced by drugs ……
…… *CHEN Yuzhen*, *JIANG Ning*, *PEI Haiyue*, *CHEN Fang*, *YUAN Zhiying*, *XIE Mengzhou*(134)
Research progress on models and pathological mechanisms of attention deficit hyperactivity disorder ……
…… *LI Xuejun*, *WANG Shumin*, *JIANG Zhiyan*, *XIAO Zhen*(145)

Issue 6

Changes of bone strength and gut microbiota in type 2 diabetic db/db mice ……
…… *ZHAO Yulan*, *YANG Yi*, *LI Jintao*, *WANG Peijin*, *JIAO Jianlin*, *ZHENG Hong*(1)
Shenfu injection improves cognitive dysfunction in vascular dementia model mice *via* the NOS/NO pathway ……
…… *RAO Sijing*, *ZHANG Sen*, *SHAO Yalan*, *HONG Fengfang*, *YANG Shulong*(8)
Effects of electroacupuncture at Zusanli and Neiguan points on neuroplasticity-related factors GAP-43 and SYN after ischemic injury in rats …… *ZHANG You*, *JIN Ziyan*, *YIN Yalong*, *WANG Jiayi*, *WU Xingui*(16)
Neuroprotective effect of liuwei dihuangwan on aged mice based on the mitochondrial quality control system ……
… *WANG Shijie*, *YANG Jing*, *MA He*, *WANG Luyao*, *ZHANG Zijuan*, *SU Yunfan*, *ZHANG Zhenqiang*(24)
Effect of *Marcksl*1 gene knockout on adult hematopoiesis in mice ……
…… *GAO Lijuan*, *LI Bo*, *YU Lei*, *QI Xiaolong*, *ZHANG Xu*, *GAO Shan*, *LIU Ning*, *MA Yuanwu*(35)
Mechanism of LINC00662 regulating temozolomide resistance of glioma cells *via* miR-144/COX-2 signaling ……
…… *YAN Wei*, *JIN Qing*, *SUN Rui*, *SHUI Bo*, *YU Han*, *DUAN Peng*(46)
Characteristics of the Long Evans model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats and the content of glutamate before and after modeling ……
…… *XIONG Yani*, *MENG Yong*, *QIAN Yimin*, *ZHANG Peng*, *ZHANG Hui*, *LI Hua*(54)
Protective effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on glutamate-induced neuronal apoptosis in the rat cerebral cortex …… *WANG Yan*, *CHEN Ling*, *PANG Yin*, *ZHANG Haifeng*, *LI Heyang*(62)
Cordycepin inhibits invasion and metastasis of Hela cervical cancer cells by regulating miR-135b-5p expression
…… *WEI Xingru*, *WANG Cui*, *PANG Xujiao*, *DU Tingting*(68)

JAK2/STAT3 signaling pathway regulates the Th17/Treg imbalance in acute lung injury ····· *ZHOU Bin*, *WAN Shaobing*, *WANG Ying*, *YU Ping*, *DIAN Wankang*, *ZHOU Ying*, *ZHOU Qin*(75)
Transcriptome-based exploration of the effect of Arbidol on HCoV-OC43 infection-induced activation of the neurotrophin signaling pathway ····· *CHEN Qimin*, *ZHOU Hongxia*, *XIE Peifang*, *LI Runfeng*, *YANG Zifeng*, *QIU Minshan*, *SHEN Lihan*(81)
Teaching method innovations in medical laboratory animal science under the "new three centers" education concept ····· *MENG Han*, *ZHANG Zhaonan*, *YANG Zihao*, *ZHANG Caiqin*, *ZHAO Ya*, *QIN Jing*, *BAI Bing*, *ZHAO Yong*, *SHI Changhong*(90)
Research progress on the correlation between gut microbiota and autism spectrum disorders ····· *DONG Lixian*, *YIN Aiwu*, *LI Canwei*, *FAN Mengran*, *WU Xiumei*, *YANG Zizhong*, *ZHANG Chenggui*, *GAO Pengfei*(95)
Role and mechanisms of intestinal microbial metabolites in cardiovascular disease ····· *WANG Zekun*, *XU Xin*, *ZHOU Xuedong*, *RONG Shuling*(102)
Research progress on the effect of exosomes on bone histocytes and its application ····· *WU Xi*, *WANG Zhongqi*, *SONG Muge*, *YANG Shichao*, *GAO Yuhai*, *CHEN Keming*(108)
Research progress of gut microbiota in improving resistance against immune checkpoint inhibitors ····· *GU Jiabo*, *LIU Jianlei*, *ZHANG Chunxia*, *JIN Heiying*, *WEI Ping*, *MENG Jun*, *XU Xiaolong*(114)
Research progress on animal and cell models of nonalcoholic fatty liver disease ····· *MA Xiaoyue*, *LI Qinqin*, *LU Huazhen*, *MA Jiyan*, *LIN Yuning*, *CHEN Wanjun*, *CHEN Yongxin*(120)
Research progress of targeted treatment of brain diseases with Chinese medicine nanotechnology ····· *FAN Ronghui*, *YANG Zhiqiang*, *LI Boshen*, *ZHANG Yuxuan*, *LI Xiaolin*, *LI Maoxing*(128)

Issue 7

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*(1)
Experimental animal model of adenoid hypertrophy ····· *ZHANG Yixing*, *JIANG Zhiyan*, *LIU Anqi*, *WANG Shumin*, *SUN Chenghui*(9)
Mechanism of Shenshuai Recipe in treating chronic kidney disease-related myocardial injury based on network pharmacology ····· *ZHANG Gedi*, *LIU Gengxin*, *LUO Fuli*, *YAN Ziyou*(17)
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*(26)
IMPDH2 expression in the temporal cortex in a rhesus macaque with chronic SHIV KU-1 infection ····· *ZHAO Changcheng*, *DING Huaming*, *LU Lunshan*, *ZHANG Qian*, *YANG Jing*, *DONG Ying*, *XUE Qunshan*, *ZHUANG Ke*(34)
Protective effect of nardosinone on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes mediated through the PI3K/Akt/mTOR pathway ····· *LI Hongyan*, *MEI Xianyun*, *YANG Huiya*, *LI Yikang*, *FENG Pei*, *SUN Fangyun*(41)
Establishment and evaluation of a chronic atopic dermatitis model induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in Brown Norway rats ····· *CHEN Wenpei*, *YANG Wei*, *DAI Jinlong*, *GUO Jianmin*(48)
Influence of miR-486-5p on the malignant behavior of endometrial cancer cells by targeting PTEN ····· *DENG Yu*, *WEI Pixi*, *REN Shuangshuang*, *LYU Guixue*, *WEI Wenwen*(55)
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 ····· *JIANG Liping*, *WANG Xia*, *PENG Xinhua*(67)

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*(78)
Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease ····· ····· *LIU Yiqin*, *ZHU Tingting*, *MAO Haixia*, *KANG Ting*, *ZHANG Liling*, *WU Weihua*, *OU Santao*(85)
Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide on sodium iodoacetate-induced chondrocyte damage in osteoarthritis regulated by lncRNA MEG3 ····· *DU Chenfei*, *HAN Lei*, *FAN Wei*, *LI Hongqi*, *ZHENG Fuzeng*(92)
Gubi powder alleviates knee osteoarthritis injury by regulating transforming growth factor-β/Smad signaling pathway in rabbits ····· *LI Dongdong*, *LI Xiaoming*, *WU Xuelian*, *YI Lu*, *CHEN Guangyou*(100)
Experimental study of curative effect of xiaochaihu decoction in a rat model of chronic pyogenic osteomyelitis of the jaw ····· *ZHANG Xiuyun*, *YANG Kun*, *LI Peijia*, *TANG Shun*, *YANG Siyu*, *CHEN Hui*(108)
Operational management and prevention of contamination in barrier environment facilities of laboratory animals ····· *ZHANG Wei*, *WANG Muzi*, *DENG Shaochang*(117)
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*(123)
Vascular endothelial dysfunction and its functional assessment ····· ····· *TIAN Jing*, *MA Yingjie*, *WANG Peng*, *LI Yang*, *ZENG Lu*, *LI Bin*, *SU Guohai*(130)
Research progress of long non-coding RNA in systemic sclerosis ····· ····· *WANG Baoyue*, *WANG Yongfu*, *SUN Xiaolin*(141)
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*(149)

Issue 8

Comparison of two animal models establishing by ovariectomy and aging to study the myocardial protective mechanism of GPR30 ····· *WANG Xiaowu*, *LI Zilin*, *MA Jipeng*, *ZHANG Shuaishuai*, *WANG Xiaoya*, *HONG Ziwei*, *LIU Jincheng*(1)
Preliminary study on the effects of subchronic exposure to sodium fluoride on multiple organ injury in male rats ····· *HUANG Damin*, *ZENG Weide*, *SU Jianwei*, *PANG Yaqin*, *GUO Rui*, *DENG Shusong*(8)
Rapamycin reduces p-tau deposition induced by aluminum through mTOR inhibition ····· ····· *XU Yirong*, *JI Jingjing*, *ZHANG Guangheng*, *TIAN Xiaoai*, *BU Fan*, *ZHANG Yeping*(15)
Effect of tiaoyuansan on behavior and cerebral biochemical index of autistic rats ····· ····· *LIANG Zhijian*, *ZHANG Jianjun*, *CHEN Runhong*, *YAN Jiarong*, *KUANG Shaosong*(22)
Effects of various ischemia times on myocardial ischemia-reperfusion injury in the Chinese miniature swine model ····· *YANG Lili*, *KANG Jing*, *REN Jianxun*, *GUO Hao*, *MENG Hongxu*, *MA Yanlei*, *SHI Yue*, *LIU Jianxun*, *LI Lei*(28)
Effects of methyltransferase-like 3-mediated N6 methyladenosine modification on oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage pyroptosis ····· *ZHANG Xinyi*, *GUO Min*, *GAO Hui*, *LIU Yu*(38)
Effects of Gancao Xiexin decoction on aquaporin 3 and 4 in rats with ulcerative colitis ····· ····· *LEI Na*, *LEI Lanping*, *WU Rong*, *QUAN Nana*, *TANG Xuegui*(47)

Establishment of *miR*-100 knockout mice and preliminary analysis of the hematopoietic phenotype ····· *WANG Xingxing*, *HUANG Zhen*, *ZHOU Jiao*, *LI Guiling*, *KAN Chen*, *ZHENG Hong*, *WANG Siying*(55)

Effects of trigonelline on lipid metabolism and insulin resistance in gestational diabetes mellitus rats ····· *ZHANG Yanhong*, *WANG Kejing*, *LI Lijuan*, *LI Guo*(68)

Study and application of a modified enrichment method to improve the efficiency of chromosome preparation in mouse spermatogonial cells ····· *ZHANG Jing*, *CHENG Dong*, *YAO Wenhuan*, *YANG Fei*, *TANG Hui*, *SUN Changhua*, *YAN Yan*, *ZHOU Wen*, *LI Hui*(75)

Effect of *Hypericum japonicum* on the hyperuricemia model in rats ····· *GAO Ping*, *LI Xiaojuan*, *XU Ning*, *LI Ruisheng*, *LI Xingjie*, *LI Aimin*(80)

*circTLK*1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via the *miR*-26*a*-5*p*/*YES*1 axis ····· *JIANG Xianxun*, *ZHANG Kai*, *ZHANG Ying*(86)

Effect of metformin on corticosterone-induced depression-like behavior in mice involves genes of the mitochondrial respiratory chain ····· *LI Jun*, *YU Dong*, *WANG Mulan*, *FENG Yulin*, *DU Lijun*, *GONG Qin*(95)

Effect of *Euphorbia humifusa* on expression of glomerular podocyte-related proteins in diabetic kidney disease rats ····· *LI Xiaoying*, *TIAN Yafei*, *LIU Chang*, *CHEN Song*, *FAN Fengyi*, *ZHANG Chun*, *WU Xin*(105)

Treatment of moderate traumatic brain injury in mice by coadministration of nerve growth factor and penetratin *YOU Lili*, *FU Wenliang*, *PEI Jie*, *YU Changle*, *XING Weiwei*, *CAI Guiling*, *ZHANG Chao*, *XU Donggang*(114)

Design, operation, and maintenance of the technology platform of mouse rederivation ····· *WANG Qianqian*, *LIU Diwen*, *HONG Shenghui*, *WANG Lie*(122)

Review on the mechanism and treatment of diabetes mellitus with a sodium/glucose cotransporter 2 inhibitor ····· *LI Meng*, *PANG Lixiang*, *MA Qianqian*, *BAO Shuyin*, *FU Danni*, *BAI Xue*(127)

Research progress on the regulatory role of miRNAs in metabolic syndrome ····· *GUO Ruyan*, *HAN Yubo*, *ZOU Guoliang*, *SUI Yanbo*, *WANG Yu*, *LIU Li*(133)

Research progress in establishment and evaluation of cell models for perimenopausal syndrome ····· *KANG Mengjiao*, *ZHANG Wei*, *ZHAO Linhua*(139)

Research progress on the pathogenesis and related signal transduction mechanisms of liver fibrosis ····· *LI Mingfang*, *LI Caofei*, *ZUO Dongze*, *ZHAO Yingli*, *YU Shibei*, *XIE Yaohui*, *PENG Jiazhi*, *LIU Jianjun*(147)

Issue 9

Uptake and transport properties of euscaphic acid in Caco-2 cells revealed by UPLC-TQ-MS ····· *WANG Ning*, *XIE Li*, *DING Wenhuan*, *TIAN Li*(1)

Tissue distribution of ligustrazine-*Salvia miltiorrhiza* before and after compatibility in acute myocardial ischemia model rats ····· *LI Rong*, *GOU Jian*, *LIU Ting*, *GONG Zipeng*, *LU Yuan*, *LIU Chunhua*, *HUANG Yong*, *SUN Jia*(8)

Alterations in gut microbiota-short-chain fatty acid axis in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and the effect of sodium butyrate ····· *ZHAN Kai*, *WU Haomeng*, *ZHENG Huan*, *QIN Shumin*, *YANG Yuanming*, *HUANG Shaogang*(16)

Evaluation of animal experiments on acupuncture for hypertension based on the SYRCLE's tool and the ARRIVE guidelines ····· *TANG Wenjing*, *ZHANG Yue*, *LI Yuxi*, *ZHONG Dongling*, *JIN Rongjiang*, *ZHANG Lili*, *LI Juan*(25)

Effect of Bushen Jianpi Kaixin formula on autophagy and apoptosis in AD rats ····· *LI Ying*, *WANG Ying*, *KONG Mingwang*(38)
Role of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury in rats ····· *LIU Shuangchun*, *ZHANG Xijiang*, *WANG Luqian*, *CHEN Zaihuan*, *LIN Ronghai*(47)
Mechanism of taxifolin regulating endoplasmic reticulum stress via the PERK-ATF4 pathway to reduce myocardial hypertrophy in hypertensive rats ····· *YU Jinyu*, *HAN Jing*, *ZHANG Ying*, *HOU Liang*, *YU Wen*(54)
Reflection of the problems found in the ethical review of experimental animal welfare ····· *LIU Liyan*, *ZHANG Hongxin*, *BIAN Jiayue*, *LIAN Haichen*, *HAN Yanmei*, *YUAN Guangfu*(63)
Advances in establishment of animal models of severe asthma ····· *WEI Dandan*, *WANG Liting*, *LONG Jie*, *CHEN Yanjiao*, *WANG Yu*, *YANG Yongqing*, *XU Yudong*(69)
Research progress in experimental models of pulmonary arterial hypertension ····· *XIE Jincheng*, *XIAO Mengyuan*, *DENG Shaodong*, *CHEN Jianying*(79)
Research progress of experimental premenstrual dysphoria models in rodents ····· *XU Jialing*, *LIU Kun*, *XING Ying*, *HU Minghui*, *ZHANG Hao*, *LI Zifa*, *GENG Xiwen*, *WEI Sheng*(90)
Research progress in animal models of cough ····· *LUO Jingshu*, *MA Jianling*, *LUO Jingyue*, *SHI Liqing*, *WEN Shaohui*, *LI Niuniu*, *WANG Liyun*(99)
Analysis of animal models of keratitis based on the characteristics of clinical conditions of traditional Chinese and Western medicines ····· *NAN Shuo*, *GONG Huanhuan*, *LI Xiumin*, *MIAO Mingsan*(113)
Advances in ferroptosis-based therapy for aging and aging-related diseases ····· *ZHOU Yongchang*, *TAO Siman*, *CHEN Shengqiang*, *PU Xiuying*(121)
Characteristics and application of cuprizone-induced animal model of multiple sclerosis ····· *LI Lin*, *WANG Yimin*, *WANG Wei*, *WANG Shan*, *PAN Meiliang*, *SUN Weiqiang*, *FAN Weiping*, *SHI Jianyun*(132)
Research progress in the pathogenesis of inflammatory bowel disease ····· *HOU Xiaoting*, *MENG Huan*, *XUE Jiachen*, *ZHANG Huamin*, *WANG Xude*, *WANG Kesi*(138)
Isolation, culture, and identification of bone marrow mesenchymal stem cells and their related applications in the repair of articular cartilage injury ····· *LIU Shaofei*, *XU Bingbing*(149)

Issue 10

Left-to-right shunt slows cardiac remodeling in rats with pulmonary hypertension ····· *JI Shuang*, *PAN Hui*, *LI Tianqi*, *YE Mengting*, *MA Mingjie*, *ZHANG Xuejia*, *WANG Xiaojian*, *YANG Xiaomin*(1)
Acupoint catgut embedding affects the level of inflammation in rheumatoid arthritis through the PD-1/OX40 signaling pathway ····· *CHEN Lichuan*, *DUAN Bo*, *YU Zhao*, *MA Zhiyi*, *MENG Qianwen*(8)
Improving effect and mechanism of modified Chaihu Guizhi Decoction on osteoporosis rats by regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway ····· *GUO Zhonghua*, *SHI Dongliang*, *CAO Yuju*, *WANG Yunfei*, *YANG Shaoxiang*, *QIN Hewei*, *ZHANG Zhongbo*, *REN Bowen*, *ZHOU Songlin*, *WANG Junjie*, *WANG Lisha*, *WAN Xiaoguan*(15)
Role and possible mechanism of ADAM10 in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and tibial fracture union ····· *TANG Xiaoxu*, *ZHANG Zhiqian*, *LI Fuqin*, *WANG Nan*(23)
Bone marrow mesenchymal stem cells isolated from rats by bone marrow and slice adherent culture *in vitro* and PKH26 labeling ····· *CHEN Shuang*, *XIE Yanyan*, *XU Juju*, *YAN Zhenyu*(32)
Effects of low-dose BPA and DEHP on AKR1C3 expression in the adult rat prostate ····· *HUANG Dongyan*,

WU Shuangshuang, *SHAO Congcong*, *SU Xin*, *YANG Rongfu*, *WANG Kaiyue*, *ZHOU Ping*, *WU Jianhui*(38)
Effects of baicalin on proliferation and apoptosis of laryngeal cancer cells via the miR-449a/HDAC1 axis ····· *WANG Jian*, *SUN Yongdong*, *ZHOU Xingwei*, *LIU Lei*, *TONG Xingke*, *CHEN Long*, *HE Xian*(45)
Keratin 17 knockout aggravates wound healing in diabetic mice ····· *BAO Dan*, *GUO Rui*, *HOU Daorong*(54)
LAMC2 regulates the proliferation of gastric cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway ····· *WANG Wenbo*, *WANG Qingyun*, *GUO Wei*, *XIA Ling*(61)
Histone deacetylases 6 inhibitor improves diabetic nephropathy by protecting mitochondrial homeostasis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells ····· *CHEN Xiaoli*, *LUO Fuli*, *TONG Mengyao*(71)
Comparative analysis and countermeasure suggestion on the current administrative situation of laboratory animal licenses in China ····· *LI Huiping*, *CHEN Meili*, *ZHAO Weibo*(81)
Research progress on kidney fibrosis animal models of qi deficiency and dampness stasis syndrome ····· *GAO Ranran*, *SHEN Zhen*, *LIAN Menghui*, *HAN Cong*, *LI Wei*(91)
Research progress of circular RNA in the field of ischemic stroke ····· *TANG Chen*, *LAN Rui*, *FU Xueqin*, *WANG Weiwei*, *ZOU Xuhuan*, *WANG Manman*, *LI Hongyu*, *LIU Shuang*(100)
Research progresses on the effects of high altitude on mitochondrial function and energy metabolism ····· *LI Boshen*, *ZHANG Yuxuan*, *FAN Ronghui*, *LI Maoxing*, *LIU Tianlong*(106)
Research progress of disease-syndrome combination models of chronic obstructive pulmonary disease ····· *BA Deting*, *HAO Binbin*, *LI Juan*(114)
Research progress on the model organism zebrafish in neurodegenerative diseases ····· *HUANG Kongli*, *SU Shijie*, *WANG Yuting*, *LIU Zhuangzhuang*, *CAO Dandan*, *WANG Pei*, *CHEN Guanlin*, *WANG Qi*(121)
Autophagy: the critical mechanism of exercise in improving neurodegenerative diseases ····· *CHEN Xianghe*, *QIU Xiao*, *LIU Chi*, *SHEN Ziming*, *ZHOU Xiangxiang*(132)
Research progress of exosomal miRNA in early screening and treatment of Alzheimer's disease ····· *ZHANG Junfeng*, *HAO Liya*, *GAO Hongyan*, *LIU Guangfu*, *ZHANG Zuyuan*, *GUO Yonggang*(140)
Research progress on gut microbiota and obesity-related metabolic diseases ····· *SUHEIYAN Perhat*, *ZHANG Jiaojiao*, *MA Zhuang*, *WANG Junren*, *LI Yanhong*(146)

Issue 11

Effects of moderate- and high-intensity intermittent exercise on myocardial mitophagy in mice with nonalcoholic fatty liver disease ····· *HE Miao*, *LI Jiahang*, *LIU Xin*, *YANG Wei*, *WU Liangwen*, *FAN Jingjing*(1)
Mechanism of hyperuricemia combined with nonalcoholic fatty liver based on the PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway ····· *GONG Xiaohong*, *LI Songwei*, *LI Huan*, *WU Shangwen*, *LU Chaoqun*, *CHEN Yiming*(10)
Mechanism of ethyl acetate extract of Liujunzi Decoction in the energy metabolism of EC9706 cells in CAF-conditioned medium *CHEN Xing*, *LOU Xiangyu*, *SHANG Yiwan*, *ZHOU Zhexu*, *LIU Yang*, *LIU Yaru*, *HU Xiaobo*, *CHEN Yulong*(17)
Effect of baicalein on core symptoms in an SHR model of attention deficit hyperactivity disorder ····· *ZHANG Yongting*, *ZHOU Rongyi*, *MA Bingxiang*, *WU Chenlei*, *XIE Xinyue*, *DING Xueying*(25)
Effect of cobalt dichloride regulating the inflammatory response and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through the HIF-1α/autophagy pathway ····· *YUE Xinxin*, *FU Yang*, *LI Yiran*, *YIN Xiaoyan*, *YU Fei*, *FU Quanwei*(33)

Allicin improves human peritoneal mesenchymal cell-mesenchymal transformation induced by high glucose through the JAK2/STAT3 signaling pathway ····· *GAN Linwang*, *LI Qiancheng*, *GAO Lichao*, *LIU Qi*, *LI Ying*, *WANG Yujie*, *OU Santao*(39)
Effect of inhibiting the mitochondrial inner membrane protein OMA1 on apoptosis in a Rot-induced Parkinson's disease cell model ····· *SHI Jin*, *LYU Yue*, *XU Ting*, *XUAN Tingting*, *YANG Juan*, *DU Dandan*, *ZHANG Junmei*, *LI Haining*(48)
Application characteristics of animal models of osteosarcoma based on data mining ····· *YU Shuaike*, *LUO Maoli*, *WANG Lianrui*, *ZHOU Tianbao*, *MIAO Mingsan*, *BAI Li*(55)
MiR-570-related lncRNA SNHG16 regulation of hepatoma cell resistance to sorafenib ····· *LIU Yang*, *FAN Wei*, *DING Jie*(63)
Establishment of chronic alcoholic brain injury model in mice ····· *CAI Yu*, *WANG Luwan*, *XIE Donglin*, *GAO Dapeng*(71)
Effect of LncRNA FGD5-AS1 on the malignant phenotype of oral squamous cell carcinoma cells ····· *YANG Feng*, *LIU Guanglong*, *WANG Yanqing*(78)
Influence of hyperoside on autophagy in rats with nephrotic syndrome through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway ····· *KONG Lujiao*, *WANG Xin*, *LIU Jing*, *GUO Xiaoyang*, *XUE Mingwei*(88)
Behavioral assessment of the Parkinson's disease model in non-human primates ····· *LIU Shuyi*, *WANG Zhengbo*(96)
Advances of CREB in the regulation of memory through synaptic plasticity and its relationship with Alzheimer's disease ····· *LUO Zhuohui*, *PANG Shuo*, *ZHANG Lianfeng*(104)
Progress of research into the roles of miRNA in neuroprotection against ischemic stroke ····· *LI Hongyu*, *LAN Rui*, *FU Xueqin*, *WANG Weiwei*, *ZOU Xuhuan*, *WANG Manman*, *ZHANG Yong*, *TANG Chen*, *LIU Shuang*(110)
Research progress on the effect of miRNAs on liver metastasis of digestive system tumors ····· *YANG Siqi*, *ZOU Qinling*, *JIN Ming*(118)
Research progress on regulation of lymphangiogenesis and its role in myocardial infarction ····· *DU Qing*, *YUE Tongtong*, *WANG He*(126)
Monkeypox virus infection and the animal model of monkeypox ····· *BAO Rong*(133)
Progress in microglia-astrocyte interactions and their mediation of neuroinflammation in Alzheimer's disease ··· *HU Xin*, *WANG Qian*, *ZHANG Chenxi*, *ZHENG Huihui*, *LI Pengyang*, *ZHAO Hongye*, *DENG Fengchun*(142)
Molecular mechanism and prognosis of HBV-infected patients with DLBCL ····· *YUAN Herui*, *GUO Pengxiang*(150)

Issue 12

Microvascular morphometric analysis of cerebral cortical functional areas in C57BL/6 mice of various ages ····· *GUO Min*, *GUO Yongchang*, *ZHANG Ruihu*, *ZHANG Yinhong*, *WANG Hailong*, *CHEN Zhaoyang*(1)
Mechanism study of *IGHG*1 on proliferation, apoptosis, and invasion of THP-1 cells in acute myeloid leukemia ····· *LI Changmei*, *JIN Ya*, *SUN Yin*, *LIU Jian*, *JIANG Daoliang*, *ZHANG Jiaoguo*, *YANG Rui*, *YANG Yong*, *QIU Li*(7)
Geniposide promotes skin ulcer wound healing in diabetic rats through the PI3K/Akt pathway ····· *JIANG Wenwen*, *LIU Huan*, *CHEN Xiaoyan*, *RONG Xiaojuan*, *LIU Yanling*, *ZENG Wei*(14)

Effect and mechanism of transplantation of human amniotic epithelial cells on endometrium of uterine scar model rats …… *WANG Jing*, *LU Chengji*, *ZANG Jianxin*, *YI Zhishuang*, *PENG Jiasheng*, *ZHANG Feng*(21)
Effect of Osteoking on lowering blood sugar and improving intestinal flora in db/db mice …… *DENG Shaoyou*, *ZHAO Yulan*, *WANG Peijin*, *LI Rong*, *ZHAO Hongbin*, *JIAO Jianlin*, *ZHENG Hong*(28)
Role and mechanism of miRNAs in alcoholic liver injury in rats …… *CONG Meili*, *LIU Tao*, *FEI Xuan*, *ZHOU Bei*, *SUN Jianxin*, *ZHAO Xiaoguo*(34)
Mongolian drug hatagaqi-7 promotes ulcer wound healing in diabetic rats via HIF-1α …… *DONG Chenghai*, *CHE Ligeer*, *CHAO Riya*, *MAN Zhu*, *BAO Yonglin*, *GONG Limin*(42)
A model study of blood in urine (bladder cancer) during scorching humid fever in MNU-induced SD rats …… *CHANG Tuo*, *WANG Jie*, *LI Nan*, *WANG Tianqi*(49)
Effect of Dingkun pill on the PI3K/AKT/mTOR signal pathway in rats with endometriosis …… *WANG Weiwei*, *XI Xin*(55)
Subacute effect of CeO_2NPs on organ structures and redox indicators in male mice …… *ZHANG Qian*, *HUANG Mingsheng*, *JIANG Li*, *GU Dongmei*, *YIN Jun*(62)
Comparison and optimization of isolation and extraction methods for Kupffer and hepatic stellate cells from mouse liver …… *MA Wenmeng*, *WU Hao*, *YAN Yutong*, *SUN Xun*, *ZHENG Qianqian*(68)
A review of animal models of vascular dementia … *SONG Yuanyu*, *CHEN Yinghua*, *LI Junfeng*, *SUN Wei*(75)
Application research progress of single cell RNA-sequencing technology in neurodegenerative diseases …… *WU Jianfei*, *LIU Yu*, *WEI Daixu*, *PU Jianlin*, *CAI Duanfang*, *WANG Binglong*(86)
Advances in animal models of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease …… *WANG Jialin*, *WANG Chongyang*, *LI Yang*, *CHEN Xianwei*, *YUAN Zhongnan*, *ZOU Chaoxia*, *ZOU Chendan*(93)
Research progress on the role of autophagy in the pathogenesis of systemic sclerosis …… *LI Xin*, *SUN Xiaolin*, *WANG Yongfu*(97)
Research progress of traditional Chinese medicine for stroke on the basis of epigenetic regulation …… *FU Xueqin*, *LAN Rui*, *ZHANG Yong*, *WANG Manman*, *ZOU Xuhuan*, *WANG Weiwei*(104)
Protective effects of the HIF-1α pathway on cold storage of isolated organs …… *WANG Zhiyang*, *ZHENG Siyang*, *ZHU Liang*(112)
Relationship between atmospheric pollutants and some adverse pregnancy outcomes …… *JIN Jian*, *CHANG Hui*, *HUANG Hehuan*, *PENG Rui*, *ZHAO Bing*, *ZHANG Xiaoan*(118)
Research progress on modeling methods and evaluation indexes of kidney injury in zebrafish …… *LAN Ailin*, *HUANG Chunhua*, *XIA Ming*, *LI Maojuan*, *WANG Siqi*, *LOU Didong*(123)