梁景珍,高映杰,叶文倩,等. 结合系统药理学与代谢组学探究黄芩素治疗高尿酸血症的作用机制［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 1-11.
Liang JZ, Gao YJ, Ye WQ, et al. Combined with systematic pharmacology and metabonomics to explore the mechanism of Baicalein in the treatment of hyperuricemia［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 1-11.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.001

结合系统药理学与代谢组学探究黄芩素治疗高尿酸血症的作用机制

梁景珍[1],高映杰[1],叶文倩[1],卫兵艳[2],陈朝阳[2],杨　帆[1*]

(1.山西医科大学药学院,太原　030001;2.山西医科大学动物实验中心,太原　030001)

【摘要】　目的　探究黄芩素治疗高尿酸血症的作用及机制。**方法**　采用酵母膏联合氧嗪酸钾的方法构建高尿酸血症小鼠模型。通过生化指标、病理改变、非靶代谢组学及网络药理学技术深入研究黄芩素治疗高尿酸血症的作用及潜在机制。**结果**　黄芩素能降低血清尿酸、肌酐和尿素氮的含量,减轻肾组织炎性损伤,上调尿酸排泄蛋白表达水平,下调尿酸重吸收蛋白表达水平。网络药理学筛选出 BCL2、SIRT1 和 XDH 等 9 个药物疾病相关靶点。代谢组学分析筛选出烟酸和烟酰胺代谢、咖啡因代谢和嘌呤代谢等 6 条关键代谢通路。**结论**　黄芩素可治疗高尿酸血症,减轻肾损伤,其作用机制可能与 SIRT1 和喹啉酸共调控的烟酸和烟酰胺代谢等途径有关。

【关键词】　黄芩素;高尿酸血症;网络药理学;代谢组学;分子对接
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0001-11

Combined with systematic pharmacology and metabonomics to explore the mechanism of Baicalein in the treatment of hyperuricemia

LIANG Jingzhen[1], GAO Yingjie[1], YE Wenqian[1], WEI Bingyan[2], CHEN Zhaoyang[2], YANG Fan[1*]
(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.
2. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】　Objective　To explore the effect and mechanism of Baicalein in the treatment of hyperuricemia. **Methods**　The mouse model of hyperuricemia was established by yeast extract combined with potassium oxazinate. The effect and potential mechanism of Baicalein in the treatment of hyperuricemia were studied by biochemical indexes, pathological changes, non-target metabonomics and network pharmacology. **Results**　Baicalein could reduce the contents of serum uric acid, creatinine and blood urea nitrogen, reduce the inflammatory injury of renal tissue, up-regulate the expression level of uric acid excretion protein and down-regulate the expression level of uric acid reabsorption protein. Nine disease-related targets such as BCL2, SIRT1 and XDH were screened by network pharmacology. Six key metabolic pathways including nicotinic acid and nicotinamide metabolism, caffeine metabolism and purine metabolism were screened by metabonomics analysis. **Conclusions**　Baicalein can treat hyperuricemia and reduce renal injury, and its mechanism may be related to the metabolic pathways of nicotinic acid and nicotinamide regulated by SIRT1 and quinolinate.

【Keywords】　Baicalein; hyperuricemia; network pharmacology; metabonomics; molecular docking
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家自然科学基金(82003770);山西省基础研究计划面上项目(202303021221129)。
[**作者简介**]梁景珍(1997—),女,硕士研究生,研究方向:临床药理学。E-mail:1248295935@qq.com
[**通信作者**]杨帆(1985—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:临床药理学。E-mail:fanfan42@126.com

随着社会生活水平的提升,高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)的患病率逐年呈上升趋势。当血液中尿酸含量蓄积超出正常水平时,可能导致尿酸盐结晶在关节、肾等组织沉积,进而引发痛风、高尿酸血症肾病和代谢综合征等并发症[1-3]。目前,HUA 的治疗主要包括减少尿酸的产生和促进尿酸的排泄。然而,西医药物虽然能够达到降低尿酸的效果,但常常伴随着不良反应,并且长期使用可能对肾造成不同程度的损害。中医认为,高尿酸血症属于“痹证”,与脾虚湿滞有关。中医学指出,湿浊内蕴是本病的重要病机,而化湿祛浊法是治疗的关键[4-5]。

黄芩素(Baicalein)是一种存在于黄芩中的黄酮类物质,具有广泛的药理活性和药用价值,其在中医药领域被广泛应用,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等作用。研究表明,黄芩素能够缓解动脉粥样硬化的发展,并通过调节 Th17/Treg 平衡来抑制炎性细胞因子(如肿瘤坏死因子-α 和白细胞介素-1β)的产生,从而减少炎症介导的损伤[6-7]。此外,它还通过多种信号传导途径(如 MAPKs 通路、IRS1/PI3K 信号)对糖尿病、高血脂和脂肪肝等代谢性疾病具有一定的治疗和调节作用[8-11]。这些研究结果为进一步深入探究黄芩素的作用机制及其在代谢性疾病治疗中的应用潜力提供了重要参考。

目前,网络药理学和分子对接技术已被广泛应用于药物研发和中药复方的研究[12-13]。这些方法可用于构建药物-靶点-疾病网络,以揭示靶点与疾病之间的相互作用,并预测药物与靶点的结合模式和亲和力。本研究基于网络药理学、分子对接技术以及肾非靶代谢组学综合分析,研究黄芩素治疗 HUA 作用、潜在靶点及差异代谢物的情况,从而探究其作用机制。该研究将为黄酮类化合物治疗高尿酸血症的基础研究和临床应用提供重要的指导,也为进一步研究中药多组分-多靶点-多作用途径的复杂性提供实验支持。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级昆明种小鼠(18~22 g)40 只,6 周龄,由北京斯贝福生物技术有限公司提供[SCXK(京)2019-0010],饲养于屏障环境,室温保持在 20~26 ℃,相对湿度为 40%~70%,自由进食和饮水。实验动物饲养及观察于山西医科大学实验动物中心[SYXK(晋)2019-0007],操作符合山西医科大学实验动物福利与伦理委员会的相关审批(SYDL2023019),动物实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例,实验动物饲养和实验过程中按实验动物 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

黄芩素(CAS491-67-8,纯度 98%)购于上海麦克林生化科技有限公司;别嘌呤醇(CAS315-30-0,纯度 98%)购自 Aladdin(C2215381);酵母膏(01-014)购自北京奥博星生物技术有限责任公司;氧嗪酸钾(CAS2207-75-2,纯度 98%)购自 Aladdin(E2124297);SIRT1 抗体购自 ABclonal 公司(A11267);尿酸(C012-2-1)、肌酐(C011-2-1)、尿素氮(C013-2-1)和黄嘌呤氧化酶(A002-1-1)检测试剂盒及蛋白定量试剂盒(A045-2)均由南京建成生物工程研究所(中国南京)提供;qPCR 实验试剂由北京聚合美生物科技有限公司提供。Agilent 1290 infinity LC 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);AB Triple TOF 6600 高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm,2.1 mm×100 mm column(美国 Waters 公司);高速冷冻离心机(KDC-140HR);SoftMax Pro 7 多功能酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司);Stepone Real-Time PCR System(美国应用生物系统公司,ABI)。

1.3 实验方法

1.3.1 网络药理学方法和分子对接技术

从 TCMSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库和 ETCM 数据库来收集黄芩素的靶点信息,并对靶点名称进行标准化处理。通过 GeneCards、OMIM 和 DrugBank 数据库检索高尿酸血症相关的靶点,进行合并去重。然后,使用 Venn 网站绘制 Venn 图,得到黄芩素治疗高尿酸血症的潜在靶点。为了筛选核心靶点,将潜在靶点输入到 STRING 数据库得到蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过 Cytoscape 软件进行网络分析。将潜在靶点输入 DAVID 数据库进行通路富集分析,进一步探究黄芩素治疗高尿酸血症的作用机制。分子对接模拟研究采用 AotuDock Vina 和 PyMol 2.5 软件进行分析,以验证黄芩素与核心靶点的结合能力。

1.3.2 动物分组及造模给药

40 只昆明种小鼠适应性喂养 3 d,被随机分为对照组、模型组(HUA)、黄芩素组(Baicalein,50 mg/

kg)、别嘌呤醇组(AP,5 mg/kg),每组 10 只。HUA 模型采用酵母膏(30 g/kg)联合氧嗪酸钾(300 mg/kg)的方式诱导,上述试剂所采用的剂量均有相关文献参照[14-17]。造模 1 周后,每天按照小鼠体重进行相应剂量灌胃给药,持续 14 d。实验结束后,收集小鼠血清、肾组织和肝组织。动物模式图见图 1。

1.3.3　组织病理学检测

将小鼠部分肾组织用 4%多聚甲醛进行固定。固定状态完好后,进行石蜡包埋、脱水处理,并切成切片,进行苏木精和伊红染色(HE)。随后,在显微镜下以不同倍率对切片进行详细观察,并对采集的图像进行分析。

1.3.4　生化指标检测

在低温离心机中,以 3500 r/min 的速度离心血清样品 15 min,以用于后续的生化指标检测。根据实验需求,将测定血清中尿酸(UA)、肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)水平,以及血清和肝中黄嘌呤氧化酶(XOD)的活性。

1.3.5　实时荧光定量 PCR 检测

用 RNA 提取剂从肾中分离 RNA,并按照试剂说明书将 RNA 反转录为 cDNA。然后,以 cDNA 为模版进行 qPCR 实验,反应体系为 20 μL。引物序列如表 1 所示。基因表达利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式进行计算,以 GAPDH 作为内参。

1.3.6　蛋白印迹法

用 RIPA 缓冲液从冷冻肾中分离总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,蛋白变形、上样、电泳、分离、转膜和封闭,加入 SIRT1(1∶1000)一抗 4 ℃孵育过夜,次日孵育二抗后在凝胶成像仪上进行显影,采用 Image J 软件进行统计其表达量。

1.3.7　非靶代谢组学研究

取适量肾组织解冻后加入预冷甲醇/乙腈/水溶液(2∶2∶1,v/v/v),提取代谢物。在质谱分析过程中,将代谢物在 50 μL 乙腈和 50 μL 水溶液中溶解,于低温离心机 1400 r/min 离心 15 min,将上层溶液取出,进行 UHPLC-Q-TOF MS 分析。流动相组成 A:水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水,B:乙腈,梯度洗脱程序如下:0~0.5 min,95% B;0.5~7 min,B 从 95%线性变化至 65%;7~8 min,B 从 65%线性变化至 40%;8~9 min,B 维持在 40%;9~9.1 min,B 从 40%线性变化至 95%;9.1~12 min,B 维持在 95%;整个分析过程中样品置于 4 ℃自动进样器

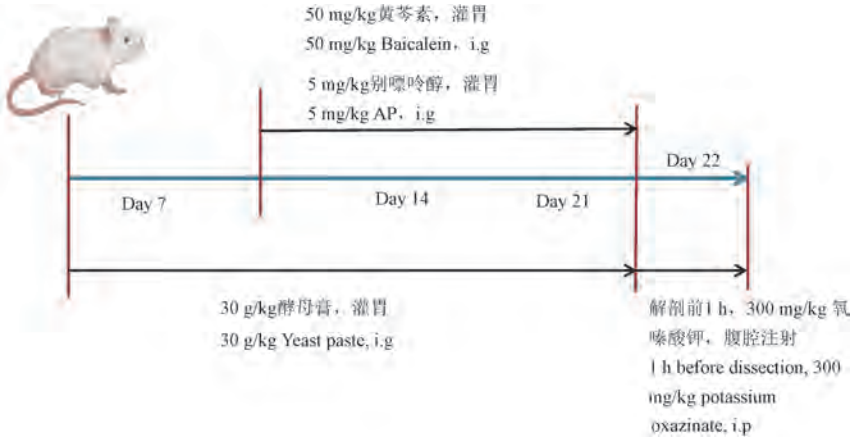


图 1　动物模式图

Figure 1　Animal model diagram

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
ABCG2	GTTTGGACTCAAGCACAGCGAATG	CCGAGGCTGATGAATGGAGAAGATG
OAT1	TTTCCCGCACAATGGCACAGAG	CCGATGAGAGCACACAAGGTTCC
GLUT9	ATGTGGACTCAATGCGATCTGGTTC	TGTTTCAATTCCTCCCGTGCTCAG
URAT1	GACCTTGGACCCGATGTTCTTCTG	CGTGGCGTTGGACTCTGTAAGC
SIRT1	GTTACATATTCCACGGTGCTGAGG	TCACTTTCATCTTCCAAGGGTTCTTC
GAPDH	GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

中。电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式条件设置如下:离子源温度为 600 ℃,喷雾电压(ISVF)±5500 V,气帘气(CUR)30 psi,一级质荷比检测范围在 60~1000 Da,二级子离子质荷比检测范围在 25~1000 Da,碰撞能量为(35±15)eV,IDA 动态排除同位素离子范围为 4 Da,每次扫描采集 10 个碎片图谱。

采用 R 包 ropls 进行数据处理和多元数据分析,采用置换检验(Permutation test)对模型进行检验。根据变量的投影重要度(VIP)值>1 和 $P<0.05$ 筛选差异代谢物,利用 MetaboAnalyst 6.0(https://www.metaboanalyst.ca/)对代谢物进行代谢途径富集分析,找到与疾病相关的代谢通路。

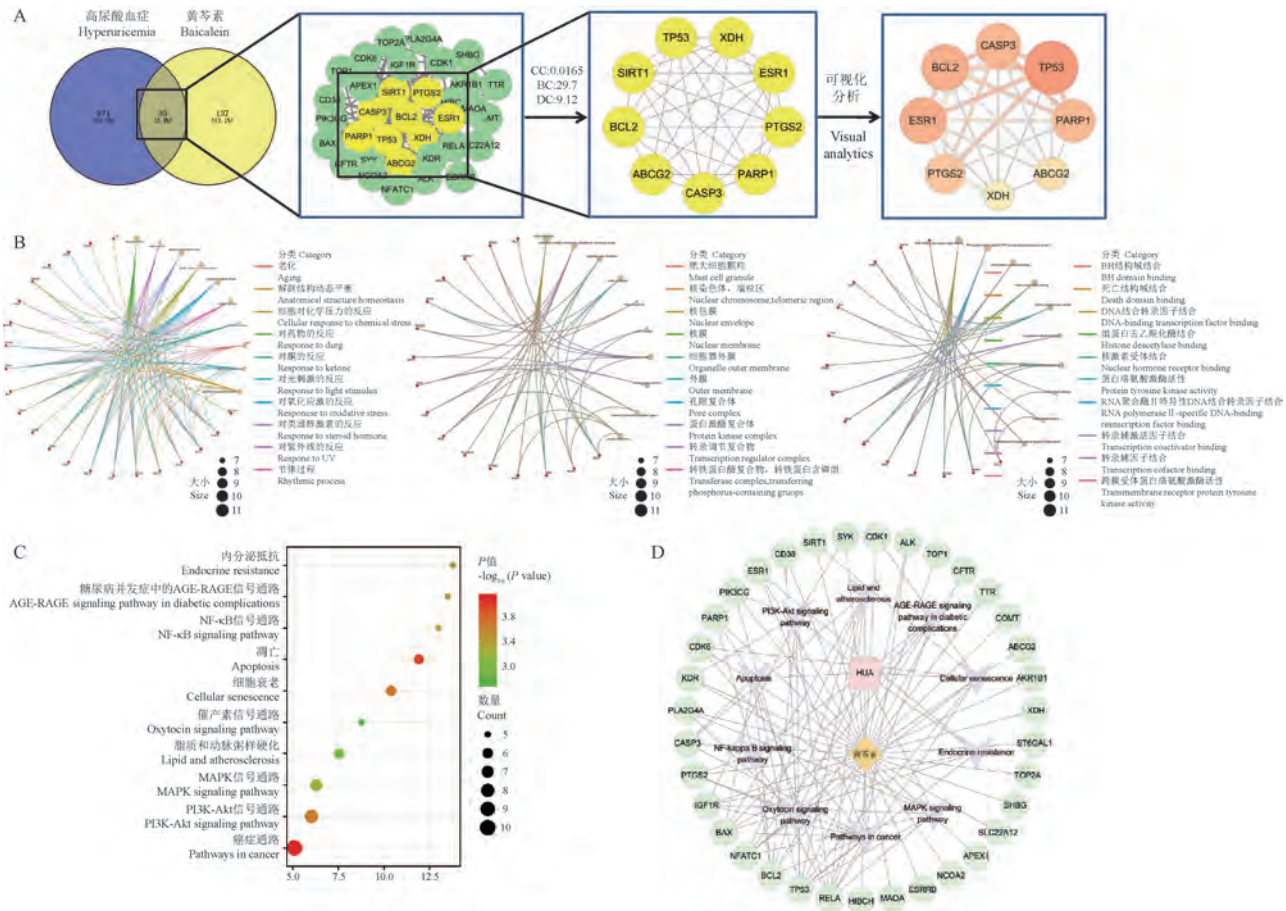
1.4 统计学方法

利用 GraphPad Prism 8.0 对每组数据进行单因素方差分析,所有数据均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,认为 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

通过数据库分析,获得黄芩素相关靶点 172 个,疾病相关靶点 906 个,交集靶点 35 个。通过 STRING 和 Cytoscape 构建 PPI 网络,可视化分析后得到 9 个核心靶点,见图 2A 和表 2。为了进一步了解黄芩素治疗高尿酸血症的理论机制,对 35 个交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析且以 $P<0.05$ 作为显著功能和通路的临界值进行筛选。根据 P 值大小排序筛选 10 条绘制 GO 和 KEGG 富集图谱(图 2B、2C)。从图 2B 中分析得到 GO 条目主要涉及对药物的反应,对氧化应激的反应,影响核膜、蛋白激酶复合体和组蛋白去乙酰化酶结合等。利用 Cytoscape 3.9.1 软件绘制网络图,进行 Network Analyzer 分析后,得到 47 个节点和 103 条关系并构建“药物-靶点-通路-疾病”网络图谱,见图 2D。



注:A:核心靶点;B:GO 富集分析;C:KEGG 富集分析;D:药物-靶点-通路-疾病网络。

图 2 网络药理学分析

Note. A, Core target. B, GO enrichment analysis. C, KEGG enrichment analysis. D, Drug-target-pathway-disease network.

Figure 2 Network pharmacological analysis

2.2　分子对接验证

根据网络药理学研究的结果，将核心靶点 TP53、XDH、ESR1、PTGS2、ABCG2、PARP1、CASP3、BCL2、SIRT1 作为受体蛋白与黄芩素配体进行分子对接，结果见表 3。为了进一步分析黄芩素与核心靶点的结合能力，使用 Pymol 2.5 软件进行可视化分析，结果见图 3。

2.3　生化指标及肾病理分析

如图 4A 所示，与对照组相比，HUA 组 UA 水平升高（$P<0.01$），表明成功构建了高尿酸血症模型。与 HUA 组相比，黄芩素和 AP 组 UA 水平均有所降低（$P<0.05$）。BUN 和 CRE 是衡量肾功能的指标，其在血清中的水平升高反映肾受到了损伤。如图 4B、4C 所示，与对照组相比，HUA 组 CRE 和 BUN 水

表 2　核心靶点的拓扑信息

Table 2　Topology information of core targets

序号 Number	基因 Gene name	介度中心性 BC	接近中心性 CC	自由度中心性 Degree
1	TP53	171.4356144	0.023809524	25
2	BCL2	83.40531136	0.022222222	21
3	ESR1	186.1817183	0.022222222	21
4	CASP3	54.3483128	0.021276596	20
5	PARP1	41.94995005	0.020408163	19
6	SIRT1	54.22628483	0.020833333	18
7	PTGS2	128.2415085	0.020408163	17
8	ABCG2	55.79358974	0.018181818	13
9	XDH	104.0511433	0.018181818	11

表 3　黄芩素与核心靶点分子对接结果

Table 3　Results of docking of baicalein with core target molecules

基因名称 Gene name	PDB ID	配体 Ligand	结合能/(kcal/mol) Binding energy
BCL2	4LXD	黄芩素 Baicalein	-8.7
SIRT1	4IF6		-8.0
XDH	2E1Q		-8.0
ABCG2	6HZM		-7.8
PTGS2	5IKR		-7.4
TP53	1XQH		-7.1
PARP1	2RIQ		-7.1
CASP3	1QX3		-6.6
ESR1	1SJ0		-6.3

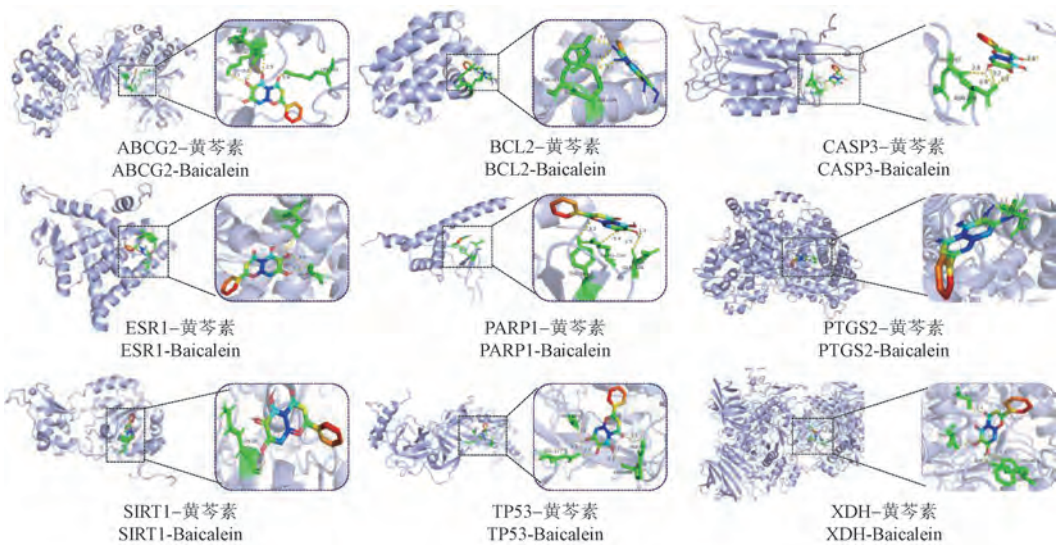


图 3　分子对接结果可视化图

Figure 3　Visualization of molecular docking results

平升高($P<0.01$)。然而,与 HUA 组相比,黄芩素和 AP 组 CRE 和 BUN 水平均有所降低($P<0.05$)。这些结果表明黄芩素具有降低尿酸水平的作用,并对肾具有一定的保护作用。此外,从图 4D、4E 结果可知,与对照组相比,HUA 组血清和肝中 XOD 的活性均升高($P<0.01$)。与 HUA 组相比,黄芩素和 AP 组血清和肝中 XOD 的活性均有所降低($P<0.05$),表明黄芩素对 XOD 的活性具有一定的抑制作用。根据肾组织 HE 染色结果(图 4F),观察到对照组、黄芩素组和 AP 组肾没有明显损伤和炎症细胞浸润,而 HUA 组小鼠肾组织伴有明显炎症细胞浸润。

2.4 黄芩素对 HUA 小鼠肾尿酸转运体表达水平的影响

与对照组相比,HUA 组显示肾中尿酸排泄蛋白 ABCG2 和 OAT1 的表达水平显著下调($P<0.01$),而尿酸重吸收蛋白 GLUT9 和 URAT1 的表达水平显著上调($P<0.01$)。黄芩素组能够在一定程度上上调尿酸排泄蛋白的表达水平,并下调尿酸重吸收蛋白的表达水平($P<0.05$),见图 5。

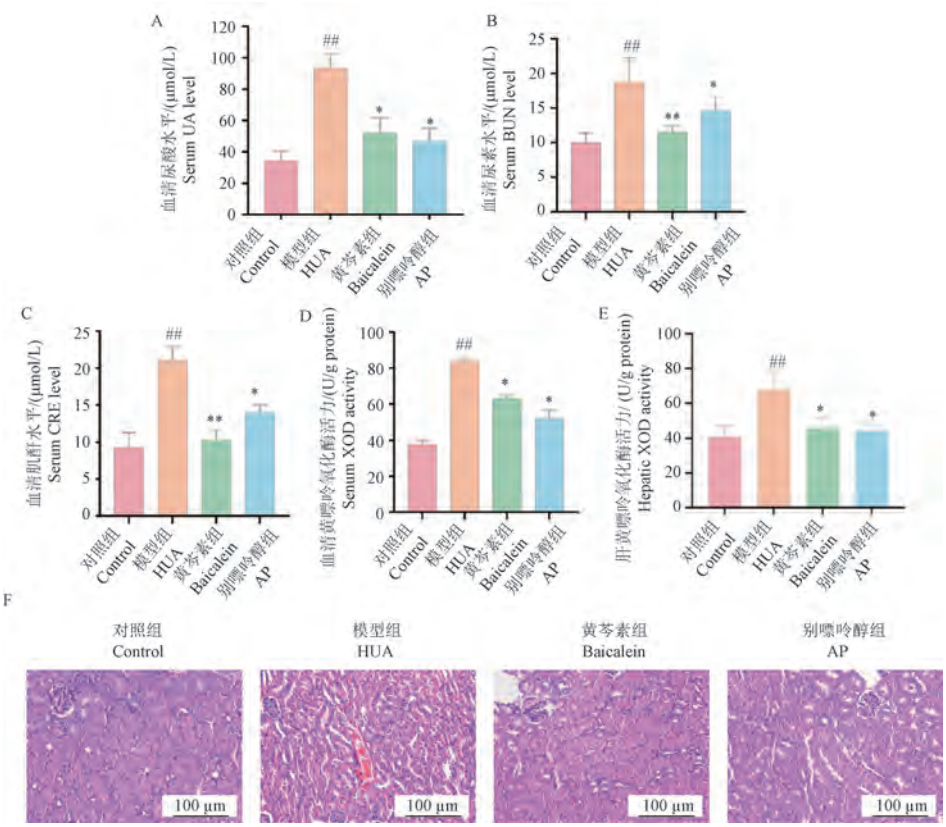
2.5 黄芩素对 HUA 小鼠肾组织 SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平的影响

从图 6A 中可以看出,与对照组相比,HUA 组 SIRT1 mRNA 表达显著下降($P<0.01$),而与 HUA 组相比,黄芩素组能显著上调 SIRT1 mRNA 的表达($P<0.05$)。Western blot 结果显示与 qPCR 结果一致(图 6B)。

2.6 代谢组学分析

2.6.1 多元统计分析

采用 OPLS-DA 方法对小鼠肾组织代谢物进行分析,绘制了 OPLS-DA 图和模型验证图(见图 7A~7C)。结果显示,对照组、HUA 组和黄芩素组在正负离子模式下均呈现明显的分离,表明代谢物发生了显著的变化。此外,经过 100 次随机置换检验后,观察到 $R^2>Q^2$ 值且 $Q^2>0.5$,这表明该模型具有较好



注:A:尿酸含量;B:尿素氮含量;C:肌酐含量;D:血清黄嘌呤氧化酶活性;E:肝黄嘌呤氧化酶活性;F:HE 染色分析。与对照组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 4 黄芩素治疗 HUA 的药效学研究($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

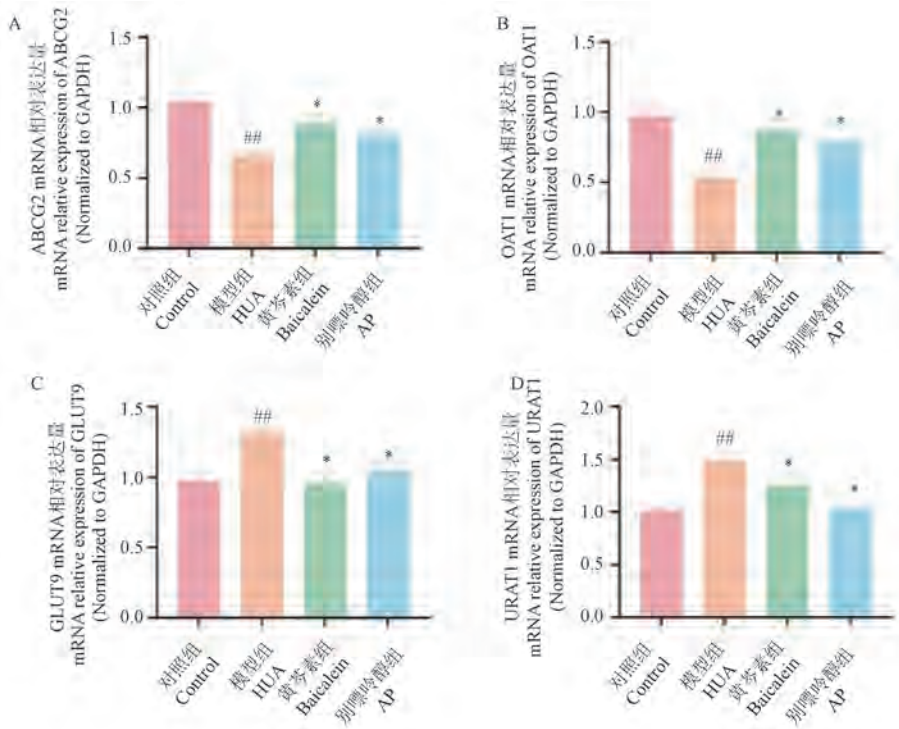
Note. A, Uric acid content. B, Urea nitrogen content. C, Creatinine content. D, Serum xanthine oxidase activity. E, Liver xanthine oxidase activity. F, HE staining analysis. Compared with the Control group, $^{\#\#}P<0.01$. Compared with the HUA group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 4 Pharmacodynamics of Baicalein in the treatment of HUA

的解释和预测能力。

2.6.2　差异代谢物和代谢通路分析

根据 VIP>1、P<0.05 的标准，将对照组和 HUA 组进行比较，筛选出 48 个差异代谢物。进一步与黄芩素组进行比较后，发现黄芩素治疗高尿酸血症存在 1,4-丁炔二醇、己二酸、枸橼酸、乙醇酸酯、红藻氨酸、L-糖精、喹啉酸、芥子醇、5-羟基黄酮 9 个潜在差异代谢物，其中黄芩素组 4 个代谢物相较与 HUA 组上调，5 个代谢物相较与 HUA 组下调（详见表 4 和图 7D、7E）。为了深入了解这些代谢物的功能和相关途径，利用 Metaboanalyst 6.0 的 Joint Pathway Analysis Module 对 9 个核心靶点和 9 个差异代谢物的代谢途径进行分析，结果见图 7F。图 8 所示，根据 impact>0.05 的标准，筛选得到影响 HUA

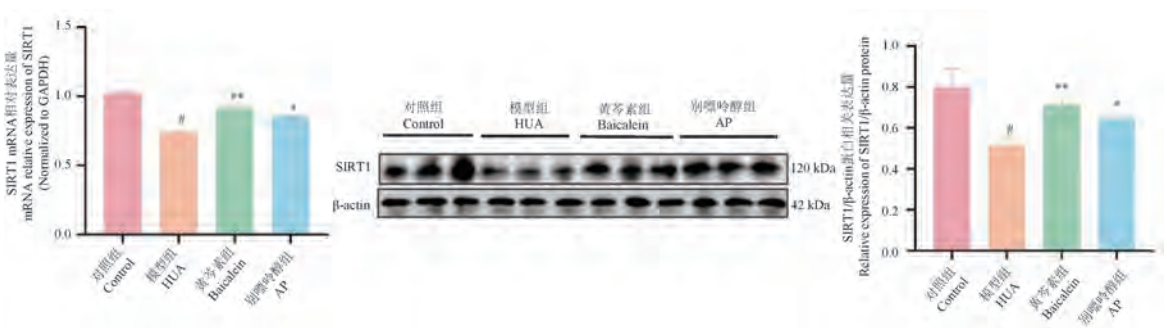


注：A：ABCG2 mRNA 的表达；B：OAT1 mRNA 的表达；C：GLUT9 mRNA 的表达；D：URAT1 mRNA 的表达。与对照组相比，$^{\#\#}P$<0.01；与模型组相比，$^{*}P$<0.05。

图 5　尿酸转运体 mRNA 的表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Note. A, Expression of ABCG2 mRNA. B, Expression of OAT1 mRNA. C, Expression of GLUT9 mRNA. D, Expression of URAT1 mRNA. Compared with the Control group, $^{\#\#}P$<0.01. Compared with the HUA group, $^{*}P$<0.05.

Figure 5　Expression level of uric acid transporter mRNA

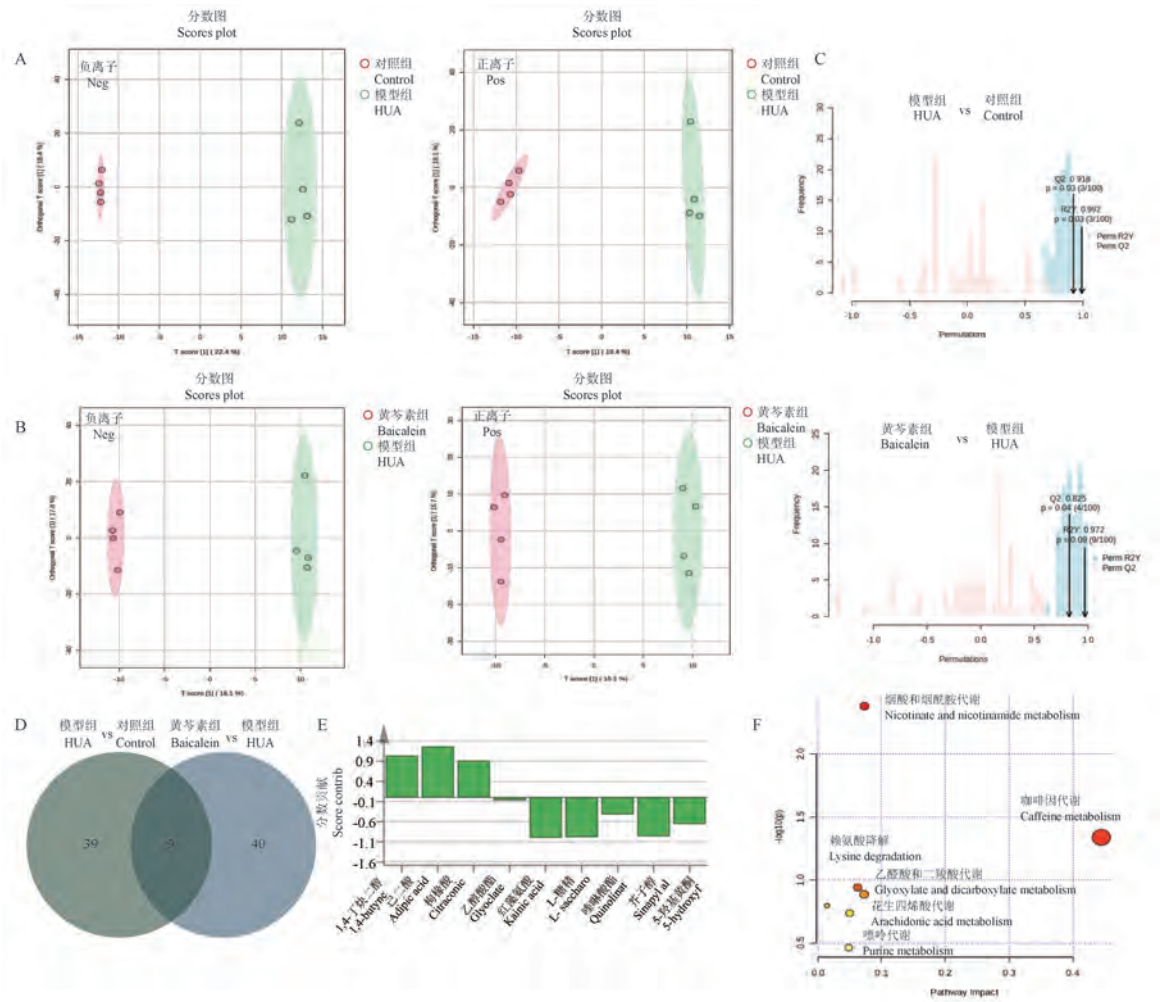


注：A：SIRT1 mRNA 的表达；B：SIRT1 蛋白表达。与对照组相比，$^{\#}P$<0.05；与模型组相比，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01。

图 6　SIRT1 mRNA 及蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Note. A, Expression of SIRT1 mRNA. B, SIRT1 protein expression. Compared with the Control group, $^{\#}P$<0.05. Compared with the HUA group, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01.

Figure 6　mRNA and protein expression levels of SIRT1



注：A：对照组与模型组的 OPLS-DA 图；B：黄芩素组与模型组的 OPLS-DA 图；C：模型验证图；D：差异代谢物交集图；E：显著差异代谢物；F：代谢通路图。

图 7 代谢组学分析

Note. A, OPLS-DA diagrams of the Control group and the HUA group. B, OPLS-DA diagram of Baicalein group and HUA group. C, Model verification diagram. D, Differential metabolites intersection map. E, Significant difference in metabolites. F, Metabolic pathway map.

Figure 7 Metabonomic analysis

表 4 肾差异代谢物筛选结果

Table 4 Screening results of renal differential metabolites

序号 Number	代谢物 Metabolites	变量投影重要度 VIP	*P* 值 *P* value	差异倍数 Fold change	趋势 Trend	离子模式 Ion mode
1	1,4-丁炔二醇 1,4-butynediol	1.20405042	0.013404993	1.592048247	↑	-
2	己二酸 Adipic acid	1.679576794	0.012890623	1.276533308	↑	-
3	枸橼酸 Citraconic acid	1.650465175	0.009899641	1.852886443	↑	-
4	乙醇酸酯 Glycolate	3.919179847	0.008237816	0.736181652	↓	-
5	红藻氨酸 Kainic acid	2.21348127	6.08393E-06	0.211560459	↓	-
6	L-糖精 L-saccharopine	6.183121445	0.000526119	0.264359556	↓	-
7	喹啉酸酯 Quinolinate	4.686148641	0.029254875	1.249903751	↑	-
8	芥子醇 Sinapyl alcohol	2.729199582	0.000889441	0.25265791	↓	-
9	5-羟基黄酮 5-hydroxyflavone	1.013715027	0.046490131	0.797367255	↓	+

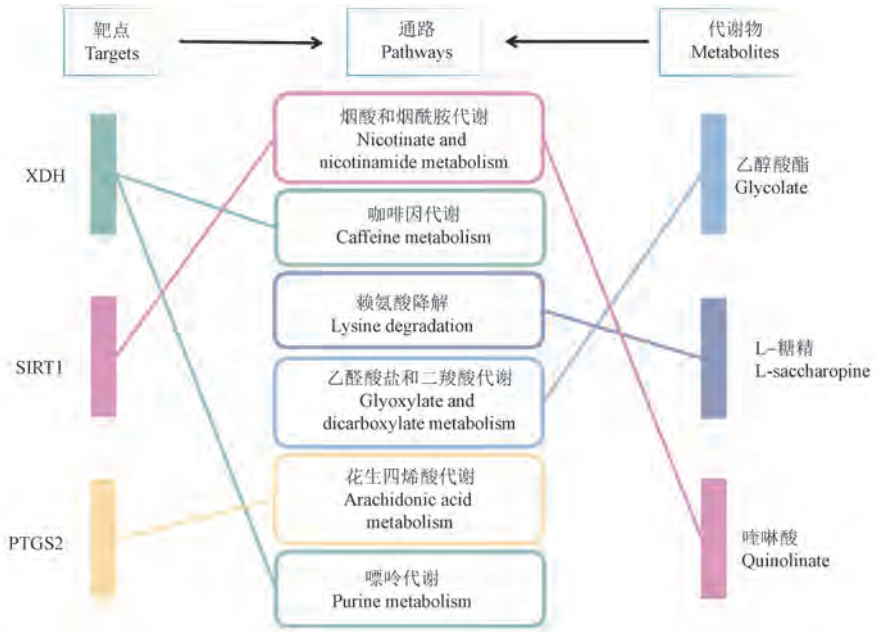


图 8　联合通路分析：靶点和代谢物

Figure 8　Joint pathway analysis: targets and metabolites

小鼠的主要代谢通路，包括咖啡因代谢、烟酸和烟酰胺代谢、赖氨酸降解、乙醛酸和二羧酸代谢、花生四烯酸代谢和嘌呤代谢。其中，烟酸和烟酰胺代谢通路富集了喹啉酸代谢物和 SIRT1 基因。这表明黄芩素可能通过调控基因和调节代谢物紊乱治疗高尿酸血症。

3　讨论

HUA 主要是由于体内尿酸合成增多或排泄减少而导致的代谢性疾病。本实验构建了 21 d 的小鼠高尿酸血症模型，观察到小鼠尿酸、肌酐、尿素氮含量和黄嘌呤氧化酶活性升高，以及肾组织炎症及尿酸转运体表达异常的情况。尿酸超过正常水平被认为是高尿酸血症的特征，而肌酐和尿素氮是常用于评估肾损伤的指标，其含量升高与肾损害密切相关。尿酸的合成受黄嘌呤氧化酶的调控，其活性异常表达会导致尿酸含量升高。研究表明，近曲小管中尿酸转运体异常表达会减少尿酸排泄[18-19]。当尿酸排泄受阻时，尿酸转运体表达异常，导致尿酸排泄减少并在肾中积聚。然而，在给予黄芩素后，观察到尿酸、肌酐和尿素氮含量的降低，黄嘌呤氧化酶活性受到抑制，肾组织炎症的减轻以及尿酸转运体表达恢复正常。这表明黄芩素能够治疗高尿酸血症并对肾损伤具有一定的保护作用。

中药的复杂性和多样性赋予了其与机体相互作用的复杂性和多变性，因此对中药进行系统、整体的分析具有重要的意义和价值。网络药理学是一种有助于揭示中药成分、靶点和疾病之间相互作用关系的方法。通过网络药理学分析，发现了 TP53、XDH、ESR1、PTGS2、ABCG2、PARP1、CASP3、BCL2 和 SIRT1 9 个核心靶点，可作为后续研究的一个重要依据。

代谢组学是一种通过检测生物体在外界刺激下代谢产物异常变化的方法，以揭示生物体对刺激作出响应的机制[20-21]。研究结果显示，黄芩素能够通过调节 1,4-丁炔二醇、己二酸、枸橼酸、乙醇酸酯、红藻氨酸、L-糖精、喹啉酸、芥子醇、5-羟基黄酮 9 个差异代谢物的异常来发挥治疗作用。此外，黄芩素还能够调控烟酸和烟酰胺代谢、咖啡因代谢、赖氨酸降解、乙醛酸和二羧酸代谢、花生四烯酸代谢和嘌呤代谢 6 条代谢通路。网络药理学结合代谢组学综合分析揭示了由 SIRT1 和喹啉酸共同富集的烟酸和烟酰胺代谢途径，进而发挥治疗高尿酸血症的作用。

烟酸和烟酰胺代谢通路富集了喹啉酸代谢物和 SIRT1 基因。烟酸和烟酰胺是 NAD 的前体，而喹啉酸是色氨酸代谢产物，其代谢过程依赖 NAD 作为辅酶。因此，烟酸和烟酰胺的代谢状态可能影响喹啉酸的代谢。喹啉酸(Quinolinate)是一种属于吡啶羧酸类有机化合物，含有带有羧酸基团的吡啶环结

构。在动物体内,喹啉酸作为 NMDA 受体激动剂发挥作用,并可能与神经退行性疾病有关[22-23]。研究表明,在肾功能不全患者中,喹啉酸的含量在血液和脑脊液中显著增加。血液透析可以降低喹啉酸的含量[24-25]。SIRT1 基因编码的酶 SIRT1 在细胞内调节 NAD 水平和烟酸代谢,从而影响细胞生理过程。SIRT1 属于去乙酰化酶家族的酶,其活性依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。它在机体衰老和炎症过程中扮演着重要的角色。其活性和表达受到烟酸和烟酰胺供应和代谢状态的调控。研究表明,SIRT1 在肾病综合征大鼠肾组织中,SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达量均显著降低,上调 SIRT1 表达,可改善肾病综合征大鼠肾损伤[26-27]。本研究也发现,模型组肾组织中 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达量均显著降低,且黄芩素显著上调了 SIRT1 的表达,表明黄芩素可能是通过这一途径治疗高尿酸血症并对肾损伤有一定保护作用。

综上,动物实验证实黄芩素可通过降低尿酸,影响尿酸转运蛋白和排泄蛋白从而治疗高尿酸血症,且对高尿酸血症引起肾损伤具有一定的改善作用。网络药理学联合代谢组学综合分析,推测出黄芩素治疗 HUA 的机制可能与 SIRT1 基因表达和调节代谢物紊乱有关,为进一步深入开发阐释黄芩素治疗高尿酸血症的药效及机制提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] 周涵, 梁伟. 慢性肾脏病与高尿酸血症 [J]. 临床内科杂志, 2023, 40(6): 374-378.
ZHOU H, LIANG W. Chronic kidney disease and hyperuricemia [J]. J Clin Intern Med, 2023, 40(6): 374-378.

[2] COSTA-BAUZA A, GRASES F. 7-methylxanthine inhibits the formation of monosodium urate crystals by increasing its solubility [J]. Biomolecules, 2023, 13(12): 1769.

[3] 朱丽华, 蒋翠花, 张健, 等. 不同程度肝肾损伤的高尿酸血症大鼠模型研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 1-8.
ZHU L H, JIANG C H, ZHANG J, et al. Hyperuricemia rat models with various degrees of hepatic and renal injuries [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 1-8.

[4] 伍朝春, 黄政德, 庞羽, 等. 中西医健康管理无症状高尿酸血症临床观察 [J]. 光明中医, 2022, 37(8): 1336-1339.
WU C C, HUANG Z D, PANG Y, et al. Clinical observation on health management of integrated traditional Chinese and western medicine in asymptomatic hyperuricemia population [J]. Guangming J Chin Med, 2022, 37(8): 1336-1339.

[5] 陈静, 徐鹏, 黎创, 等. 从“湿”辨治高尿酸血症及其并发症理论探析 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(7): 1810-1815.
CHEN J, XU P, LI C, et al. Exploration on the differentiation and treatment of hyperuricemia and its complications from the perspective of pathogenic damp [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 40(7): 1810-1815.

[6] 胡青, 颜微微, 王文广, 等. 黄芩素通过抑制 NF-κB/STAT3/ERK 信号通路改善过敏性鼻炎小鼠的炎症反应 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(1): 165-170.
HU Q, YAN W W, WANG W G, et al. Baicalein improves the inflammatory response of allergic rhinitis mice by inhibiting NF-κB/STAT3/ERK signaling pathway [J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(1): 165-170.

[7] 李子元,许慧龙,秦东,等. 黄芩苷和黄芩素对高尿酸血症肾病的影响 [J]. 肾脏病学,2023,28(6):315-327.
LI Z Y, XU H L, QIN D, et al. Effect of baicalin and baicalin on hyperuricemia nephropathy [J]. Nephrology, 2023, 28(6): 315-327.

[8] 杜红丽, 张晨宇, 赵清. 黄芩素通过调节 HIF-1α/VEGF 信号通路抑制类风湿关节炎大鼠的炎症反应和病理性血管生成 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(12): 2213-2219.
DU H L, ZHANG C Y, ZHAO Q. Baicalein inhibits inflammatory response and pathological angiogenesis in rheumatoid arthritis rats by regulating HIF-1α/VEGF signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(12): 2213-2219.

[9] PU P, WANG X, SALIM M, et al. Baicalein, a natural product, selectively activating AMPKα (2) and ameliorates metabolic disorder in diet-induced mice [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 362(1/2): 128-138.

[10] GAO L, ZHOU F, WANG K X, et al. Baicalein protects PC12 cells from $A\beta_{25-35}$-induced cytotoxicity via inhibition of apoptosis and metabolic disorders [J]. Life Sci, 2020, 248: 117471.

[11] 邱华明, 李子祥, 金源卿, 等. 2 型糖尿病气阴两虚证大鼠尿液代谢组学研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 722-732.
QIU H M, LI Z X, JIN Y Q, et al. Urine metabonomics in type 2 diabetes rats with qi Yin deficiency syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 722-732.

[12] 张格第, 刘庚鑫, 罗富里, 等. 基于网络药理学研究肾衰方治疗 CKD 心肌损伤的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 17-25.
ZHANG G D, LIU G X, LUO F L, et al. Mechanism of Shenshuai Recipe in treating chronic kidney disease-related myocardial injury based on network pharmacology [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 17-25.

[13] QU P, DU S, WANG W, et al. Treatment of gouty arthritis with traditional Chinese medicine decoction: Meta-analysis, network pharmacology analysis, and molecular docking [J]. Medicine (Baltimore), 2024, 103(1): e36722.

[14] 袁瑞瑛, 普珍, 王敏竹, 等. 藏党参提取物对酵母膏联合氧嗪酸钾致高尿酸血症小鼠的保护作用研究 [J]. 中医药导

报, 2022, 28(10): 6-11.
YUAN R Y, PUZHEN, WANG M Z, et al. Study on the protective effect of Zangdangshen[*Codonopsis thalictrifolia* wall. var. mollis(Chipp.) L. T. Shen]Extract on hyperuricemia mice induced by yeast extract paste combined with potassium oxonate [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 28(10): 6-11.

[15] 程雅欣, 李佳. 高尿酸血症和痛风动物模型及其建立方法的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(2): 251-256.
CHENG Y X, LI J. Animal models of hyperuricemia and gout: established methods and research progress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(2): 251-256.

[16] 宋丽, 王跃, 田飞, 等. 黄芩素通过抑制氧化应激与凋亡改善小鼠心肌重构的作用研究 [J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2022, 39(3): 1-7.
SONG L, WANG Y, TIAN F, et al. Effects of baicalein on myocardial remodeling in mice by inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. J Hubei Minzu Univ Med Ed, 2022, 39(3): 1-7.

[17] 徐俊涛, 王莹, 马飞, 等. 黄芩素通过抑制 NF-κB 通路对小鼠烧伤愈合的促进作用 [J]. 中成药, 2022, 44(8): 2496-2503.
XU J T, WANG Y, MA F, et al. Effects of baicalein on promoting burn healing in mice *via* inhibiting NF-κB pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(8): 2496-2503.

[18] 蒲强红, 林茂, 吴珊, 等. 尿酸转运体 BCRP 与 GLUT9 基因多态性与吡嗪酰胺致高尿酸血症的相关性研究 [J]. 中国处方药, 2023, 21(9): 13-16.
PU Q H, LIN M, WU S, et al. Urate transporters *BCRP* GLUT9 gene polymorphisms and pyrazinamide induced hyperuricemia [J]. J China Prescr Drug, 2023, 21(9): 13-16.

[19] 努尔玛娜提·胡安别克, 周子虔, 王春, 等. 秋菊丸化学成分鉴定及靶向 GLUT9-OAT3 尿酸转运体介导慢性高尿酸血症大鼠尿酸代谢和肾保护的机制研究 [J]. 药物评价研究, 2023,46(6):1201-1213.
NURMANATI J, ZHOU Z Q, WANG C, et al. Chemical composition identification of Qiuju Pills and mechanism of targeting GLUT9-OAT3 uric acid transporter mediating uric acid metabolism and renal protection in chronic hyperuricemia rats [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(6): 1201-1213.

[20] 赵昶潞, 尹聪, 高继宁. 中医诊治慢性肾脏病中代谢组学的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(1): 160-162.
ZHAO C L, YIN C, GAO J N. Research progress of metabonomics in traditional Chinese medicine in the diagnosis and treatment of chronic kidney disease [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2024, 22(1): 160-162.

[21] 苏海燕, 刘俊宏, 王柏清, 等. 基于代谢组学探讨中医肾虚证物质基础研究概况 [J]. 中国中医药信息杂志, 2024, 31(5): 172-177.
SU H Y,LIU J H,WANG B Q,et al. Overview of basic research of TCM kidney deficiency syndrome based on metabolomics [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2024, 31(5): 172-177.

[22] HAMED A, HOSSEIN J, FATEMEH H S, et al. The protective effects of hesperidin as an antioxidant against quinolinic acid-induced toxicity on oligodendroglia cells: an *in vitro* study [J]. Mult Scler Relat Disord, 2024, 82: 105401.

[23] 邓寒冰, 李春琴, 张粲, 等. 基于 NLRP3/caspase-1 研究电针刺激对脑卒中大鼠小胶质细胞形态转换及神经元凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(2): 51-57.
DENG H B, LI C Q, ZHANG C, et al. Electroacupuncture stimulation regulates the morphological transformation and neuronal apoptosis of microglia in rats following stroke *via* NLRP3/caspase-1 signaling [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(2): 51-57.

[24] 张楠楠, 赵瑞鹏, 施建华. 喹啉酸磷酸核糖转移酶与疾病的研究进展 [J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(11): 1725-1727.
ZHANG N N, ZHAO R P, SHI J H. Research progress of quinolinic acid phosphoribosyltransferase and diseases [J]. Chin J Lab Diagn, 2021, 25(11): 1725-1727.

[25] ZHAO B, LI M, LI B, et al. The action mechanism by which C1q/tumor necrosis factor-related protein-6 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic mice [J]. Neural Regen Res, 2024, 19(9): 2019-2026.

[26] VÁZQUEZ-LIZARRAGA R, MENDOZA-VIVEROS L, CID-CASTRO C, et al. Hypothalamic circuits and aging: keeping the circadian clock updated [J]. Neural Regen Res, 2024, 19(9): 1919-1928.

[27] LI H Q, YANG H F, QIN Z B, et al. Colchicine ameliorates myocardial injury induced by coronary microembolization through suppressing pyroptosis via the AMPK/SIRT1/NLRP3 signaling pathway [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2024, 24(1): 23.

〔收稿日期〕2024-01-28

钟颖怡,丁宁,王浥尘,等. miR-22-3p 靶向 GSDMD 抑制同型半胱氨酸诱导的平滑肌细胞焦亡［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 12-18.
Zhong YY, Ding N, Wang YC, et al. MiR-22-3p targets gasdermin D to inhibit homocysteine-induced pyroptosis of vascular smooth muscle cells［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 12-18.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.002

miR-22-3p 靶向 GSDMD 抑制同型半胱氨酸诱导的平滑肌细胞焦亡

钟颖怡[1],丁　宁[2],王浥尘[1],刘　超[3],董治锋[1],马胜超[1],熊建团[1],
郝银菊[1],白志刚[4],姜怡邓[1*]

(1.国家卫生健康委代谢性心血管疾病研究重点实验室,银川　750004;2.宁夏医科大学基础医学院,银川　750004;
3.宁夏医科大学临床医学院,银川　750004;4.宁夏回族自治区人民医院,银川　750004)

【摘要】　目的　探讨 miR-22-3p 对同型半胱氨酸(Hcy)诱导血管平滑肌细胞焦亡的影响。**方法**　体外培养人血管平滑肌细胞(VSMC),分为 Control 组(0 μmol/L Hcy)与 Hcy 组(100 μmol/L Hcy),Western blot 检测细胞中 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 表达水平,qRT-PCR 检测 miR-22-3p 表达情况;ELISA 检测上清中 IL-1β、IL-18 的浓度。转染 miR-22-3p 对照(miR-22-3p-NC)、miR-22-3p 的模拟物(miR-22-3p-mimic)及抑制物(miR-22-3p-inhibitor)后观察 Hcy 诱导下 VSMC 的变化。**结果**　与 Control 组相比,Hcy 组 VSMC 中 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 表达水平增加($P<0.05$),IL-1β、IL-18 浓度更高($P<0.01$),miR-22-3p 相对表达水平低($P<0.01$);转染 miR-22-3p-mimic 后,VSMC 中 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 表达水平显著降低($P<0.01$),IL-1β、IL-18 浓度降低($P<0.01$);转染 miR-22-3p-inhibitor 后 VSMC 中 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 表达水平显著增加($P<0.01$),IL-1β、IL-18 浓度升高($P<0.05$)。**结论**　miR-22-3p 可抑制 Hcy 诱导的 VSMC 焦亡。

【关键词】　动脉粥样硬化;血管平滑肌细胞;焦亡;miR-22-3p;同型半胱氨酸
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0012-07

MiR-22-3p targets gasdermin D to inhibit homocysteine-induced pyroptosis of vascular smooth muscle cells

ZHONG Yingyi[1], DING Ning[2], WANG Yichen[1], LIU Chao[3], DONG Zhifeng[1], MA Shengchao[1], XIONG Jiantuan[1], HAO Yinju[1], BAI Zhigang[4], JIANG Yideng[1*]

(1. National Health Commission Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Disease Research, Yinchuan 750004, China. 2. School of Basic Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 3. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 4. Ningxia Hui Autonomous Region People's Hospital, Yinchuan 750004)

【Abstract】　Objective　To investigate the effect of miR-22-3p on pyroptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by homocysteine (Hcy). **Methods**　Human VSMCs were cultured *in vitro* and divided into a Control group (0 μmol/L Hcy) and a Hcy group (100 μmol/L Hcy). After intervention, expression levels of pro Caspase-1,

[基金项目]国家自然科学基金项目(U21A20343, 82370293, 82270492);宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2023BEG02074, 2022BFH02013, 2021BEG02033, 2020BFH02001)。
[作者简介]钟颖怡(1999—),女,硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail:zhonyiy@163.com
[通信作者]姜怡邓(1974—),男,教授,博士生导师,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:jydeng@nxmu.edu.cn

gasdermin D (GSDMD), N-GSDMD, and NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) were detected by Western blot. MiR-22-3p expression was determined by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Interleukin (IL)-1β and IL-18 levels in the supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Cells were also transfected with control miR-22-3p (miR-22-3p-NC), miR-22-3p-mimic, and miR-22-3p-inhibitor, to observe the effects on VSMC pyroptosis induced by Hcy. **Results** Expression levels of pro Caspase-1, GSDMD, N-GSDMD, and NLRP3 in VSMCs were increased ($P<0.05$), IL-1β and IL-18 levels were increased ($P<0.01$), and the relative expression level of miR-22-3p was reduced ($P<0.01$) in the Hcy group compared with the Control group. Transfection with miR-22-3p-mimic significantly decreased the expression levels of pro Caspase-1, GSDMD, N-GSDMD, and NLRP3 in VSMCs ($P<0.01$), and significantly decreased levels of IL-1β and IL-18 ($P<0.01$), while transfection with miR-22-3p-inhibitor significantly increased the expression levels of pro Caspase-1, GSDMD, N-GSDMD, and NLRP3 in VSMCs ($P<0.01$) and significantly increased the levels of IL-1β and IL-18 ($P<0.05$). **Conclusions** MiR-22-3p may delay Hcy-induced VSMC pyroptosis.

【Keywords】 atherosclerosis; VSMC; pyroptosis; miR-22-3p; homocysteine

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

动脉粥样硬化(AS)是冠心病等心血管疾病的病理基础,而心血管疾病在我国城乡居民疾病死亡构成比中居首位[1],严重危害我国国民健康。大量研究表明,AS 是一种慢性炎症性疾病,具有经典炎症变性、渗出及增生的特点[2],而血管平滑肌细胞(VSMC)是 AS 斑块所有阶段的主要细胞类型[3]。细胞焦亡则具有通过将细胞裂解从而将细胞内容物释放到细胞间质,导致炎症的明显特征。细胞焦亡与 AS 的形成密切相关[4]。同型半胱氨酸(Hcy)是由蛋氨酸去甲基生成的一种含硫氨基酸,在体内的代谢共有 4 种途径。它通过其中两种途径再甲基化生成蛋氨酸,构成蛋氨酸循环[5]。正常人血浆 Hcy 浓度为 5~15 μmol/L,高同型半胱氨酸血症患者可高达 500 μmol/L。Hcy 水平升高可引起骨质疏松和晶状体脱位等症状,但高 Hcy 水平与心血管并发症最密切相关[6]。Hcy 已被认为是 AS 以及心血管疾病的独立危险因素[7]。研究表明 Hcy 促进 N-GSDMD 的表达,沉默 GSDMD 以拯救 Hcy 诱导的内皮细胞焦亡[8]。因此,探究 VSMC 焦亡相关调节机制或可为 Hcy 致 AS 的诊疗提供新的观点。微小 RNA(microRNA)是长度为 20~22 个碱基,位于基因组内或基因序列中的非编码 RNA[9]。microRNA 是通过与靶基因信使 RNA 结合以降解并抑制翻译的方式扮演转录后基因调控的关键调控因子的角色,它在大多数生物过程包括细胞发育、分化、增殖、细胞周期调控和代谢的调控中起重要作用[10]。此外 miR-22-3p 也参与多种疾病的发生与发展,包括亚甲炎[11]、脑膜瘤[12]等。miR-22-3p 已被证实是一种有效的抗炎因子,且作为 NLRP3/caspase-1/IL-1β 信号轴的负向调控因子对抗哮喘发作后的炎症反应[13]。研究发现 miR-22-3p 或可作为诊断冠状动脉疾病的特异性生物标志物[14],但 miR-22-3p 对 VSMC 的影响目前尚未明确。本研究期望通过探查 miR-22-3p 是否通过 GSDMD 靶向调控 VSMC 焦亡,为 AS 的诊疗机制研究提供可参数据。

1 材料和方法

1.1 细胞

人源 VSMC 株(苏州北纳创联生物技术有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

Hcy(美国 Sigma 公司);青霉素-链霉素双抗(北京碧云天生物技术公司);胰蛋白酶(北京碧云天生物技术公司);总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);pro Caspase-1、NLRP3 抗体(美国 Abcam 公司);GSDMD(Full Length + N terminal)(武汉爱博泰克生物技术公司);β-actin(北京中杉金桥生物技术有限公司);人白细胞介素 1β(IL-1β)ELISA 科研试剂盒、人白细胞介素 18(IL-18)ELISA 科研试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司);Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Primer、Bulge-Loop™ U6 qRT-PCR Primer Set(广州锐博生物科技有限公司);miR-22-3p-mimic、miR-22-3p-inhibitor、miR-22-3p-NC(上海吉玛制药技术有限公司)。荧光定量 PCR 仪(德国 Ana-lytik Jena 公司);电泳仪、化学发光凝胶成像仪系统(美国 Bio-Rad 公司);CO_2 培养箱、微量台式离心机(德国 Thermo Fisher

Scientific 公司);超净工作台(中国苏州安泰有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

VSMC 细胞用含 10%血清和含 1%青链霉素的 RPMI 1640 完全培养基进行培养及传代。VSMC 细胞置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.3.2 细胞转染

取细胞密度达到 60%的 VSMC 细胞,按脂质体 Lipofectamine™ 2000 说明书分别转染 miR-22-3p 对照(miR-22-3p-NC)、miR-22-3p 的过表达(miR-22-3p-mimic)和抑制物(miR-22-3p-inhibitor),6 h 之后更换为含 10%血清的 RPMI 1640 完全培养基恢复培养。

1.3.3 实验分组

实验分 Control 组(0 μmol/L Hcy)、Hcy 组(100 μmol/L Hcy)、NC 组(转染 miR-22-3p-NC)、mimic 组(转染 miR-22-3p-mimic)、inhibitor 组(转染 miR-22-3p-inhibitor)、NC+Hcy 组(转染 miR-22-3p-NC+100 μmol/L Hcy)、mimic+Hcy 组(转染 miR-22-3p-mimic+100 μmol/L Hcy)和 inhibitor+Hcy 组(转染 miR-22-3p-inhibitor+100 μmol/L Hcy)。

1.3.4 ELISA 检测

根据 ELISA 试剂盒说明书收集细胞培养上清,设置标准品孔和样品孔。取各组 VSMC 细胞培养上清液,在各孔板内对应加入 50 μL 上清液或标准品工作液后,各孔加入酶标试剂 100 μL,用封板膜封板后置于 37 ℃恒温箱孵育 60 min;待孵育结束后,弃去板内工作液,洗板 5 次(每孔加入 300 μL 洗涤液);最后一次洗板后弃液并拍干,避光条件下加入显色剂 A 50 μL,显色剂 B 50 μL,混匀后置于 37 ℃恒温箱孵育 15 min;孵育结束后,加入 50 μL 终止液;反应终止后,采用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度值。设置横坐标为标准品浓度、纵坐标为吸光度值,回归分析确定最佳拟合曲线。将标准品和样品所测吸光度值代入标准曲线计算样品中 IL-1β、IL-18 浓度。

1.3.5 qRT-PCR 检测

根据总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组 VSMC 总 RNA,RNA 的浓度和纯度通过微量分光光度计分析在 A_{260}/A_{280} 处的吸光度比值来评估,依据 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Primer 说明书和 Bulge-Loop™ U6 qRT-PCR Primer Set 说明书合成对应各组 cDNA。以 U6 为对照,同体系扩增目的基因相对量。PCR 扩增条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s、60 ℃ 34 s,共 45 个循环,反应结束后,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组细胞中 miR-22-3p 的相对表达量。

1.3.6 Western blot 检测

收取各组细胞后,根据全蛋白提取说明书提取各组 VSMC 总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白样品浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳,上样(每孔 10 μL 蛋白样品),电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。PVDF 膜置于 5%脱脂牛奶中封闭,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温下孵育 2 h 后,滴加 ECL 发光液显色,通过 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

实验结果均为计量资料,符合正态分布,采用 Graphpad Prism 8.0.2 统计软件对实验数据进行统计分析,结果采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hcy 干预后对平滑肌细胞焦亡的影响

Western blot 结果显示,Hcy 组较 Control 组 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD($P<0.01$)以及 NLRP3 蛋白($P<0.05$)的相对表达水平显著升高(图 1A)。ELISA 检测结果显示,Hcy 组较 Control 组 IL-1β($P<0.01$,图 1B)、IL-18($P<0.01$,图 1C)表达水平显著升高。结果表明 Hcy 可促进细胞焦亡相关蛋白和炎症因子的表达,增强 VSMC 细胞焦亡。

2.2 Hcy 干预后对 miR-22-3p 表达的影响

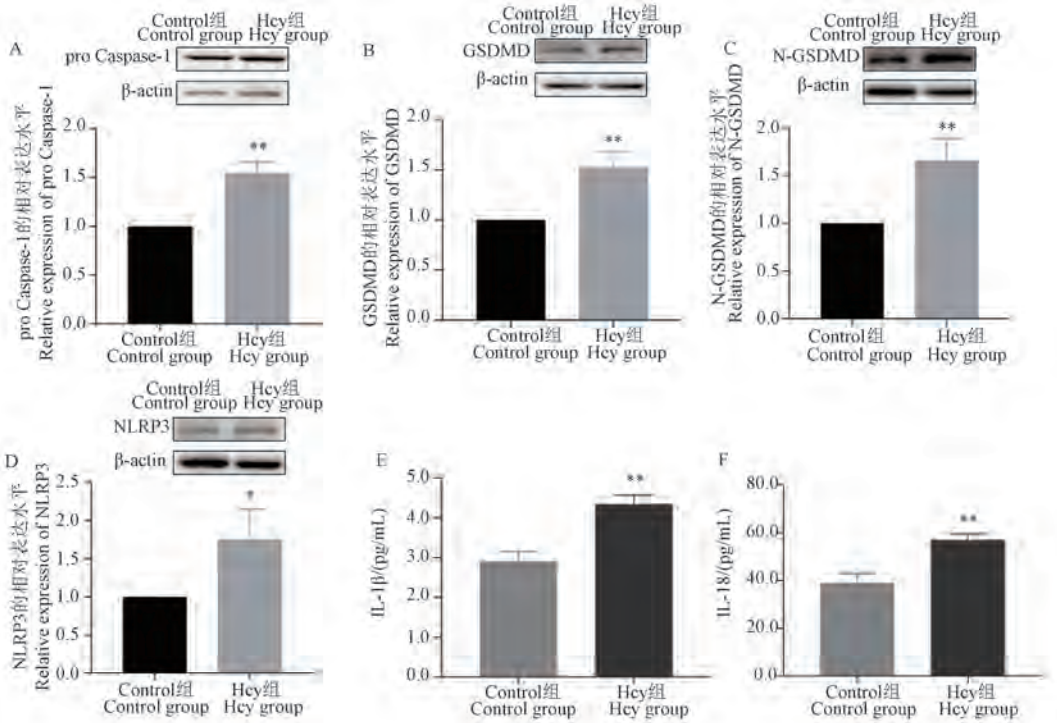
通过 qRT-PCR 检测显示,Hcy 组较 Control 组,平滑肌细胞中 miR-22-3p 相对表达水平显著降低($P<0.01$)(图 2)。结果说明,Hcy 可促进 VSMC 内 miR-22-3p 的表达。

2.3 miR-22-3p 的自身验证

qRT-PCR 检测显示,Control 组较 NC 组,miR-22-3p 无明显差异($P>0.05$);mimic 组较 NC 组,miR-22-3p 表达显著增高($P<0.01$);inhibitor 组较 NC 组,miR-22-3p 表达显著降低($P<0.01$)(图 3)。

2.4 验证 miR-22-3p 在平滑肌细胞焦亡中的功能

Western blot 结果显示,Control 组较 Hcy 组 pro

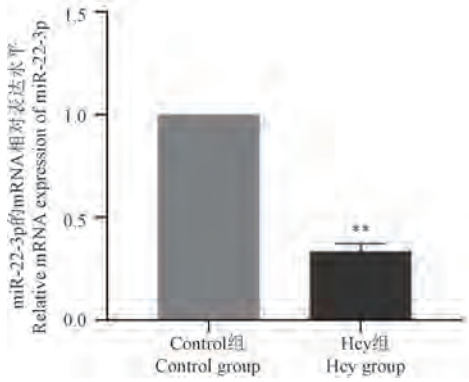


注:A~D:Western blot 检测 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 蛋白表达的变化;E:ELISA 检测 IL-1β 的浓度变化;F:ELISA 检测 IL-18 的浓度变化。与 Control 组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 1 Hcy 干预后各组平滑肌细胞焦亡水平比较

Note. A~D, Changes in protein expression of pro Caspase-1, GSDMD, N-GSDMD, NLRP3 detected by Western blot. E, Changes in concentration of IL-1β detected by ELISA. F, Changes in concentration of IL-18 detected by ELISA. Compared with Control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 1 Comparison of pyroptosis expression level of vascular smooth muscle cells induced by homocysteine

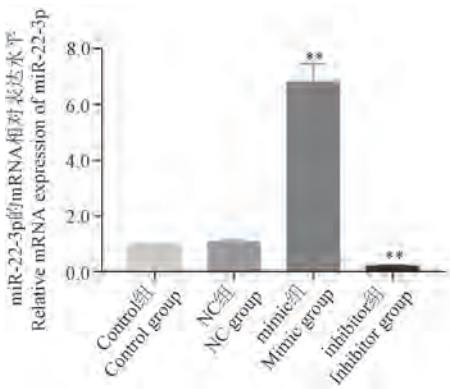


注:与 Control 组相比,$^{**}P<0.01$。

图 2 Hcy 干预后各组 miR-22-3p 的相对表达水平

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

Figure 2 Relative expression of miR-22-3p in each group after Hcy intervention



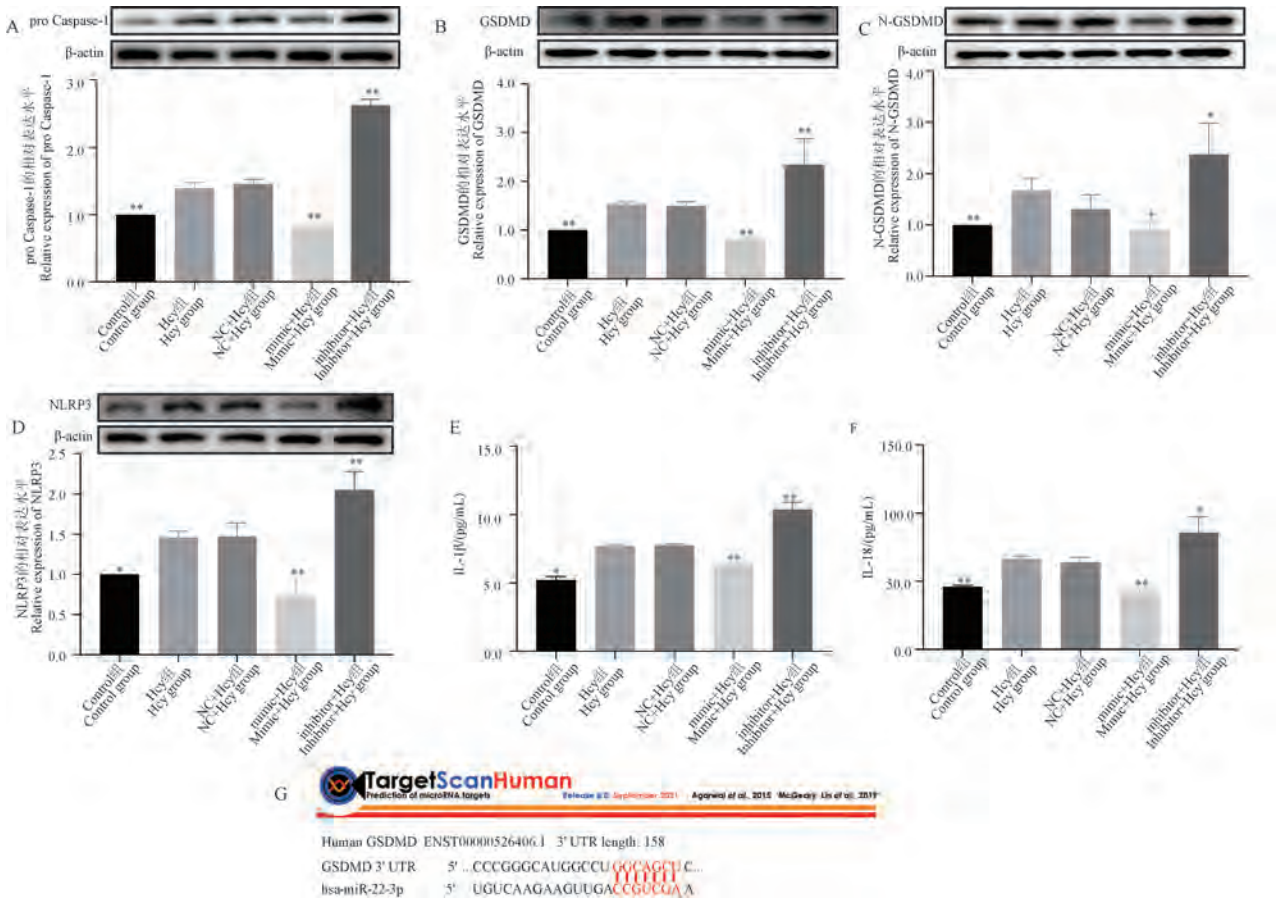
注:与 NC 组相比,$^{**}P<0.01$。

图 3 各组 miR-22-3p 的相对表达水平

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

Figure 3 Relative expression of miR-22-3p in each group

Caspase-1、N-GSDMD、NLRP3 蛋白的相对表达水平均显著降低($P<0.01$);NC+Hcy 组较 Hcy 组 pro Caspase-1、N-GSDMD、NLRP3 蛋白水平无明显变化($P>0.05$);mimic+Hcy 组较 Hcy 组 pro Caspase-1、N-GSDMD、NLRP3 蛋白的表达量显著降低($P<0.01$);inhibitor+Hcy 组较 Hcy 组 pro Caspase-1、N-GSDMD、NLRP3 蛋白的比值显著增高($P<0.01$)(图 4A)。ELISA 检测结果显示,Control 组较 Hcy 组 IL-



注：A～D：Western blot 检测 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 蛋白表达的变化；E：ELISA 检测 IL-1β 的浓度变化；F：ELISA 检测 IL-18 的浓度变化。G：TargetScan 查询显示 GSDMD 可能为 miR-22-3p 的潜在靶基因。与 Hcy 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 4 miR-22-3p 靶向调控人血管平滑肌细胞焦亡

Note. A～D, Western blot detection of changes in pro Caspase-1, GSDMD, N-GSDMD, NLRP3 protein expression. E, ELISA detection of IL-1β changes. F, ELISA detects changes in the concentration of IL-18. G, TargetScan query shows that GSDMD may be a potential target gene for miR-22-3p. Compared with Hcy group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 4 MiR-22-3p targets and regulates pyroptosis of human VSMC

1β、IL-18 的表达水平均显著降低（$P<0.01$）；NC+Hcy 组较 Hcy 组 IL-1β、IL-18 的表达差别不大（$P>0.05$）；mimic+Hcy 组较 Hcy 组 IL-1β、IL-18 的表达量显著降低（$P<0.01$）；inhibitor+Hcy 组较 Hcy 组 IL-1β、IL-18 的表达显著增高（$P<0.05$）（图 4B、4C）。结果说明，通过过表达 miR-22-3p，可以减轻 VSMC 细胞焦亡，而当抑制 miR-22-3p 时，VSMC 细胞焦亡的程度则会加重。同时为了阐明 miR-22-3p 的作用机制，通过生物信息学 TargetScan 在线软件预测了 miR-22-3p 的潜在靶基因，结果发现 GSDMD 的 3'UTR 与 miR-22-3p 存在潜在结合关系（图 4D）。

3 讨论

AS 是一种大中动脉慢性炎症性疾病，且总是伴有自身免疫反应[15]。最初，血液中的单核细胞进入内膜分化为巨噬细胞，吞噬低密度氧化脂蛋白（ox-LDL）后形成泡沫细胞，这就是早期脂肪条纹病变的标志；而后，活化的巨噬细胞和内皮细胞产生多种趋化因子和生长因子，这些因子作用于邻近的平滑肌细胞从而诱导它们在内膜室内增殖和合成细胞外基质成分，由此产生了纤维肌斑块[16]。研究发现血管壁中最丰富的细胞类型 VSMC 可转变为斑块不稳定（炎症、骨化）或斑块稳定（胶原基质沉积）细胞状态的过渡性多潜能细胞[17]。

临床前和临床资料均表明 Hcy 水平异常升高是 AS 的独立危险因素。Hcy 产生的超氧化物和过氧化物可导致血管内皮细胞损伤和 ox-LDL 氧化，使 VSMC 持续收缩缺氧，进一步加速 AS 的进程。尽管我们在理解这一病理过程的分子机制方面不断取得进步，但迄今为止仍没有特异性的靶向治疗被证

实[18]。许多研究表明,焦亡与 AS 密切相关。焦亡不仅会引起局部炎症,还会放大炎症反应,加剧斑块的不稳定性,导致斑块破裂和血栓形成,最终导致急性心血管事件[19]。

焦亡是一种炎症性程序性细胞死亡。典型的炎症小体通路是第一个被发现的。而导致焦亡的典型炎症小体途径由各种刺激诱导并激活 caspase-1,激活的 caspase-1 在其连接区域切割自抑制的 GSDMD,以从其阻遏蛋白 C 末端结构域(C-GSDMD)中释放 GSDMD(N-GSDMD)的 N 端结构域。然后,N-GSDMD 易位到质膜上,并经历寡聚化和孔隙形成,这导致渗透压升高并最终导致细胞裂解。孔的形成还促进了细胞内容物和炎性细胞因子 IL-18、IL-1β 在被 caspase-1 激活后的释放[20]。

近年来,许多研究表明,焦亡与 AS、缺血再灌注损伤(IRI)和心肌梗塞(MI)等心血管疾病的发生发展密切相关。在 AS 形成过程中,促炎细胞因子刺激 VSMC 从中膜向病变动脉内膜迁移。迁移的 VSMC 产生细胞外基质,并在斑块上产生保护性纤维帽。随着 AS 的发展,强大的 VSMC 死亡导致纤维帽变薄和坏死核心的生长,最终使病变容易破裂[21]。而作为一种新型的促炎细胞死亡,VSMC 焦亡在 AS 的发展中起着重要的作用。已发现焦亡相关蛋白如 NLRP3 炎症小体相关基因在 AS 斑块中高度表达[22]。此外,研究证实 ox-LDL 通过 NLRP3 炎性体途径诱导 VSMC 焦亡。提示人 AS 斑块中存在 VSMC 焦亡,并可能与斑块不稳定有关[23]。此外,由于焦亡与心血管疾病的发生和发展有关,因此已经开发了许多针对焦亡治疗这些疾病的策略[24],如抗炎药褪黑激素可以通过调节 AS 中母体表达基因 3/miR-223/NLRP3 的信号通路来预防内皮细胞焦亡,从而用于治疗与细胞焦亡相关的 AS[25]。本文中通过 Hcy 来处理 VSMC,探究其对 VSMC 焦亡的影响,实验结果发现 Hcy 干预组较 Control 组 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 蛋白的比值均明显升高,同时培养基上清中 IL-1β 与 IL-18 的表达水平较之对照组也有不同水平的浓度增加。实验结果提示 Hcy 对 VSMC 焦亡具有一定促进作用。

microRNA 通过与靶基因信使 RNA 结合以调控生物过程从而参与多种疾病的发生发展。而在心血管相关疾病中,microRNA 同样起到重要调控作用。如 miR-433-3p 过表达可在心肌损伤中起保护作用[26],抑制 miR-4306 表达则可以减轻内皮细胞损伤从而延缓 AS 的发生发展[27]等。文中提到的 miR-22-3p 是一种存在于机体内的非编码 RNA,在不同的机体状态下 miR-22-3p 的表达也会随着改变,如在注意缺陷多动障碍(ADHD)患者中较正常儿童表达更低[28],在肺腺癌重也呈现出较正常组更低的表达[29]。本文使用 Hcy 干预,qRT-PCR 检测发现 miR-22-3p 在 Hcy 组呈现了更低的表达水平。miR-22-3p 与其他 microRNA 一样也参与多种疾病调控。如 miR-22-3p 可调节肾炎细胞模型中炎症因子的分泌、细胞凋亡和自噬[30]。也有研究发现 miR-22-3p 可作为衰老相关 microRNA 影响 DNA 损伤和衰老[31],但在心血管疾病中是否参与调控未见说明。

先前的研究已发现 Hcy 对 VSMC 焦亡具有一定促进作用,同时 miR-22-3p 在 Hcy 组相对表达低。为了进一步探讨 miR-22-3p 是否也参与 VSMC 焦亡的相关调控,利用生物信息网站软件在线预测发现了 miR-22-3p 和 GSDMD 存在结合的互补碱基对。随后,我们通过蛋白免疫印迹法检测 VSMC 中焦亡相关蛋白相对表达情况,发现 miR-22-3p 过表达能下调 pro Caspase-1、GSDMD、N-GSDMD、NLRP3 的表达,而 miR-22-3p 抑制则增加了焦亡相关蛋白的相对表达水平。通过检测细胞培养上清中 IL-1β 与 IL-18 的表达,我们得到了同样的结果,miR-22-3p 过表达能下调细胞焦亡水平,而 miR-22-3p 抑制的作用是上调的。因此可以确定 miR-22-3p 确实参与 VSMC 焦亡的相关调控。

综上所述,此次研究探讨了 miR-22-3p 对 VSMC 在细胞焦亡的一些影响,发现 miR-22-3p 过表达显著抑制细胞的焦亡水平。由于细胞焦亡与心血管疾病的发生和发展相关,许多针对焦亡治疗这些疾病的策略已被开发。而本研究中 miR-22-3p 也被发现在 VSMC 焦亡中具有一定调控作用,因此 miR-22-3p 或可通过影响细胞焦亡的方式对 AS 存在一定治疗作用。期望未来可进一步深入研究并进行体内实验探索,从而增加一些针对 AS 治疗的相关策略。

参考文献:

[1] 《中国心血管健康与疾病报告》编写委员会. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要[J]. 中国循环杂志, 2023, 38(6): 583-612.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2022: an updated summary[J]. Chin Circ J, 2023, 38(6): 583-612.

[2] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 36(2): 141-152.

LIU J T. Progress in inflammatory pathogenesis of atherosclerosis [J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2015, 36(2): 141-152.
[3] BASATEMUR G L, JØRGENSEN H F, CLARKE M C H, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(12): 727-744.
[4] RAJAMÄKI K, LAPPALAINEN J, OÖRNI K, et al. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11765.
[5] 程丝, 冯娟, 王宪. 高同型半胱氨酸血症治疗研究进展 [J]. 生理科学进展, 2011, 42(5): 329-334.
CHENG S, FENG J, WANG X. Research advances in the treatment of hyperhomocysteinemia [J]. Prog Physiol Sci, 2011, 42(5): 329-334.
[6] HASAN T, ARORA R, BANSAL A K, et al. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(2): 1-13.
[7] LAI W K C, KAN M Y. Homocysteine-induced endothelial dysfunction [J]. Ann Nutr Metab, 2015, 67(1): 1-12.
[8] LENG Y, CHEN R, CHEN R, et al. HMGB1 mediates homocysteine-induced endothelial cells pyroptosis via cathepsin V-dependent pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532(4): 640-646.
[9] GE D W, WANG W W, CHEN H T, et al. Functions of microRNAs in osteoporosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(21): 4784-4789.
[10] FENG Q, ZHENG S, ZHENG J. The emerging role of microRNAs in bone remodeling and its therapeutic implications for osteoporosis [J]. Biosci Rep, 2018, 38(3): BSR20180453.
[11] KARAKUS N, CATAK M, KUTLUTURK F, et al. The effects of circulating MIR22-3p and MIR16-1-3p levels in different stages of subacute thyroiditis [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2023, 42(6): 436-447.
[12] DING Y, GE Y, WANG D, et al. LncRNA-IMAT1 promotes invasion of meningiomas by suppressing KLF4/hsa-miR22-3p/Snai1 pathway [J]. Mol Cells, 2022, 45(6): 388-402.
[13] HU Z, LV X, CHEN L, et al. Protective effects of microRNA-22-3p against retinal pigment epithelial inflammatory damage by targeting NLRP3 inflammasome [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18849-18857.
[14] ZHANG M, HU Y, LI H, et al. MiR-22-3p as a potential biomarker for coronary artery disease based on integrated bioinformatics analysis [J]. Front Genet, 2022, 13: 936937.
[15] KOBIYAMA K, LEY K. Atherosclerosis [J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1118-1120.
[16] GIMBRONE M A Jr, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 620-636.
[17] MIANO J M, FISHER E A, MAJESKY M W. Fate and state of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. Circulation, 2021, 143(21): 2110-2116.
[18] WEI F, DING Y, OU J, et al. Accurate detection of hcy in human serum and two-photon visualization of atherosclerosis using a highly specific fluorescent probe [J]. Anal Chem, 2023, 95(24): 9173-9181.
[19] LIU X, LUO P, ZHANG W, et al. Roles of pyroptosis in atherosclerosis pathogenesis [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 166: 115369.
[20] LOVELESS R, BLOOMQUIST R, TENG Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 264.
[21] HE B, NIE Q, WANG F, et al. Role of pyroptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(10): 7159-7175.
[22] PARAMEL VARGHESE G, FOLKERSEN L, STRAWBRIDGE R J, et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(5): e003031.
[23] LI Y, NIU X, XU H, et al. VX-765 attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice by modulating VSMCs pyroptosis [J]. Exp Cell Res, 2020, 389(1): 111847.
[24] RAO Z, ZHU Y, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer [J]. Theranostics, 2022, 12(9): 4310-4329.
[25] ZHANG Y, LIU X, BAI X, et al. Melatonin prevents endothelial cell pyroptosis via regulation of long noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 axis [J]. J Pineal Res, 2018, 64(2): e12449.
[26] 盛静宇, 朱海根, 王丽. MiR-433-3p 通过调控 MAPK8 蛋白在 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤中发挥保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 63-70.
SHENG J Y, ZHU H G, WANG L. miRNA-433-3p protects against H_2O_2-induced injury to cardiac myocytes by targeting MAPK8 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 63-70.
[27] 王瑞青, 郑彩虹, 朱巍, 等. 血小板微粒介导 miR-4306 调控糖尿病大鼠主动脉血管内皮细胞损伤的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 105-112.
WANG R Q, ZHENG C H, ZHU W, et al. Effects and mechanisms of miR-4306, mediated by platelet microparticles, on vascular endothelial cell injury in the aorta of diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 105-112.
[28] KANDEMIR H, ERDAL M E, SELEK S, et al. Evaluation of several micro RNA (miRNA) levels in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder [J]. Neurosci Lett, 2014, 580: 158-162.
[29] MA D J, ZHOU X Y, QIN Y Z, et al. MiR-22-3p Expression is down-regulated in lung adenocarcinoma [J]. Acta Biochim Pol, 2021, 68(4): 667-672.
[30] GUO P, MA Y, DENG G, et al. CYR61, regulated by miR-22-3p and MALAT1, promotes autophagy in HK-2 cell inflammatory model [J]. Transl Androl Urol, 2021, 10(8): 3486-3500.
[31] CHOU J, KALLER M, JAECKEL S, et al. AP4 suppresses DNA damage, chromosomal instability and senescence via inducing MDC1/Mediator of DNA damage Checkpoint 1 and repressing MIR22HG/miR-22-3p [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 120.

〔收稿日期〕2024-02-22

杨钰婷,杨依纯,卫兵艳,等. 近交系自发性 2 型糖尿病中国地鼠山医群体血液生理生化指标的检测分析［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 19-23.
Yang YT, Yang YC, Wei BY, et al. Analysis of blood physiological and biochemical indicators of spontaneous type 2 diabetes in inbred SHANXI MU Chinese hamsters［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 19-23.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.003

近交系自发性 2 型糖尿病中国地鼠山医群体血液生理生化指标的检测分析

杨钰婷[1,2],杨依纯[1,2],卫兵艳[1,2],武剑琴[1,2],张瑞虎[1,2],陈朝阳[1,2*]

(1.山西医科大学实验动物中心,太原　030001;2.山西省实验动物与人类疾病动物模型重点实验室,太原　030001)

【摘要】　目的　对课题组前期建立的近交系自发性 2 型糖尿病(T2DM)中国地鼠山医群体的血液生理生化指标进行检测并分析。**方法**　选取 12 月龄近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体及正常地鼠各 10 只,进行空腹采血,应用 Sysmex XT 自动血液分析仪及 Hitachi 全自动生化仪对血液 15 项生理指标及 16 项生化指标进行测定并进行统计分析。**结果**　与对照组相比,糖尿病组白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)、血红蛋白(HGB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、血糖(GLU)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、尿酸(UA)等指标差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　对课题组前期建立的近交系中国地鼠自发性 T2DM 模型进行血液生理生化指标检测分析,其变化符合人类 T2DM 发病的趋势,为该模型的应用及发展提供了基础数据。

【关键词】　中国地鼠;2 型糖尿病;生理指标;生化指标
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0019-05

Analysis of blood physiological and biochemical indicators of spontaneous type 2 diabetes in inbred SHANXI MU Chinese hamsters

YANG Yuting[1,2], YANG Yichun[1,2], WEI Bingyan[1,2], WU Jianqin[1,2], ZHANG Ruihu[1,2], CHEN Zhaoyang[1,2*]

(1. Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.
2. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Diseases, Taiyuan 030001)

【Abstract】　Objective　To determine the blood physiological and biochemical indexes in the inbred SHANXI MU strain of spontaneous type 2 diabetes (T2DM) Chinese hamsters. **Methods**　Chinese hamsters with spontaneously developed T2DM and normal hamsters ($n=10$ hamsters per group), aged 12 months, were selected for the study. Fasting blood samples were collected and 15 physiological parameters and 16 biochemical indicators were analyzed using a Sysmex XT automated hematology analyzer and Hitachi fully automatic biochemical analyzer. **Results**　The white cell count, red cell count, platelet count, hemoglobin level, alanine transaminase, aspartate transaminase, glutamate, total cholesterol, triglycerides, and uric acid all differed significantly between the diabetic and control groups ($P<0.05$). **Conclusions**　The change of blood physiological and biochemical indexes in the Chinese hamster spontaneous T2DM model were in line with the trend in human T2DM incidence, thus providing basic data for the application of this model.

【Keywords】　Chinese hamster; type 2 diabetes; physiological indexes; biochemical indexes
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家自然科学基金(U21A20194);山西省科技厅,中央引导地方科技发展资金项目(YDZJSX2022B009)。
[**作者简介**]杨钰婷(1998—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail:18142567208@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。E-mail:ccytycn@163.com

当前,糖尿病及其并发症的流行对全球健康构成重大威胁,已严重影响着人们的日常生活,不仅加重了患者的心理负担,降低其生活质量,也给患者家庭和社会带来了巨大的经济负担[1]。在过去的三十年中,全球糖尿病和糖耐量受损(impaired glucose tolerance,IGT)的患病率翻了两番[2]。根据国际糖尿病联合会(international diabetes federation,IDF)的最新报告显示,到了 2045 年,患有糖尿病的人将会增加到 7.83 亿[3]。2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)占糖尿病的 90%以上,被认为是本世纪增长最快的全球卫生紧急事件之一[3],其发生与遗传、环境等多因素有关,以胰岛素抵抗及 β 细胞损害为病理基础,主要表现为高血糖[4]。由于该疾病的复杂性,其具体的发病机制尚不清楚,也没有治愈的确切方法[5]。而动物模型是研究基础科学和应用科学的最佳方法,对实验动物其复杂的生物现象和疾病的研究可以提供关于人类的大量信息[6]。因此,开发更多更适合的 T2DM 动物模型不仅有助于研究 T2DM 的发病机制,而且还为其治疗相关的研究提供新的模型材料。

目前,构建 T2DM 动物模型的方法中,自发性 T2DM 动物模型、转基因 T2DM 动物模型、单纯 STZ 作用的 T2DM 动物模型、STZ/HFD 联合作用的 T2DM 动物模型等应用较多[7]。其中,自发性 T2DM 动物模型的发病机制和代谢特征与人类相似[8]。而动物模型的发病特征越类似于人类,其生理和病理生理过程就越有可能与人类相似[9]。

中国地鼠,1959 年首次报道其自发性遗传性糖尿病的表现[10],说明其有成为自发性 T2DM 动物模型的潜力。而后 Meier 等[11]发现,该群体近亲繁殖可自发产生糖尿病。中国地鼠山医群体为山西医科大学薄家璐教授自 1980 年从北京郊区捕获,并通过实验室驯化、建立的实验动物群体[12]。近年来,我们对该群体进行了标准化研究,并通过选择性近交繁育的初步建立了 T2DM 动物模型群体,发现该群体具有与人类疾病类似的代谢异常现象,并且在 12 月龄其空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)明显上升(FBG≥6.0 mmol/L),开始自发出现 T2DM 相关症状[13]。本文通过检测近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体的血液生理生化指标,为模型的应用提供了基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由山西医科大学实验动物中心提供的普通级中国地鼠[SCXK(晋)2019-0004],12 月龄近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体和正常对照地鼠各 10 只,雌雄对半,体重 20~30 g,饲养于实验动物中心屏障环境中[SYXK(晋)2019-0007],光照交替:明 12 h、暗 12 h;恒温:20~24 ℃,湿度:50%~70%,自由采食和饮水,饲料符合国家标准(GB14924.6-2001)《实验动物地鼠配合饲料》的要求。动物实验方案获得山西医科大学实验动物伦理委员会批准(SYDL2021002),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

稀释液(D20020)、(嗜碱)溶血剂(FBA005)、(血红蛋白)溶血剂(SLS005)、(白细胞)溶血剂(4DL005)、(染色液)溶血剂(4DS126)、浓缩清洗液(C31100)等相关试剂购自美国 Sysmex 公司。

自动血液分析仪(Sysmex XT-2000iV)购自 Sysmex 公司;全自动生化仪(Hitachi 7020)购自日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集

实验动物分为对照组(n = 10):FBG ≤ 4.5 mmol/L 及糖尿病组(n = 10):FBG ≥ 6.0 mmol/L。动物禁食 12 h 后,眶下采血,取 1 mL 置于 1.5 mL 肝素钠抗凝管中,充分混匀后冰上静置,用于血液生理指标的测定;另取 1 mL 血液置于 1.5 mL EP 管中,3500 r/min 离心 15 min 取上清,用于生化指标的测定。

1.3.2 各项测定指标

(1)血液生理指标

测定白细胞(white blood cell,WBC)、红细胞(red blood cell,RBC)、红细胞压积(hematocrit,HCT)、平均红细胞压积(mean corpuscular volume,MCV)、平均红细胞含量(mean corpuscular hemoglobin,MCH)、平均红细胞浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration,MCHC)、红细胞分布宽度(red blood cell distribution width,RDW)、血小板(platelet,PLT)、平均血小板体积(mean platelet volume,MPV)、血红蛋白(hemoglobin,HGB)、中性粒细胞(neutrophilic granulocyte,NEUT)、单核细胞(monocyte,MONO)、淋巴细胞

(lymphocyte,LYMPH)、嗜酸性粒细胞(eosimophil,EO)、嗜碱性粒细胞(basophil,BASO)等 15 项指标。

(2)血液生化指标

测定白蛋白(serum albumin,ALB)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、谷丙转氨酶(alanine transaminase,ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase,AST)、钙(calcium,Ca)、肌酸磷酸激酶(creatine kinase,CK)、肌酐(creatinine,CR)、γ-谷氨酰转移酶(γ-glutamyl transferase,GGT)、血糖(blood glucose,GLU)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、总胆红素(total bilirubin,TBIL)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、总蛋白(total protein,TP)、尿酸(uric acid,UA)、尿素(blood urea nitrogen,UREA)等 16 项指标。

1.4 统计学方法

在本次的研究过程采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计,并以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用独立样本 t 检验对两组进行比较,$P<0.05$ 时具有显著性差异。

2 结果

2.1 血液生理指标比较分析

近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体血液生理指标检测结果(表 1)显示,与对照组相比,糖尿病组 WBC 水平明显上升($P<0.05$),提示机体可能存在炎症反应;RBC、PLT、HGB 水平明显下降($P<0.05$),提示机体存在一定的贫血及微循环障碍。而不同白细胞比例中,中性粒细胞及单核细胞有所下降,淋巴细胞有所增加,但并无统计学意义($P>0.05$),可能也与机体的炎症反应相关。

表 1 近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体生理指标($n=10$)

Table 1 Physiological indexes of Chinese hamsters with spontaneous T2DM

分组 Groups	对照组 Control group	糖尿病组 Diabetic group
WBC/(10^9/L)	1.54±0.54	2.60±0.83 *
RBC/(10^{12}/L)	10.91±0.33	9.51±0.90 *
HCT/%	13.81±0.51	13.63±1.01
MCV/fL	13.00±0.48	13.45±1.21
MCH/pg	15.42±0.64	16.03±1.38
MCHC/(g/L)	1191.80±38.29	1199.90±30.67
RDW/%	14.04±1.01	14.15±2.67
PLT/(10^9/L)	524.60±68.49	401.33±61.61 *
MPV/fL	1.71±0.13	1.69±0.11
HGB/(g/L)	170.17±5.67	157.67±9.03 *
NEUT/%	42.78±22.95	40.78±12.60
MONO/%	9.87±6.12	6.06±4.94
LYMPH/%	44.61±19.11	50.19±8.90
EO/%	2.03±1.19	2.62±1.67
BASO/%	0.70±0.66	0.35±0.57

注:与对照组相比,*$P<0.05$。

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

2.2 血液生化指标比较分析

近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体血液生化指标检测结果(表 2)显示,与对照组相比,糖尿病组 ALT、AST、GLU、TC、TG、UA 水平明显升高($P<0.05$),提示机体可能出现了一定的肝肾损伤。ALP、CK、GGT、LDH、TBIL、UREA 等指标也有所升高,但无统计学意义($P>0.05$),可能也与机体的肝肾功能受损有关。

表 2 近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体生化指标($n=10$)

Table 2 Biochemical indexes of Chinese hamsters with spontaneous T2DM

分组 Groups	对照组 Control group	糖尿病组 Diabetic group
ALB/(g/L)	33.62+2.06	32.40+2.94
ALP/(U/L)	213.56+44.72	220.70+64.66
ALT/(U/L)	80.33+9.22	97.57+5.44 **
AST/(U/L)	384.17+34.16	510.25+116.43 *
Ca/(mmol/L)	2.02+0.11	1.94+0.14
CK/(U/L)	452.44+241.86	612.90+368.48
CR/(μmol/L)	12.72+3.67	11.59+5.29
GGT/(U/L)	3.63+0.62	4.67+1.37
GLU/(mmol/L)	3.99+0.40	8.02+2.01 ****
LDH/(U/L)	298.33+39.17	350.80+66.25
TBIL/(μmol/L)	1.25+0.44	1.33+0.35
TC/(mmol/L)	4.31+0.35	5.73+0.98 **
TG/(mmol/L)	1.14+0.48	2.49+1.16 *
TP/(g/L)	63.08+5.87	59.57+6.31
UA/(μmol/L)	104.41+27.63	182.40+88.10 *
UREA/(mmol/L)	11.28+1.18	13.91+2.89

注:与对照组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$,****$P<0.0001$。

Note. Comapred with control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$, ****$P<0.0001$.

3 讨论

人类疾病动物模型的应用对于深入了解疾病发病机制、发现新的治疗靶点以及促进研究成果向临床转化至关重要[14],而血液生理生化指标扮演着至关重要的角色,其不仅能够直观地揭示机体的健康状态和潜在问题,而且往往成为诊断疾病、监测病情进展以及制定治疗方案的重要依据。

课题组之前的研究发现近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体的发病特征在 12 月龄开始显现[13],12 月龄的地鼠相当于人类的中年期(40 岁左右)[15]。而年龄作为 T2DM 发病的危险因素之一,

美国糖尿病协会建议无危险因素的患者从 45 岁开始筛查 T2DM[16],而新加坡建议从 40 岁开始筛查[17],均表示 T2DM 在中年就开始有发病的倾向,近交系自发性 T2DM 中国地鼠山医群体与之相似。

目前越来越多的证据表明慢性炎症也参与了 T2DM 的发病机制[18]。WBC 是机体炎性反应的重要指标[19],其通过不同方式、机制消灭病原体、过敏原,通过参与免疫反应产生抗体、抵抗病原微生物入侵。Vozarova 等[20]研究发现 WBC 增高与胰岛素敏感性降低有一定关系,并且可以预测 T2DM 的发展。Zhang 等[21]研究表明 WBC 及中性粒细胞和淋巴细胞水平的增加都可以作为 T2DM 发病率的预测因素,而 Pannacciulli 等[22]研究发现 WBC 在糖尿病大血管、微血管并发症的发病机制中发挥重要作用。本实验中 12 月龄自发性 T2DM 中国地鼠中 WBC 显著增加,究其原因可能是由于自发性 T2DM 中国地鼠体内长期的高糖环境,引起体内的代谢紊乱,大量的炎性细胞被激活而导致,该结果与人类 T2DM 进程相似。

血液生理检测结果显示 RBC、HGB 水平明显下降,提示自发性 T2DM 中国地鼠可能存在一定程度的贫血,PLT 降低又提示在机体微循环出现了障碍。糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病微循环障碍的表现之一,是慢性肾病变(chronic kidney disease,CKD)的一种重要类型,而贫血是 CKD 的主要并发症[23]。且 DKD 患者相较于非糖尿病肾病(non-diabetic kidney disease,NDKD)也更容易发生贫血[24]。我们推测自发性 T2DM 中国地鼠可能是出现了糖尿病的并发症 DN 进而导致的贫血。在其后的生化指标中,UA 水平明显升高,且 UREA 水平也有所升高,也提示机体肾功能受损,与血液生理结果相一致。因此,当 T2DM 患者伴有红细胞及血小板参数变化异常,及时进行肾功能的检测,可能为 DKD 的预防和临床诊断提供有效的科学依据。

本实验中 12 月龄自发性 T2DM 中国地鼠血液生化指标中 ALT、AST 水平明显升高,提示其肝细胞损伤。而 GLU、TC、TG 水平明显升高,提示机体出现糖脂代谢紊乱。且在我们前期的研究中发现糖尿病组肝组织部分脂肪变性和局灶性坏死[13]。肝作为人体重要的代谢器官,参与葡萄糖、脂质、胆固醇等多种代谢以及其他生理过程[25],并且可以依靠葡萄糖转运蛋白来参与血糖水平的调节过程[26],是糖尿病发生发展过程中主要受累靶器官。而肝损害又会导致糖脂代谢紊乱,进一步引起非酒精性脂肪肝和胰岛素抵抗[27]。肝损伤后,肝细胞释放大量的 ALT 和 AST 入血,因而血液中 ALT、AST 水平成为评估肝损伤程度的重要指标[28]。而 Mingrone 等[29]表示耐胰岛素的糖尿病可能由高水平 TG 引起,且 Yang 等[30]发现高 TG 与 T2DM 风险密切相关。而 Jung 等[31]表示血清 TC 水平与心血管疾病死亡率有关。以上结果进一步表示近交系中国地鼠山医群体自发性 T2DM 动物模型发病特征与人类 T2DM 相似。此外,在自发性糖尿病动物模型中,有研究报道在长爪沙鼠糖尿病模型近交系的血液生化指标中,GLU、TC、TG 在糖尿病动物中显著升高,且其肝和肾均发生一定程度的组织损伤病变[32]。在遗传性糖尿病 GK 大鼠中,GLU、TC、TG 显著升高[33]。与本研究结果相一致。

总之,我们在课题组建立的近交系中国地鼠山医群体自发性 T2DM 动物模型上,发现自发性 T2DM 中国地鼠山医群体的血液生理生化指标的变化符合人类 T2DM 发病的趋势,为该模型的应用及发展提供了基础数据,对临床上应用实验动物具有一定的参考价值。今后,我们将进一步对模型的基础生物学特性、病理生理等指标进行更深入研究,为近交系中国地鼠山医群体自发性 T2DM 动物模型提供更为完善的基础生物学数据。

参考文献:

[1] CHAN J C N, LIM L L, WAREHAM N J, et al. The Lancet Commission on diabetes: using data to transform diabetes care and patient lives [J]. Lancet, 2021, 396(10267): 2019-2082.

[2] MAJETY P, LOZADA ORQUERA F A, EDEM D, et al. Pharmacological approaches to the prevention of type 2 diabetes mellitus [J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1118848.

[3] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 183: 109119.

[4] WANG L, GAO P, ZHANG M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.

[5] ARTASENSI A, PEDRETTI A, VISTOLI G, et al. Type 2 diabetes mellitus: a review of multi-target drugs [J]. Molecules, 2020, 25(8): 1987.

[6] PANDEY S, DVORAKOVA M C. Future perspective of diabetic animal models [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2020, 20(1): 25-38.

[7] 朱超, 朱莹莹. Ⅱ型糖尿病动物模型的构建 [J]. 中国实验

动物学报, 2013, 21(2): 84-88.
ZHU C, ZHU Y Y. Animal models of type Ⅱ diabetes: an overview [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2013, 21(2): 84-88.

[8] SANDOR C, BEER N L, WEBBER C. Diverse type 2 diabetes genetic risk factors functionally converge in a phenotype-focused gene network [J]. PLoS Comput Biol, 2017, 13(10): e1005816.

[9] DENAYER T, STÖHRN T, VAN ROY M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction [J]. N Horiz Transl Med, 2014, 2(1): 5-11.

[10] MEIER H, YERGANIAN G A. Spontaneous hereditary diabetes mellitus in Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). 1. Pathological findings [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1959, 100(4): 810-815.

[11] MEIER H, YERGANIAN G. Spontaneous diabetes mellitus in the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Findings in the offspring of diabetic parents [J]. Diabetes, 1961, 10: 12-18.

[12] 王济, 薄家璐. 山医群体中国地鼠自发的遗传性糖尿病模型 [J]. 中国病理生理杂志, 1988, 4(5): 262-266.
WANG J, BO J L. Spontaneous hereditary diabetes model of China hamster in mountain medical group [J]. Chin J Pathophysiol, 1988, 4(5): 262-266.

[13] WANG L, WANG C, ZHANG R, et al. Phenotypic characterization of a novel type 2 diabetes animal model in a SHANXI MU colony of Chinese hamsters [J]. Endocrine, 2019, 65(1): 61-72.

[14] LANGE S, INAL J M. Animal models of human disease [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(21): 15821.

[15] DUTTA S, SENGUPTA P. Men and mice: Relating their ages [J]. Life Sci, 2016, 152: 244-248.

[16] Introduction: *Standards of medical care in diabetes*-2019 [J]. Diabetes Care, 2019, 42(Suppl 1): S1-S2.

[17] GOH S Y, ANG S B, BEE Y M, et al. Ministry of health clinical practice guidelines: diabetes mellitus [J]. Singapore Med J, 2014, 55(6): 334-347.

[18] ROHM T V, MEIER D T, OLEFSKY J M, et al. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders [J]. Immunity, 2022, 55(1): 31-55.

[19] HERRERO-CERVERA A, SOEHNLEIN O, KENNE E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(2): 177-191.

[20] VOZAROVA B, WEYER C, LINDSAY R S, et al. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002, 51(2): 455-461.

[21] ZHANG H, YANG Z, ZHANG W, et al. White blood cell subtypes and risk of type 2 diabetes [J]. J Diabetes Complications, 2017, 31(1): 31-37.

[22] PANNACCIULLI N, GIORGINO F, MARTINA R A, et al. Effect of family history of type 2 diabetes on white blood cell count in adult women [J]. Obes Res, 2003, 11(10): 1232-1237.

[23] TSAI S F, TARNG D C. *Anemia* in patients of diabetic kidney disease [J]. J Chin Med Assoc, 2019, 82(10): 752-755.

[24] ITO K, YOKOTA S, WATANABE M, et al. *Anemia* in diabetic patients reflects severe tubulointerstitial injury and aids in clinically predicting a diagnosis of diabetic nephropathy [J]. Intern Med, 2021, 60(9): 1349-1357.

[25] TREFTS E, GANNON M, WASSERMAN D H. The liver [J]. Curr Biol, 2017, 27(21): R1147-R1151.

[26] ZHANG W Q, ZHAO T T, GUI D K, et al. Sodium butyrate improves liver glycogen metabolism in type 2 diabetes mellitus [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(27): 7694-7705.

[27] LIU Z, ZHANG Y, GRAHAM S, et al. Causal relationships between NAFLD, T2D and obesity have implications for disease subphenotyping [J]. J Hepatol, 2020, 73(2): 263-276.

[28] 王永斌, 陆奎英, 苏勇, 等. 非酒精性脂肪肝患者肝功能、氧化应激水平变化及临床意义 [J]. 检验医学, 2020, 35(9): 903-907.
WANG Y B, LU K Y, SU Y, et al. Changes and clinical significance of liver function and oxidative stress in patients with nonalcoholic fatty liver [J]. Lab Med, 2020, 35(9): 903-907.

[29] MINGRONE G, HENRIKSEN F L, GRECO A V, et al. Triglyceride-induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency [J]. Diabetes, 1999, 48(6): 1258-1263.

[30] YANG T, LIU Y, LI L, et al. Correlation between the triglyceride-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio and other unconventional lipid parameters with the risk of prediabetes and Type 2 diabetes in patients with coronary heart disease: a RCSCD-TCM study in China [J]. Cardiovasc Diabetol, 2022, 21(1): 93.

[31] JUNG E, KONG S Y, RO Y S, et al. Serum cholesterol levels and risk of cardiovascular death: a systematic review and a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies [J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(14): 8272.

[32] 杜小燕, 李长龙, 王冬平, 等. 长爪沙鼠自发性糖尿病模型近交系培育及其生物学特性的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 507-511.
DU X Y, LI C L, WANG D P, et al. Research progress in the establishment of a spontaneous diabetic inbred gerbil and its biological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 507-511.

[33] 徐倍, 吴国亭, 韩玉麒, 等. 2 型糖尿病 GK 大鼠病程进展与组织形态学改变 [J]. 同济大学学报(医学版), 2007, 28(5): 17-21, 25.
XU B, WU G T, HAN Y Q, et al. Relationship of progressive course and morphologic changes in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. J Tongji Univ Med Sci, 2007, 28(5): 17-21, 25.

〔收稿日期〕2024-04-17

田骄,苏芮,王婷婷,等. 聚肌胞苷酸复合游泳诱导的慢性疲劳综合征模型小鼠行为学中品系及性别差异研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 24-33.
Tian J, Su R, Wang TT, et al. Strain and gender differences in behavioral models of chronic fatigue syndrome induced by polyinosinic-polycytidylic acid and swimming in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 24-33.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.004

聚肌胞苷酸复合游泳诱导的慢性疲劳综合征模型小鼠行为学中品系及性别差异研究

田 骄[1#],苏 芮[1#],王婷婷[1,2],裴海鸾[1,2],王 晶[1*]

(1.北京中医药大学中药学院,北京 102488;2.北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,北京 100071)

【摘要】 目的 比较 ICR 和 C57BL/6J 两个品系小鼠建立的慢性疲劳综合征模型行为学中品系及性别的差异,为慢性疲劳综合征模型动物的选择提供实验依据。**方法** ICR 和 C57BL/6J 小鼠,雌雄各半,通过每隔 3 d 腹腔注射聚肌胞苷酸(polyinosinic-polycytidylic acid, Poly I:C)复合每天游泳,连续造模 15 d,造模期间测定小鼠体重、进食量并进行疲劳量表评分,造模结束后进行行为学测定,包括力竭游泳、悬尾、机械痛阈和高架十字迷宫。**结果** 与对照组相比,两种品系模型组小鼠力竭游泳时间均显著缩短($P<0.05$、$P<0.01$),悬尾不动时间显著延长($P<0.05$、$P<0.01$),机械痛阈值显著降低($P<0.05$、$P<0.01$),两品系雄性模型鼠高架十字迷宫进入开放臂时间及次数显著降低($P<0.05$、$P<0.01$),C57BL/6J 雄性模型鼠体重显著降低($P<0.05$、$P<0.01$),ICR 雌性模型鼠体重显著降低($P<0.05$)后有所升高。C57BL/6J 对照组小鼠力竭游泳时间显著低于 ICR 对照组小鼠($P<0.01$)。C57BL/6J 模型组小鼠悬尾不动时间显著高于 ICR 模型组小鼠($P<0.01$)。**结论** 两品系小鼠在体重、疲劳程度及抑郁程度方面均有差异;同品系小鼠的雌性与雄性之间存在差异,雄性鼠焦虑程度重于雌性鼠。

【关键词】 慢性疲劳综合征;聚肌胞苷酸;病毒感染;品系差异
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0024-10

Strain and gender differences in behavioral models of chronic fatigue syndrome induced by polyinosinic-polycytidylic acid and swimming in mice

TIAN Jiao[1#], SU Rui[1#], WANG Tingting[1,2], PEI Hailuan[1,2], WANG Jing[1*]
(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.
2. Beijing Tongrentang Technologies Co. Ltd Pharmaceutical Factory, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To compare strain and gender differences between ICR and C57BL/6J mouse chronic fatigue syndrome models and provide experimental evidence for the selection of model animals for chronic fatigue syndrome. **Methods** ICR and C57BL/6J mice (half male and half female) were injected intraperitoneally with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) every three days and forced to swim daily. The modeling was performed for 15 consecutive days, during which the weight and food intake of the mice were measured, and fatigue scores were assessed. After the modeling was completed, behavioral tests were carried out, including exhaustive swimming, tail suspension, mechanical pain threshold, and elevated plus maze. **Results** Compared with the control group, both strains of model mice had

[**基金项目**]国家重点研发计划(2019YFC1711400)。
[**作者简介**]田骄(1997—),女,硕士研究生,研究方向:神经药理学。E-mail:tianjiao_324@163.com
苏芮(2000—),女,硕士研究生,研究方向:神经药理学。E-mail:surui080620@126.com #共同第一作者
[**通信作者**]王晶(1973—),女,博士,副教授,研究方向:神经药理及消化药理。E-mail:wangj@bucm.edu.cn.

significantly decreased exhaustion times in the exhaustive swimming test ($P<0.05$, $P<0.01$), significantly increased immobility time in the tail suspension test ($P<0.05$, $P<0.01$), and a significantly decreased mechanical pain threshold ($P<0.05$, $P<0.01$), and male model mice had significantly decreased open arm entry time and frequency in the elevated plus maze ($P<0.05$, $P<0.01$). The weight of model male C57BL/6J mice significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). The weight of model female ICR mice increased after a significant reduction ($P<0.05$). The exhaustion time of control C57BL/6J mice was significantly lower than that of control ICR mice ($P<0.01$). The immobility time of model C57BL/6J mice was significantly greater than that of model ICR mice ($P<0.01$). **Conclusions** There were differences between the two strains of mice in terms of weight change, fatigue level, and depression. Within the same strain, there were differences between males and females, and the anxiety level of males was higher than that of females.

【Keywords】 chronic fatigue syndrome; polyinosinic-polycytidylic acid; virus infection; strain difference

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

慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFS)以严重疲劳症状为主要表现,该疲劳症状持续时间大于 6 个月,无法通过休息缓解,同时可伴有咽痛、肌肉关节痛、急性呼吸道感染、抑郁、焦虑、睡眠障碍、注意力不集中等多种症状[1-2]。近年来 CFS 引起了研究者们的关注,但其病理机制迄今并不明确。有研究显示,CFS 与病毒感染有密切关联[3-9]。例如 1984 年在美国 Lake Tahoe 地区居民广泛发生继发于 EB 病毒感染后的疲劳症状[10]。在本研究中我们采用腹腔注射 Poly I:C 复合游泳的方法来诱导小鼠出现疲劳症状,复制了模拟病毒感染诱导的 CFS 小鼠模型。Poly I:C 是一种由肌苷酸和胞苷酸聚合而成的双链 RNA,常被用于模拟病毒感染,诱发机体炎症反应。注射 Poly I:C 可激活 T 细胞,增强巨噬细胞吞噬作用[11]。众多学者的研究表明,注射 Poly I:C 可导致实验动物出现明显疲劳症状[12-13]、抑郁、焦虑样行为[14]、发热、睡眠/觉醒周期紊乱[15]和厌食。本研究通过复合每日游泳造成小鼠体力疲劳,连续造模 15 d 后通过行为学测试评估 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠免疫疲劳复合体力疲劳模型的品系差异及性别差异。

动物模型普遍用于药物开发的非临床研究阶段。与大鼠及其他常见模型动物相比,小鼠具备易于操作、可重复性高且成本低的优点[16]。然而需要注意的是,不同品系的小鼠在多种行为学实验中的表现存在着显著差异[17-20]。C57BL/6J 小鼠在蔗糖消耗程度、强迫游泳实验、高架十字迷宫实验中表现更好,且体重降低、脾指数下降及运动活动降低的幅度远高于其他品系。不同品系小鼠对药物的易感性也存在差异,例如,在强迫游泳实验与悬尾实验中,抗抑郁药的功效存在小鼠品系差异[21-22]。因此,当我们在进行 CFS 相关动物实验研究时,对于模型小鼠品系的选择就显得至关重要。研究显示,不同性别的动物在药物代谢动力学方面存在差异。临床上,女性体重总体较低,肌肉含量较少,脂肪占比多,对于亲脂性药物的吸收率较高;但女性胃酸含量较少,胃排空较慢,可能会影响药物的代谢和排泄[23]。在动物实验中,由于雌性鼠易受雌激素波动的影响,不易成功复制实验模型,部分实验者会偏好仅采用雄鼠进行研究。国家食品药品监督管理局印发的关于新药研发技术的文件中明确指出,如无特殊情况,受试动物应雌雄兼用。本实验使用双性别小鼠,探讨性别差异对于 CFS 模型动物行为学的影响。

考虑到不同品系以及同品系不同性别小鼠对 Poly I:C 易感性及行为学实验可能存在差异,在本研究中,我们选择了雌雄各半的近交系 C57BL/6J 小鼠和远交系 ICR 小鼠通过腹腔注射 Poly I:C 复合游泳建立 CFS 模型,通过一般情况观察、力竭游泳测试、悬尾实验、机械痛阈测试和高架十字迷宫实验来评估两种模型动物之间的行为学差异以及性别差异,为后续 CFS 模型动物的选择以及相关机制研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

购于斯贝福(北京)生物技术有限公司的 SPF 级 3 周龄 ICR 小鼠 28 只,雌雄各半,体重 16~18 g;购于斯贝福(北京)生物技术有限公司的 SPF 级 5 周龄 C57BL/6J 小鼠 28 只,雌雄各半,体重 16~18 g [SCXK(京)2019-0010]。饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室[SYXK(京)2020-0033]。实验期间,保持动物饲养室相对温度为(23.0±1.0)℃,相对湿度为 55%~65%,光照条件为 12 h/

12 h 明/暗交替。实验动物自由进食及饮水。该实验通过了北京中医药大学动物伦理委员会审查(BUCM-4-2022070502-3008;BUCM-4-2022102301-4020),遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

聚肌胞苷酸(赛普锐思(北京)科技有限公司,批号:RH298024)。Von-Frey 纤维毛触痛仪;Noldus EthoVision XT9 采集分析系统(荷兰 Noldus 公司);小鼠高架十字迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司,型号:ZH-DSG)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验试剂的配制

精密称取 Poly I:C 粉末 40 mg,倒入 20 mL 容量瓶中,量取 14 mL 生理盐水溶解,定容至 20 mL,充分溶解,使其浓度为 2 mg/mL,现用现配。

1.3.2 CFS 小鼠模型的复制

小鼠适应性饲养后,根据动物体重及状态进行初步筛选,按照随机数字表法将 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠各分出 12 只作为对照组,其余小鼠作为模型组参与造模。造模组第一天上午进行游泳测定,小鼠负重自身体重的 5%进行游泳,记录首次下沉时间及下沉 3 s 潜伏期作为初始值。力竭游泳 2 h 后腹腔注射 Poly I:C(20 mg/kg),注射 2 h 后进行第二轮游泳测定,以第二次的下沉 3 s 潜伏期低于初始值的 60%作为小鼠出现疲劳的标准。筛选出出现疲劳的 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠各 12 只。之后对照组小鼠每隔 3 d 腹腔注射生理盐水(0.1 mL/10 g),模型组小鼠每隔 3 d 腹腔注射 Poly I:C (20 mg/kg,0.1 mL/10 g),同时每天上、下午负重游泳,造模共进行 15 d。

1.3.3 小鼠一般情况观察

造模期间观察各组小鼠精神状态、毛发、粪便、进食量、活跃程度及体重变化。体重隔天记录,进食量每 3 d 测定 1 次。造模期间根据一般情况半定量评分表隔天观察小鼠的精神状态、粪便、耳尾颜色、皮肤和毛发的色泽情况,并按照表 1 进行评分(可交叉得分)。

1.3.4 力竭游泳实验

小鼠负重自身体重的 6%,放入水桶中(水深超过小鼠体长,水温 21~23 ℃),记录小鼠首次下沉时间及力竭时间,以小鼠口鼻沉入水中 6 s 仍不能返回水面上作为力竭标准。

1.3.5 悬尾实验

将小鼠尾巴前 1/3 处用医用胶布粘在自制悬尾仪上,使小鼠头部距桌面大约 12~15 cm,绑好小鼠同时计时 6 min,记录后 4 min 内小鼠的不动时间,以小鼠四肢不剧烈挣扎作为不动的标准。

1.3.6 高架十字迷宫实验

将小鼠头部面向开放臂放入十字迷宫中,使用 Noldus EthoVision XT9 采集分析系统记录 5 min 内小鼠在开放臂和封闭臂的时间(OT、CT)以及进入开放臂和封闭臂的次数(OE、CE)。最后根据以下

表 1 一般情况半定量评分表

Table 1 General semi-quantitative scoring table

值 Score	精神状态 Mental state	粪便 Feces	皮毛色泽程度 Color of the fur	耳尾颜色 Color of the ear and tail
0	神态安静,时而活泼好动,眼睛有神 Demeanor is quiet, sometimes lively and active, and the eyes are bright	粪便干,成形 Drying and molding feces	皮肤与脂肪连接紧密,皮毛光洁整齐 Skin is tightly connected to fat, and the fur is smooth and neat	红润光泽 Ruddy and gloss
1	易激怒好争斗,自主活动减少 Irritable and aggressive, with reduced voluntary activity	粪便黏软有形 Soft and tangible feces	皮肤略松弛,毛发枯黄无光泽 Skin is slightly loose and hair is yellow and dull	淡红少泽 Pale red and not gloss
2	懒动倦怠,眼神黯淡无光,反应能力降低 Lazy and tired, dull eyes, and reduced reflexes	粪便不成形,但不稀溏 Feces are not formed, but not loose	皮肤松弛易抓取,毛发干枯或接穗打卷,无光泽 Skin is loose and easy to grasp, and hair is dry or curled with scion, and dull	淡白少泽 Pale white and not gloss
3	精神萎靡,缩肩拱背,攻击性、对抗性行为减少 Listlessness, shrinking shoulders and arching back, less aggressive and confrontational behavior	粪便稀溏,绿褐黏腻恶臭 Feces are loose, greenish-brown sticky and foul-smelling	皮肤松弛,皮下无脂肪,抓之触骨;全身毛发枯槁,稀疏脱落 Skin is loose, there is no fat under the skin, and scratch touches the bones; the hair on the whole body is withered and sparsely shed	苍白或透青色 Pale or translucent blue

公式计算在开放臂停留时间及进入次数的比值。

OT/% = OT/(OT+CT)×100%, OE/% = OE/(OE+CE)×100%。

1.3.7　机械性缩足反射阈值(MTW)实验

将小鼠提前放置于实验笼中,待小鼠充分适应笼内环境后开始测量。选用质量为 1.0、1.4、2、4、6、8、10 g 的 Von-Frey 纤维毛刺激小鼠足下肉垫较薄处,采用 up-and-down 法进行测量,具体操作方法为:用中间克数的纤维毛刺激小鼠足下,小鼠产生逃避、缩足、舔足等疼痛反应,则为阳性反应,记作○,下一次刺激需选用质量小一级的纤维毛;若小鼠无以上反应,则为阴性反应,记作×,下一次刺激需选用质量大一级的纤维毛进行测定,当发生质变反应(阳性变阴性或阴性变阳性)时,再测定 4 次,按照公式计算出 50%引起阳性反应量(ED_{50})。

$ED_{50} = 10^{\log a + k \times b}$;其中 a 为最后一次测试所对应的纤毛对应值;b 为所使用纤毛的对数差的平均值;k 为对应参数值。

1.4　统计学方法

本研究使用 IBM SPSS Statistics 25 统计学软件对实验数据进行统计学分析。所有数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。两组数据均符合正态分布及方差齐时采用独立样本 t 检验进行分析,方差不齐采用非参检验。统一设定 95%的置信区间,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响

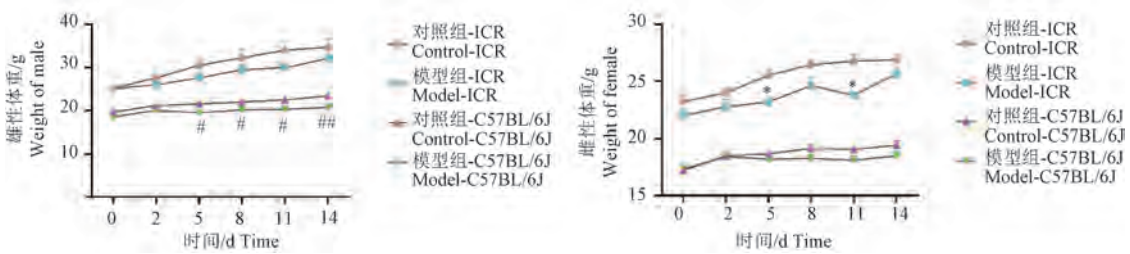
结果如图 1 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8、11 和 14 天显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 8、11 和 14 天有降低的趋势,但无显著差异($P>0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8 和 11 天有降低的趋势,但无显著差异($P>0.05$);ICR 模型组雌性小鼠体重造模前无显著差异,造模开始后第 5、8、11 和第 14 天有降低的趋势,其中第 5 天和第 11 天体重显著降低($P<0.05$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠体重降低,C57BL/6J 雄性小鼠和 ICR 雌性小鼠体重下降更显著。

2.2　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠进食量的影响

结果如图 2 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠造模后第 11 天和第 15 天进食量有所降低;C57BL/6J 模型组雌性小鼠造模后第 3 天和第 15 天进食量有降低的趋势。ICR 模型组雄性小鼠造模后第 1、3 和 7 天进食量有所降低;ICR 模型组雌性小鼠造模后第 15 天进食量有所降低。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠食量下降,C57BL/6J 小鼠食量下降更明显。

2.3　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠疲劳量表评分的影响

结果如图 3 所示,与对照组相比,C57BL/6J 模型组雄性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4、8 和 12 天显著升高($P<0.05$);C57BL/6J 模型组雌性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4 天和第 8 天有升高的趋势,但无显著差异($P>0.05$),第 12 天显著升高($P<0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4 天和第 8 天显著升高($P<0.05$),第 12 天有升高趋势($P>0.05$);ICR 模型组雌性小鼠疲劳量表评分造模前无显著差异,造模开始后第 4、8 和 12 天有升高的趋势,其中第 4 天和第 12 天显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示



注:与对照组-ICR 小鼠相比, $^{*}P<0.05$;与对照组-C57BL/6J 小鼠相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$。

图 1　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠体重的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{*}P<0.05$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 1　Effects of Poly I:C injection combined swimming on body weight of ICR and C57BL/6J mice

Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠疲劳。

2.4 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠力竭游泳的影响

结果如图 4 所示，与对照组相比，C57BL/6J 模型组雄性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低（$P<0.01$）；C57BL/6J 模型组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低（$P<0.01$）。ICR 模型组雄性小鼠首次下沉时间及力竭时间与显著降低（$P<$

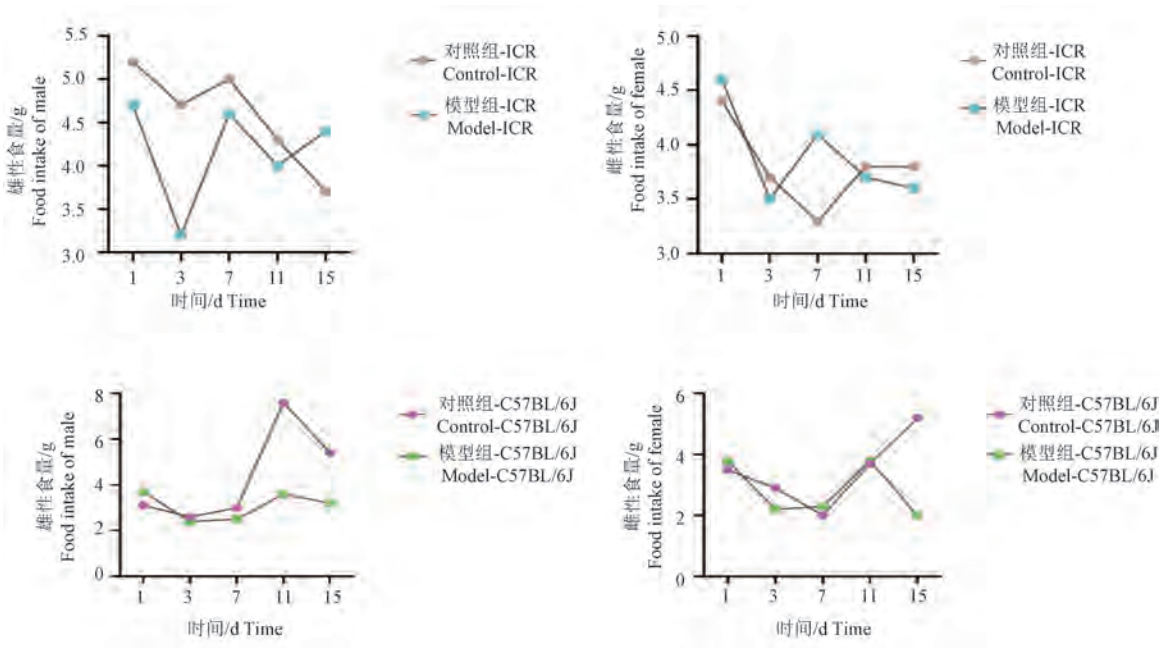
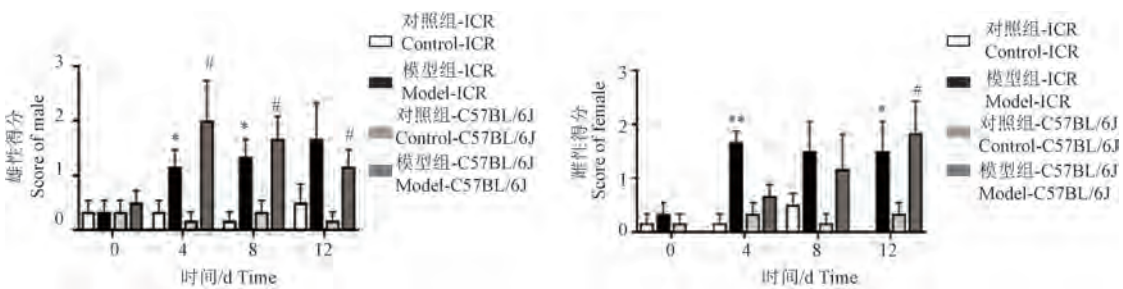


图 2 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠进食量的影响

Figure 2 Effects of Poly I:C injection combined swimming on food intake of ICR and C57BL/6J mice

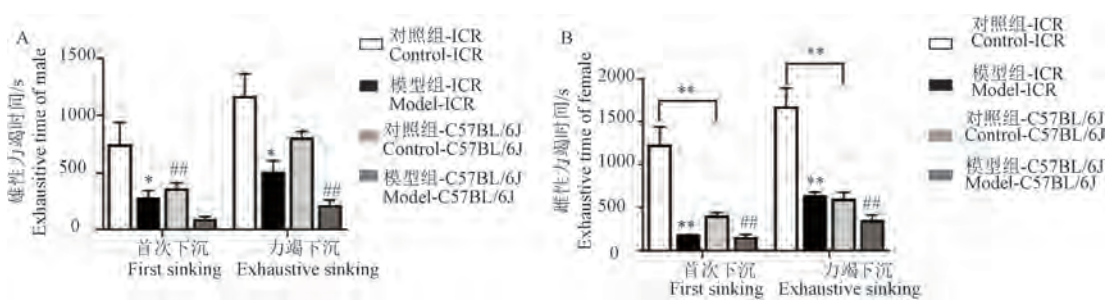


注：与对照组-ICR 小鼠相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与对照组-C57BL/6J 小鼠相比，$^{\#}P<0.05$。

图 3 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠疲劳量表评分的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#}P<0.05$.

Figure 3 Fatigue scale scores of ICR and C57BL/6J mice treated with combination of Poly I:C injections and swimming



注：与对照组-ICR 小鼠相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与对照组-C57BL/6J 小鼠相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图 4 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠力竭游泳的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 4 Effects of Poly I:C injection combined swimming shown by the exhaustive swimming test in ICR and C57BL/6J mice

0.05)；ICR 模型组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低($P<0.01$)。与 ICR 对照组雌性小鼠相比，C57BL/6J 对照组雌性小鼠首次下沉时间及力竭时间显著降低($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠疲劳，C57BL/6J 雄性小鼠疲劳程度更显著。

2.5　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠悬尾不动时间的影响

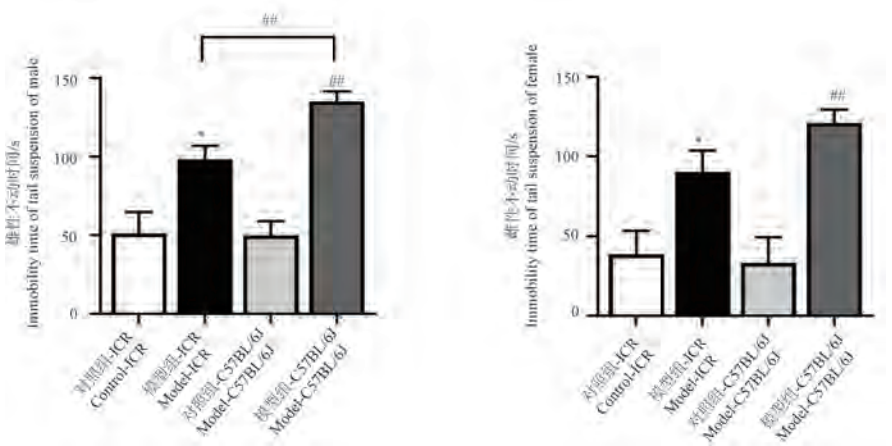
结果如图 5 所示，与对照组相比，C57BL/6J 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.01$)；C57BL/6J 模型组雌性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.01$)。ICR 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.05$)；ICR 模型组雌性小鼠悬尾不动时间显著降低($P<0.05$)。与 ICR 模型组雄性小鼠相比，C57BL/6J 模型组雄性小鼠悬尾不动时间显著升高($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可诱导小鼠出现抑郁情绪，C57BL/6J 小鼠抑郁情绪更显著。

2.6　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠机械痛阈的影响

结果如图 6 所示，与对照组相比，C57BL/6J 模型组雄性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$)；C57BL/6J 模型组雌性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.05$)。ICR 模型组雄性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$)；ICR 模型组雌性小鼠机械痛阈阈值显著降低($P<0.01$)。提示 Poly I:C 注射复合游泳可造成小鼠痛觉降低。

3.7　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠高架十字迷宫的影响

结果如图 7 所示，与对照组相比，C57BL/6J 模

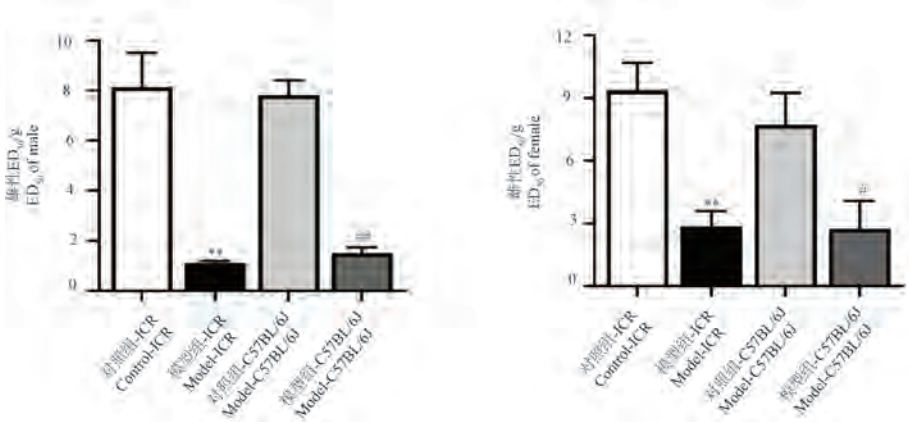


注：与对照组-ICR 小鼠相比，$^{*}P<0.05$；与对照组-C57BL/6J 小鼠相比，$^{\#\#}P<0.01$。

图 5　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠悬尾不动时间的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{*}P<0.05$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 5　Effects of Poly I:C injection combined swimming on immobility time in the tail suspension of ICR and C57BL/6J mice

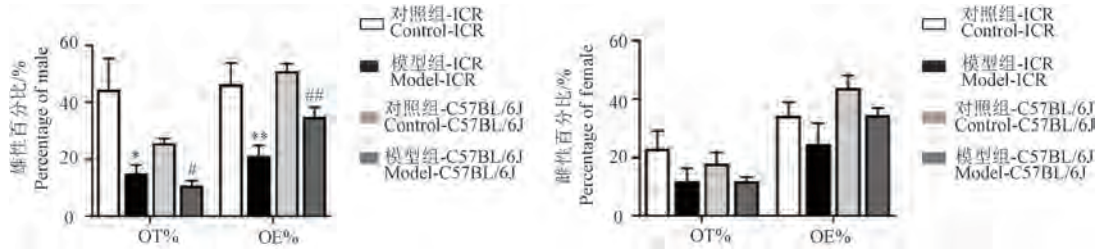


注：与对照组-ICR 小鼠相比，$^{**}P<0.01$；与对照组-C57BL/6J 小鼠相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 6　Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠机械痛阈的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{**}P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 6　Effects of Poly I:C injection combined swimming on mechanical pain threshold of ICR mice and C57BL/6J mice



注：与对照组-ICR 小鼠相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与对照组-C57BL/6J 小鼠相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 7 Poly I:C 注射复合游泳对 ICR 小鼠和 C57BL/6J 小鼠高架十字迷宫行为的影响

Note. Compared with control-ICR mice, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J mice, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 7 Effects of Poly I:C injection combined swimming on the performance shown by the elevated plus maze in ICR and C57BL/6J mice

型组雄性小鼠 OT%及 OE%显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；C57BL/6J 模型组雌性小鼠 OT%及 OE%有降低的趋势（$P>0.05$）。ICR 模型组雄性小鼠 OT%及 OE%显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；ICR 模型组雌性小鼠 OT%及 OE%有降低的趋势（$P>0.05$）。提示 Poly I:C 注射复合游泳可诱导小鼠出现焦虑情绪，雄性小鼠焦虑情绪更显著。

3 讨论

CFS 是于 1988 年由 Holmes 等[24]首次提出，是一种特发性、异质性疾病，涉及多个器官系统的体内平衡失调。1994 年美国疾病控制与预防中心（centers for disease control and prevention，CDC）公布的 CFS 的诊断标准[2]直至今日仍被广泛使用。该标准认为 CFS 是以持续长时间疲劳为主要特点的慢性全身性综合性症候群，疲劳超过 6 个月，且伴有以下 4 种及以上症状，包括短期记忆或注意力损害、喉咙痛、颈部或腋窝淋巴结触痛、肌肉酸痛、多发性非关节炎性关节疼痛、头痛、睡眠后精力不能恢复、体力或脑力劳动后 24 h 内持续不舒服及休息后也不能缓解其疲劳状态。后续研究发现 CFS 伴有其他并发症状，如焦虑样、抑郁样、睡眠障碍等多种精神上的症状[1]。CFS 涉及身体多个系统的内稳态失调，严重影响患者的生活、精神状态及工作效率。

CFS 的症状与大部分急性病毒感染有很多的相似之处，近年来对于病毒感染与 CFS 的相关性研究日益增多。系统分析结果显示，CFS 合并病毒感染类型主要有 EB 病毒[5]、肠道病毒[3,7-8]以及人类疱疹病毒[4,6]等。

Poly I:C 是一种人工合成的病毒双链 RNA 类似物，为 toll 样受体-3（toll-like receptor-3，TLR3）激动剂，可引发机体的固有免疫应答，出现与系统性病毒感染相当的炎症反应。作为目前被广泛应用的病毒感染模型，腹腔注射 Poly I:C 能够激活机体免疫系统，引起若干中枢和全身反应。有研究显示，外周注射 Poly I:C 后会引起大鼠疲劳，表现为跑步机活动时间及自发转轮活动时间持续减少 1 周以上[25]。本研究采用每隔 3 d 腹腔注射 Poly I:C 复合每天 2 次负重游泳，导致 C57BL/6J 和 ICR 小鼠力竭游泳时间显著降低，悬尾不动时间显著增长，机械痛阈阈值显著降低，高架十字迷宫中更倾向于进入闭合臂，表明该造模方式引起了小鼠体力及精神方面的疲劳。

有研究表明，啮齿动物长期以来被用于模拟情感和免疫缺陷及其相互作用研究[26]。有研究表明小鼠似乎比大鼠更适合用于神经炎症诱导的抑郁症等精神异常模型，具有更好的敏感性和可信度[26]。C57BL/6 小鼠是抑郁模型中使用频率最高的品系，其次是 ICR 小鼠[26]。ICR 小鼠毛色白化，适应性强，体格健壮，繁殖力强，生长速度快，实验重复性较好，是国际通用的封闭群小鼠；然而作为远交系小鼠，ICR 小鼠同时具有遗传可变性的缺点[27]。C57BL/6J 小鼠属于近交系小鼠，是 C57 小鼠亚系之一，毛发黑色，是实验动物小鼠中使用最广泛的品系之一，具有基因组序列全部清楚、寿命长等优点，适用于多种模型建造，例如Ⅱ型糖尿病模型、肥胖模型及代谢综合征模型等。然而，关于 CFS 模型小鼠不同品系的行为学差异研究非常有限，这不利于 CFS 相关药物开发的深入研究。

我们的研究结果表明两种品系小鼠雌性与雄性之间存在行为学上的差异。由于雌性鼠受雌激素、动情周期以及生殖影响，部分指标可能会出现

波动,一般情况下,研究者更加倾向于使用雄性鼠,但临床数据表明,CFS 患者女性占比较大[28],在进行动物实验及机制研究时不应只使用单一雄性鼠。实验结果显示,C57BL/6J 雄性鼠在高架十字迷宫进入开放臂的时间及次数上显著降低($P<0.05$、$P<0.01$),而雌性鼠降低不显著;雄性鼠机械痛阈值($P<0.01$)较雌性鼠($P<0.05$)降低更为显著。ICR 雄性鼠在高架十字迷宫进入开放臂的时间及次数上显著降低($P<0.05$、$P<0.01$),而雌性鼠降低不显著。因此,不论是进行新药研发、药物增加适应症或是研究药物作用机制均不应单独使用雄性。美国国立卫生研究院也发表了应考虑到性别差异,对雌性动物展开研究的文章[29]。故建议在进行实验研究时应使用雌雄双性别动物。

本实验中探索了近交系的 C57BL/6J 小鼠和远交系的 ICR 小鼠对于注射 Poly I:C 复合游泳后是否具有差异。我们的实验结果显示,与对照组相比较,ICR 模型组雌性小鼠在第 5 天及第 11 天的体重显著下降($P<0.05$),ICR 模型组雄性小鼠体重有下降的趋势但无显著差异,而 C57BL/6J 模型组雄性小鼠在第 5、8、11 和 14 天均显著下降($P<0.05$、$P<0.01$),C57BL/6J 模型组雌性小鼠体重有下降的趋势但无显著性差异。总体看来,C57BL/6J 模型组小鼠体重增长较 ICR 小鼠缓慢,但 C57BL/6J 模型组小鼠进食量受造模影响较大,C57BL/6J 模型组小鼠进食量降低,体重下降较 ICR 模型组小鼠更为显著。

力竭游泳实验结果显示,C57BL/6J 模型组雄性小鼠力竭时间显著降低($P<0.01$),降低幅度远高于 ICR 模型组雄性小鼠($P<0.05$)。且 C57BL/6J 对照组小鼠力竭时间明显较 ICR 对照组小鼠更短,C57BL/6J 对照组雌性小鼠与 ICR 对照组雌性小鼠具有显著差异($P<0.01$)。实验期间,为尽量排除小鼠品系以及性别差异以外的干扰因素,其他实验变量保持一致,包括力竭游泳容器、水温、水量以及实验时间等。实验结果表明,在初始体重相同的情况下,C57BL/6J 小鼠生长较缓慢、体力较低、初始疲劳值要高于 ICR 小鼠。结合疲劳量表评分,C57BL/6J 模型组小鼠在实验后期仍有较高的疲劳值,而 ICR 模型组雄性小鼠第 12 天疲劳评分已不具有显著差异。

有研究表明,在悬尾实验中,与其他品系小鼠相比 C57BL/6J 小鼠不动时间更长[22]。悬尾实验中小鼠的不动行为称为行为绝望,CFS 模型小鼠更加倾向于表现出不动时间的增长,即更明显的行为绝望。我们的实验结果显示,与对照组相比较,ICR 模型组小鼠不动时间虽然与对照组比较具有显著的差异($P<0.05$),但 C57BL/6J 模型组小鼠均表现出更长的不动时间($P<0.01$),C57BL/6J 模型组雄性小鼠比 ICR 模型组雄性小鼠不动时间显著增长($P<0.01$),这与 Ripoll 等[22]的实验结果一致,提示 C57BL/6J 小鼠在悬尾不动实验中表现出的抑郁倾向更加严重。

高架十字迷宫结果显示,C57BL/6J 模型组雄性小鼠和 ICR 模型组雄性小鼠表现出进入开放臂时间显著降低($P<0.05$)以及进入开放臂次数显著减少($P<0.01$),而 C57BL/6J 雌性鼠和 ICR 雌性鼠则无显著差异。同时 Nesher 等[20]提出 C57BL/6J 小鼠较 ICR 小鼠表现出更多的焦虑样行为,我们的实验结果也表明 C57BL/6J 对照组小鼠较 ICR 对照组小鼠进入开放臂的时间大大减少($P>0.05$),C57BL/6J 对照组小鼠更加的焦虑。这一结果表明 C57BL/6J 小鼠本身焦虑样行为较 ICR 小鼠更为严重,Poly I:C 复合游泳诱导的模型组 C57BL/6J 小鼠焦虑样行为更为严重。

近年来,CFS 已成为影响我国国民健康的重要问题,但目前 CFS 的病理生理机制尚不明确,亦无明确的生物学标记物。目前,关于其发生机制的主要假说涵盖了基因易感性、能量代谢异常、氧化应激、下丘脑-垂体-肾上腺轴功能障碍、神经内分泌系统失调、感染及免疫系统功能紊乱等诸多方面。本研究成功复制了两种品系小鼠 CFS 动物模型,结果表明两种品系、同品系不同性别小鼠在行为学实验方面存在差异(见表 2)。本实验结果可为 CFS 的药物开发研究提供动物模型选择的参考依据。众所周知,与 C57BL/6J 小鼠相比,ICR 小鼠更具有价格优势,通常 ICR 小鼠价格约为 C57BL/6J 小鼠的 1/4~1/3。除了成本优势,ICR 小鼠快速增长的体重有利于实验的操作,并可收获更多的血液和组织样本用于进一步的机制研究。然而 C57BL/6J 小鼠具有遗传稳定,异质性低,对 Poly I:C 易感性强的显著优点,因此本课题组更推荐使用 C57BL/6J 小鼠进行 CFS 模型动物的相关研究。

表 2 两种品系小鼠指标比较

Table 2 Comparison of indicators between the two strains of mice

实验指标 Experiment	模型组-ICR 雌性与对照组-ICR 雌性 Model-ICR mice of female vs control-ICR mice of female	模型组-ICR 雄性与对照组-ICR 雄性 Model-ICR mice of male vs control-ICR mice of male	模型组-C57BL/6J 雌性与对照组-C57BL/6J 雌性 Model-C57BL/6J mice of female vs control-C57BL/6J mice of female	模型组-C57BL/6J 雄性与对照组-C57BL/6J 雄性 Model-C57BL/6J mice of male vs control-C57BL/6J mice of male
力竭游泳 Exhaustive swimming	**	*	##	##
悬尾实验 Tail suspension	*	*	##	##
机械痛阈 Mechanical pain threshold	**	**	#	##
高架十字迷宫 OT% OT% of the elevated plus maze	/	*	/	#
高架十字迷宫 OE% OE% of the elevated plus maze	/	**	/	##

注:与对照组-ICR 相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与对照组-C57BL/6J 相比, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$。

Note. Compared with control-ICR, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with control-C57BL/6J, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

参考文献:

[1] HICKIE I, LLOYD A, WAKEFIELD D, et al. The psychiatric status of patients with the chronic fatigue syndrome [J]. Br J Psychiatry, 1990, 156: 534-540.

[2] FUKUDA K, STRAUS S E, HICKIE I, et al. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study [J]. Ann Intern Med, 1994, 121(12): 953-959.

[3] CHIA J K, CHIA A Y. Chronic fatigue syndrome is associated with chronic enterovirus infection of the stomach [J]. J Clin Pathol, 2008, 61(1): 43-48.

[4] URISMAN A, MOLINARO R J, FISCHER N, et al. Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant [J]. PLoS Pathog, 2006, 2(3): e25.

[5] LOEBEL M, STROHSCHEIN K, GIANNINI C, et al. Deficient EBV-specific B- and T-cell response in patients with chronic fatigue syndrome [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85387.

[6] LOMBARDI V C, RUSCETTI F W, DAS GUPTA J, et al. Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome [J]. Science, 2009, 326 (5952): 585-589.

[7] LANE R J, SOTERIOU B A, ZHANG H, et al. Enterovirus related metabolic myopathy: a postviral fatigue syndrome [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003, 74(10): 1382-1386.

[8] OBERSTE M S, PALLANSCH M A. Establishing evidence for enterovirus infection in chronic disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1005: 23-31.

[9] VERNON S D, SHUKLA S K, CONRADT J, et al. Analysis of 16S rRNA gene sequences and circulating cell-free DNA from plasma of chronic fatigue syndrome and non-fatigued subjects [J]. BMC Microbiol, 2002, 2: 39.

[10] SHEE C D. Phantom lymphadenopathy. An association with chronic fatigue syndrome [J]. Postgrad Med J, 2003, 79 (927): 59-60.

[11] SAJADIAN A, TABARRAEI A, SOLEIMANJAHI H, et al. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine [J]. Arch Virol, 2014, 159(8): 1951-1960.

[12] KATAFUCHI T, KONDO T, TAKE S, et al. Brain cytokines and the 5-HT system during poly I: C-induced fatigue [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1088: 230-237.

[13] CUNNINGHAM C, CAMPION S, TEELING J, et al. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I: C) [J]. Brain Behav Immun, 2007, 21 (4): 490-502.

[14] GIBNEY S M, MCGUINNESS B, PRENDERGAST C, et al. Poly I: C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression [J]. Brain Behav Immun, 2013, 28: 170-181.

[15] TRAYNOR T R, MAJDE J A, BOHNET S G, et al. Sleep and body temperature responses in an acute viral infection model are altered in interferon type I receptor-deficient mice [J]. Brain Behav Immun, 2006, 20(3): 290-299.

[16] CHATUPHONPRASERT W, RERMRAKSAKUL P, UDOMSUK L, et al. Different profiles of hepatic alkoxyresorufin O-dealkylase activities in small rodents [J]. J Appl Toxicol, 2012,

32(12): 1002-1007.
[17] POTHION S, BIZOT J C, TROVERO F, et al. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress [J]. Behav Brain Res, 2004, 155(1): 135-146.
[18] SUGIMOTO Y, KAJIWARA Y, HIRANO K, et al. Mouse strain differences in immobility and sensitivity to fluvoxamine and desipramine in the forced swimming test: analysis of serotonin and noradrenaline transporter binding [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 592(1/2/3): 116-122.
[19] WANG Q, WU H, ZHOU J, et al. Involvement of the central hypothalamic-pituitary-adrenal axis in hair growth and melanogenesis among different mouse strains [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0202955.
[20] NESHER E, PESKOV V, RYLOVA A, et al. Comparative analysis of the behavioral and biomolecular parameters of four mouse strains [J]. J Mol Neurosci, 2012, 46(2): 276-284.
[21] DAVID D J, RENARD C E, JOLLIET P, et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test [J]. Psychopharmacology, 2003, 166(4): 373-382.
[22] RIPOLL N, DAVID D J, DAILLY E, et al. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test [J]. Behav Brain Res, 2003, 143(2): 193-200.
[23] SCHMID Y, NAVARINI A, THOMAS Z M, et al. Sex differences in the pharmacology of itch therapies-a narrative review [J]. Curr Opin Pharmacol, 2019, 46: 122-142.
[24] HOLMES G P, KAPLAN J E, GANTZ N M, et al. Chronic fatigue syndrome: a working case definition [J]. Ann Intern Med, 1988, 108(3): 387-389.
[25] KATAFUCHI T, KONDO T, YASAKA T, et al. Prolonged effects of polyriboinosinic: polyribocytidylic acid on spontaneous running wheel activity and brain interferon-alpha mRNA in rats: a model for immunologically induced fatigue [J]. Neuroscience, 2003, 120(3): 837-845.
[26] YIN R, ZHANG K, LI Y, et al. Lipopolysaccharide-induced depression-like model in mice: meta-analysis and systematic evaluation [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1181973.
[27] YILMAZER-HANKE D M. Morphological correlates of emotional and cognitive behaviour: insights from studies on inbred and outbred rodent strains and their crosses [J]. Behav Pharmacol, 2008, 19(5/6): 403-434.
[28] ROLLNIK J D. Chronic fatigue syndrome: a critical review [J]. Fortschr Neurol Psychiatr, 2017, 85(2): 79-85.
[29] CLAYTON J A, COLLINS F S. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies [J]. Nature, 2014, 509(7500): 282-283.

〔收稿日期〕2024-03-15

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2024 年征订启事

《中国比较医学杂志》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。

屈金权,李佳佳,鲁洪男,等. 高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤肠道继发性通透性改变研究［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 34-42.
Qu JQ, Li JJ, Lu HN, et al. Study on changes to intestinal permeability secondary to firearm-related penetrating wound of pig abdominal intestine in cold environment at high altitudes［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 34-42.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.005

高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤肠道继发性通透性改变研究

屈金权[1],李佳佳[2],鲁洪男[3],杨欣悦[2],孙　赳[1],梁飞行[1],王　岩[4],刘江伟[2*]

(1.新疆军区总医院高原高寒医学保障重点实验室,乌鲁木齐　830000;2.新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室,乌鲁木齐　830000;3.新疆军区总医院临床检验中心,乌鲁木齐　830000;4.新疆公安厅特警总队训练基地,乌鲁木齐　830000)

【摘要】　目的　观察高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤后未直接损伤肠道继发性通透性改变及可能机制。**方法**　55 只实验猪分为高原寒冷组(HC)及平原常温组(LN)共 2 个大组,每个大组下按照观察时间点将分为 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 5 个实验亚组,HC 组下每个亚组 6 只实验猪,LN 组下每个亚组 5 只实验猪。按照分组时间点安乐死实验猪,取肠道组织,以 ELISA 法检测肠道组织匀浆炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的水平以及血液中肠道通透性标志蛋白二氨氧化酶(diarnine oxidse,DAO)、D-乳酸(D-lactate,D-LA)浓度;取 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 时间点实验猪肠道组织,使用 HE 染色后观察其肠道病理变化并评分,通过蛋白质印迹法(Western blot)检测肠道通透性相关的咬合蛋白(Occludin)、闭合小环蛋白 1(zonula occluden-1,ZO-1)、闭合蛋白 3(Claudin-3)与通道相关的 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4,TLR4)、核因子 κB(nuclear factor-κB,NF-κB)、肌球蛋白轻链激酶(myocin light chain kinase,MLCK)的含量。**结果**　HC 组与 LN 组伤后均导致了典型的腹部肠管贯通伤,腹腔感染评分及肠管粘连在两组间无明显差异($P>0.05$)。HC 组与 LN 组实验猪血清中 DAO、D-LA 随时间逐渐增加,HC 组 DAO、D-LA 在全部时间点均显著高于 LN 组($P<0.01$ 或 $P<0.001$),HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h 而 LN 组则为 8~24 h。HC 组肠道组织病理评分显著高于 LN 组实验猪($P<0.01$)。LN 组与 HC 组肠道组织炎症因子 TNF-α 和 IL-6 随时间均不断升高,HC 组炎症因子增加最明显的时间点为 4~8 h,LN 组为 8~24 h。HC 组实验猪肠道组织中的 IL-6、TNF-α 在全部时间中均高于 LN 组($P<0.05$、$P<0.01$ 或 $P<0.001$)。HC-8 h 组 Occludin 与 ZO-1 较 LN-8 h 时间点均下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 对比 LN-8 h 显著下降($P<0.001$)。HC-8 h 组 TLR4、NF-κB 与 MLCK 均高于 LN-8 h 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　高原寒冷环境会导致腹部肠管火器贯通伤后继发性肠道通透性增加,其机制可能与 TLR4/NF-κB/MLCK 通路的激活相关。

【关键词】　高原寒冷环境;腹部火器伤;肠道通透性;紧密连接
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0034-09

Study on changes to intestinal permeability secondary to firearm-related penetrating wound of pig abdominal intestine in cold environment at high altitudes

[基金项目]实验动物专项课题(SYDW[2017]11 号)。
[作者简介]屈金权(1995—),男,硕士研究生,研究方向:普外基础与临床。E-mail:scdzqjq@163.com
[通信作者]刘江伟(1970—),男,博士后,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:普外基础与临床及特殊环境医学研究。E-mail:ljw273273@163.com

QU Jinquan[1], LI Jiajia[2], LU Hongnan[3], YANG Xinyue[2], SUN Jiu[1], LIANG Feixing[1], WANG Yan[4], LIU Jiangwei[2]*
(1. Key Laboratory of High Altitude and Frigid Zone Medical Support, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000, China. 2. Key Laboratory of Special Environmental Medicine, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000. 3. Clinical Examination and Diagnostic Center, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000. 4. General Special Police Force Training Base of Xinjiang Public Security Department, Urumqi 830000)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the changes to, and possible mechanism of, intestinal permeability in pigs without direct injury after an abdominal- and intestinal-penetrating injury from firearms in cold environment at high altitudes. **Methods** Fifty-five experimental pigs were divided into two groups: high-altitude cold group (HC) and low-altitude normal temperature group (LN). According to the observation time, each group was divided into five experimental subgroups: 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h. There were six pigs in each HC subgroup and five pigs in each LN subgroup. After euthanasia, intestinal tissues were taken, and the levels of the inflammatory factors TNF-α, and IL-6 in intestinal homogenate and the concentrations of intestinal permeability-related proteins DAO and D-lactate acid in blood were detected by ELISA method. The intestinal tissues of experimental pigs were taken at 0 h and 8 h for LN and 8 h for HC, and intestinal pathological changes were observed and scored after HE staining. The concentrations of Occludin, ZO-1, Claudin-3, TLR4, NF-κB, and MLCK (proteins related to intestinal permeability) were detected by Western blot to explore the effect of a cold environment at high altitude on secondary intestinal permeability changes after injury and the possible mechanisms. **Results** Both the HC group and LN group experienced typical abdominal intestinal penetrating injuries, and there were no significant differences in their abdominal infection scores or intestinal adhesion ($P>0.05$). The levels of DAO and D-LA in the serum of experimental pigs in the HC and LN groups gradually increased over time. The levels of DAO and D-LA in the HC group were significantly higher than those in the LN group at all time points ($P<0.01$ or $P<0.001$). The fastest increase in DAO and D-LA in the HC group was 4 h to 8 h, while in the LN group, it was 8 h to 24 h. The pathological score of intestinal tissue in the HC group was significantly higher than that in the LN group of experimental pigs ($P<0.01$). The inflammatory factors TNF-α and IL-6 both increased over time in the intestinal tissue of LN and HC groups. The most significant time point for a increase of inflammatory factors in the HC group was 4 h to 8 h, while in the LN group, it was 8 h to 24 h. The intestinal tissue IL-6 and TNF-α levels of experimental pigs in the HC group were higher than those in the LN group the entire time ($P<0.05$, $P<0.01$, or $P<0.001$). The levels of occludin and ZO-1 in the HC group at 8 h decreased significantly compared to those of the LN group at the 8 h time point ($P<0.05$), while claudin-3 showed a significant decrease in LN ($P<0.001$). In the HC group, TLR4, NF-κB, and MLCK were both higher than those in the LN group at 8 h, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** A high-altitude cold environment can lead to a secondary increase in intestinal permeability after abdominal-penetrating firearm injury, and its mechanism may be related to the TLR4/NF-κB/MLCK pathway.

【**Keywords**】 cold environment at high altitudes; abdominal firearm injury; intestinal permeability; tight junction
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

腹部在火器伤受伤部位中占有很大比例[1],且死亡率高[2],肠道在腹腔中分布范围广,在火器伤中受到损伤的可能性最大[3]。高原环境恶劣的气候条件,落后的医疗及基础设施建设,都制约着火器伤的救治。在腹部肠管火器贯通伤后期确定性的手术救治过程中,腹部探查以及肠管切除再吻合是其治疗的主要方法,直接损伤的肠道因为部分组织已经坏死,一部分肠管将会被切除,其余未直接损伤的肠道将重建消化道,此时肠道的继发性损伤将是影响吻合部位以及机体恢复的重要因素[4]。然而高原低压缺氧环境对机体的影响是持续作用的,并不会因为机体脱离高原环境而快速停止。因此高原寒冷环境腹部火器伤后送至平原环境后继发性肠道的损伤情况,高原环境对火器伤后肠道屏障功能和通透性的影响及可能的机制研究则在后期的救治中至关重要。本研究在高原寒冷环境猪

肠管火器贯通伤模型建立的基础上通过检测血液中肠道通透性标志性蛋白、组织中炎症因子、肠道组织紧密连接(tight junction,TJ)蛋白以及损伤相关的通道蛋白,研究肠道通透性改变及可能的机制,为后期进一步救治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通清洁级长白猪 55 头,2~3 月龄,均系公猪,体重 30~35 kg,检疫合格证明(NO. 9001068323),购于新疆泰昆农牧科技有限责任公司(动物生产许可证号:新兵 B030101)。实验猪送达后于新疆军区总医院特殊环境医学重点实验室大型动物饲养间[SYXK(军)2017-0049]预饲养 4~7 d,将实验猪单笼饲养,按照自然光照条件,未进行饲养环境光暗处理,环境温度(26.3±3.6)℃,相对湿度(46±18)%。所有实验猪在适应性饲养期间不限食水,本实验方案获得新疆军区总医院动物伦理委员会批准(DWLL20190314),并符合动物福利 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

硫酸阿托品(天津金耀);盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞);猪 TNF-α ELISA 检测试剂盒(武汉菲恩);猪 IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉菲恩);猪 D-LA ELISA 试剂盒(上海科兴);猪 DAO ELISA 试剂盒(武汉菲恩);NF-κB p65 抗体(CST);MLCK 抗体(博奥森);TLR4 抗体(NOVUS);ZO-1 抗体(博奥森);Claudin-3 抗体(博奥森);Occludin 抗体(Abcam)。西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院);显微图像分析采集系统(Leica);酶标仪(Bio-Rad);Western blot 电泳、转膜设备(Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

按照随机数法将 55 头实验猪分为高原寒冷组(HC)及平原常温组(LN)共 2 个大组,每个大组下按照观察时间点将分为 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 5 个实验亚组,HC 组下每个亚组 6 头实验猪,LN 组下每个亚组 5 头实验猪。待实验猪预适应结束后,将 HC 组实验猪放置于西北特殊环境人工实验舱内,调节高度为 6000 m(大气压 47.33 kPa,空气氧分压为 9.87 kPa,温度 10 ℃),待实验舱达到相应高度后停留 48 h,出舱前 12 h 禁食,6 h 禁水,余下时间自由食水。高原暴露结束后将实验猪置于靶场,使用硫酸阿托品注射液+盐酸氯胺酮注射液对猪注射麻醉后,将其呈四肢体下垂悬吊于靶场,专业射手调教手枪后,距离实验猪约 2 m 的距离瞄准右侧腹部髂前上棘前方 3 cm,腹中线靠背侧 3 cm 交界处标记点射击完成造模。平原常温组除将实验猪放置于海拔 800 m(大气压 89.87 kPa,空气氧分压为 18.8 kPa,温度 25 ℃)48 h 外,按上述相同方法建模。

1.3.2 检测指标

记录实验猪体重、伤情及解剖情况,腹腔感染情况采用腹腔感染评分系统进行评分[5],使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒测定两组实验猪各时间点血清标本中 DAO、D-LA 含量以及肠道组织中 IL-6 与 TNF-α 的含量。使用回肠组织 HE 染色切片,两位专业病理医生分别观察切片并按肠道 Chiu's 六级评分标准打分,取均值,分值相差 2 分及以上者引入第 3 位病理医生观察并评分[6]。Western blot 法检测肠道组织 ZO-1、Claudin-3、Occludin 蛋白以及 TLR4、NF-κB 和 MLCK 蛋白的表达。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 25 统计软件进行数据处理,使用 Image J 进行 Western blot 图像分析,使用 Graph Pad Prism 8 进行绘图,符合正态分布的计量指标用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不符合正态分布的指标采用中位数±四分位间距表示 $M(QL,QU)$。组间比较用独立因素 T 检验,组内比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多重比较方差齐用 LSD-T 检验,方差不齐采用 Dunnett's $T3$ 检验,非正态分布资料采用非参数检验。检验水准 $\alpha=0.05$,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

HC 组暴露后体重为(28.344±1.712)kg,较进舱前(32.570±1.416)kg 显著降低($P<0.001$)。创伤后 HC 组与 LN 组实验猪在各时间点取材前均存活,解剖时均观察到有肠管贯通伤。两组腹腔感染情况均随时间增加而加重,表现为损伤部位肠管肿胀,腹腔内纤维膜覆盖,肠管表面出现白色米粒样结节,但两组各时间点间对比均无差异性($P>0.05$)。两组肠管均在 4 h 时间点开始出现肠管粘连,并随时间增加表现更加严重,表现为肠管与腹壁、肠系膜、肠管间粘连加重,两组各时间点间对比也均无差异性($P>0.05$)。详细见表 1。

2.2　血清 DAO、D-LA 检测结果

如图 1 所示两组实验猪肠道 DAO、D-LA 总体趋势均随时间而逐渐增加。HC 组实验猪血清中的 DAO、D-LA 在 2 h、4 h、8 h、24 h 时间点均显著高于 LN 组(P<0.01 或 P<0.001)。HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h,而 LN 组则为 8~24 h。

2.3　肠道炎症因子检测结果

如图 2 所示两组实验猪肠道炎症因子 IL-6、TNF-α 总体趋势均随时间而逐渐增加。在随时间点的变化趋势中,HC 组 IL-6、TNF-α 含量急剧升高,最早出现在 4~8 h 之间,而 LN 组出现这一现象的时间段为 8~24 h 之间。HC 组实验猪肠道组织中的 IL-6 在 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 时间点均显著高于 LN 组(P<0.01 或 P<0.001)。HC 组实验猪肠道组织中的 TNF-α 在 0 h、2 h、8 h、24 h 时间点对比 LN 组显著增高(P<0.01 或 P<0.001);在剩下的 4 h 时间点也高于 LN 组,差异具有统计学意义(P<0.05)。

2.4　肠道病理学评分

选择 LN 组 0 h 时间点(LN-0 h)、LN 组 8 h 时间点(LN-8 h)与 HC 组 8 h 时间点(HC-8 h)距子弹直接损伤部位 10 cm 肠道组织包埋切片后 HE 染色,进行观察评分。如图 3 所示,HC-8 h 平均病理评分为 3.83(3.55~3.90)对比 LN-0 h 平均病理评分的分值 0.00(0.02~0.24)与 LN-8 h 平均病理评分的分值 1.67(1.51~1.69)均显著增高(P<0.01)。

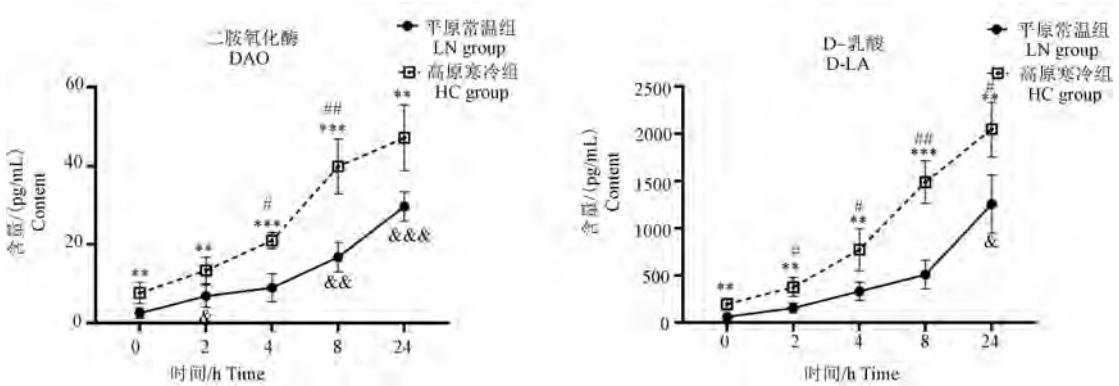
2.5　肠道通透性相关蛋白表达结果

如图 4 所示,肠道紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 与 Claudin-3 均表现出在 LN-0 h 组含量最高,LN-8 h 组次之,而 HC-8 h 组含量最少。HC-8 h 时间点实验猪的肠道通透性蛋白 Occludin 与 ZO-1 的相对表达

表 1　HC 与 LN 组实验猪伤后不同时间点腹腔感染及腹腔粘连情况
($\bar{x}\pm s$ 或 $M(QL,QU)$,LN=5 只/时间点,HC=6 只/时间点)

Table 1　Abdominal infection and adhesion of experimental pigs in HC and LN groups at different time points after injury
($\bar{x}\pm s$ or $M(QL,QU)$, LN=5 pigs / time point, HC=6 pigs / time point)

	分组 Groups	0 h	2 h	4 h	8 h	24 h
腹腔感染(评分) Abdominal infection (score)	LN	0.00(0.000~0.000)	1.00(1.000~2.000)	2.00(1.500~2.000)	3.00(2.500~3.000)	4.00(4.000~4.500)
	HC	0.00(0.000~0.000)	1.50(1.000~2.000)	2.00(1.750~2.000)	3.00(3.000~3.250)	4.00(4.000~4.250)
	Z	0.000	−0.316	−0.136	−1.354	−0.136
	P	1.000	0.752	0.892	0.176	0.892
腹腔粘连(n) Abdominal adhesions	LN	0.00(0.000~0.000)	0.00(0.000~0.500)	5.400±1.817	5.600±1.673	9.400±2.510
	HC	0.00(0.000~0.000)	0.00(0.000~1.000)	5.500±1.643	5.667±1.751	10.500±2.345
	Z/F	0.000	−0.471	−0.096	−0.064	−0.751
	P	1.000	0.637	0.926	0.950	0.472

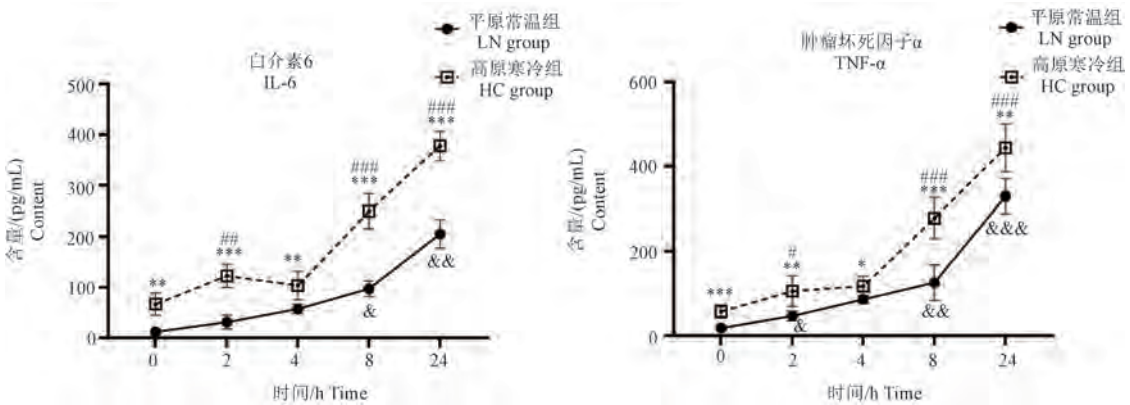


注:HC 组与同组前一时间点相比,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01;LN 组与同组前一时间点相比,$^{\&}P$<0.05,$^{\&\&}P$<0.01,$^{\&\&\&}P$<0.001;与相同时间 LN 组相比,$^{**}P$<0.01,$^{***}P$<0.001。

图 1　LN 组与 HC 组肠道通透性相关指标 DAO、D-LA 检测结果

Note. HC group compared with the previous time point in the same group, $^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01. LN group compared with the same group at the previous time point, $^{\&}P$<0.05, $^{\&\&}P$<0.01, $^{\&\&\&}P$<0.001. Compared with the LN group at the same time, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001.

Figure 1　Detection results of DAO and D-LA indicators related to intestinal permeability in LN group and HC group

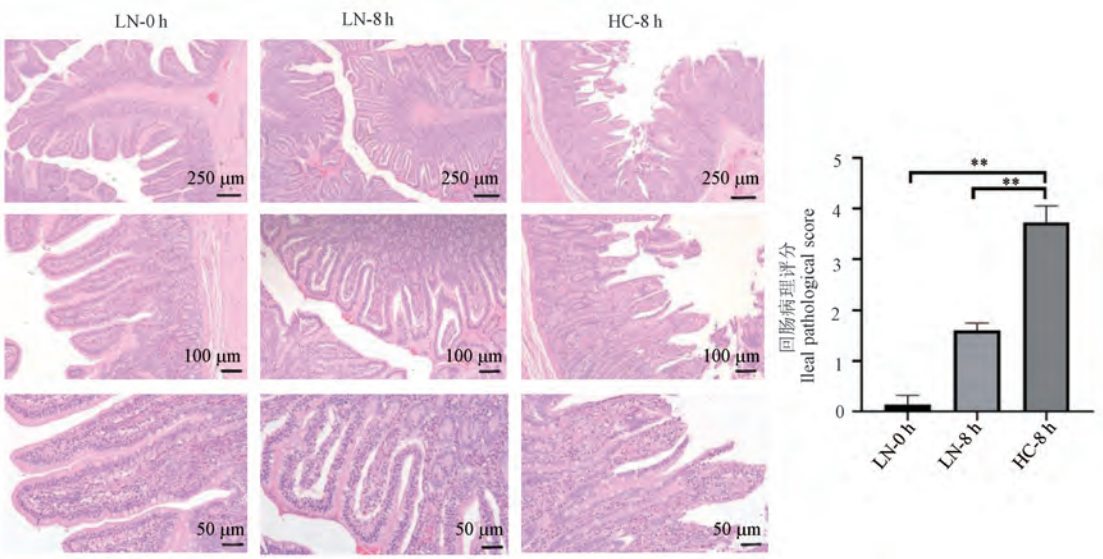


注:HC 组与同组前一时间点相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$;LN 组与同组前一时间点相比,$^{\&}P<0.05$,$^{\&\&}P<0.01$,$^{\&\&\&}P<0.001$;与相同时间 LN 组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图 2 LN 组与 HC 组伤后不同时间肠道组织炎症因子变化

Note. HC group compared with the previous time point in the same group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$. LN group compared with the same group at the previous time point, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$, $^{\&\&\&}P<0.001$. Compared with the LN group at the same time, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 2 Changes in inflammatory factors in intestinal tissue at different times after injury in LN and HC groups



注:与 HC-8 h 组相比,$^{**}P<0.01$。

图 3 LN 组与 HC 组回肠 HE 染色切片病理评分

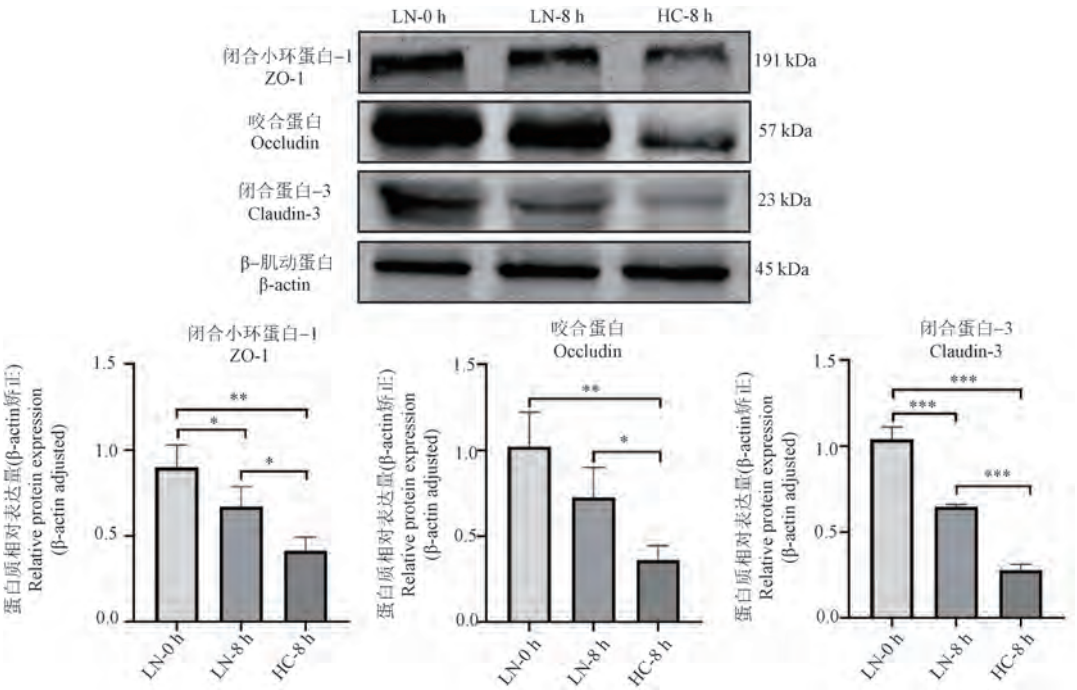
Note. Compared with the HC-8 h group, $^{**}P<0.01$.

Figure 3 Pathological scores of HE stained sections of ileum in LN group and HC group

量较 LN-8 h 时间点均下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 蛋白的相对表达量对比 LN-8 h 则是显著下降($P<0.001$)。HC-8 h 组对比 LN-0 h 组 Occludin、ZO-1 与 Claudin-3 的含量明显减少($P<0.01$)。LN-8 h 组相较于 LN-0 h 组,Occludin 含量降低但无统计学意义($P>0.05$),ZO-1 的差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 则是显著降低($P<0.001$)。

2.6 TLR4/NF-κB/MLCK 通道蛋白表达结果

如图 5 所示,TLR4/NF-κB/MLCK 通路蛋白在 HC-8 h 组表达量最高,LN-8 h 组次之,LN-0 h 表达量最低。HC-8 h 组实验猪的 TLR4、NF-κB 与 MLCK 的相对表达量均高于 LN-8 h 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。HC-8 h 组对比 LN-0 h 组 TLR4、NF-κB 与 MLCK 的含量显著增加($P<0.01$)。LN-8 h 组相较于 LN-0 h 组,TLR4、NF-κB 与 MLCK 的含量有

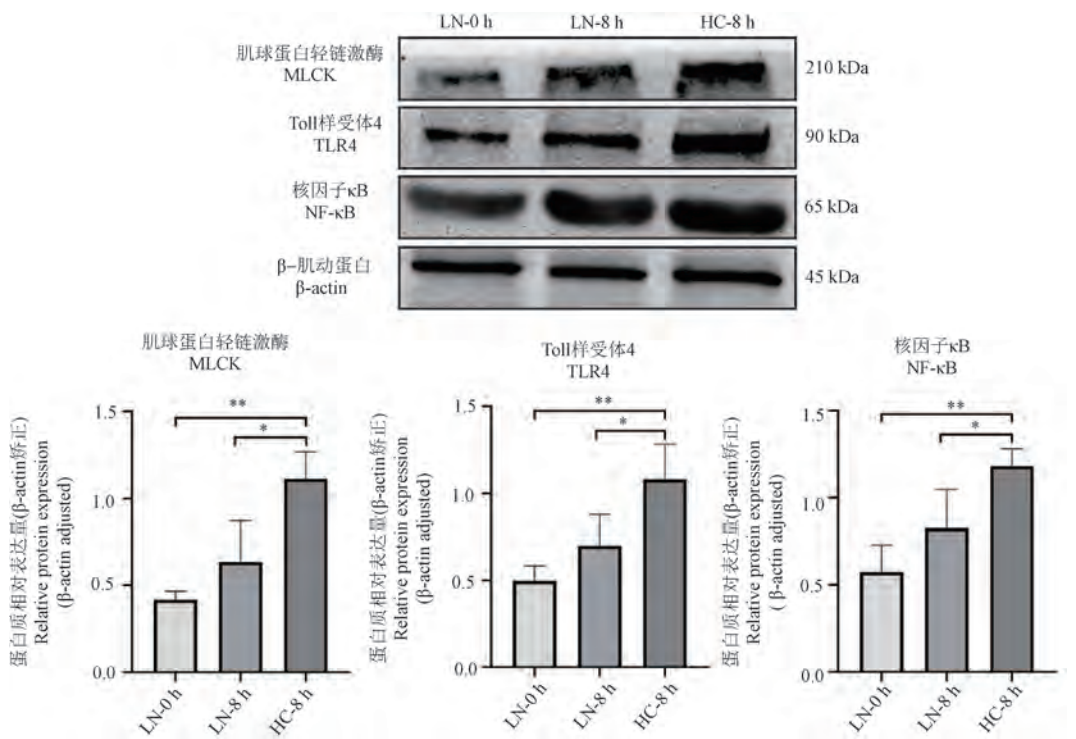


注：与 HC-8 h 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

图 4 LN 组与 HC 组肠道通透性相关蛋白表达结果

Note. Compared with the HC-8 h group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 4 Expression results of intestinal permeability related proteins in LN and HC groups



注：与 HC-8 h 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 5 LN 组与 HC 组肠道 TLR4/NF-κB/MLCK 通路蛋白表达结果

Note. Compared with the HC-8 h group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 5 Expression results of TLR4/NF-κB/MLCK pathway proteins in the intestine of LN and HC groups

所增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

高原环境对肠道屏障功能有损伤作用[7],其作用机制主要是高原缺氧会加重小肠微绒毛缺氧状态造成肠道上皮损伤,同时缺氧会导致产生一些缩血管物质,进一步导致肠道缺血、缺氧,加重肠道损伤,其次高原环境改变肠道内菌群结构也是导致肠道屏障功能受损的一大因素[8],而且高原环境也会诱导肠道炎症通路相关蛋白合成增加,导致肠道炎症因子大量释放加重肠道屏障功能损伤。机体各类型的损伤会通过应激反应造成肠道屏障功能损伤,同时机体的炎症反应产生的大量炎症因子也被证实会对肠道屏障功能造成损伤[9],同时高原缺氧环境会导致大脑部分功能抑制,两者共同作用使得实验猪在高原环境摄食减少,而且高原应激等损伤会导致机体消耗增加,使得实验猪体重显著下降。大量研究表明高原寒冷缺氧环境会导致细菌繁殖降低,感染时限延长,但我们研究发现高原环境中实验猪体温相比平原环境一直保持在高位[10],这也许是导致本实验中 HC 组与 LN 组在腹腔感染以及肠道粘连中无差异的原因之一。

二氨氧化酶(diarnine oxidse,DAO)主要存在于哺乳动物的绒毛顶端肠上皮细胞,主要在肠黏膜表达,通常血液中的 DAO 含量非常低[11],但当肠道上皮细胞受损时,其中的 D-LA 会释放到机体血液中,导致血中 DAO 含量增加[12]。大量研究表明,DAO 的含量反映了肠粘膜的完整性,以及肠道黏膜损伤和恢复情况[13]。在机体内,D-乳酸(D-lactate,D-LA)主要由胃肠道内的细菌代谢而产生,但哺乳动物没有可以代谢 D-LA 的酶[14],其无法通过正常的肠道上皮屏障,因此 D-LA 在正常机体血液中含量很少。但当肠道黏膜上皮细胞受损时,D-LA 会通过损伤的肠道屏障进入到循环血液中,导致血清 D-LA 水平升高[11,15]。在本实验中,无论是 LN 组还是 HC 组实验猪,其血清中的 DAO 和 D-LA 水平均随时间而增加,而且 HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h 而 LN 组则为 8~24 h。结果说明两组实验猪在伤后肠道通透性均不断增加。而 HC 组肠道通透性增最快的时间段为 4~8 h,LN 组为 8~12 h,说明高原环境暴露对机体的影响是持续的,即使脱离了缺氧环境,机体的损伤还是会更加严重,所以发生在高原环境的创伤即使脱离了高原环境仍要警惕损伤加重,而且相较于平原更加严重,同时损伤的峰值可能会提前出现,这与高原缺氧导致的炎症反应以及应激反应可能相关[16]。鉴于 HC 组 4~8 h 时间段肠道损伤加重最为明显,而 LN 组在 8~24 h 明显,因此我们选择了 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 时间点来进一步观察高原寒冷环境对火器伤后肠道的损伤与平原常温组的区别,也有利于进一步的机制研究。在对 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 的肠道病理观察与评分中,我们发现 HC-8 h 组的肠道病理评分要显著高于 LN-8 h 与 LN-0 h,而且在观察中发现 HC-8 h 的 6 头实验猪几乎都存在着多少不一的肠道上皮绒毛脱落,顶端基底层暴露,固有层血管扩张充血的情况。结果同样印证了高原寒冷环境会进一步加重火器伤后肠道的继发性损伤,导致血清中肠道通透性相关指标升高。

大量研究表明肠道组织紧密连接蛋白的表达与细胞间紧密连接结构和肠道屏障功能有着密不可分的联系[17]。细胞紧密连接相关蛋白主要由 Occludin、Claudin 家族以及 Jams 等跨膜蛋白构成,紧密连接相关蛋白与咬合蛋白家族和细胞骨架构成紧密连接复合体,组成紧密连接复合体的蛋白之间通过不同的调节机制共同调节肠道上皮的屏障功能[18]。有研究表明高原环境可导致肠道通透性增加,张方信等[19]观察到急进高原大鼠肠道中紧密连接蛋白相比平原地区表达减少,而且这种减少的趋势随着在高原停留时间的增加而加快。在本研究中,通过检测 LN-0 h、LN-8 h、HC-8 h 肠道组织中的 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的相对表达量,我们发现创伤后上述蛋白表达减少,这与 Katzenberger 等[20]和 Corson 等[21]所观察到的现象一致,而高原环境会进一步降低 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的表达,说明高原寒冷环境与创伤具有协同作用,两者将会进一步增加肠道的通透性。肠道中的紧密连接复合体相关蛋白的表达与分布受多种因素的影响,其中研究最多的就是炎症反应对该类蛋白的影响[22-23]。有相关细胞实验表明组织中炎症因子 TNF-α 增加会导致 Claudin 家族与 ZO-1 表达减少与分布异常[24]。在本次研究中通过对组织匀浆检测其中的炎症因子 TNF-α 与 IL-6,结果提示 HC 与 LN 组火器伤后 TNF-α、IL-6 均逐渐升高,而且在上升的趋势中,HC 组同样在 4~8 h 幅度最大,而 LN 组则为 8~24 h,这与肠道通透性标志蛋白表现一致。上述结果提示高原环境进一步降低

Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的表达可能与肠道组织中 TNF-α、IL-6 含量增加相关。

MLCK 是一种蛋白激酶,它通过磷酸化调节肌球蛋白轻链 MLC-2,诱导 ATP 供能的肌动蛋白-肌球蛋白收缩[25]。有研究发现 TNF-α 诱导的细胞骨架结构改变与 NF-κB 蛋白的激活有密切关系,TNF-α 通过 NF-κB 亚基引起 MLCK 转录启动子激活,诱导 MLCK 转录,最终导致 MLCK 蛋白表达增加[26]。MLCK 将进一步激活 MLC 蛋白轻链,使 MLC 结构发生变化,同时激活肌球蛋白头部的 ATP 酶,产生能量,使细胞骨架-肌动蛋白产生滑动,导致紧密连接的前肌动球蛋白环收缩和张力增加,引起 Occludin、Claudin 家族、ZO-1 等紧密连接蛋白和周围细胞骨架蛋白的重新分布,最终导致紧密连接结构改变,细胞旁路开放,导致肠粘膜通透性增加[27-28]。经典的炎症通路中,肠道中的 LPS 通过损伤的肠道上皮细胞以及上皮细胞旁通路进入内环境,作用于肠道组织细胞胞膜上的 TLR4 蛋白受体,TLR4 级联激活下游的 MYD88、NF-κB,激活的 NF-κB 进入细胞核进一步启动下游炎症因子 TNF-α、IL-6 的基因转录,从而产生大量的炎症因子 TNF-α、IL-6,而 TNF-α 进一步作用于该通路,形成炎症瀑布[29-31]。在本研究中,我们观察到肠道组织中的 TNF-α、IL-6 增加,同时发现火器伤后 LN-8 h 肠道组织中的 TLR4、NF-κB 以及 MLCK 均较 LN-0 h 升高,而 HC-8 h 较 LN-8 h 又进一步升高了,而 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白表达下降。因此我们推测高原寒冷环境通过 TLR4/NF-κB/MLCK 信号通路降低腹部肠管火器贯通伤后肠道组织 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 的蛋白的含量,进一步损伤肠道屏障功能。

综上所述,高原寒冷环境腹部肠管火器贯通伤可导致机体未直接损伤的肠道继发性通透性较平原腹部肠管火器贯通伤进一步增加,其机制可能与 TLR4/NF-κB/MLCK 信号通路的激活相关。

参考文献:

[1] VLČEK M, JAGANJAC E, NIEDOBA M, et al. Current treatment procedures for civilian gunshot wounds [J]. Rozhl Chir, 2018, 97(12): 558-562.

[2] MAGHAMI S, HENDRIX C, MATECKI M, et al. Comparison of the causes of death and wounding patterns in urban firearm-related violence and civilian public mass shooting events [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2020, 88(2): 310-313.

[3] 崔鸿斌, 张小培, 王秉钧. 142 例腹部火器伤的诊疗体会 [J]. 甘肃医药, 2010, 29(3): 285-288.
CUI H B, ZHANG X P, WANG B J. Diagnosis and treatment of 142 cases of abdominal firearm injury [J]. Gansu Med J, 2010, 29(3): 285-288.

[4] BERG R J, INABA K, OKOYE O, et al. The peril of thoracoabdominal firearm trauma: 984 civilian injuries reviewed [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 77(5): 684-691.

[5] 邵永胜, 张应天. 继发性腹膜炎的评分系统 [J]. 腹部外科, 2002, 15(3): 188-189.
SHAO Y S, ZHANG Y T. Scoring system of secondary peritonitis [J]. J Abdom Surg, 2002, 15(3): 188-189.

[6] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.

[7] MCKENNA Z J, BELLOVARY B N, DUCHARME J B, et al. Circulating markers of intestinal barrier injury and inflammation following exertion in hypobaric hypoxia [J]. Eur J Sport Sci, 2023, 23(10): 2002-2010.

[8] LIU D, GAO X, HUANG X, et al. Moderate altitude exposure impacts host fasting blood glucose and serum metabolome by regulation of the intestinal flora [J]. Sci Total Environ, 2023, 905: 167016.

[9] 胡琼源. 中性粒细胞胞外诱捕网在脓毒症及肠屏障功能中的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(10): 1084-1088.
HU Q Y. Progress research of neutrophil extracellular traps in sepsis and intestinal barrier function [J]. J Med Postgrad, 2019, 32(10): 1084-1088.

[10] 屈金权, 李佳佳, 杨欣悦, 等. 高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤后弹道细菌变化及药敏分析 [J]. 创伤外科杂志, 2024, 26(4): 247-255.
QU J Q, LI J J, YANG X Y, et al. Ballistic bacteria changes and drug sensitivity analysis after abdominal intestinal firearm pen-etrating wound in pig models exposed in simulated cold and high altitude environments [J]. J Trauma Surg, 2024, 26(4): 247-255.

[11] ZHANG Q, GAO X, WU J, et al. The correlation between endotoxin, D-lactate, and diamine oxidase with endoscopic activity in inflammatory bowel disease [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 9171436.

[12] LUK G D, VAUGHAN W P, BURKE P J, et al. Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine [J]. Cancer Res, 1981, 41(6): 2334-2337.

[13] D'AGOSTINO L, PIGNATA S, DANIELE B, et al. Postheparin plasma diamine oxidase values in the follow up of patients with small bowel Crohn's disease [J]. Gut, 1991, 32(8): 932-935.

[14] OUYANG J, YAN J, ZHOU X, et al. Relevance of biomarkers indicating gut damage and microbial translocation in people living

with HIV [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1173956.
[15] NIELSEN C, MORTENSEN F V, ERLANDSEN E J, et al. L- and D-lactate as biomarkers of arterial-induced intestinal ischemia: an experimental study in pigs [J]. Int J Surg, 2012, 10(6): 296-300.
[16] GAO Y, LONG Q, YANG H, et al. Transcriptomics and metabolomics study in mouse kidney of the molecular mechanism underlying energy metabolism response to hypoxic stress in highland areas [J]. Exp Ther Med, 2023, 26(5): 533.
[17] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(7): 417-432.
[18] OTANI T, FURUSE M. Tight junction structure and function revisited [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(10): 805-817.
[19] 张方信, 邓芝云, 李文祥, 等. 急进高原与平原大鼠肠黏膜屏障紧密连接蛋白 occludin 表达的对比研究 [J]. 西北国防医学杂志, 2013, 34(5): 401-403.
ZHANG F X, DENG Z Y, LI W X, et al. Expression of occludin protein in intestinal mucosa barrier in model rats of radical plateau and plain [J]. Med J Natl Defending Forces Northwest China, 2013, 34(5): 401-403.
[20] KATZENBERGER R J, GANETZKY B, WASSARMAN D A. The gut reaction to traumatic brain injury [J]. Fly, 2015, 9(2): 68-74.
[21] CORSON R J, PATERSON I S, O'DWYER S T, et al. Lower limb ischaemia and reperfusion alters gut permeability [J]. Eur J Vasc Surg, 1992, 6(2): 158-163.
[22] STEPHENS M, VON DER WEID P Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner [J]. Gut Microbes, 2020, 11(3): 421-432.
[23] ZHANG X, ZHANG Y, HE Y, et al. β-glucan protects against necrotizing enterocolitis in mice by inhibiting intestinal inflammation, improving the gut barrier, and modulating gut microbiota [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 14.
[24] TIAN Y, SHU R, LEI Y, et al. Somatostatin attenuates intestinal epithelial barrier injury during acute intestinal ischemia-reperfusion through Tollip/Myeloiddifferentiationfactor 88/Nuclear factor kappa-B signaling [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 5005-5020.
[25] KHAPCHAEV A Y, SHIRINSKY V P. Myosin light chain kinase MYLK1: anatomy, interactions, functions, and regulation [J]. Biochemistry, 2016, 81(13): 1676-1697.
[26] ZHONG J, YU R, ZHOU Q, et al. Naringenin prevents TNF-α-induced gut-vascular barrier disruption associated with inhibiting the NF-κB-mediated MLCK/p-MLC and NLRP3 pathways [J]. Food Funct, 2021, 12(6): 2715-2725.
[27] HE W Q, WANG J, SHENG J Y, et al. Contributions of myosin light chain kinase to regulation of epithelial paracellular permeability and mucosal homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 993.
[28] CHANEZ-PAREDES S D, ABTAHI S, ZHA J, et al. Mechanisms underlying distinct subcellular localization and regulation of epithelial long myosin light-chain kinase splice variants [J]. J Biol Chem, 2024, 300(2): 105643.
[29] KIM Y C, LEE S E, KIM S K, et al. Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(9): 907-916.
[30] LIU Y, ZHAO C, MENG J, et al. Galectin-3 regulates microglial activation and promotes inflammation through TLR4/MyD88/NF-κB in experimental autoimmune uveitis [J]. Clin Immunol, 2022, 236: 108939.
[31] 杨玲, 周素芳, 路月红, 等. 基于 LPS/TLR4 信号通路探讨酒精性肝病进展的相关机制 [J]. 医学研究生学报, 2022, 35(1): 35-40.
YANG L, ZHOU S F, LU Y H, et al. The exploration of the mechanism of progression in alcoholic liver disease based on LPS/TLR4 signaling pathway [J]. J Med Postgrad, 2022, 35(1): 35-40.

〔收稿日期〕2024-04-10

韩立华,赵晓茹,彭莉莉,等. 基于蛋白质组学技术探讨桦褐孔菌提取物治疗克罗恩病的作用机制［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 43-55.
Han LH, Zhao XR, Peng LL, et al. Study on the mechanism of *Inonotus obliquus* extract in treatment of Crohn's disease based on proteomics［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 43-55.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.006

基于蛋白质组学技术探讨桦褐孔菌提取物治疗克罗恩病的作用机制

韩立华,赵晓茹,彭莉莉,郝 渺,原红霞*

(山西中医药大学,中药与食品工程学院,基于炎性反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室,山西 晋中 030619)

【摘要】 目的 采用蛋白质组学技术研究桦褐孔菌提取物治疗克罗恩病的作用机制。**方法** 采用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导建立克罗恩病(Crohn's disease, CD)模型。48 只 SD 雄性大鼠,随机分为对照组、模型组、桦褐孔菌提取物低(200 mg/kg)、中(400 mg/kg)、高(800 mg/kg)剂量组和阳性对照组(美沙拉嗪,225 mg/kg)。药物干预 1 周后,进行疾病活动指数(DAI)评分和结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分;苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织病理变化;ELISA 检测大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 炎症因子水平。取对照组、模型组及桦褐孔菌提取物高剂量组的结肠组织,采用非标记蛋白质组学分析鉴定各组大鼠结肠组织中的蛋白,并对其进行生物信息学分析。最后采用 Western blot 和 RT-qPCR 对关键蛋白进行验证。**结果** 与模型组相比,桦褐孔菌提取物中、高剂量组的 DAI、CMDI 及 HE 染色评分显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其血清中炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量也显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。蛋白质组学显示,桦褐孔菌提取物高剂量组与模型组间有 199 个差异蛋白(DEPs),其中 63 个 DEPs 与 CD 相关,生物信息学结果显示 63 个 DEPs 要涉及 NOD 样受体信号通路、钙信号通路和坏死性凋亡等多条通路。Western blot 和 RT-qPCR 检测各组大鼠结肠组织中 Vdac1 和 Trpv2 的蛋白和 mRNA 水平,与蛋白质组学结果一致。**结论** 桦褐孔菌提取物可能通过干预 Vdac1、Trpv2 的表达,调节 NOD 样受体信号通路、钙信号通路和坏死性凋亡,从而达到治疗 CD 的效果。

【关键词】 桦褐孔菌提取物;关键蛋白;蛋白质组学;克罗恩病
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0043-13

Study on the mechanism of *Inonotus obliquus* extract in treatment of Crohn's disease based on proteomics

HAN Lihua, ZHAO Xiaoru, PENG Lili, HAO Miao, YUAN Hongxia*
(Shanxi Key Laboratory of Innovative Drug for the Treatment of Serious Diseases Basing on the Chronic Inflammation, College of Traditional Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *Inonotus obliquus* extract on Crohn's disease and its mechanism by proteomics technology. **Methods** Crohn's disease (CD) model was induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). A total of 48 SD male rats were randomized into control, model, *Inonotus obliquus* low-dose (200 mg/kg), medium-dose (400 mg/kg), high-dose (800 mg/kg) groups, and positive control group (mesalazine, 225 mg/kg). The

[基金项目]山西省中药管理研究项目(2022ZYYC094);山西省高校科技创新项目(2022L342);山西省医药科技创新带头人团队(2020TD02);中药化学学科建设经费(2024XKJS-25)。
[作者简介]韩立华(1996—),男,硕士研究生,研究方向:中药/天然药物化学研究。E-mail:1819853112@qq.com
[通信作者]原红霞(1982—),女,副教授,研究方向:中药/天然药物化学研究。E-mail:yuanhongxia609@163.com

disease activity index (DAI) score and the colonic mucosal injury index (CMDI) score were assessed after one week of drug intervention. HE staining was used to observe the histopathological changes in the colon, and ELISA was used to detect the levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the serum. Proteins were extracted from the colonic tissues of the control group, model group, and *Inonotus obliquus* high-dose group, and bioinformatics analysis was performed for the proteins identified by quantitative proteomics. Finally, Western blot and RT-qPCR were employed to verify the key proteins. **Results** Compared with the model group, the DAI, CMDI and HE staining scores were significantly decreased in the medium and high dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), as well as the levels of inflammatory factors IL-1β, IL-6 and TNF-α in serum ($P<0.05$ or $P<0.01$). Proteomic tests showed that there were 199 differentially expressed proteins (DEPs) between the *Inonotus obliquus* high-dose group and the model group, of which 63 DEPs were related to CD. Bioinformatics analysis showed that these 63 DEPs were mainly involved in NOD-like receptor signaling pathway, calcium signaling pathway, necroptosis, and other pathways. Consistent with proteomic result, expressions of Vdac1 and Trpv2 were confirmed by Western blot and RT-qPCR in colon tissue. **Conclusions** *Inonotus obliquus* extract may regulate NOD-like receptor signaling pathway, calcium signaling pathway, and necroptosis by interfering with the expression of Vdac1 and Trpv2, so as to achieve the effect of treating CD.

【**Keywords**】 *Inonotus obliquus* extract; key proteins; proteomics; Crohn's disease

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

克罗恩病(Crohn's disease,CD)是一种炎症性肠病(inflammatory bowel diseases,BD)[1],在肠道内主要表现为溃疡、黏膜水肿、管腔狭窄以及出现连续的炎症区域等,并伴随着一些并发症如疲劳、发烧、腹痛、体重减轻等[2]。近年来,CD 在我国的发病率快速增长,且发病人群偏年轻化,这将对我国人民健康、卫生系统和经济产生严重影响[3]。CD 的具体发病机制目前仍不完全明确,但当前主要认为与免疫和炎症水平的改变密切相关[4]。目前用于治疗 CD 的药物主要有糖皮质激素类、免疫制剂、氨基水杨酸类、生物制剂等,这些药物在控制病情方面疗效明显,但副作用大,停药易复发,不宜长期使用[5]。因此,寻找安全、有效的新药对于 CD 的治疗具有至关重要的意义。

桦褐孔菌又称白桦茸,属多孔菌科,是一种黑褐色植物寄生真菌,寄生于成熟桦树的树干上[6],主要分布在北美洲、亚洲和欧洲[7],在中国主要分布在黑龙江省和吉林省的长白山一带[8],山西吕梁地区也有栽培[9]。既往研究显示,桦褐孔菌乙酸乙酯提取物能明显降低结肠炎 UC 小鼠疾病活动指数评分,改善结肠组织局部损伤,抑制炎症表达[10];桦褐孔菌多糖对 AOM/DSS 诱导的结肠炎相关性结直肠癌模型小鼠具有防治作用[11]。目前关于桦褐孔菌治疗克罗恩病的相关研究较少。基于此,本研究采用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导建立 CD 模型,探讨桦褐孔菌提取物治疗 CD 的疗效;并通过运用非标记定量蛋白质组学技术获取桦褐孔菌提取物治疗 CD 的相关蛋白,通过生物信息学分析相关蛋白参与调控的信号通路,从分子水平上阐释桦褐孔菌提取物治疗 CD 的机制,为桦褐孔菌在炎症性肠病相关方面的深入研究奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

42~55 日龄健康 SPF 级雄性 SD 大鼠共 48 只,体重(230±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],于山西中医药大学动物房饲养[SYXK(晋)2020-0006],本实验经山西中医药大学实验动物伦理委员会批准(AWE202209151),在实验过程中按照动物实验使用的 3R 原则给于人文关怀。SD 大鼠适应性喂养 1 周后进行实验,在此期间严格按照饲养标准饲养,保证室内阳光充足,温度适宜,通风良好。

1.2 主要试剂与仪器

桦褐孔菌由大兴安岭森源山产品有限公司提供,将桦褐孔菌颗粒以 10 倍蒸馏水浸泡 3 h,加热过滤得到第一次滤液,向滤渣中再加入 10 倍蒸馏水,加热 1 h 后,收集滤液,合并滤液,于 60~70 ℃减压浓缩至原体积的 1/10,加入无水乙醇,4 ℃静置过夜,收集沉淀,冷冻干燥至粉末状得到桦褐孔菌提取物。

美沙拉嗪肠溶片由葵花药业集团佳木斯鹿灵制药有限公司生产,国药准字 H19980148,生产批号:211119;2,4,6-三硝基苯磺酸(美国 Sigma 公司,货号:2297);尿粪隐血测试盒(南京建成生物工程研究所有限公司,货号:C027-1-1);组织固定液

(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:G1101);HE 染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:G1005);IL-1β、IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒(上海泛柯生物科技有限公司,货号:F2923-A、F3066-B、F3056-A);BCA 蛋白定量试剂盒(博士德生物工程有限公司,货号:18J09A97);T-PER 裂解液(赛默飞世尔科技有限公司,货号:WE320059);二硫苏糖醇(DTT,美国 Sigma 公司,货号:51033321);碘乙酰胺(IAA,美国 Sigma 公司,货号:SLCL5599);质谱级胰酶(Promega 公司,货号:V511A);兔源 Vdac1、Trpv2 抗体(武汉三鹰技术生物有限公司,货号:55259-1-1AP、15991-1-AP);羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号:GB25303);RT-qPCR 相关试剂均购于宝日医生物技术(大连)有限公司(货号:RR8820A、RR047A)。

Orbitrap Exploris 240 高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);EASY-nLC 1200 纳升级超高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);-80 ℃超低温冰箱(新加坡艺思高科技有限公司);ME104E 电子天平(美国 Mettler Toledo 公司);CM3050 冰冻切片机(上海徕卡显微系统贸易有限公司);倒置显微镜(上海尼康仪器有限公司);化学发光荧光酶标仪(Molecular devices);高速冷冻离心机(Genespeed);超纯水仪(密理博中国有限公司);高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);ImageQuant LAS500 一体化成像仪(北京英木和生物技术有限公司);荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 桦褐孔菌提取物含量测定

取桦褐孔菌提取物粉末,采用苯酚-硫酸法测定其多糖的含量[12];采用间羟基联苯比色法测定其糖醛酸的含量[12];采用用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定其还原糖的含量[13];采用考马斯亮蓝法测定其总蛋白的含量[14];采用用福林-酚法测定其总酚的含量[15]。

1.3.2 动物分组、造模与给药

48 只 SD 大鼠,随机分为对照组、模型组、桦褐孔菌提取物各剂量组(200 mg/kg、400 mg/kg、800 mg/kg)、阳性对照组(美沙拉嗪,225 mg/kg),每组 8 只。SD 大鼠适应性喂养 1 周之后,大鼠禁食 24 h(期间不禁水),造模之前尽量排出粪便。麻醉大鼠后,用液体石蜡润滑灌胃针,灌胃针吸取适量 TNBS 溶液(60 mg/kg 的 5% TNBS 溶液与 0.25 mL 的 50%乙醇混合),缓慢注射入肛门中,注射完毕放回笼中。对照组相同条件下注射生理盐水。大鼠出现进食减少、腹泻、便血等现象,则表明造模成功。连续给药 1 周,对照组和模型组均采用等量的生理盐水灌胃。

1.3.3 大鼠行为学检测

每天记录大鼠的体重、毛色、饮水量、精神状态、便血情况等,采用疾病活动指数(DAI)评估大鼠疾病症状,DAI=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。DAI 的评分标准[16]为:体重下降分数的评分范围为 0~4,<1%为 0;1%~5%为 1;6%~10%为 2;11%~15%为 3;>15%为 4。大便性状分数的评分范围为 0~4,量少、硬、干、不黏、不散为 0;量少、硬、湿、黏为 1;量多、软、很黏为 2;量多、软、散为 3;稀便为 4。便血分数尿的评分范围为 0~4(粪隐血测定试剂盒进行检测),无颜色为 0;蓝色反应为点状为 1;持续蓝色为 2;深色大便潜血蓝色为 3;血便深蓝色为 4。DAI 越高表明肠炎症状越严重。

1.3.4 取材

末次给药后,对各组大鼠禁食 12 h(不禁水),将大鼠麻醉后,切开腹部,进行腹主动脉取血,离心,取上清,血清在-80 ℃保存。取出结肠,取 1 cm 结肠用组织固定液固定,进行后续的组织学染色检测,再取 1 cm 结肠,用 PBS 冲洗后分装置于-80 ℃保存,进行后续的蛋白质组学检测,将剩余的结肠纵向剪开,清洗后平铺,观察结肠组织损伤情况。

1.3.5 HE 染色和结肠黏膜损伤指数(CMDI)评价

将固定好的结肠用石蜡包埋,进行常规的病理切片,HE 染色后,在高倍显微镜下观察拍照。HE 染色对结肠评分的范围为 0~4,其标准[17]为:无症状为 0;炎症为轻度,病变在黏膜下层,基底有 1/3 的隐窝被破坏为 1;炎症为中度,病变在肌层,基底有 2/3 的隐窝被破坏为 2;炎症为重度,病变在浆膜层,仅有完整表面上皮为 3;炎症为重度,病变在浆膜层,全部隐窝和表面上皮被破坏为 4,分数越高表明结肠炎症越严重。CMDI 评分范围为 0~4,其标准[18]为:正常形态为 0;结肠壁轻度增厚但无充血为 1;结肠壁中度增厚并充血为 2;结肠壁明显增厚变硬并充血为 3;结肠壁明显增厚变硬、充血并粘连为 4,结肠粘膜损伤指数评分越高表明结肠炎症越严重。

1.3.6 ELISA 检测相关炎性因子

按照 ELISA 试剂盒的步骤对血清中 IL-1β、IL-

6、TNF-α 炎症因子进行检测。

1.3.7 蛋白质组学分析

(1)结肠组织蛋白样品预处理

称取适量结肠组织样品,加入适量 T-PER 裂解液,对蛋白样品进行提取,使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量,于-80 ℃储存备用。采用 FASP(filter-aided sample preparation)蛋白质酶解的方式进行酶解,对照组、模型组、桦褐孔菌提取物高剂量组蛋白各取 300 μg,依次加入 DTT、IAA 对蛋白进行还原和烷基化,加入胰酶对蛋白进行酶切,得到多肽。采用脱盐柱对多肽进行脱盐,多肽浓缩,于-20 ℃储存,用 0.1%的甲酸水溶解后进行后续检测。

(2)结肠组织蛋白样品质谱检测

采用 EASY-nLC 1200 HPLC 系统结合 Orbitrap Exploris 240 质谱仪进行样品的检测,液相色谱分析采用(ThermoFisher Scientific, USA) Acclaim PepMap™ RSLC 100 C_{18} 色谱柱(75 μm×25 cm,2 μm),设置流动相洗脱浓度。质谱分析采用 Orbitrap 质量分析器在数据依赖性(DDA)模式下采集图谱,分析时长为 130 min,一级质谱采用正离子模式检测,对其强度前 20 个离子峰进行二级质谱采集。

(3)结肠组织蛋白样品质谱数据分析及处理

采用 Proteome Discovery 2.5 对质谱的原始数据进行分析,选用 UniProt 的 rat.fasta 作为数据库[19]。设置检索参数对蛋白数据进行分析,数据库匹配鉴定到的蛋白标准:错误发现率(false discovery rate, FDR)<1%的蛋白。

1.3.8 生物信息学分析

对各组间的差异蛋白(DEPs)进行筛选,筛选的条件为:蛋白表达差异倍数 FC≥1.2 或 FC≤0.83 和 $P<0.05$,得到对照组与模型组和桦褐孔菌提取物组与模型组的差异蛋白,对得到的差异蛋白进一步做交集,得到共有的差异蛋白。将得到的差异蛋白通过 KOBAS 数据库(http://kobas.cbi.pku.edu.cn/)进行基因本体(Gene Ontology,GO)分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路富集分析,选择与 CD 疾病相关的关键通路和蛋白进行分析,将其导入 Cytoscape 3.9.0 软件作网络图。

1.3.9 Western blot 检测结肠组织中关键蛋白的表达水平

提取各组大鼠结肠组织蛋白,测定其浓度,制备 Western blot 蛋白样品。电泳使蛋白分离,各孔上样量为 30 μg,然后进行转模、封闭操作。将 Vdac1、Trpv2、β-actin 一抗稀释后,蛋白条带 4 ℃孵育过夜,清洗,用稀释的羊抗兔二抗室温孵育 2 h,清洗,使用一体化成像仪对蛋白条带显影。用 Image J 软件定量蛋白条带的灰度值,以 β-actin 为内参计算其相对表达量。

1.3.10 RT-qPCR 检测结肠组织中关键蛋白的 mRNA 水平表达

提取各组大鼠结肠组织的 RNA,测定其浓度。按照逆转录试剂盒说明书,将 RNA 样品逆转录成 cDNA,然后对 cDNA 进行扩增。对扩增的样品使用 PCR 仪检测,反应条件:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃点火、延伸 20 s,反应 40 个循环。各引物序列(5'-3')为:GAPDH(F:AGTGCCAGCCTCGTCTCATA,R:GATGGTGATGGGTTTCCCGT);Vdac1(F:ATGTGAATGATGGGACGGAGTTTG,R:CGACCTGATACTTGGCTGCTATTC);Trpv2(F:CCTGCTGGTCTACCTGGTCTTC,R:CCGTCACTGTGGAGTTGTTATCTTC)。得到 CT 值,以 GAPDH 为内参,采用通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算目的基因的表达量,实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 7.0.0 软件进行数据处理,数据结果均采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。$P<0.05$ 认为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 桦褐孔菌提取物含量分析

桦褐孔菌提取物的含量测定结果见表 1。结果显示,多糖含量约 19.10%;糖醛酸含量约 6.82%;还原糖含量约 14.61%;总蛋白含量约 7.98%;总酚含量约 12.31%。

2.2 桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠模型疾病活动指数(DAI)的影响

模型组与对照组相比,大鼠体重下降,毛发脏乱无光泽,饮食下降,反应迟缓,精神状态较差,粪便不成形且便血严重,其 DAI 显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,桦褐孔菌提取物低、中剂量组体重下降缓慢,毛发脏乱略有光泽,饮食情况有所好转,精神转态有所好转,粪便不成型,便血减轻,DAI 显著减低($P<0.05$)。桦褐孔菌提取物高剂量组和阳性对照组的体重有所增长,毛色有光泽,饮食正常,

精神状态良好,粪便成型且硬度适中,偶尔出现便血情况,DAI 显著降低($P<0.01$),见图 1。

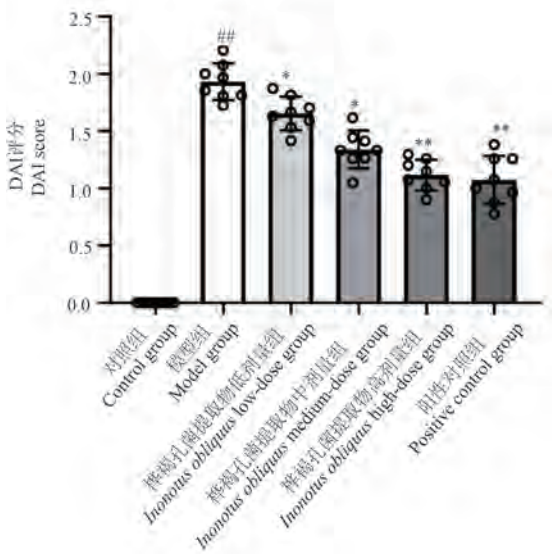
2.3　桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠模型结肠黏膜损伤指数(CMDI)的影响

模型组与对照组相比,结肠壁明显变硬变厚、充血水肿严重,并伴有大面积结肠组织溃疡和组织坏死的情况,周围组织有粘黏。与模型组相比,桦褐孔菌提取物低剂量组结肠组织损伤情况稍有好转,但无显著性差异;中剂量组结肠壁硬度及厚度适中、充血水肿减少,结肠组织的溃疡面积减少,组织坏死面积也相对减少,无组织粘黏情况,CMDI 显著降低($P<0.05$);高剂量组与阳性对照组的结肠壁较为正常,无充血,结肠溃疡面积和组织坏死面积得到了明显的修复,无组织粘黏的情况,CMDI 显著减低($P<0.01$),见图 2。

表 1　桦褐孔菌提取物主要成分测定结果

Table 1　Results of determination of the main components of *Inonotus obliquus* extracts

成分 Components	成分含量/% Component content
多糖 Polysaccharide	19.10 ± 0.67
糖醛酸 Uronic acid	6.82 ± 0.15
还原糖 Reducing sugar	14.61 ± 0.92
总蛋白 Total protein	7.98 ± 0.36
总酚 Total phenol	12.31 ± 0.28



注:与对照组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 1　桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠 DAI 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

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

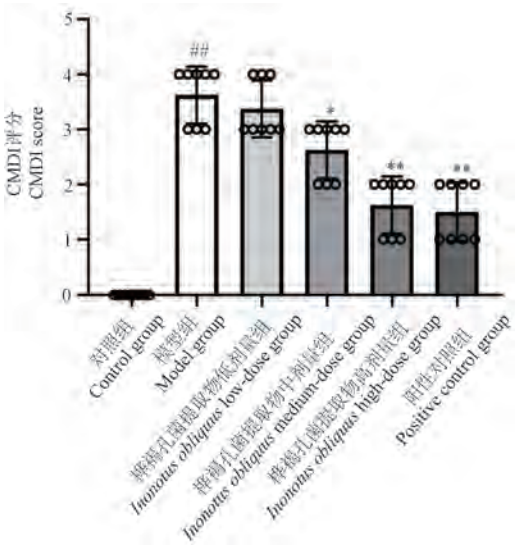
Figure 1　Effect of *Inonotus obliquus* extracts on DAI in CD rats

2.4　桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠模型 HE 染色评分的影响

模型组与对照组相比,炎症反应严重,结肠组织黏膜上皮大面积破坏,黏膜下皮有大量水肿,可见大量的炎症细胞浸润,固有层隐窝破坏严重,其 HE 评分显著提高($P<0.01$)。与模型组相比,桦褐孔菌提取物中剂量组炎症反应减轻,结肠组织黏膜上皮破坏面积减少,黏膜下层水肿面积减小,炎症细胞浸润减少,固有层隐窝破坏减少,其 HE 评分显著减低($P<0.05$);高剂量组与阳性对照组的炎症反应显著减少,结肠组织黏膜大部分完好,少量水肿和部分炎症细胞浸润,其 HE 评分均显著下降($P<0.01$),见图 3。

2.5　桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠模型血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 炎症因子的影响

模型组与对照组相比,SD 大鼠血清中的 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,桦褐孔菌提取物低剂量组血清中 TNF-α 的含



注:与对照组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 2　桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠结肠 CMDI 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

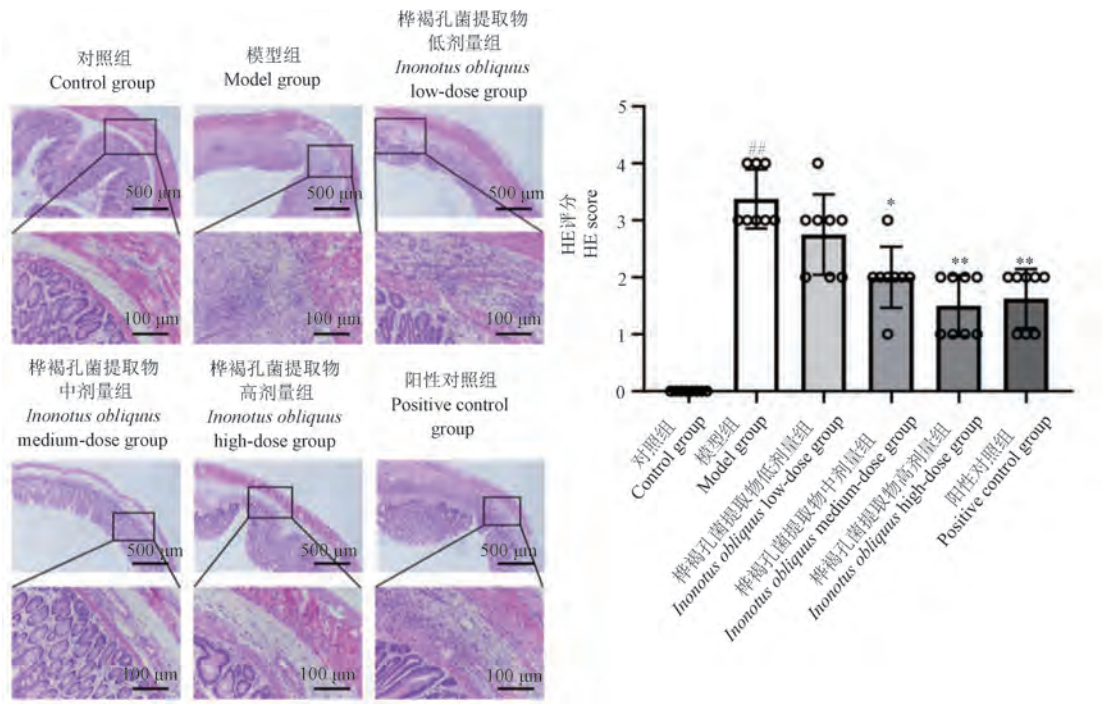
Note. Compared with control group, $^{\#\#}P<0.01$. Compared with model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2　Effects of *Inonotus obliquus* extracts on CMDI in CD rats

量降低($P<0.05$),而 IL-1β、IL-6 无明显变化;中、高剂量组和阳性对照组血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6 的含量显著减低($P<0.05$),见图 4。

2.6 蛋白质鉴定及质量控制

蛋白质组学结果共鉴定肽段数 44 201 条,蛋白质数量共有 7626 个,这些蛋白质中有 74.95% 的蛋白包含 2 条及以上的特异性肽段,肽段长度的分布可以体现酶切质量,本研究的结果表明,肽段长度主要分布在 7~24,说明酶切效率较好。蛋白质的相对分子质量主要分布在 1~150 kDa,占蛋白质总数的 93.27%,蛋白质覆盖度低于 40% 的占 84.55%,见图 5。结果表明得到蛋白质数据置信度较高。

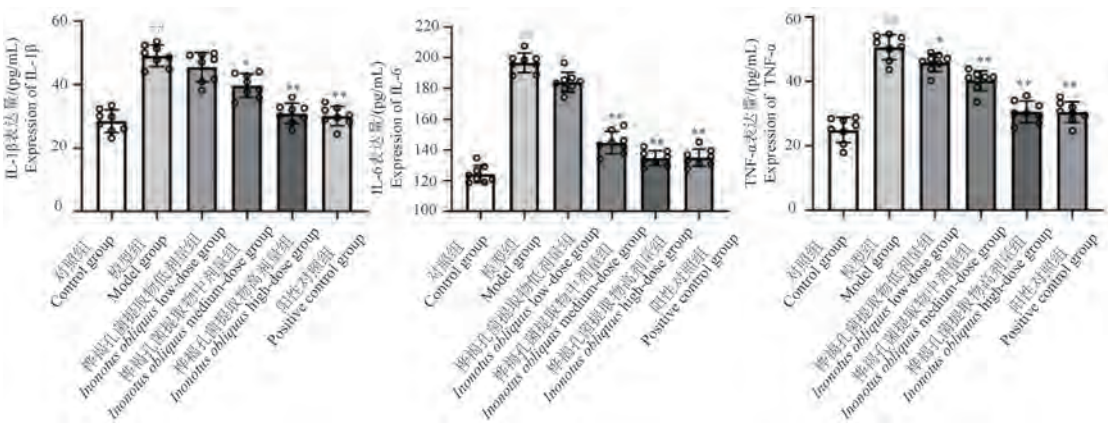


注:与对照组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 3 桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠 HE 染色及 HE 染色评分的影响($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

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

Figure 3 Effects of *Inonotus obliquus* extracts on HE staining and HE staining score in CD rats



注:与对照组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与模型组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 4 桦褐孔菌提取物对 CD 大鼠血清炎症因子含量的影响($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

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

Figure 4 Effect of *Inonotus obliquus* extracts on serum inflammatory factors in CD rats

2.7　各组肠组织差异蛋白(DEPs)的分析

对各组得到的蛋白质进行筛选,筛选条件为:FC≥1.2 或 FC≤0.83,P<0.05。与模型组相比,桦褐孔菌提取物高剂量组肠组织共有 199 个 DEPs,其中上调的 DEPs 有 66 个,下调的 DEPs 有 133 个,见图 6A;与模型组相比,对照组肠组织共有 204 个 DEPs,其中上调的 DEPs 有 78 个,下调的 DEPs 有 126 个,见图 6B。将桦褐孔菌提取物组与模型组的 DEPs 与对照组与模型组的 DEPs 做交集,共得到 71 个 DEPs,其中有 63 个 DEPs 有回调的趋势,13 个 DEPs 造模后表达降低,桦褐孔菌提取物干预后显著上调;50 个 DEPs 造模后表达升高,桦褐孔菌提取物干预后显著下调,见图 6C。对 63 个 DEPs 进行层次聚类分析,63 个 DEPs 在对照组与桦褐孔菌提取物高剂量组表达基本一致,且与模型组可以分开,见图 6D。由于这 63 个 DEPs 在 TNBS 造模和桦褐孔菌提取物治疗前后均发生了显著变化,这 63 个 DEPs 可能与桦褐孔菌提取物治疗 CD 的作用机制相关。

2.8　GO 功能富集分析

交集得到的 63 个 DEPs 进行 GO 功能富集分析,结果见图 7,共得到 789 条 GO 富集条目,其中生物过程(biological process,BP)有 329 条、细胞组分(cell component,CC)有 227 条、分子功能(molecular function,MF)233 有条。按照 P 值大小进行排序,分别对前 10 条富集条目进行作图,见图 7。在 BP 方面:病毒的反应、病毒基因组复制的负调控、核糖核酸酶活性的调节、对细菌的反应、对有机环化合物的反应、对过氧化氢的反应、细胞氧化解毒等;在 CC 方面:血红蛋白-结合珠蛋白复合物、细胞外空间、细胞质、膜筏、线粒体外膜、胞质、胞质核糖体等;在 MF 方面:相同的蛋白质结合、蛋白结合、2'-5'-低聚腺苷酸合成酶活性、孔蛋白活性、双链 RNA 结合、内肽酶抑制剂活性、蛋白同型二聚化活性等。

2.9　KEGG 通路富集分析

对交集得到的 63 个 DEPs 进行 KEGG 通路富集分析,结果见图 8,共得到 97 条通路富集条,按照 P 值大小进行排序,主要对前 20 条进行做图,见图

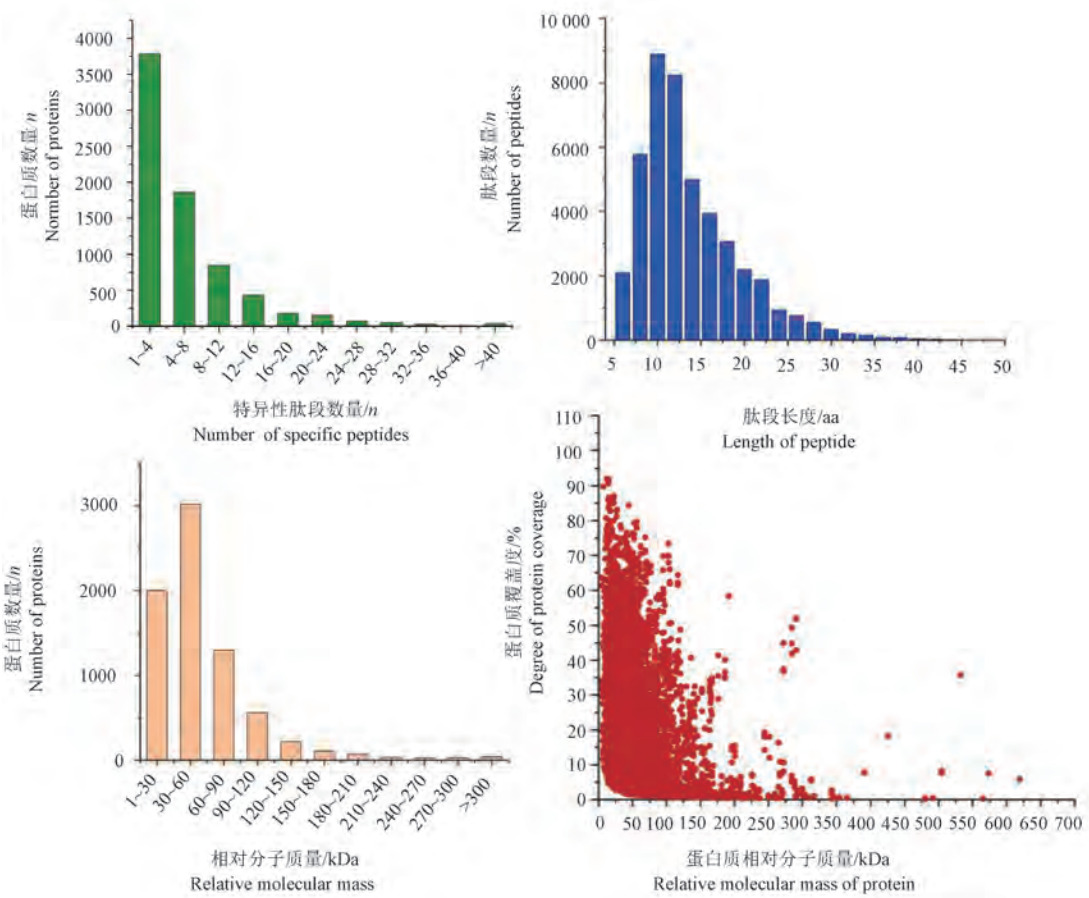
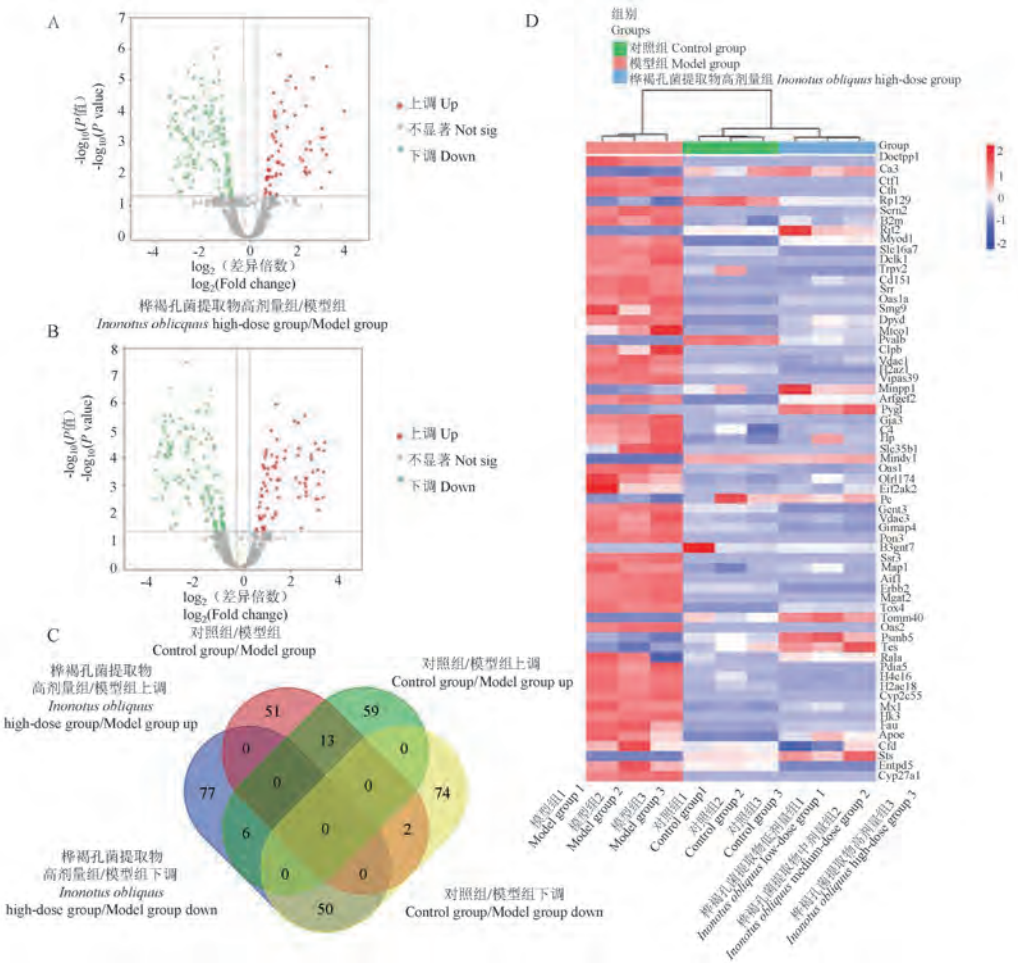


图 5　蛋白质组学数据的质量控制

Figure 5　Quality control of proteomic data



注:A:桦褐孔菌提取物组与模型组火山图;B:对照组与模型组火山图 ;C:韦恩图;D:聚类分析。

图 6 各组肠组织蛋白质中差异蛋白(DEPs)分析

Note. A, Volcano plot of the *Inonotus obliquus* group and model group. B, Volcano plot of control group and model group. C, Venn Diagram. D, Clustering analysis.

Figure 6 Analysis of differential proteins (DEPs) in intestinal tissues of each group

8。交集得到的 DEPs 主要在代谢途径、胆固醇代谢、补体和凝血级联、NOD 样受体信号通路、非洲锥虫病、嘧啶代谢、坏死性凋亡、甲型流感、EB 病毒感染、淀粉和蔗糖代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢等。

2.10 桦褐孔菌-关键蛋白-关键通路网络分析

根据 GO 注释分析和 KEGG 通路富集分析的结果发现,63 个 DEPs 与 NOD 样受体信号通路、钙信号通路和坏死性凋亡等多条通路有关。结合文献的查询,选择与 CD 炎症相关的信号通路,做桦褐孔菌-关键蛋白-关键通路网络图,见图 9。桦褐孔菌提取物可能通过干预线粒体外膜通道蛋白 1(voltage-dependent anion-selective channel protein 1, Vdac1)、瞬时受体电位香草样蛋白 2(transient receptor potential cation channel subfamily V, Trpv2)和 2'-5'-寡腺苷酸合酶 1a(2'-5'-oligoadenylate synthase 1a, Oas1a)等 10 个关键蛋白的表达,调节与炎症相关的信号通路来治疗 CD。

2.11 Western blot 验证 Vdac1、Trpv2 的蛋白表达水平

选择桦褐孔菌提取物干预的 10 个关键蛋白中与 CD 信号通路密切相关的 Vdac1 和 Trpv2 进行验证,结果见图 10。与对照组相比,模型组的 Vdac1 和 Trpv2 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比,桦褐孔菌提取物干预后,Vdac1 和 Trpv2 蛋白表达水平显著减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),该结果与蛋白质组学的结果一致。

2.12 RT-qPCR 验证 Vdac1、Trpv2 的 mRNA 表达水平

对各组结肠组织中 Vdac1、Trpv2 的 mRNA 水平

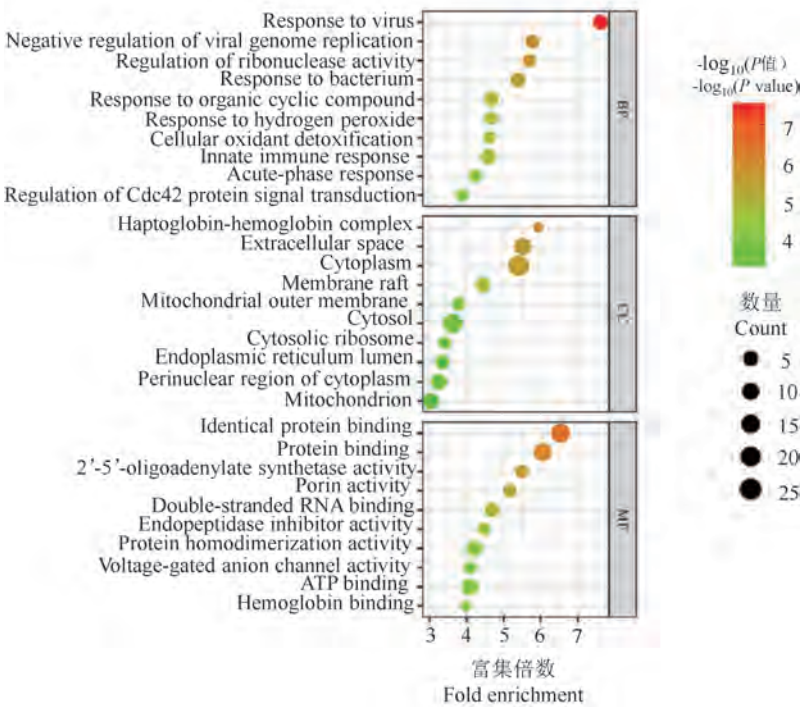


图 7　GO 功能富集分析

Figure 7　GO functional enrichment analysis

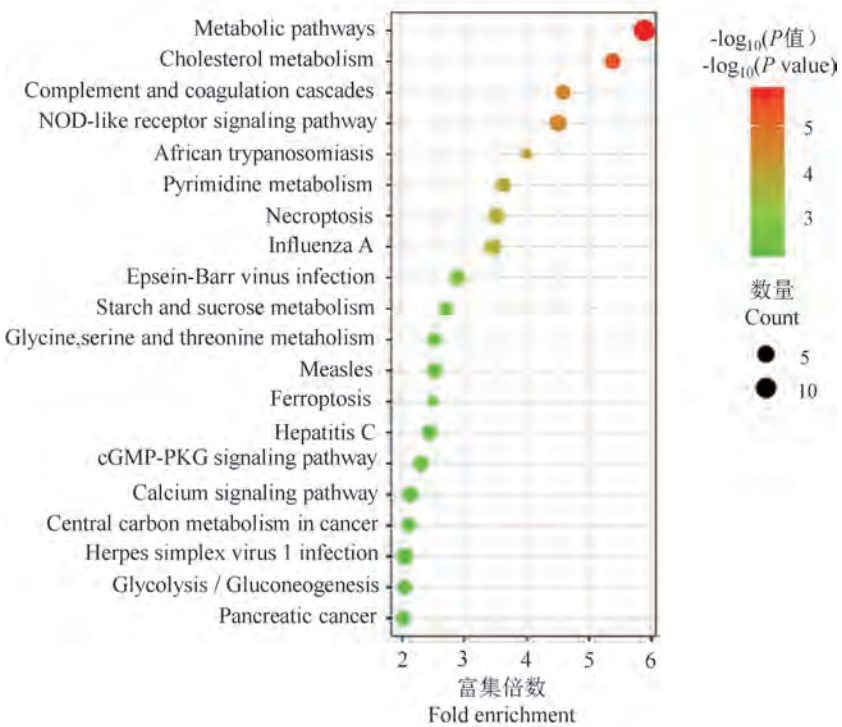


图 8　KEGG 通路富集分析

Figure 8　Enrichment analysis of KEGG pathway

进行检测，结果见图 11。对照组相比，模型组的 Vdac1、Trpv2 mRNA 水平显著升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；与模型组相比，桦褐孔菌提取物干预后，Vdac1、Trpv2 的 mRNA 水平显著降低（$P<0.05$）。进一步验证蛋白质组学的结果，表明桦褐孔菌提取物治疗 CD 与 Vdac1、Trpv2 有关。

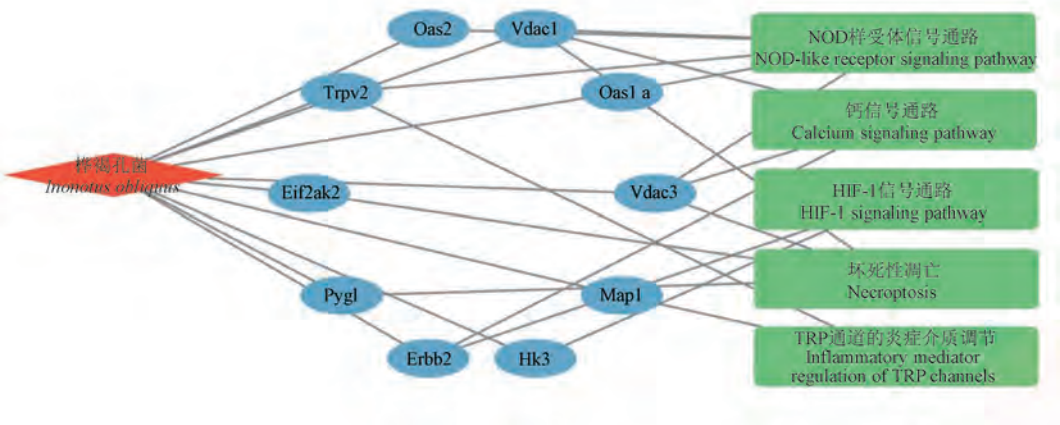
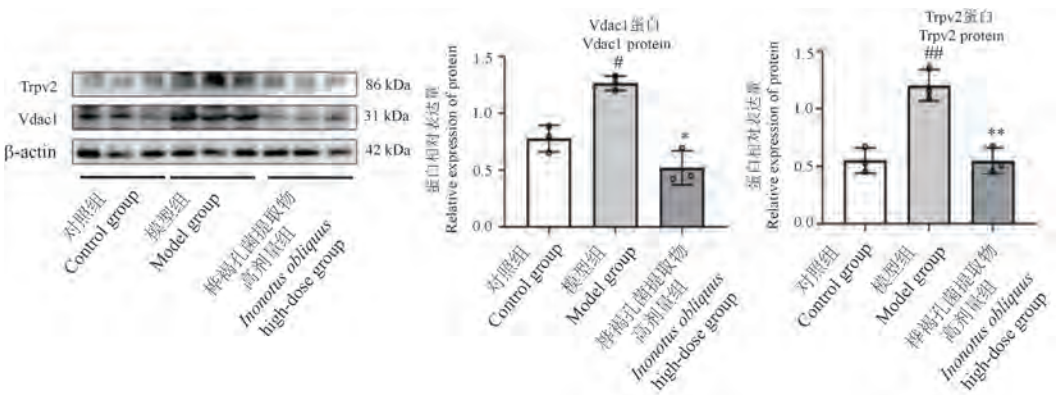


图 9 桦褐孔菌-关键蛋白-关键通路网络图

Figure 9 *Inonotus obliquus*-key protein-key pathway network diagram

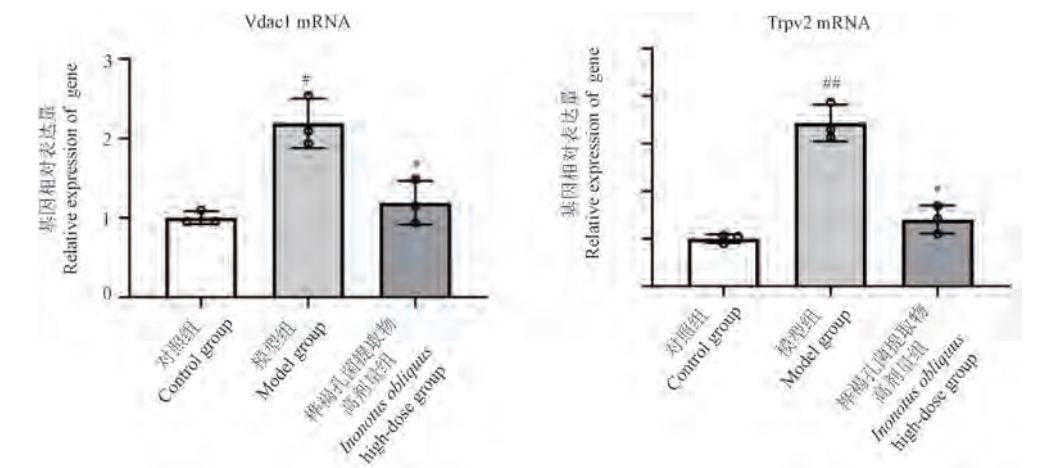


注：与对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 10 Western blot 检测 Vdac1 和 Trpv2 蛋白水平的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

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

Figure 10 Expression levels of Vdac1 and Trpv2 proteins were detected by Western blot



注：与对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组相比，$^{*}P<0.05$。

图 11 RT-qPCR 检测 Vdac1、Trpv2 mRNA 水平的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

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

Figure 11 mRNA levels of Vdac1 and Trpv2 were detected by RT-qPCR

3 讨论

克罗恩病是一种慢性炎症性肠道疾病,其特征是慢性、复发性炎症,其炎症累积可遍及整个肠道[20]。在全世界范围内 CD 的发病率均有上升的趋势,但亚洲的发病率低于西方国家,在中国其患病率为 4∶100 000,且还在增加[21]。目前,对于 CD 的治疗并没有较好的药物,一般用美沙拉嗪来治疗 CD,但对于 CD 的复发其效果较差[22];相关抗生素主要被用于治疗 CD 的脓毒症,如氟喹诺酮类药物,此类药物会产生肌腱炎、肌腱断裂、抑制儿童软骨生长等副作用[23];抗 TNF-α 药物被认为是治疗 CD 较为安全的药物,但伴随着感染、恶性肿瘤、代谢和免疫紊乱等不良反应[24]。因此,对治疗 CD 的药物开发具有重大意义,本研究采用桦褐孔菌来作为研究对象,研究桦褐孔菌提取物对 TNBS 诱导大鼠 CD 的作用机制。

本次实验结果表明,桦褐孔菌提取物治疗可显著减低 DAI、CMDI、HE 染色评分,及其相关的炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的含量也均显著降低,说明桦褐孔菌提取物显著缓解了 TNBS 诱导大鼠 CD 的炎症。基于蛋白质组学的鉴定及分析共得到肠组织的蛋白有 7626 个,通过桦褐孔菌提取物组与模型组的差异蛋白与对照组与模型组的差异蛋白做交集,共得到桦褐孔菌提取物治疗 CD 的相关蛋白有 63 个。通过生物信息学分析表明桦褐孔菌提取物可能通过干预 Vdac1、Trpv2、Oas1a 等 10 个关键蛋白的表达,来调控与 CD 炎症相关的钙信号通路、NOD 样受体信号通路和坏死性凋亡等多条信号通路[25-27]。选择与 CD 炎症密切相关的 Vdac1 和 Trpv2 进行验证,Western blot 和 RT-qPCR 实验结果表明桦褐孔菌提取物可通过抑制 Vdac1、Trpv2 的表达,达到治疗 CD 的效果。

Vdac1 属于 Vdac 家族成员,Vdac 位于线粒体外膜中,是线粒体进出代谢物的守门员,Vdac 参与 ATP 调节、Ca^{2+} 运输、细胞凋亡等细胞功能[28]。Vdac1 是一种多功能蛋白,可以与 100 多种蛋白质相互作用,主要参与细胞死亡途径和调节线粒体功能[29]。Vdac1 与炎症小体的激活有关,其可通过激活 Nlrp3 的表达来调节炎症,其具体机制是 Vdac1 寡聚体在 Nlrp3 炎症小体复合物形成的初始阶段充当对接位点,进而达到促炎作用[30]。Vdac1 可以调节线粒体促凋亡蛋白,将其从膜间隙中释放到细胞质中,也可以通过与细胞凋亡蛋白相互作用来调节细胞凋亡,从而导致炎症的发生[31]。研究表明,在 IBD 患者的结肠中 Vdac1 过表达,使得 Ca^{2+} 数量增加,从而诱导 Nlrp3 的激活,导致促炎反应[32]。本实验发现,模型组与对照组相比,Vdac1 的蛋白和 mRNA 水平显著升高,桦褐孔菌提取物显著降低了模型组中 Vdac1 的表达,推测桦褐孔菌提取物可能通过影响 Vdac1 的表达,从而抑制炎症小体 Nlrp3 的表达,来发挥其抑制炎症的作用。

Trpv2 属于 Trpv 家族成员,参与多种细胞功能,是一种钙通透性的非选择性阳离子通道,可触发多种生理功能[33]。Trpv2 主要在单核细胞和巨噬细胞中表达,参与了巨噬细胞的迁移、原酶激活、免疫球蛋白 G 和补体介导的吞噬,这些过程对炎症反应至关重要。Trpv2 还介导了脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞 TNF-α 和 IL-6 的产生。在肥大细胞中,Trpv2 的激活允许细胞内 Ca^{2+} 通量,这一过程刺激蛋白激酶 A(PKA)依赖性脱颗粒,从而促进炎症因子的释放[34]。研究表明,在 TNBS 诱导的结肠炎大鼠模型中,其结肠中 Trpv2 的表达显著升高,Trpv2 抑制剂缓解了 TNBS 诱导结肠炎大鼠的炎症[35];与野生型结肠炎小鼠相比,Trpv2 缺陷的结肠炎小鼠,其结肠的炎症程度较低及结肠粘膜的浸润减少[36]。本实验发现,与对照组相比,模型组大鼠的 Trpv2 蛋白和 mRNA 水平显著升高,桦褐孔菌提取物显著降低了 Trpv2 表达,说明桦褐孔菌提取物可通过降低 Trpv2 的表达,来缓解 CD 的炎症。

综上所述,本研究通过建立 TNBS 诱导的 CD 模型,探讨了桦褐孔菌提取物治疗 CD 的疗效及作用机制。研究发现桦褐孔菌提取物缓解了 CD 的肠道炎症,并降低了血液中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 炎症因子的表达水平,其作用机制可能是桦褐孔菌提取物通过抑制 Vdac1、Trpv2 的表达,阻止 Ca^{2+} 通路的信号传导,调控 NOD 样受体信号通路等生物过程,发挥抗炎等药理作用。后续仍需针对这些关键蛋白及其作用机制进行深入研究,以进一步明确桦褐孔菌提取物治疗 CD 的具体作用机制。

参考文献:

[1] 侯晓婷, 孟欢, 薛佳辰, 等. 关于炎症性肠病发病机制的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 138-148.
HOU X T, MENG H, XUE J C, et al. Research progress in the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 138-148.

[2] CUSHING K, HIGGINS P D R. Management of crohn disease: a review [J]. JAMA, 2021, 325(1): 69-80.

[3] 周吴平, 穆楠, 简伟研, 等. 克罗恩病患者疾病经济负担现状与相关因素 [J]. 北京大学学报(医学版), 2021, 53(3): 555-559.
ZHOU W P, MU N, JIAN W Y, et al. Economic burden and factors associated with Crohn's disease [J]. J Peking Univ Health Sci, 2021, 53(3): 555-559.

[4] PETAGNA L, ANTONELLI A, GANINI C, et al. Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence [J]. Biol Direct, 2020, 15(1): 23.

[5] DOLINGER M, TORRES J, VERMEIRE S. Crohn's disease [J]. Lancet, 2024, 403(10432): 1177-1191.

[6] CUI Y, KIM D S, PARK K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1/2): 79-85.

[7] SZYCHOWSKI K A, SKÓRA B, POMIANEK T, et al. *Inonotus obliquus*-from folk medicine to clinical use [J]. J Tradit Complement Med, 2021, 11(4): 293-302.

[8] 曾文丽, 罗美琪, 陈玉, 等. 桦褐孔菌化学成分研究 [J]. 绿色科技, 2023, 25(12): 264-270.
ZENG W L, LUO M Q, CHEN Y, et al. Studies on chemical constituents of *Inonotus obliquus* [J]. J Green Sci Technol, 2023, 25(12): 264-270.

[9] 李艳婷, 徐莉娜, 郭霄飞, 等. 山西桦褐孔菌的鉴定与固态发酵初步研究 [J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 555-561.
LI Y T, XU L N, GUO X F, et al. Preliminary study on identification and solid-state fermentation of Shanxi *Inonotus obliquus* [J]. Southwest China J Agric Sci, 2020, 33(3): 555-561.

[10] 肖昆, 林佩, 林军. 桦褐孔菌乙酸乙酯提取物抗溃疡性结肠炎机制 [J]. 食用菌学报, 2021, 28(5): 37-46.
XIAO K, LIN P, LIN J. The mechanism of *Inonotus obliquus* ethyl acetate extract against ulcerative colitis [J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(5): 37-46.

[11] 曲超. 桦褐孔菌多糖对 AOM/DSS 诱导的结肠炎相关结直肠癌模型小鼠的影响及其机制的初步探讨 [D]. 延吉: 延边大学, 2019.
QU C. Effect of *Inonotus obliquus* polysaccharide on AOM/DSS-induced colitis-related colorectal cancer model mice and its mechanism [D]. Yanji: Yanbian University, 2019.

[12] 魏霞, 王星星, 方勤勤, 等. 基于肠道菌群探究一贯煎多糖的结构及改善小鼠肝纤维化作用 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1110-1123.
WEI X, WANG X X, FANG Q Q, et al. Exploration on structure and anti-liver fibrosis effect in mice of Yiguan Decoction polysaccharides based on gut microbiota [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(4): 1110-1123.

[13] 吴迪, 王旭升, 于特, 等. β-葡聚糖酶降解黑木耳多糖工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(6): 130-135.
WU D, WANG X S, YU T, et al. Optimization of β-glucanase degradation of *Auricularia auricula* polysaccharides [J]. Food Res Dev, 2022, 43(6): 130-135.

[14] 杨敏. 桦褐孔菌水提物对人肝癌细胞 HepG2 抑制作用的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2019.
YANG M. Inhibitory effect of *Inonotus obliquus* water extract on human hepatocellular carcinoma cell HepG2 [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2019.

[15] 高志远, 胡亚亚, 韩美坤, 等. 甘薯块根多酚高效测定技术优化与应用 [J]. 中国粮油学报, 2021, 36(11): 49-56.
GAO Z Y, HU Y Y, HAN M K, et al. Optimization and application of efficient determination technique for polyphenol in sweet potato tubers [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2021, 36(11): 49-56.

[16] ZHANG X, ZUO L, GENG Z, et al. Vindoline ameliorates intestinal barrier damage in Crohn's disease mice through MAPK signaling pathway [J]. FASEB J, 2022, 36(11): e22589.

[17] MOTTA J P, PALESE S, GIORGIO C, et al. Increased mucosal thrombin is associated with Crohn's disease and causes inflammatory damage through protease-activated receptors activation [J]. J Crohns Colitis, 2021, 15(5): 787-799.

[18] GAO L, YU Q, ZHANG H, et al. A resident stromal cell population actively restrains innate immune response in the propagation phase of colitis pathogenesis in mice [J]. Sci Transl Med, 2021, 13(603): eabb5071.

[19] 苗玉发, 康慧君, 王晓姝, 等. 用蛋白组学技术鉴定肝细胞损伤大鼠血清中的差异蛋白 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 45-51.
MIAO Y F, KANG H J, WANG X S, et al. Serum differential protein analysis by proteomics technology after hepatocyte injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 45-51.

[20] CLINTON J W, CROSS R K. Personalized treatment for Crohn's disease: current approaches and future directions [J]. Clin Exp Gastroenterol, 2023, 16: 249-276.

[21] LEONG R W, ARMUZZI A, AHMAD T, et al. *NOD2*/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 17(12): 1465-1470.

[22] MOJA L, DANESE S, FIORINO G, et al. Systematic review with network meta-analysis: comparative efficacy and safety of budesonide and mesalazine (mesalamine) for Crohn's disease [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(11): 1055-1065.

[23] KHAN K J, ULLMAN T A, FORD A C, et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis [J]. 2011, 106(4): 661-673.

[24] LIMA C C G, QUEIROZ N S F, SOBRADO C W, et al. Critical analysis of anti-tnf use in the era of new biological agents in inflammatory bowel disease [J]. Arq Gastroenterol, 2020, 57(3): 323-332.

[25] 何兰娟, 邓渊, 王燕, 等. 四神丸对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 TLR4、NOD2 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 613-618.
HE L J, DENG Y, WANG Y, et al. Effect of Sishen pills on the expression of TLR4 and NOD2 in a rat colon with ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 613-618.

[26] LETIZIA M, WANG Y H, KAUFMANN U, et al. Store-operated calcium entry controls innate and adaptive immune cell function in inflammatory bowel disease [J]. EMBO Mol Med, 2022, 14(9): e15687.
[27] LI S, NING L G, LOU X H, et al. Necroptosis in inflammatory bowel disease and other intestinal diseases [J]. World J Clin Cases, 2018, 6(14): 745-752.
[28] SHOSHAN-BARMATZ V, DE PINTO V, ZWECKSTETTER M, et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death [J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(3): 227-285.
[29] SHOSHAN-BARMATZ V, DE S, MEIR A. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1, Ca^{2+} transport, apoptosis, and their regulation [J]. Front Oncol, 2017, 7: 60.
[30] BAIK S H, RAMANUJAN V K, BECKER C, et al. Hexokinase dissociation from mitochondria promotes oligomerization of VDAC that facilitates NLRP3 inflammasome assembly and activation [J]. Sci Immunol, 2023, 8(84): eade7652.
[31] SHOSHAN-BARMATZ V, MALDONADO E N, KRELIN Y. VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress [J]. Cell Stress, 2017, 1(1): 11-36.
[32] VERMA A, PITTALA S, ALHOZEEL B, et al. The role of the mitochondrial protein VDAC1 in inflammatory bowel disease: a potential therapeutic target [J]. Mol Ther, 2024, 32(4): 1178.
[33] ZIELIŃSKA M, JARMUŻ A, WASILEWSKI A, et al. Role of transient receptor potential channels in intestinal inflammation and visceral pain: novel targets in inflammatory bowel diseases [J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21(2): 419-427.
[34] SANTONI G, FARFARIELLO V, LIBERATI S, et al. The role of transient receptor potential vanilloid type-2 ion channels in innate and adaptive immune responses [J]. Front Immunol, 2013, 4: 34.
[35] MATSUMOTO K, SUGIMOTO F, MIZUNO T, et al. Immunohistochemical characterization of transient receptor potential vanilloid types 2 and 1 in a trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis model with visceral hypersensitivity [J]. Cell Tissue Res, 2023, 391(2): 287-303.
[36] ISSA C M, HAMBLY B D, WANG Y, et al. TRPV2 in the development of experimental colitis [J]. Scand J Immunol, 2014, 80(5): 307-312.

〔收稿日期〕2024-03-28

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R　　国际刊号 ISSN 1671-7856　　邮局代号 82-917

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

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

投稿网址:http://zgsydw.cnjournals.com

期待您的来稿!

劳筱清,陈晨,张宏民,等. 芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的作用机制研究［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 56-65.
Lao XQ, Chen C, Zhang HM, et al. Effect and mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mouse early diabetic nephropathy［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 56-65.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.007

芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的作用机制研究

劳筱清[1],陈　晨[2],张宏民[1],杨　秀[1],史姜珊[1],粟宏伟[2],沈宏萍[2],王　丽[2],游蔓芮[3],李晓斌[2],赵长英[2*]

(1.西南医科大学中西医结合学院,四川 泸州　646000;2.西南医科大学附属中医医院,四川 泸州　646000;
3.乐山市中医医院,四川 乐山　614000)

【摘要】　目的　探讨芪石肾舒胶囊对早期糖尿病肾病小鼠肾纤维化的治疗作用和机制。**方法**　采用多次注射链脲佐菌素建立糖尿病肾病小鼠模型。小鼠随机分为正常组、模型组和给药组(0.9 g/(kg·d)),每组 8 只,连续灌胃 4 周,监测每周空腹血糖。4 周后,检测尿微量白蛋白肌酐比、血肌酐和血尿素氮含量;苏木精-伊红染色、过碘酸雪夫染色和天狼星红染色观察肾病理变化情况;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白 α1 及 α-平滑肌肌动蛋白的 mRNA 表达水平;免疫组化和免疫蛋白印迹法检测纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白、足突蛋白、肾病蛋白及转化生长因子-β1/SMAD 家族成员 2/3(TGF-β1/Smad2/3)通路相关蛋白含量。**结果**　与正常组相比,模型组小鼠空腹血糖和尿微量白蛋白肌酐比水平升高($P<0.001$);肾组织出现系膜增生、基底膜增厚和胶原沉积;纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白 α1 及 α-平滑肌肌动蛋白的 mRNA 水平升高($P<0.05$);足突蛋白和肾病蛋白水平下降($P<0.05$),纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白、足突蛋白、肾病蛋白及 TGF-β1/Smad2/3 通路蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组相比,给药组尿微量白蛋白肌酐比水平降低($P<0.05$),肾病理损伤有所缓解;纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白 α1 及 α-平滑肌肌动蛋白的 mRNA 水平下降($P<0.05$),足突蛋白和肾病蛋白水平升高($P<0.05$),纤维连接蛋白、Ⅰ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白、α-平滑肌肌动蛋白及 TGF-β1/Smad2/3 通路蛋白水平均降低($P<0.05$)。**结论**　芪石肾舒胶囊可改善糖尿病肾病小鼠肾纤维化,其机制可能与抑制 TGF-β1/Smad2/3 信号通路有关。

【关键词】　芪石肾舒胶囊;糖尿病肾病;肾纤维化;足细胞;TGF-β1/Smad2/3
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0056-10

Effect and mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mouse early diabetic nephropathy

LAO Xiaoqing[1], CHEN Chen[2], ZHANG Hongmin[1], YANG Xiu[1], SHI Jiangshan[1], SU Hongwei[2], SHEN Hongping[2], WANG Li[2], YOU Manrui[3], LI Xiaobin[2], ZHAO Changying[2*]

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China. 2. Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Leshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Leshan 614000)

[**基金项目**]四川省科技计划资助(2022YFS0407,2022YFS0621);四川省中医药管理局(2021MS426)。
[**作者简介**]劳筱清(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治内分泌代谢疾病基础。E-mail:15048248608@163.com
[**通信作者**]赵长英(1973—),女,教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治内分泌代谢疾病基础与临床。E-mail:zhaocy540@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the therapeutic effect and underlying mechanism of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in mice with early diabetic nephropathy (DN). **Methods** A DN mouse model was established by multiple injections of streptozotocin. The mice were randomly divided into a normal group (NC), model group (DN), and Qishi group (QS) (0.9 g/(kg·d)), with eight mice in each group. Mice were gavaged continuously for 4 weeks, and fasting blood glucose (FBG) was measured weekly. Four weeks later, urinary albumin/creatinine (UACR), serum creatinine, and blood urea nitrogen were measured. Hematoxylin-eosin, periodicacid-Schiff, and Sirius red staining were used to analyze renal pathological changes. Real-time fluorescence quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction was used to detect the mRNA levels of fibronectin (FN), collagen type I alpha 1 (Col1a1), and α-smooth muscle actin (α-SMA). Immunohistochemistry and Western blot were performed to detect FN, collagen type I (Collagen I), collagen type III (Collagen III), α-SMA, Podocin, Nephrin, and transforming growth factor-β1/SMAD family member2/3 (TGF-β1/Smad2/3) pathway-related proteins. **Results** Compared with mice in the NC group, those in the DN group showed significantly higher levels of FBG and UACR ($P<0.001$), and mesangial hyperplasia, basement membrane thickening, and collagen deposition in the renal tissue. The mRNA levels of FN, Col1a1, and α-SMA were increased ($P<0.05$). Protein levels of Podocin and Nephrin were decreased ($P<0.05$). The levels of FN, Collagen I, Collagen III, α-SMA, and TGF-β1/Smad2/3 pathway proteins were increased ($P<0.05$). Compared with the DN group, the QS group's level of UACR was decreased ($P<0.05$), their renal pathological injury was alleviated, and mRNA levels of FN, Collagen I, and α-SMA were attenuated ($P<0.05$); whereas their protein levels of Podocin and Nephrin were elevated ($P<0.05$). The levels of FN, Collagen I, Collagen III, α-SMA, and TGF-β1/Smad2/3 pathway proteins were also decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Qishishenshu Capsule improved renal fibrosis in DN mice, probably through the inhibition of the TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway.

【Keywords】 Qishishenshu Capsule; diabetic nephropathy; renal fibrosis; podocyte; TGF-β1/Smad2/3
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病是全球重大的公共卫生挑战,其发病率和患病率急剧上升,其中高达 35%的患者会发生肾疾病[1-2],根据我国肾病数据报告显示,慢性肾疾病中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)占 26.7%[3]。DN 是糖尿病最常见的并发症之一,通常由Ⅰ型糖尿病引起,偶由Ⅱ型糖尿病引起[4-6]。DN 的病理改变包括肾小球基底膜增厚、系膜基质增生、足细胞损伤和肾纤维化,主要特征是肾小球滤过屏障异常引起的蛋白尿[5,7-8]。在 DN 进展为终末期肾病(end stage renal disease,ESRD)的过程中,肾小球和肾小管间质出现进展性纤维化样变[9],可见纤维化改变是疾病进展的重要环节[10]。作为被广泛研究的成纤维细胞因子,转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)通过刺激细胞外基质的产生增加和诱导细胞向肌成纤维细胞转化从而介导肾纤维化,SMAD 家族成员 2(SMAD family member 2, Smad2)和 SMAD 家族成员 3(SMAD family member 3,Smad3)是 TGF-β1 生物学效应的两个关键下游转录因子,在 DN 患者和动物模型中,TGF-β 配体、受体及下游信号分子 Smad2 和 Smad3 被上调或激活,从而调节促纤维化基因的表达[11-13]。

DN 进展与成本协同增加,早期确诊和干预可大大减轻家庭和社会负担[14-15]。目前,Ⅰ型 DN 的治疗以改善生活方式和注射胰岛素为主,当患者合并高压、高脂和心血管事件时,合并口服药物。然而这些药物存在一定的副作用和局限性,因此近年来人们从天然产物中寻找副作用低且潜力大的替代疗法[16]。

芪石肾舒胶囊是西南医科大学附属中医医院院内制剂,由黄芪、生地、益母草、水蛭、石韦、蜈蚣等多种中药组成,具有清热利湿、舒络活血、益气固肾的功效,对多种肾病具有良好疗效[17-20]。本课题组前期研究表明,芪石肾舒胶囊通过抑制自噬改善糖尿病肾病的早期损害[21],也可通过干预炎症通路的激活保护肾[22]。然而,尚不清楚芪石肾舒胶囊是否可以改善糖尿病肾病纤维化病变。因此,本研究通过建立 DN 小鼠模型,探讨芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的改善作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只,8 周龄,体重 22~25 g,购自成都药康生物科技有限公司[SCXK

(川)2020-0034]。小鼠分笼饲养于西南医科大学城北校区 SPF 级动物房[SYXK(川)2020-230],温度(24±2)℃,湿度 45%~55%,12 h/12 h 昼夜交替。实验动物伦理由西南医科大学实验动物伦理委员会审批通过(20220616-001)。实验中坚持 3R 原则:给予舒适的居住环境、足够营养的饲料、清洁的饮用水;操作时给予必要的麻醉剂和体外消毒;温和抚慰、减少应激、实施安乐死;在优化实验方法和步骤的前提下,以较小量的小鼠完成动物研究。

1.2 主要试剂与仪器

芪石肾舒胶囊购自西南医科大学附属中医医院第一中药房。制剂许可证号:川 20160039HZ;备案号:川字制备字 Z20200161000;产品批号:20220707;配制单位及提供单位:西南医科大学附属中医医院。

链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)购自美国 Sigma 公司,批号 S0130-1G;柠檬酸和柠檬酸三纳购自中国 Macklin 公司,批号 C805019、C824131;小鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒购自美国 Crystal Chem 公司,批号 80630;戊巴比妥钠购自中国山东西化工科技有限公司,批号 F0749;尿素氮试剂盒和肌酐试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所,批号 C013-2-1、C011-2-1;4%多聚甲醛购自中国 Biosharp 公司,批号 BL539A;DAB 显色试剂盒购自中国北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9018;逆转录试剂盒和 qPCR 试剂盒购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号 R323、Q711;PCR 引物购于中国上海生工生物工程股份有限公司;β-actin 抗体购自美国 Affinity 公司,批号 AF7018;纤维连接蛋白(fibronectin,FN)抗体购自中国 Abways 公司,批号 CY9537;Ⅰ型胶原(collagen type Ⅰ,Collagen Ⅰ)抗体和Ⅲ型胶原(Collagen type Ⅲ,Collagen Ⅲ)抗体购自美国 Southern Biotech 公司,批号 1310-01、1330-01;α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)抗体购自美国博士德公司,批号 BM0002;足突蛋白(Podocin)抗体购自美国 Invitrogen 公司,批号 PA5-79757;肾病蛋白(Nephrin)抗体购自中国上海生工生物工程股份有限公司,批号 D260661;TGF-β1 抗体购自中国 Abways 公司,批号 BY0105;Smad2、Smad3、p-Smad2、p-Smad3 抗体购自美国 CST 公司,批号 3122S、9523S、3108S、9520S。

血糖仪和血糖试纸购自中国江苏鱼跃医疗设备股份有限公司,型号 695,批号 Y330;Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra 小型垂直电泳转印系统购自美国伯乐公司,货号 1658033;多功能酶标仪购自美国 Bio Tek 公司,型号 SYNEGY 2;实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司,型号 Light Cycler 480Ⅱ。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的分组、建模和干预

适应性喂养 1 周后,除正常组(Normal group,NC)8 只外,造模组小鼠连续 5 d 小剂量腹腔注射 STZ(50 mg/kg,溶于 10 mmol/L 柠檬酸钠,pH = 4.5),正常组小鼠注射同等体积(5 μL/g)柠檬酸钠,注射结束 1 周后,测定尾尖随机血糖(random blood glucose,RBG),RBG≥16.7 mmol/L 即为造模成功[23],造模组小鼠随机分为模型组(Model group,DN)和给药组(Qishi group,QS),每组 8 只。QS 组灌胃剂量为 0.9 g/kg,NC 组和 DN 组给予同等体积(10 μL/g)生理盐水,连续灌胃 28 d。

1.3.2 用药剂量换算

芪石肾舒胶囊购于西南医科大学第一中药房,根据说明书及临床用药经验得知:胶囊每粒 0.4 g,70 kg 成人每次服用 6 粒,每天 3 次,则 70 kg 成人每天服用 7.2 g 药物,可转化为 102.86 mg/kg。根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中人和动物体表面积比值剂量换算,可知小鼠与人的等效剂量比值系数是 9.1(剂量以 mg/kg 换算),则小鼠的灌胃剂量为 0.936 g/kg。

1.3.3 样本采集

末次给药后,收集小鼠随机尿,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.01 mL/10 g)进行麻醉,心脏取血,全血于 37 ℃静置 30 min,4 ℃静置过夜后分离血清,用于检测生化指标。取血处死后取肾组织,部分肾组织采用 4%多聚甲醛固定 24 h 后进行石蜡包埋,其余部分去髓质留皮质,冻存于-80 ℃,用于检测相关 RNA 和蛋白的表达。

1.3.4 空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)

药物干预过程中,每周测定 1 次尾尖末梢 FBG,测定时间固定在 10:00 am。

1.3.5 生化检测

取小鼠随机尿,采用 ELSIA 试剂盒测定尿白蛋白浓度,采用试剂盒测定尿肌酐,并计算尿微量白蛋白肌酐比(urinary albumin/creatinine,UACR)。血清肌酐(serum creatinine,Scr)和尿素氮(blood urea

nitrogen, BUN)水平分别采用试剂盒测定。

1.3.6　肾组织病理学染色

肾组织采用 4%多聚甲醛中固定 24 h 后,进行石蜡包埋切片,切片经过二甲苯脱蜡和梯度乙醇复水后,按照试剂盒说明书分别进行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)、过碘酸雪夫染色(periodicacid-Schiff staining, PAS)和天狼星红染色(sirius red staining, sirius red),通过光学显微镜观察肾组织病理学改变、肾小球系膜增生和纤维化情况。

1.3.7　实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)

取"1.3.3"项下液氮中适量肾组织进行匀浆,通过 TRIzol 法提取 RNA。取 1 μg 总 RNA 利用 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂盒进行逆转录合成 cDNA,再使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增。FN 正向引物为:CCCCAACTGGTTACC CTTCC,反向引物为:TGTCCGCCTAAAGC CATGTT;α-SMA 正向引物为:CCTTCGTGACTACTGCCGAG,反向引物为:ATAGGTGGTTTCGTGGATGC;Ⅰ型胶原蛋白 α1(collagen type I alpha 1, Col1a1)正向引物为:TTCTCCTGGCAAAGACGGAC,反向引物为:CTCAAGGTCACGGTCACGAA。PCR 反应体系(10 μL)为 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL, 10 μmol/L 正向引物 0.2 μL, 10 μmol/L 反向引物 0.2 μL, cDNA 1 μL, ddH_2O 3.6 μL。PCR 反应程序为 95 ℃预变性 30 s;95 ℃变性 10 s, 60 ℃退火 30 s,共 40 个循环。以 β-actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达情况。

1.3.8　免疫组化(immunohistochemistry, IHC)

取"1.3.6"项下石蜡切片,梯度乙醇脱蜡复水后进行抗原修复和阻断,5% BSA 室温下孵育 1 h,再分别加入 FN、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、α-SMA、TGF-β1 和 p-Smad3 抗体 4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤后室温孵育二抗 1 h,进行 DAB 显色、苏木素复染和中性树胶封片,通过光学显微镜采集图片,由 Image J 软件分析阳性表达情况。

1.3.9　免疫蛋白印记法(Western blot)

取"1.3.3"项下液氮中适量肾组织,以 RIPA 裂解缓冲液充分裂解,4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,取上清,以 BCA 法检测蛋白浓度。取 30 μg 蛋白与上样缓冲液混合,于 100 ℃加温变性 10 min,以 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离蛋白(80 V, 30 min;120 V, 90 min),后通过湿转法将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(100 V, 90 min),5% BSA 室温下封闭 1 h,而后分别加入内参和各目的蛋白进行孵育:β-actin 抗体(1∶3000)、FN 抗体(1∶2000)、α-SMA 抗体(1∶1000)、Collagen Ⅰ抗体(1∶1000)、Podocin 抗体(1∶1000)、Nephrin 抗体(1∶1000)、TGF-β1 抗体(1∶1000)、Smad2 抗体(1∶1000)、Smad3 抗体(1∶1000)、p-Smad2 抗体(1∶1000)和 p-Smad3 抗体(1∶1000),4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 10 min,加入 HRP 标记的山羊抗兔/鼠二抗(1∶10 000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜后加入 ECL 发光液显影拍照,由 Image J 软件分析各蛋白条带灰度值。

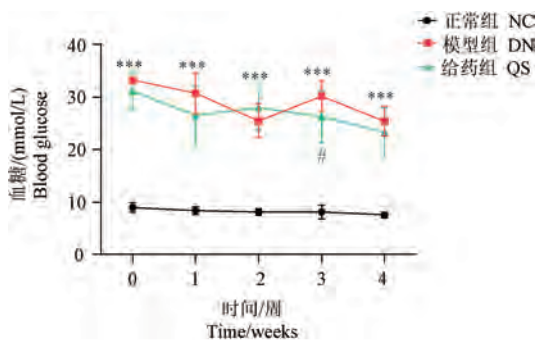
1.4　统计学方法

采用采用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析,GraphPad Prism 9.4.1 进行绘图,所有数据结果均表示为"平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)",符合正态分布且等方差,多组间比较采用单因素方差分析(one-way, ANOVA);不符合正态分布,采用非参数 Kruskal-Wallis 检验;组间多重比较均采用 Dunnett 检验;以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠空腹血糖的影响

如图 1 所示,与 NC 组相比,DN 组小鼠 FBG 水平显著升高($P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组小鼠 FBG 水平影响无统计学意义($P>0.05$),提示芪石肾



注:与正常组相比, *** $P<0.001$;与模型组相比, # $P<0.05$。

图 1　芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠空腹血糖的影响

Note. Compared with NC group, *** $P<0.001$. Compared with DN group, # $P<0.05$.

Figure 1　Effect of Qishishenshu Capsule on fasting blood glucose in DN mice

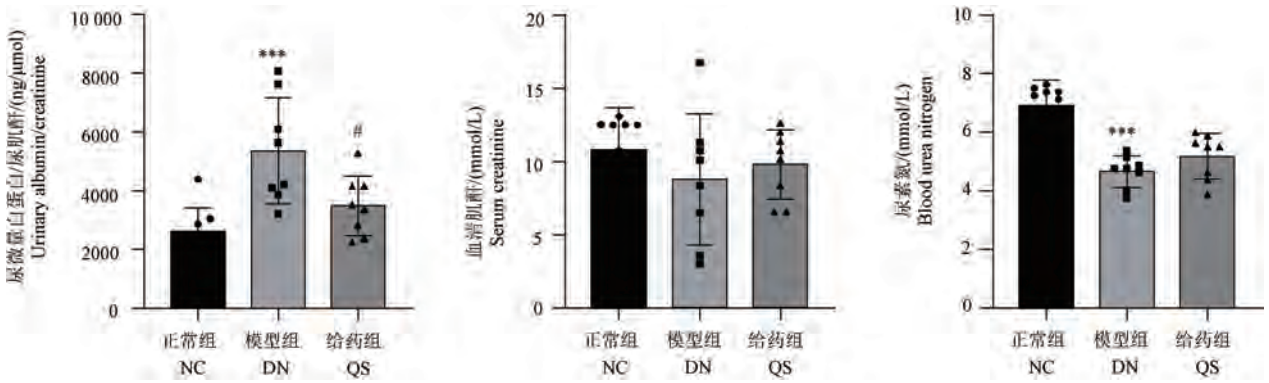
舒胶囊对空腹血糖水平影响不大。

2.2 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠生化指标的影响

如图 2 所示，与 NC 组相比，DN 组小鼠 UACR 水平显著升高（$P<0.001$）；与 DN 组相比，QS 组 UACR 表达水平下降（$P<0.05$）。与 NC 组相比，DN 组小鼠 Scr 呈降低趋势（$P=0.3946$）；与 DN 组相比，QS 组 Scr 略有回升趋势（$P=0.7785$），但其差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与 NC 组相比，DN 组小鼠 BUN 水平显著降低（$P<0.001$）；与 DN 组相比，QS 组 BUN 水平影响无统计学意义（$P=0.3$）。

2.3 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾组织结构的影响

如图 3 所示，NC 组小鼠肾组织结构完整，形态正常，肾小球形态规则，肾小管排列紧密，肾间质无异常；与 NC 组相比，DN 组小鼠组织结构紊乱，系膜

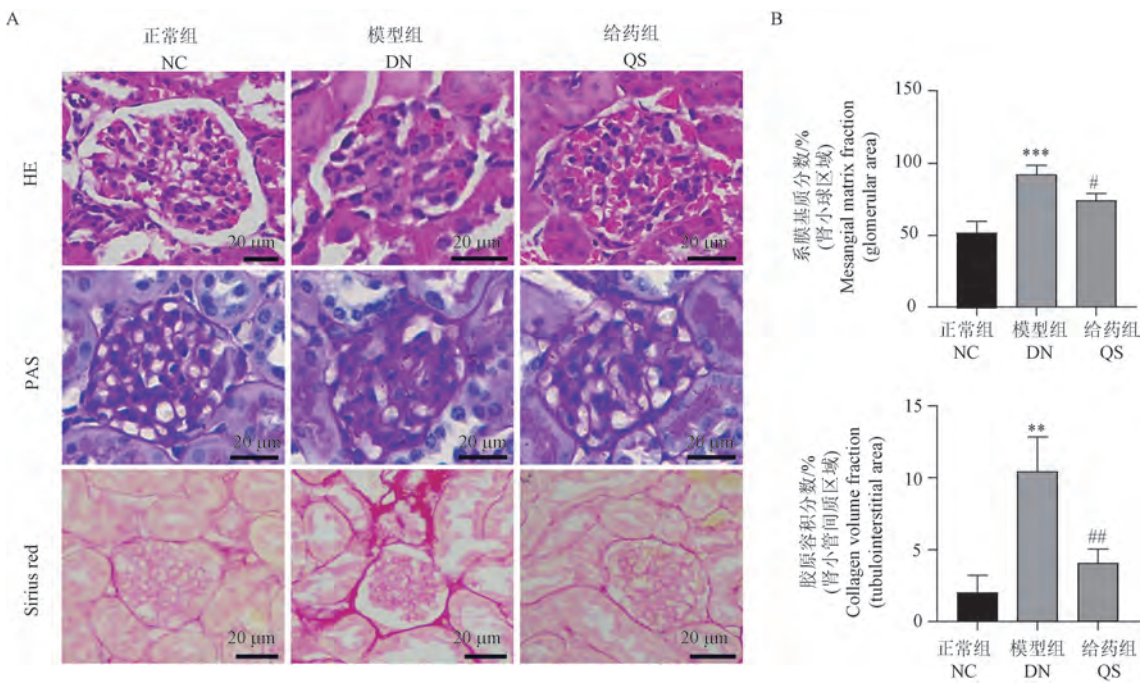


注：与正常组相比，$^{***}P<0.001$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$。

图 2 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠生化指标的影响

Note. Compared with NC group, $^{***}P<0.001$. Compared with DN group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 2 Effect of Qishishenshu Capsule on biochemical indicators in DN mice



注：A：HE、PAS 和 Sirius red 染色；B：肾小球系膜扩张面积和胶原沉积面积。与正常组相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

图 3 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾组织结构的影响

Note. A, HE, PAS and Sirius red staining. B, Area of glomerular mesangial dilatation and collagen deposition. Compared with NC group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with DN group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

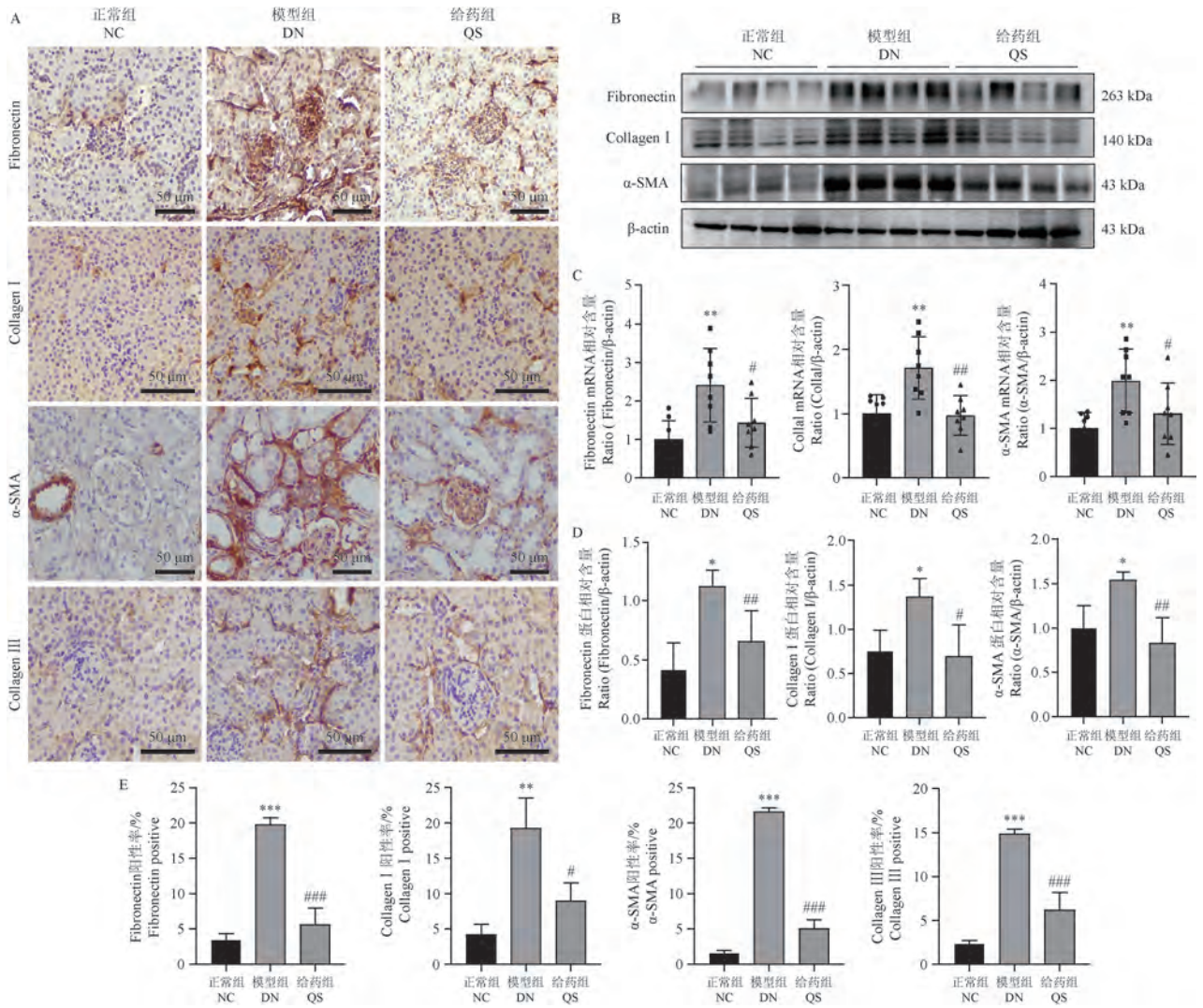
Figure 3 Effect of Qishishenshu Capsule on renal tissue structure in DN mice

基质弥漫性增生，肾小球和肾小管基底膜增厚，肾间质可见明显胶原纤维红色染色；与 DN 组相比，QS 组小鼠肾组织病理学变化、系膜增生及纤维化沉积均有所改善。

PAS 染色结果显示，与 NC 组相比，DN 组肾小球系膜扩张面积增加（$P<0.001$）；与 DN 组相比，QS 组肾小球系膜扩张面积减少（$P<0.05$）；sirius red 染色结果显示，与 NC 组相比，DN 组小鼠胶原红染面积增加（$P<0.01$）；与 DN 组相比，QS 组胶原红染面积减少（$P<0.01$）。

2.4　芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的影响

如图 4 所示，与 NC 组相比，DN 组小鼠肾组织 FN、Col1a1、α-SMA 的 mRNA 表达显著增加（$P<0.01$）；与 DN 组相比，QS 组小鼠肾组织 FN、Col1a1、α-SMA 的 mRNA 表达显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$）。与 NC 组相比，DN 组小鼠肾组织 FN、Collagen Ⅰ、α-SMA 蛋白表达显著增加（$P<0.05$）；与 DN 组相比，QS 组小鼠肾组织 FN、Collagen Ⅰ、α-SMA 蛋白表达显



注：A、E：Fibronection、Collagen Ⅰ、α-SMA、Collagen Ⅲ的免疫组化结果及定量分析；B、D：Fibronection、Collagen Ⅰ、α-SMA 的 Western blot 结果及定量分析；C：Fibronection、Col1a1 和 α-SMA 的 RT-qPCR 结果。与正常组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$。

图 4　芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠肾纤维化的影响

Note. A/E, Immunohistochemical results and quantitative analysis of fibronectin, Collagen I, α-SMA and Collagen III. B/D, Western blot results and quantitative analysis of fibronectin, Col1a1 and α-SMA. C, RT-qPCR results of fibronectin, Col1a1 and α-SMA. Compared with NC group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with DN group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$.

Figure 4　Effect of Qishishenshu Capsule on renal fibrosis in DN mice

著下降($P<0.01$,$P<0.05$)。与 NC 组相比,DN 组小鼠肾组织 FN、Collagen Ⅰ、α-SMA、Collagen Ⅲ在肾小球、肾小管间质和细胞外基质的阳性表达显著增加($P<0.01$,$P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组小鼠肾组织 FN、Collagen Ⅰ、α-SMA、Collagen Ⅲ的阳性表达显著下降($P<0.05$,$P<0.001$)。

2.5 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠足细胞的影响

如图 5 结果所示,与 NC 组相比,DN 组小鼠 Nephrin 和 Podocin 蛋白表达量下降($P<0.05$);与 DN 组相比,QS 组足细胞标志物蛋白表达升高($P<0.05$)。

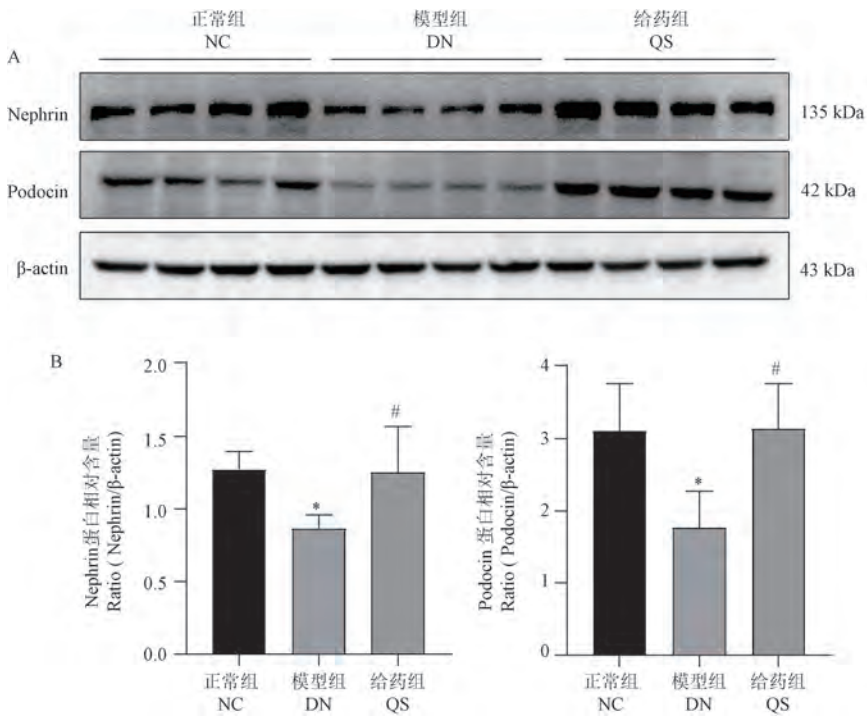
2.6 芪石肾舒胶囊对 TGF-β/Smad 信号通路的影响

如图 6A、6B 结果提示,与 NC 组相比,DN 组 TGF-β1 在肾小球和肾小管上皮细胞的阳性表达增强,p-Smad3 的核易位亦增强($P<0.01$,$P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组 TGF-β1 和 p-Smad3 的表达明显减弱($P<0.05$,$P<0.01$)。如图 6C、6D 结果所示,与 NC 组相比,DN 组 TGF-β1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达量显著增加($P<0.001$);与 DN 组相比,QS 组小鼠肾组织 TGF-β1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达显著下降($P<0.001$)。

3 讨论

本研究采用多次小剂量注射 STZ 建立 DN 小鼠模型。该方法使小鼠在 2 周内出现高血糖,5 周内出现白蛋白尿,同时伴随高滤过和系膜扩张,与人类早期 DN 的病理特点相符合,因此被广泛使用[24-26]。

实验过程中,注射 STZ 后 9 d,测量尾尖血糖,选择 RBG≥16.7 mmol/L 的 10 周龄小鼠进行灌胃干预,随后每周测量小鼠 FBG。作为 DN 早期诊断的敏感指标,尿微量白蛋白容易受到摄水量影响导致检测不准确;尿肌酐的代谢相对平稳,摄水量也会影响其浓度;而二者的比值能抵消这种稀释或浓缩效应,客观地评估尿白蛋白的排泄量,因此以 UACR 作为首选评价指标[27]。BUN 是蛋白质的最终产物,Scr 是肌肉内磷酸肌酸的代谢产物,二者主要由肾小球滤过,是衡量肾功能的经典指标。实验结果表明,STZ 诱导 6 周的 DN 组小鼠血糖始终维持在高水平,UACR 显著升高,病理染色可见肾小球和肾小管基底膜增厚、系膜基质增生、出现少量局部节段硬化以及胶原纤维沉积增加,而由于早期

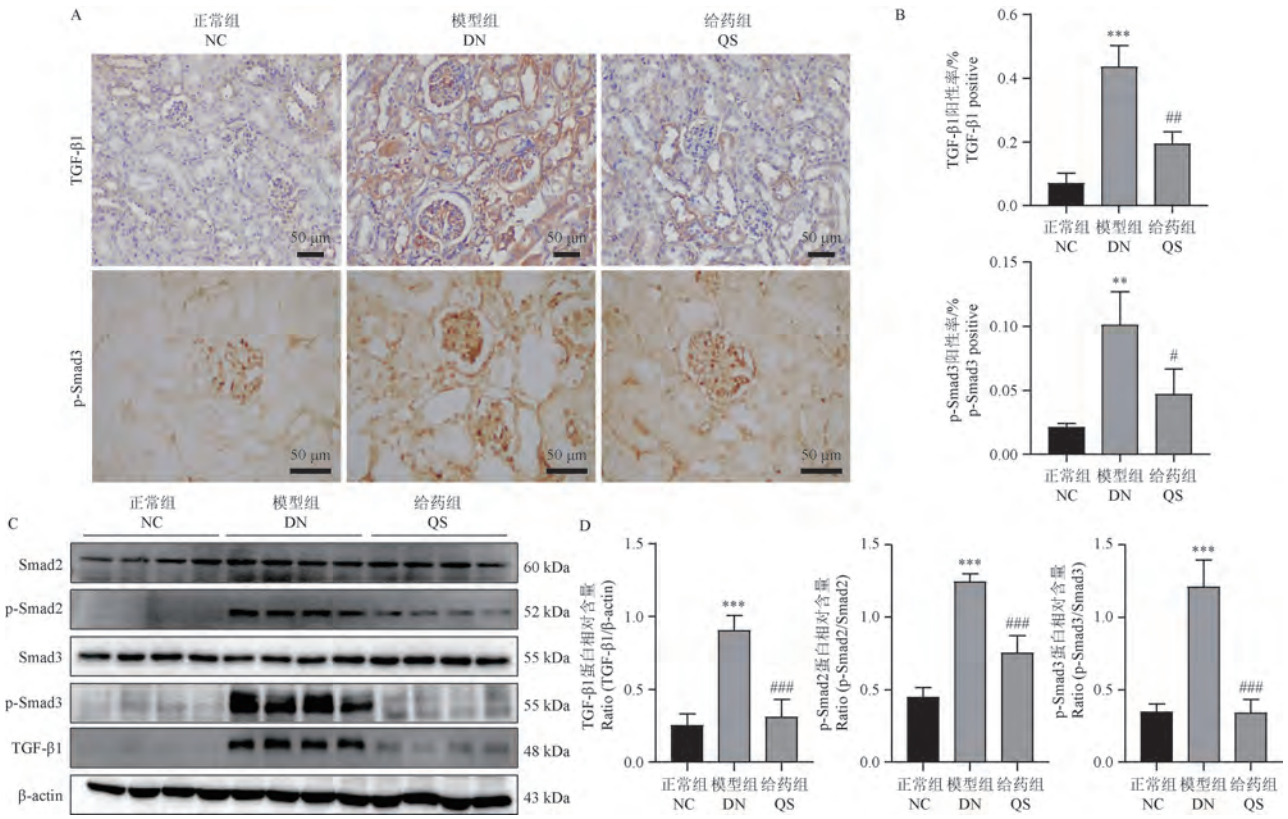


注:与正常组相比,$^{*}P<0.05$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$。

图 5 芪石肾舒胶囊对 DN 小鼠足细胞的影响

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

Figure 5 Effect of Qishishenshu Capsule on podocyte of DN mice



注:A、B:TGF-β1 和 p-Smad3 的免疫组化结果及定量分析;C、D:TGF-β/Smad 信号通路的 Western blot 结果及定量分析。与正常组相比,$^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$;与模型组相比,$^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$。

图 6 芪石肾舒胶囊对 TGF-β/Smad 信号通路的影响

Note. A/B, Immunohistochemical results and quantitative analysis of TGF-β1 and p-Smad3. C/D, Western blot results and quantitative analysis of TGF-β/Smad signaling pathway. Compared with NC group, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. Compared with DN group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$.

Figure 6 Effect of Qishishenshu Capsule on TGF-β/Smad signaling pathway

DN 存在高滤过状态,BUN 和 Scr 水平出现不同程度的降低;治疗 4 周后,QS 组小鼠的血糖并未改善,BUN 和 Scr 水平也未恢复正常,但其 UACR 水平明显下降,系膜基质分数和胶原容积分数降低,其他肾病理损伤也有所缓解。提示在Ⅰ型 DN 中,芪石肾舒胶囊具有独立于血糖调控的肾保护作用。在其他研究中也出现过类似情况[28-29]。

在 DN 进展为 ESRD 的过程中,肾小球逐渐形成不可避免的瘢痕,随后在肾小管间质区域出现类似的纤维化过程[30]。在高糖条件下,各种肾上皮细胞长期受损,它们可以释放多种细胞因子,参与成纤维细胞的发病机制并分泌过多的细胞外基质[31]。其中最常检测的的基质蛋白是 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 FN[32]。α-SMA 作为纤维化的标志物,主要表达于血管平滑肌,发生病理时,在肾小球和肾小管间质呈现高表达[33]。根据 RT-qPCR 结果可见,DN 组 FN、Col1a1 和 α-SMA 的 mRNA 表达水平升高,QS 组 FN、Col1a1 和 α-SMA 的 mRNA 表达水平均显著降低;Western blot 和 IHC 结果可见,DN 组 FN、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 α-SMA 的表达升高,系膜基质和小管间质中细胞外基质的阳性面积增加,在 QS 组,这些情况均被缓解。

足细胞丢失是 DN 的必要早期事件,这与蛋白尿的产生和肾小球硬化的发生密切相关[34-36]。足细胞标志蛋白是维持肾小球滤过屏障结构和功能的重要角色:由 NPHS2 编码的 Podocin 和由 NPSH1 编码的 Nephrin 是定位于足突裂孔隔膜的跨膜蛋白,Nephrin 起黏附及信号转导作用,Podocin 可激活并增强 Nephrin 诱导的信号转导;在 DN 中,Podocin 的表达随着足细胞损伤和基底膜破坏的程度而减少[37]。Western blot 结果显示,在 STZ 诱导的 DN 中,足细胞特异性标志物 Podocin 和 Nephrin 表达下降,说明肾小球结构受损且足细胞骨架已被破坏;芪石肾舒胶囊治疗后,其蛋白表达增强。提示芪石

肾舒胶囊可减轻足细胞损伤。

DN 的发病与多种因素相关,他们均可通过依赖和独立于 TGF-β 的机制激活 TGF-β 信号[38]。TGF-β 有 3 种亚型,即 TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3,虽然三者及其受体均在肾中广泛表达,但 TGF-β1 是 DN 发病的关键介质;TGF-β1 与 TGF-β 受体Ⅱ结合后,激活 TGF-β 受体Ⅰ激酶,导致 Smad2 和 Smad3 磷酸化,激活后的 Smad2 和 Smad3 与 Smad4 形成 Smad 复合物,该寡聚复合物易位到细胞核内与转录因子一起介导靶基因的表达[39-40];在 UUO 和 DN 引起的肾纤维化中 Smad3 均起致病作用;而与 UUO 中发挥肾保护作用的 Smad2 不同,在 DN 中 Smad2 起致病作用[38,41]。Western blot 和 IHC 结果表明,DN 组 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白水平显著升高,p-Smad3 的核易位增强,QS 组 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白水平明显下降,p-Smad3 的核易位减弱。提示芪石肾舒胶囊可能通过 TGF-β1/Smad2/3 通路改善糖尿病肾病肾纤维化。

综上所述,本研究证明芪石肾舒胶囊可以减轻糖尿病肾病肾纤维化的病理改变,其机制可能与抑制 TGF-β1/Smad2/3 通路的表达有关。但本研究存在一些局限性,需要探索芪石肾舒胶囊治疗糖尿病肾病纤维化的具体分子机制,以提供更准确的干预手段。

参考文献:

[1] GUPTA S, DOMINGUEZ M, GOLESTANEH L. Diabetic kidney disease: an update [J]. Med Clin North Am, 2023, 107(4): 689-705.

[2] REUTENS A T. Epidemiology of diabetic kidney disease [J]. Med Clin North Am, 2013, 97(1): 1-18.

[3] YANG C, GAO B, ZHAO X, et al. Executive summary for China kidney disease network (CK-NET) 2016 annual data report [J]. Kidney Int, 2020, 98(6): 1419-1423.

[4] WENG W, GE T, WANG Y, et al. Therapeutic effects of fibroblast growth factor-21 on diabetic nephropathy and the possible mechanism in type 1 diabetes mellitus mice [J]. Diabetes Metab J, 2020, 44(4): 566-580.

[5] SELBY N M, TAAL M W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines [J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22(Suppl 1): 3-15.

[6] MOHANDES S, DOKE T, HU H, et al. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2023, 133(4): e165654.

[7] PILLAI A, FULMALI D. A narrative review of new treatment options for diabetic nephropathy [J]. Cureus, 2023, 15(1): e33235.

[8] KOSTOVSKA I, TRAJKOVSKA K T, TOPUZOVSKA S, et al. Nephrinuria and podocytopathies [J]. Adv Clin Chem, 2022, 108: 1-36.

[9] BROSIUS F C 3rd. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2008, 9(4): 245-254.

[10] SAMSU N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1497449.

[11] HATHAWAY C K, GASIM A M H, GRANT R, et al. Low TGFβ1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(18): 5815-5820.

[12] ZENG L F, XIAO Y, SUN L. A glimpse of the mechanisms related to renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 49-79.

[13] LAN H Y. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.

[14] JIN B, LIU J, ZHU Y, et al. Kunxian capsule alleviates podocyte injury and proteinuria by inactivating β-catenin in db/db mice [J]. Front Med, 2023, 10: 1213191.

[15] LIU S, YUAN Y, XUE Y, et al. Podocyte injury in diabetic kidney disease: a focus on mitochondrial dysfunction [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 832887.

[16] TANG G, LI S, ZHANG C, et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(9): 2749-2767.

[17] 黄淑芬, 张琼, 张茂萍, 等. 肾舒胶囊治疗肾性蛋白尿 69 例临床观察 [J]. 泸州医学院学报, 1997, 25(4): 264-266.
HUANG S F, ZHANG Q, ZHANG M P, et al. Clinical observation on 69 cases of renal proteinuria treated with Renshu capsule [J]. J Luzhou Med Coll, 1997, 25(4): 264-266.

[18] 黄淑芬, 张茂萍, 张军, 等. 肾舒胶囊与卡托普利治疗轻中度肾性蛋白尿疗效观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(8): 466-468.
HUANG S F, ZHANG M P, ZHANG J, et al. Clinical observation of Shenshu capsule and captopril in the treatment of mild to moderate renal proteinuria [J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2003, 4(8): 466-468.

[19] 黄淑芬. 肾舒胶囊治疗肾性蛋白尿的临床与实验研究 [R]. 四川: 泸州, 2001.
HUANG S F. Clinical and experimental study of Shenshu capsule on renal proteinuria [R]. Sichuan: Luzhou, 2001.

[20] 黄淑芬, 张琼, 张茂萍, 等. 肾舒胶囊配合激素治疗重度肾性蛋白尿疗效观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(6): 16-17.
HUANG S F, ZHANG Q, ZHANG M P, et al. Clinical observation on the effect of Shenshu capsule match hormone in treatment of heavy kidney albuminuria [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2003, 10(6): 16-17.

[21] 赵长英, 孙楠, 杨洁珂, 等. 肾舒胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏 mTOR、beclin-1 自噬通路的表达及意义[J]. 广西中医药, 2019, 42(6): 55-58.
ZHAO C Y, SUN N, YANG J K, et al. Expression and significance of renal Shu capsule on renal mTOR and beclin-1 autophagy pathway in rats with diabetic nephropathy [J]. Guangxi J Tradit Chin Med, 2019, 42(6): 55-58.

[22] 赵长英, 杨洁珂, 孙楠, 等. 肾舒胶囊通过 AKT/NF-κB 信号通路改善大鼠糖尿病肾病纤维化作用研究[J]. 实用中医内科杂志, 2020, 34(10): 70-74.
ZHAO C Y, YANG J K, SUN N, et al. Therapeutic effect of Shenshu capsule on kidney of diabetic nephropathy rats and its effect on AKT/NF-κB signaling pathway [J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2020, 34(10): 70-74.

[23] LI A, YI B, HAN H, et al. Vitamin D-VDR (vitamin D receptor) regulates defective autophagy in renal tubular epithelial cell in streptozotocin-induced diabetic mice via the AMPK pathway [J]. Autophagy, 2022, 18(4): 877-890.

[24] THIBODEAU J F, HOLTERMAN C E, BURGER D, et al. A novel mouse model of advanced diabetic kidney disease [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113459.

[25] NOSHAHR Z S, SALMANI H, KHAJAVI RAD A, et al. Animal models of diabetes-associated renal injury [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 9416419.

[26] LI F, MA Z, CAI Y, et al. Optimizing diabetic kidney disease animal models: Insights from a meta-analytic approach [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(5): 433-451.

[27] MARIAT C, DELANAYE P, BASTARD J P, et al. Urinary protein or albumin/creatinin ratio for reporting measurements results [J]. Ann Biol Clin, 2018, 76(6): 643-650.

[28] SEO E, KANG H, OH Y S, et al. *Psoralea* corylifolia L. seed extract attenuates diabetic nephropathy by inhibiting renal fibrosis and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Nutrients, 2017, 9(8): 828.

[29] SUN N, YANG N, ZHOU J, et al. Yiqi Qingre Xiaozheng formula protects against diabetic nephropathy by restoring autophagy in mice [J]. J Tradit Chin Med Sci, 2023, 10(3): 310-320.

[30] HE X, ZHANG T, TOLOSA M, et al. A new, easily generated mouse model of diabetic kidney fibrosis [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 12549.

[31] CANAUD G, BONVENTRE J V. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(4): 575-583.

[32] MASON R M, WAHAB N A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(5): 1358-1373.

[33] DING H, CHEN J, QIN J, et al. TGF-β-induced α-SMA expression is mediated by C/EBPβ acetylation in human alveolar epithelial cells [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 22.

[34] HERMAN-EDELSTEIN M, THOMAS M C, THALLAS-BONKE V, et al. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-β: a model for diabetic podocytopathy [J]. Diabetes, 2011, 60(6): 1779-1788.

[35] YASUDA-YAMAHARA M, KUME S, TAGAWA A, et al. Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy [J]. Autophagy, 2015, 11(12): 2385-2386.

[36] KLAUSEN K, BORCH-JOHNSEN K, FELDT-RASMUSSEN B, et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes [J]. Circulation, 2004, 110(1): 32-35.

[37] HU Y, YE S, XING Y, et al. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal nephrin and podocin in type 2 diabetic rats [J]. Acta Diabetol, 2020, 57(3): 279-286.

[38] WANG L, WANG H L, LIU T T, et al. TGF-β as a master regulator of diabetic nephropathy [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7881.

[39] LAN H Y. Transforming growth factor-β/Smad signalling in diabetic nephropathy [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8): 731-738.

[40] WU W, WANG Y, LI H, et al. Buyang Huanwu Decoction protects against STZ-induced diabetic nephropathy by inhibiting TGF-β/Smad3 signaling-mediated renal fibrosis and inflammation [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 118.

[41] LOEFFLER I, LIEBISCH M, ALLERT S, et al. FSP1-specific SMAD2 knockout in renal tubular, endothelial, and interstitial cells reduces fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition in murine STZ-induced diabetic nephropathy [J]. Cell Tissue Res, 2018, 372(1): 115-133.

〔收稿日期〕2024-01-15

徐明飞,张怡,康如意,等. EFHD2 调节 NOX4/ROS 通路启动糖代谢重编程促进乳腺癌进展的机制研究［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 66-75.
Xu MF, Zhang Y, Kang RY, et al. EFHD2 regulates the NOX4/ROS pathway to initiate glucose metabolism reprogramming and promote breast cancer progression［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 66-75.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.008

EFHD2 调节 NOX4/ROS 通路启动糖代谢重编程促进乳腺癌进展的机制研究

徐明飞[1],张　怡[3],康如意[3],刘超越[2*]

(1.川北医学院基础医学与法医学院人体解剖学教研室,四川 南充　637000;2.川北医学院基础医学与法医学院免疫学教研室,四川 南充　637000;3.川北医学院临床医学院,四川 南充　637000)

【摘要】　目的　基于 NOX4/ROS 信号通路探讨 EFHD2 影响乳腺癌发生进展的作用机制。**方法**　将细胞分为 NC-shRNA 组和 EFHD2-shRNA 组,构建沉默 EFHD2 表达的慢病毒载体及其对照载体后转染乳腺癌细胞 MDA-MB-23、MCF-7,qRT-PCR 验证转染效率;CCK8 检测细胞增殖活性;平板克隆实验检测细胞集落形成能力;划痕实验检测细胞迁移;Transwell 实验检测细胞侵袭;流式细胞术检测细胞凋亡及 ROS 水平;qRT-PCR 检测 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH mRNA 的表达;Western blot 检测 Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 蛋白的表达。**结果**　与 NC-shRNA 组相比,EFHD2-shRNA 组细胞中 EFHD2 的表达明显降低,细胞存活及其集落形成能力减弱;细胞凋亡率及促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达升高;细胞迁移距离缩短,细胞侵袭数及促迁移、侵袭蛋白 MMP-2 的表达降低;乳酸及 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、LDH 的水平降低,ATP 及 PDH 的水平升高;流式结果表明沉默 EFHD2 后 ROS 水平降低,NOX4 蛋白下调。**结论**　EFHD2 可通过调节 NOX4/ROS 信号通路,抑制 ROS 生成,引起乳酸及葡萄糖堆积从而促进乳腺癌细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移及侵袭。

【关键词】　乳腺癌;代谢重编程;NOX4/ROS 信号通路;EFHD2;免疫逃逸
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0066-10

EFHD2 regulates the NOX4/ROS pathway to initiate glucose metabolism reprogramming and promote breast cancer progression

XU Mingfei[1], ZHANG Yi[3], KANG Ruyi[3], LIU Chaoyue[2*]
(1. Department of Human Anatomy, Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China. 2. Department of Immunology, Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000. 3. School of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)

【Abstract】　Objective　To investigate the mechanism by which EFHD2 affects the occurrence and progression of breast cancer based on the NOX4/ROS signaling pathway. **Methods**　Cells were divided into an NC-shRNA group and EFHD2-shRNA group. A lentiviral vector for EFHD2 silencing and a control vector were constructed and used to transfect

[基金项目]四川省科技厅项目(2024NSFSC1277);南充市科学技术局项目(20SXQT0333);大学生创新创业国家级项目(202310634020);大学生创新创业省级项目(202310634040)。
[作者简介]徐明飞(1987—),男,实验师,硕士,研究方向:乳腺癌。E-mail:289112406@qq.com
[通信作者]刘超越(1988—),女,副教授,博士,研究方向:病毒与肿瘤。E-mail:liuchaoyue@nsmc.edu.cn

MDA-MB-23 and MCF-7 breast cancer cells. The transfection efficiency was verified by qRT-PCR. A CCK8 assay was used to detect cell proliferation activity. A plate cloning assay was employed to measure cell colony formation ability. A scratch test was used to detect cell migration, and a Transwell assay used to assess cell invasion. Flow cytometry was applied to detect apoptosis and ROS levels. qRT-PCR was used to analyze the mRNA expression of GLUT1, PDK1, PFK1, PKM2, PDH, and LDH, while Western blot was applied to detect the expression of Cleaved caspase-3, MMP-2, and NOX4 proteins. **Results** Compared with the NC-shRNA group, the EFHD2-shRNA group's EFHD2 expression was significantly decreased and its cell survival and colony formation ability were weakened. The apoptosis rate and the expression of the pro-apoptotic protein Cleaved caspase-3 increased. The cell migration distance was shortened, while the number of invading cells and the expression of MMP-2, which promotes migration and invasion, were decreased. The levels of lactic acid and GLUT1, PDK1, PFK1, PKM2, and LDH decreased, while the levels of ATP and PDH increased. Streaming result showed that ROS levels were reduced and NOX4 protein was down-regulated after silencing EFHD2. **Conclusions** EFHD2 inhibits ROS production by regulating the NOX4/ROS signaling pathway, causing lactic acid and glucose accumulation, promoting the apoptosis of breast cancer cells, and inhibiting cell proliferation, migration, and invasion.

【**Keywords**】 breast cancer; metabolic reprogramming; NOX4/ROS signaling pathway; EFHD2; immune escape
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

乳腺癌是很常见的恶性肿瘤之一,在女性癌症中其发病率位居第一[1]。手术通常是乳腺癌治疗的首选。大多数妇女可能会接受额外的治疗,包括化疗、激素治疗、放疗或靶向治疗[2-3]。90%以上的乳腺癌在确诊时没有发生转移[4]。然而,据估计,近 30%的早期乳腺癌患者将发展为转移性乳腺癌[5],这些患者的中位生存期为 8~36 个月[6]。由此可见,乳腺癌已成为女性健康的第一杀手,不可忽视。由于我们对乳腺癌的理解取得了实质性进展,对乳腺癌的早期诊断和治疗取得了重大突破,被诊断出患有乳腺癌的女性能够获得更加适当的治疗,因此与过去相比,乳腺癌的死亡风险有所降低[7]。但是研究表明转移性乳腺癌的死亡率仍然没有降低。由于乳腺癌在形态学和遗传学上的高度异质性,部分早期乳腺癌患者仍会出现复发转移[8]。迄今为止,晚期乳腺癌依然是难以完全治愈的,且乳腺癌复发和预后会严重影响患者生存率[9]。因此,探索乳腺癌分子转移机制,由此开发筛选乳腺癌特异性诊断的分子标志物和靶向治疗位点,对乳腺癌的早期预防、防止复发、延长患者的生存周期和改善生活品质具有重要意义。

螺旋-环-螺旋拓扑结构域蛋白 D2(helix-loop-helix topology protein D2,EFHD2)是一种钙结合蛋白,主要参与钙信号转导细胞骨架组装和突触形成[10]。EFHD2 在各种细胞类型中广泛表达,在肿瘤侵袭转移、细胞凋亡、钙离子信号通路、体液免疫等多种生理病理过程中发挥着重要的调控作用[11]。近年来随着治疗方法的优化,乳腺癌患者的预后已得到明显改善,但其复发和转移是导致患者死亡的重要原因,这与乳腺癌细胞免疫逃逸发生有关,但截至目前其具体调控机制尚不清楚。研究证明代谢重编程介导的微环境免疫抑制是肿瘤复发转移、化疗抵抗和免疫逃逸的关键[12],近年来 NOX4 在肿瘤的研究中受到关注,其在乳腺癌中高表达,且促进乳腺癌发展[13]。NOX4/ROS 通路介导的能量代谢重编程可为肿瘤细胞增殖和迁移提供能量和物质供应,而代谢产物乳酸造成的酸性微环境可引起微环境免疫抑制并造成免疫逃逸[11]。NOX4 产生的 ROS 通过 HIF-1α 激活胶质母细胞瘤中转录因子 FOXM1 促进有氧糖酵解[14]。在非小细胞肺癌中,NOX4 调控 ROS/PI3K/AKT 影响糖酵解,其抑制剂与糖酵解抑制剂协同抑制癌细胞[15]。此外,NOX4 蛋白表达影响夹竹桃麻素药物干预小鼠的正常脂代谢、NOX2 蛋白表达下降、肝组织内三酰甘油和高密度脂蛋白胆固醇浓度下降[16]。为此,本研究基于 NOX4/ROS 信号通路,分析沉默 EFHD2 对脂代谢重编程及乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,探讨 EFHD2 对乳腺癌细胞免疫逃逸的作用机制,为乳腺癌病情诊断和治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞

人乳腺癌细胞 MDA-MB-23、MCF-7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,货号:CL-0150、CL-0149。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、MCF-7 细胞专用培养基、

MEM(含 NEAA)培养基(Procell,货号:PM150210、CM-0149、PM150410);胎牛血清(Vivacell,货号:C04001-500);双抗(上海源培,货号:S110JV);CCK8 试剂盒(Biosharp,货号:BS350B);Annexin V-APC 双染细胞凋亡检测试剂盒(凯基,货号:KGA1030);活性氧检测试剂盒(碧云天,货号:S0033S);胰酶(+EDTA)(上海源培,货号:S310JV);胰酶(-EDTA)(Bomei,货号:BMB1127);慢病毒(汉恒生物);总蛋白、ATP、乳酸(LD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A045-2-1、A095-1-2、A019-2-1);Molpure ® Cell/Tissue Total RNA Kit(YEASEN 公司,货号:19221ES50);PrimeScript RT reagent Kit(宝日医生物技术有限公司,货号:RR047A);TB Green TM Premix Ex TaqTM Ⅱ(宝日医生物技术有限公司,货号:RR820A);DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司,货号:ZLI-9018);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0009);Western blot 相关 β-actin、MMP-2、NOX4 抗体(abclonal,货号:AC026、A6247、A11274);Cleaved caspase-3 抗体(Cell Signaling,货号:9661);二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)HRP(Affbiotech,货号:S0001)。

电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司,型号:DZKW-4);高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:KZ-III-F);酶标仪(美谷分子仪器有限公司,型号:SpectraMAX Plus384);UV752N 紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司,型号:UV752N);台式低温离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司,型号:TDZ4-WS);CO_2 培养箱(Thermo,型号:311);流式分析仪(Beckman,型号:Cytoflex);压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂,型号:DSX-280B);超净工作台(力康精密科技有限公司,型号:OptiClean 1300);实时荧光定量(RT-PCR)仪(ThermoFisher,型号:QuantStudio TM3);旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司,型号:XH-B);垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY-SCZ4+);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY200C);数显水平摇床(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:DS-H200);荧光图像分析系统(Tanon,型号:5200 Multi)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

快速解冻乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 和 MCF-7,然后用 DMEM 完全培养基(加入 10% 胎牛血清和 1%青霉素-链霉素)培养,调节细胞密度为 3×10^4/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养。

1.3.2 慢病毒感染及分组

沉默 EFHD2 表达的慢病毒(EFHD2-shRNA)及其对照慢病毒(NC-shRNA)由上海汉恒生物科技有限公司负责构建。将细胞随机分为 NC-shRNA 组和 EFHD2-shRNA 组,将对数生长的细胞经胰酶消化并制成 3×10^4/mL 的细胞悬液,分别吸取 2 mL 细胞悬液置于 6 孔板中,将感染试剂与完全培养基混合并预留加入病毒液体积,根据病毒滴度,加入相应病毒量,按照分组感染,37 ℃、5% CO_2 恒温培养。感染后 24 h 后用完全培养基进行换液,37 ℃、5% CO_2 恒温培养 48 h。根据分组,吸取上层清液于对应编号的离心管中备用,PBS 洗涤细胞 1 次,吸弃上清。胰酶消化,于 37 ℃下消化至细胞边缘离壁,加入已收集的细胞上清液终止消化并收集于对应离心管中,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清液,加入适量 PBS 洗涤并将悬液转移至 1.5 mL 尖底 EP 管中,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清,获得细胞沉淀,用于 PCR 验证。

1.3.3 CCK8 检测细胞增殖活性

取转染后的 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞,PBS 洗涤,胰酶消化后培养为细胞悬液,调节细胞密度 5×10^4/mL,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,37 ℃、5% CO_2 恒温培养。培养 24 h 后,吸弃上清。无血清培养基 1∶10 稀释 CCK8 试剂,加入已稀释 CCK8 工作液每孔 110 μL;37 ℃、5% CO_2 培养 2 h。测定 450 nm 波长处各孔的吸光值。

1.3.4 平板克隆实验检测细胞集落形成能力

将细胞悬液以每皿 1800 个细胞密度分别接种于含 2 mL 37 ℃预热培养液的 35 mm 皿中,轻轻吹打,使细胞分散均匀;37 ℃、5% CO_2 恒温培养。结晶紫染色后在显微镜下观察到单个细胞长到 50 个以上细胞克隆,6 孔板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 轻柔洗涤 2 次。加入纯乙醇,固定 30 min 后,去除固定液,PBS 洗涤 1 次,吸除上清液,0.1%结晶紫染色 15~20 min,PBS 洗去多余结晶紫,空气干燥,收集拍照采集图像,用肉眼直接计数克隆。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移

在 6 孔板背后用每隔约 0.5~1 cm 画一道横

线,每孔至少穿过 5 条线。待细胞长满至单层,200 μL 移液枪垂直于背后横线划痕;PBS 洗涤 2 次,37 ℃、5% CO_2 恒温培养 24 h。0、24 h 时间点取样,50 倍镜跟踪拍摄各孔细胞划痕状态。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞侵袭

用预温的无血清培养基重悬细胞,调节细胞密度 2×10^5/mL。在下室(即 24 孔板底部)板中加入 600 μL 含 20% FBS 的完全培养基,将小室放入板中;在 Transwell 小室中加入 200 μL 的细胞悬液,放于孵箱中继续培养 24 h,固定上室细胞,以结晶紫染色后在光学显微镜下观察各组上室图像,经 Image J 软件分析定量其每组数目,即为每组侵袭数。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡及 ROS 水平

细胞胰酶(不含 EDTA)消化,250 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤转移,250 r/min 离心 5 min,吸弃上清,获得细胞沉淀。细胞凋亡检测用 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V、5 μL 的 PI 混匀避光反应 15 min,上机检测分析。ROS 检测每管加入 1 mL 的 10 μmol/L DCFH-DA 稀释液,37 ℃孵育 20 min,3~5 min 颠倒混匀 1 次,350 r/min 离心 5 min,吸弃上清,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次。阳性对照组装载探针加入 1 mL 的 Rosup 稀释液(1∶1000),37 ℃孵育 30 min,洗涤 3 次,350 r/min 离心 5 min,吸弃上清,加入 PBS 重悬,上机检测分析。

1.3.8 qRT-PCR 检测 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH mRNA 的表达

按照制造商的说明,使用 TRIzol 试剂从细胞中提取 RNA,逆转录获得 cDNA,使用 Fast SYBR® Green Master Mix 和实时荧光定量(RT-PCR)仪进行 qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量,以 GAPDH 作为内参。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜索基因全序列,使用 Primer Premier 引物设计软件设计筛选各基因特异性引物,相关基因的引物序列信息如表 1 所示。

1.3.9 Western blot 检测 Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 的表达

提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,然后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,孵一抗(Cleaved caspase-3、MMP-2、NOX4 抗体 1∶1000 稀释;β-actin 抗体 1∶50 000 稀释)4 ℃过夜,孵辣根过氧化物酶标记二抗 IgG(1∶5000 稀释)室温 1.5 h,用 ECL 化学发光试剂盒显影,β-actin 作为内参,用 Tanon 荧光图像分析系统软件 V2.0 对条带进行曝光,结果以 Gel-Pro analyzer4 软件扫描曝光结果,并以目的蛋白积分光密度(IOD)表示。

1.4 统计学方法

各组数值均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,用 Graphpad prism 8.0 软件进行绘图。两组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐用最小差数(LSD)法比较,方差不齐用 Tamhane's 比较,以 $P<0.05$ 作为评定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞行为学的影响

2.1.1 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞增殖的影响

采用免疫荧光的进行 shRNA 下调 EFHD2 的序列设计蛋白表达的验证,同时设计观察 2~3 条 EFHD2-shRNA 干扰效率(图 1A)。EFHD2-shRNA2 构建沉默 EFHD2 表达的载体及对应空载体,用慢病毒感染乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 及 MCF-7,并通过 qRT-PCR 实验验证各组细胞中 EFHD2 的表达情况,结果显示,与 NC-shRNA 组比较,MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的 EFHD2-shRNA 组中 EFHD2 mRNA 的表达均显著下调($P<0.05$),表明转染成功(图 1B)。通过 CCK8 检测细胞增殖活力发现 EFHD2-shRNA 组的细胞存活率较其对照组明显降低($P<0.01$)(图 1C),平板克隆形成实验结果表明与 NC-shRNA 组相比沉默 EFHD2 的 EFHD2-shRNA 组细

表 1 qRT-PCR 检测基因的引物序列

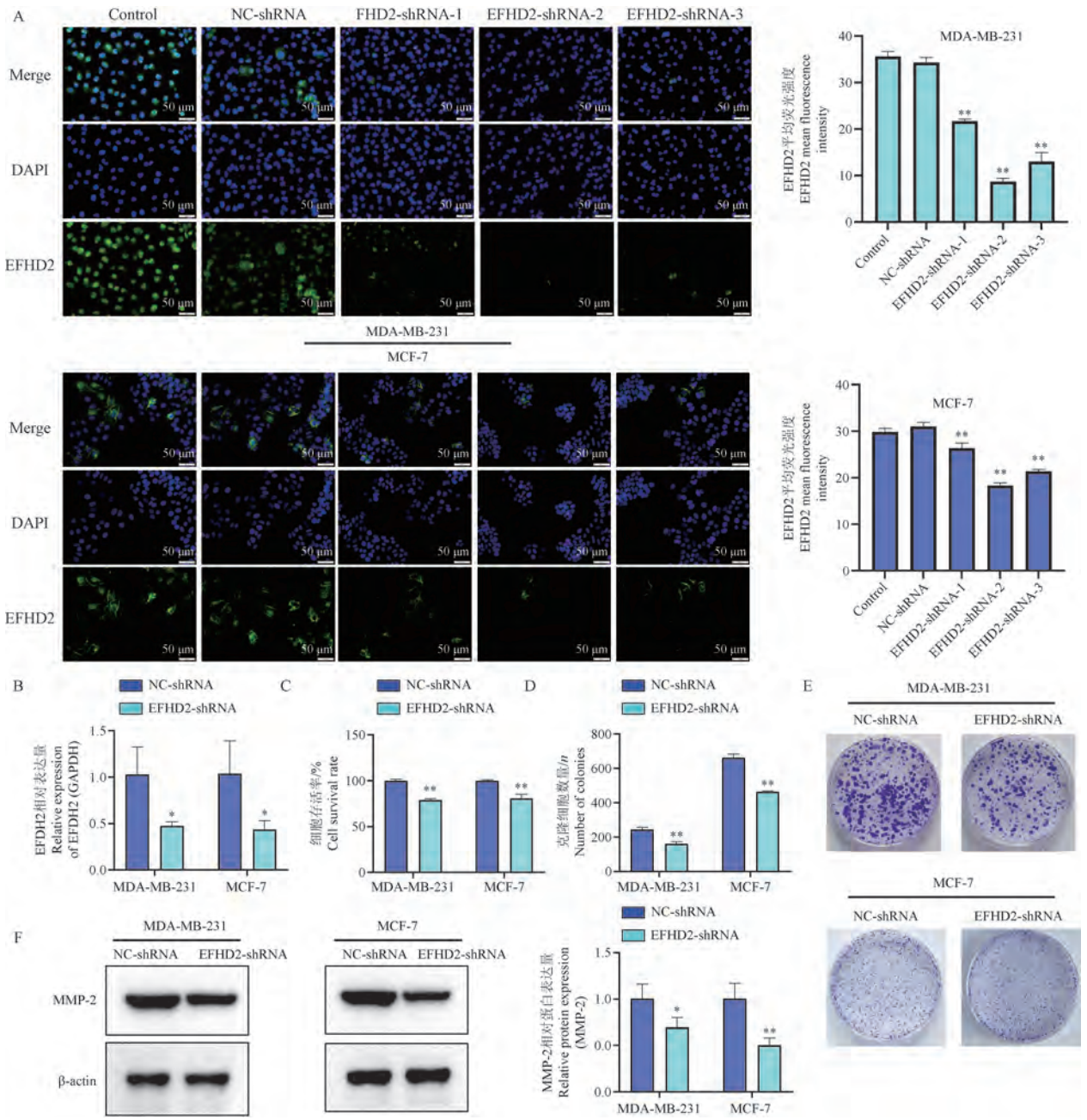
Table 1 Primer sequences of genes detected by qRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GAPDH	F:TGACTTCAACAGCGACACCCA; R:CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA
EFDH2	F:GACATGGAGAAGATGTTCAAGC; R:TCCATCATGAGTTTTAGCTCCA
GLUT1	F:ATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATG; R:AGCACCACAGCGATGAGGATG
LDH	F:AGGTGATCAAACTCAAAGGCTA; R:CCCAAAATGCAAGGAACACTAA
PDH	F:AAGAGAACTAGAACGGCTGAAA; R:CATCTCCAAATGCCCTAAATGG
PDK1	F:GCCACTATGGAACACCATGCCAACAG; R:AACGCCACCTCCTCGGTCACTCAT
PFK1	F:TTGTCCATGAGGGTTATCAAGG; R:ATGACACAGAGATTGGTGATCC
PKM2	F:ACTGGCATCATCTGTACCATTG; R:AGCCACATTCATTCCAGACTTA

胞的集落形成明显减弱($P<0.01$)(图 1D、1E);通过 Western blot 实验检测 MMP2 的表达,2 结果显示,与 NC-shRNA 组比较,MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的 EFHD2-shRNA 组中 MMP2 蛋白的表达均显著下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图 1F)。

2.1.2 EFHD2 沉默对乳腺癌细胞凋亡的影响

慢病毒转染 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞后用流式细胞术检测细胞凋亡,结果表明,与 NC-shRNA 组比较,沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组的细胞凋亡率明显上调($P<0.01$)(图 2A、2B);通过



注:A:免疫荧光检测 EFHD2-shRNA 干扰效率;B:qRT-PCR 检测 EFHD2 mRNA 的表达;C:CCK8 检测细胞增殖活性;D、E:结晶紫染色检测各组细胞集落生成;F:蛋白免疫印记实验检测 MMP2 蛋白的表达。与 NC-shRNA 组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

图 1 沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞中 EFHD2 的表达及细胞增殖的影响

Note. A, EFHD2-shRNA interference efficiency was measured by immunofluorescence. B, EFHD2 mRNA expression was detected by qRT-PCR. C, Cell proliferation activity was detected by CCK8 assay. D/E, Crystal violet staining was used to detect cell colony formation in each group. F, MMP2 protein expression was detected by Western blot. Compared with NC-shRNA group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 1 Effect of EFHD2 silencing on EFHD2 expression and cell proliferation in breast cancer cells

Western blot 实验检测细胞凋亡标志蛋白 Cleaved caspase-3 的表达发现，与 NC-shRNA 组相比，EFHD2-shRNA 组细胞中促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达明显升高（$P<0.05$）（图 2C）。

2.1.3　EFHD2 沉默对乳腺癌细胞迁移及侵袭的影响

通过划痕实验和 Transwell 实验分别检测细胞迁移及侵袭，结果发现与 NC-shRNA 组比较，沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组的细胞迁移距离与侵袭数降低（$P<0.01$）（图 3A、3B）。通过 Western blot 实验检测与细胞迁移及侵袭相关的蛋白 MMP-2 的表达发现，与 NC-shRNA 组相比，EFHD2-shRNA 组 MMP-2 蛋白的表达在 MDA-MB-231 细胞中显著下调（$P<0.05$），在 MCF-7 细胞中明显下调（$P<0.01$）（图 3C）。

2.2　EFHD2 沉默对乳腺癌细胞代谢重编程的影响

利用生化试剂盒检测乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中乳酸及 ATP 的含量，结果表明与 NC-shRNA 组比较，沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组中乳酸的含量明显降低，ATP 的含量明显升高（$P<0.01$）（见图 4）。

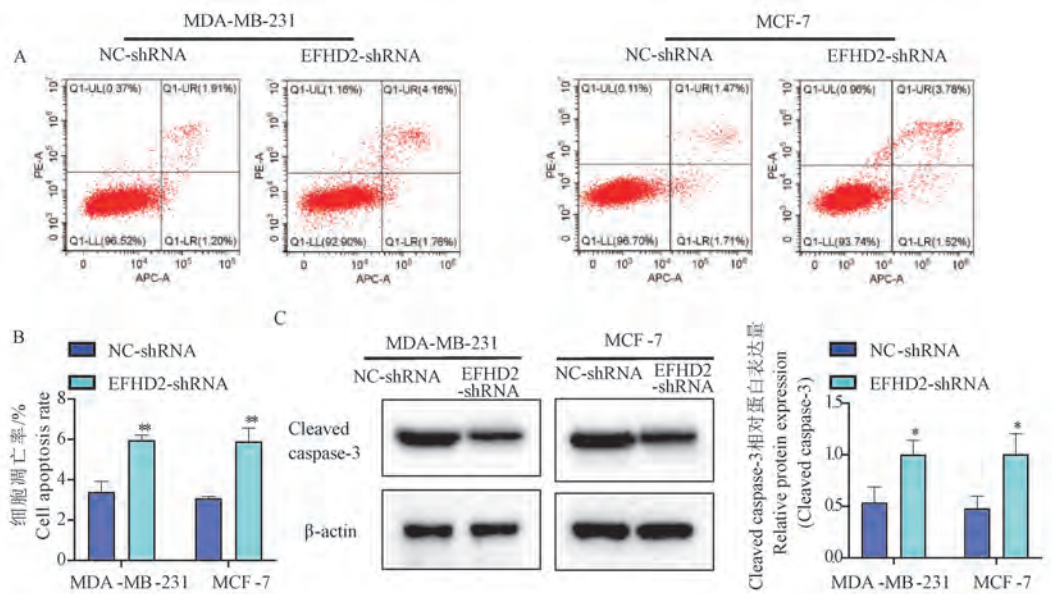
利用 qRT-PCR 实验检测乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中与代谢重编程调控的相关代谢酶 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2、PDH、LDH 的表达，结果表明与 NC-shRNA 组比较，沉默 EFHD2 表达的 EFHD2-shRNA 组中 GLUT1、PDK1、PFK1、PKM2 及 LDH mRNA 的表达明显降低，PDH 的表达明显升高（$P<0.05$）（见图 5）。

2.3　EFHD2 沉默对 NOX4/ROS 通路的影响

通过流式细胞术检测 ROS 的水平发现，与 NC-shRNA 组相比，EFHD2-shRNA 组的 ROS 含量明显降低（$P<0.01$）（图 6A、6B）；通过 Western blot 实验检测 NOX4 的表达发现，沉默 EFHD2 后 NOX4 蛋白在乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中的表达明显下调（$P<0.01$）（图 6C）。

3　讨论

机体免疫系统具有免疫监视功能，免疫系统能够识别并通过免疫机制抵御肿瘤的发生发展[17]。原发性和转移性肿瘤是一个复杂的生态系统，由肿瘤细胞、细胞外基质和肿瘤基质（非肿瘤细胞）组成，其中包括特异性间充质支持细胞、内皮细胞和浸润的炎症免疫细胞[18]。癌细胞和辅助细胞之间的串扰促进和塑造了肿瘤的发展，从而导致肿瘤免疫逃避发生、发展[19]。近年来，肿瘤细胞合成代谢和分解代谢均发生了适应性变化，即“代谢重编程”

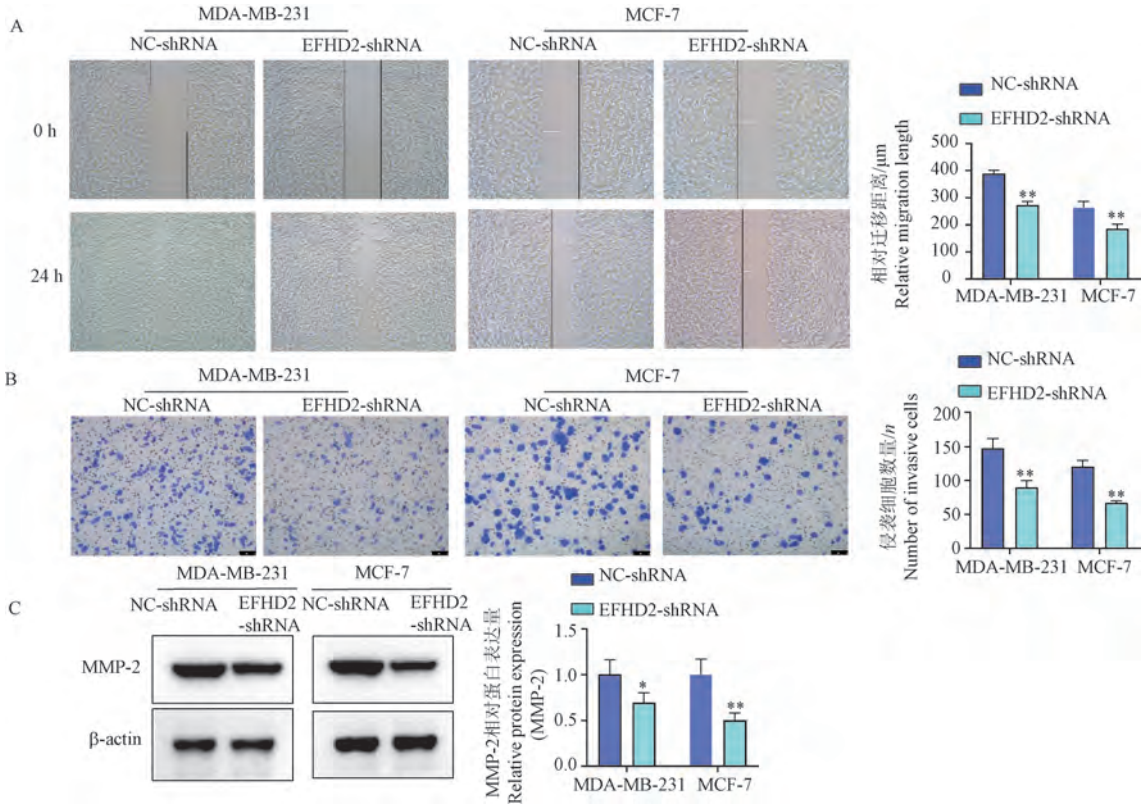


注：A、B：流式检测细胞凋亡的结果；C：Western blot 检测细胞凋亡标志蛋白 Cleaved caspase-3 的表达。与 NC-shRNA 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 2　沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞凋亡的影响

Note. A/B, Results of cell apoptosis detected by flow cytometry. C, Western blot was used to detect the expression of Cleaved caspase-3. Compared with NC-shRNA group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2　Effect of silencing EFHD2 on apoptosis of breast cancer cells

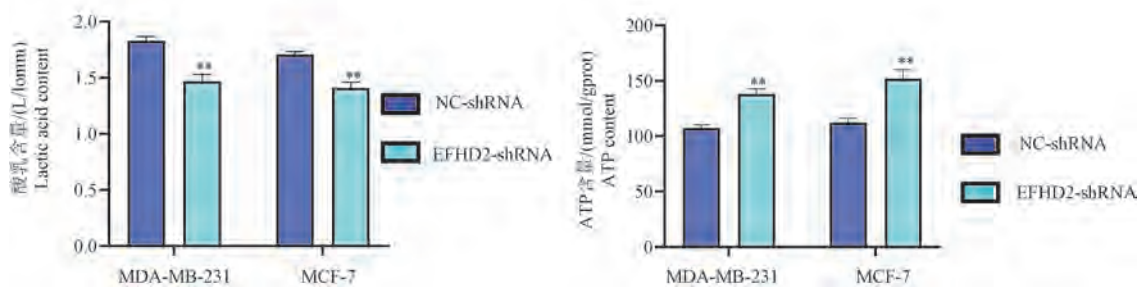


注:A:划痕实验检测各组细胞迁移;B:Transwell 实验检测各组细胞侵袭;C:Western blot 检测细胞迁移及侵袭相关蛋白 MMP-2 的表达。与 NC-shRNA 组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

图 3 沉默 EFHD2 对乳腺癌细胞迁移及侵袭的影响

Note. A, Scratch test was used to detect cell migration in each group. B, Transwell assay was used to detect cell invasion in each group. C, Western blot was used to detect the expression of MMP-2, a protein related to cell migration and invasion. Compared with NC-shRNA group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 3 Effect of silencing EFHD2 on migration and invasion of breast cancer cells



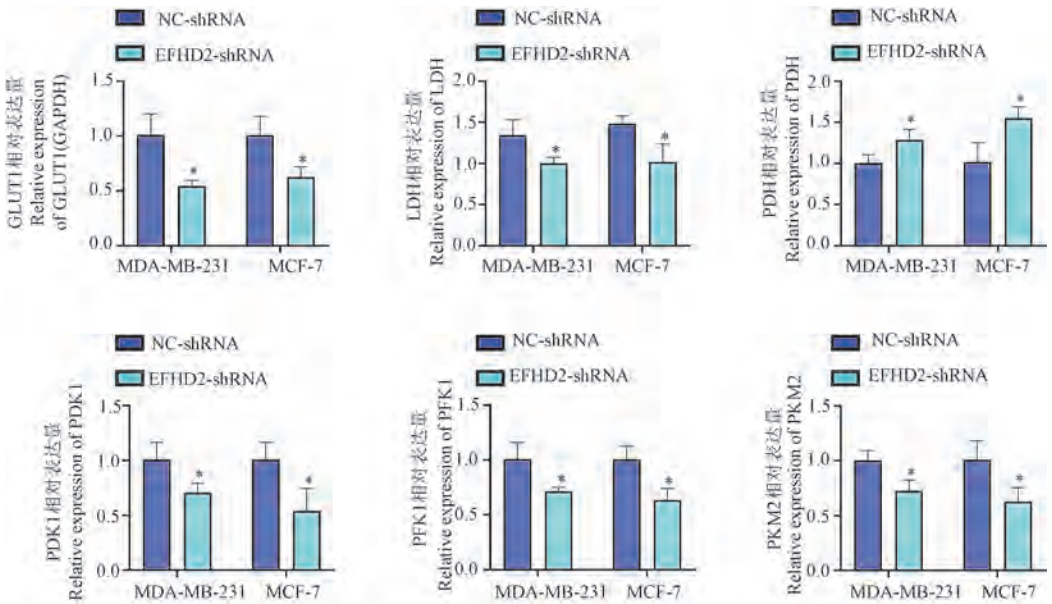
注:与 NC-shRNA 组比较, $^{**}P<0.01$。

图 4 各组乳腺癌细胞中乳酸及 ATP 的含量比较

Note. Compared with NC-shRNA group, $^{**}P<0.01$.

Figure 4 Comparison of lactate and ATP contents in breast cancer cells of each group

为肿瘤免疫治疗提供了新思路[19]。代谢重编程是指细胞对能量来源偏好(葡萄糖、脂肪酸或酮类)的改变,包括有氧糖酵解增强、葡萄糖摄取和消耗增加、脂类和蛋白质合成加强,以及谷氨酰胺摄取和分解代谢增加,满足肿瘤快速增殖的需求[20]。Warburg 效应是肿瘤细胞在氧气充足的条件下仍以糖酵解的方式代谢葡萄糖和产生乳酸,使肿瘤微环境呈现缺氧、低 pH 和代谢物蓄积的特征,促进了肿瘤微环境的免疫抑制能力和免疫逃逸的发生[21]。糖酵解(glycolysis)是指在无氧条件下,葡萄糖在细胞质中被分解成为丙酮酸的过程,其中丙酮酸脱氢酶(PDH)、乳酸脱氢酶(LDH)和 M2 型丙酮酸激酶

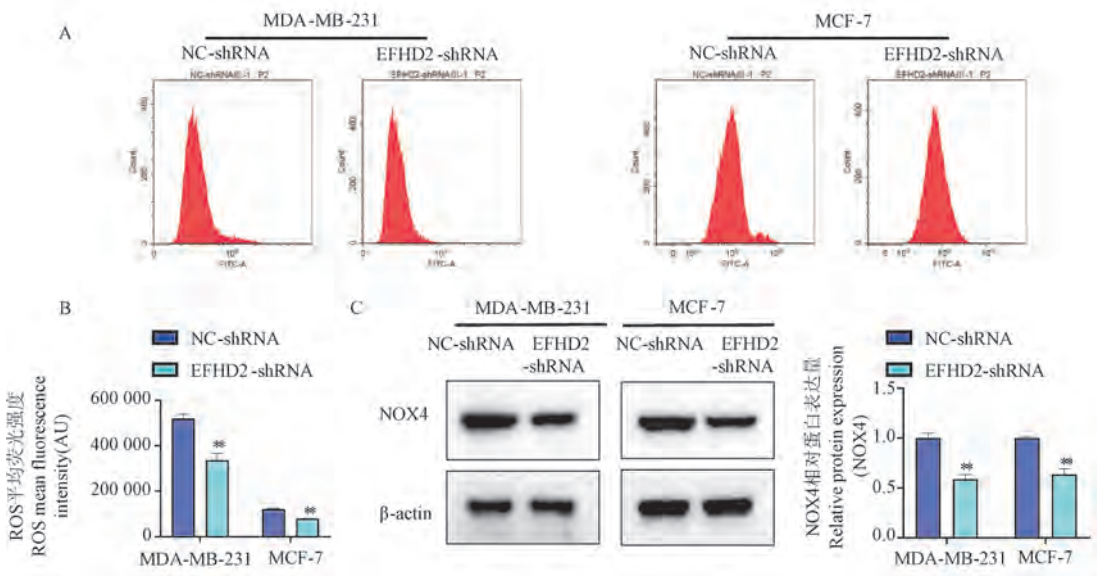


注：与 NC-shRNA 组比较，$^{*}P<0.05$。

图 5　qRT-PCR 实验检测 GLUT1、LDH、PDH、PDK1、PFK1 和 PKM2 mRNA 的表达

Note. Compared with NC-shRNA group, $^{*}P<0.05$.

Figure 5　qRT-PCR assay to detect mRNA expression of GLUT1, LDH, PDH, PDK1, PFK1 and PKM2



注：A、B：流式细胞术检测 ROS 的结果；C：Western blot 检测 NOX4 蛋白的表达。与 NC-shRNA 组比较，$^{**}P<0.01$。

图 6　沉默 EFHD2 对 NOX4/ROS 通路的影响

Note. A/B, Results of ROS detection by flow cytometry. C, Western blot analysis of NOX4 protein expression. Compared with NC-shRNA group, $^{**}P<0.01$.

Figure 6　Effect of silencing EFHD2 on the NOX4/ROS pathway

(M2 pyruvate kinase, PKM2)是糖降解过程中重要的代谢酶[22]。研究表明 PKM2 的高表达在肿瘤的增殖、侵袭转移中起重要作用[23]。丙酮酸脱氢酶 1(pyruvate dehydrogenase 1, PDK1)是糖酵解限速酶，脂肪组织缺氧时细胞代谢向无氧糖酵解转化，PDK1 表达升高[24]。葡萄糖转运子 1(glucose transporter 1, GLUT1)是巨噬细胞葡萄糖转运子亚型，在促进巨噬细胞激活和炎症反应中发挥重要作用[25]。本研究结果发现在乳腺癌细胞 MDA-MB-23 及 MCF-7 中沉默 EFHD2 的表达会下调糖降解相关 GLUT1、

PDK1、PFK1、PKM2 和促乳酸生成的 LDH 及乳酸的水平,并上调促进丙酮酸脱羧的 PDH 及能量来源 ATP 的水平,揭示沉默 EFHD2 可促进能量代谢及糖代谢,降低乳酸生成并促进丙酮酸降解。

EFHD2 是一种具有两个 EF 手形蛋白结构域的钙结合蛋白[26]。体内研究表明,EFHD2 可能与多种肿瘤的免疫浸润和肿瘤耐药相关。例如,一项早期的研究报道,EFHD2 通过增加 Rho 家族的 GTP 酶信号传导来刺激癌症的侵袭和转移[27]。最近的一项研究表明,它可能参与非小细胞肺癌的耐药和上皮-间充质转化[11],并通过细胞骨架重塑影响巨噬细胞的迁移[28]。目前,EFHD2 在癌细胞侵袭和转移方面的重要作用引起了科研学者的关注。研究发现 EFHD2 在肺腺癌中高表达,可促进肺腺癌细胞迁移、侵袭,也能促进 EMT,且其表达与肺腺癌患者术后复发显著相关,是患者预后的独立预测因子[29]。EFHD2 高表达与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)患者化疗后的低总生存率相关,EFHD2 过表达增加了顺铂耐药,而 EFHD2 沉默增加了细胞对顺铂的敏感性,其机制与 EFHD2 诱导 NOX4 产生,增加细胞内 ROS 生成,促进药物外排有关[11]。然而,迄今为止,EFHD2 在乳腺癌中的表达及对乳腺癌发生发展的影响尚未见文献报道。本研究结果表明沉默 EFHD2 可减少乳腺癌细胞的集落生成及细胞侵袭数,缩短细胞迁移距离,并使细胞凋亡增多,揭示 EFHD2 在乳腺癌中可通过抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、迁移及侵袭从而加重癌的发生和进展。

与正常细胞相比,癌细胞由于原癌基因激活、代谢异常和线粒体功能紊乱等原因,需要更高浓度的抗氧化酶和 GSH 来控制活性氧(reactive oxygen species,ROS),以此逃逸凋亡来维持其恶性表型[30]。线粒体是 ROS 和 ATP 产生的主要场所,当线粒体 DNA 发生突变,线粒体呼吸链合成 ATP 效率降低,ROS 含量升高,导致生物大分子(脂质、蛋白质和 DNA)氧化损伤,增加遗传不稳定性,诱发恶性肿瘤[31-32]。因此,干预癌细胞代谢重编程和线粒体 ROS 产生过程是干预肿瘤细胞免疫逃逸的新思路。NOX4 是 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase,NOX)家族成员,是线粒体内的一种新型能量传感器,可作为一个检查点,与线粒体能量代谢及癌细胞的耐药性有关[33]。有研究发现 NOX4 通过激活 ROS/PI3K 信号通路,刺激细胞产生多种因子,诱导了肿瘤相关巨噬细胞 M2 极化,从而促进 NSCLC 的转移。另外,NOX4 还可诱导 ROS 产生降低肺鳞癌细胞对顺铂的敏感性[34]。NOX4 过表达可诱导 ROS 生成,促进胶质母细胞的代谢重编程和 EMT 进程[35]。因此,NOX4/ROS 通路是肿瘤细胞能量代谢重编程和转移的重要机制。本研究结果发现沉默 EFHD2 可下调 NOX4 的表达,并抑制 ROS 生成,揭示沉默 EFHD2 后 NOX4/ROS 通路被抑制。

综上所述,沉默 EFDH2 可通过促进能量代谢,减少葡萄糖及乳酸堆积从而促进乳腺癌细胞凋亡,抑制细胞增殖、迁移及侵袭,其机制与抑制 NOX4/ROS 信号通路活化相关。

参考文献:

[1] 刘璐, 赵燕乔, 王晓娜, 等. MiR-185-5p 影响小鼠乳腺癌 PY8119 细胞增殖、侵袭迁移的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(9): 1126-1132.
LIU L, ZHAO Y Q, WANG X N, et al. Effect of miR-185-5p on proliferation, invasion, and migration of mouse breast cancer PY8119 cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(9): 1126-1132.

[2] ZHANG L, CHEN W, LIU S, et al. Targeting breast cancer stem cells [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(2): 552-570.

[3] ZANNETTI A. Breast cancer: from pathophysiology to novel therapeutic approaches 2.0 [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2542.

[4] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment: a review [J]. JAMA, 2019, 321(3): 288-300.

[5] RIGGIO A I, VARLEY K E, WELM A L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer [J]. Br J Cancer, 2021, 124(1): 13-26.

[6] WANG R, ZHU Y, LIU X, et al. The Clinicopathological features and survival outcomes of patients with different metastatic sites in stage IV breast cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1091.

[7] JIANG J, JIANG S, AHUMADA-CANALE A, et al. Breast cancer screening should embrace precision medicine: evidence by reviewing economic evaluations in China [J]. Adv Ther, 2023, 40(4): 1393-1417.

[8] LEE J. Current treatment landscape for early triple-negative breast cancer (TNBC) [J]. J Clin Med, 2023, 12(4): 1524.

[9] DONAHUE P M C, MACKENZIE A, FILIPOVIC A, et al. Advances in the prevention and treatment of breast cancer-related lymphedema [J]. Breast Cancer Res Treat, 2023, 200(1): 1-14.

[10] ZHANG W Z, CHEN L L, YANG S, et al. Clinical characterization of EFHD2 (swiprosin-1) in Glioma-associated macrophages and its role in regulation of immunosuppression [J]. Genomics, 2023, 115(5): 110702.

[11] FAN C C, TSAI S T, LIN C Y, et al. EFHD2 contributes to

non-small cell lung cancer cisplatin resistance by the activation of NOX4-ROS-ABCC1 axis [J]. Redox Biol, 2020, 34: 101571.

[12] KANG Y, AMOAFO E B, ENTSIE P, et al. A role for platelets in metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1250982.

[13] 郭思佳, 周中源. 有氧运动抑制 Nox4/ROS/NF-κB/NLRP3 炎症信号通路激活减轻糖尿病 db/db 小鼠肾脏损伤的作用机制研究 [A]. 2023 年中国生理学会运动生理学专业委员会学术会议暨运动生理学专业委员会成立 20 周年庆祝大会论文集、南京医科大学康达学院; 连云港市妇幼保健 [C]. 2023.
GUO S, ZHOU Z Y. Study on the mechanism of aerobic exercise inhibiting the activation of Nox4/ROS/NF-κB/NLRP3 inflammatory signaling pathway to reduce renal injury in diabetic db/db mice [A]. Proceedings of the 2023 Academic Conference of the Exercise Physiology Professional Committee of the Chinese Physiological Society and the 20th Anniversary Celebration of the Establishment of the Exercise Physiology Professional Committee, Kangda College of Nanjing Medical University; Maternal and Child Health Care in Lianyungang [C]. 2023.

[14] SU X, YANG Y, YANG Q, et al. NOX4-derived ROS-induced overexpression of FOXM1 regulates aerobic glycolysis in glioblastoma [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1181.

[15] ZENG C, WU Q, WANG J, et al. NOX4 supports glycolysis and promotes glutamine metabolism in non-small cell lung cancer cells [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 101: 236-248.

[16] 崔玮, 崔迪, 欧阳婷, 等. 抑制 NOX 缓解酒精肝模型小鼠肝细胞损伤及脂代谢紊乱 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(35): 5589-5595.
CUI W, CUI D, OUYANG T, et al. Inhibiting NADPH oxidase alleviates hepatocellular injury and lipid metabolism disorder in a mouse model of alcoholic liver damage [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(35): 5589-5595.

[17] LIU X, SONG J, ZHANG H, et al. Immune checkpoint HLA-E: CD94-NKG2A mediates evasion of circulating tumor cells from NK cell surveillance [J]. Cancer Cell, 2023, 41(2): 272-287.

[18] GONZALEZ H, HAGERLING C, WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression [J]. Genes Dev, 2018, 32(19/20): 1267-1284.

[19] TSAI C H, CHUANG Y M, LI X, et al. Immunoediting instructs tumor metabolic reprogramming to support immune evasion [J]. Cell Metab, 2023, 35(1): 118-133.

[20] YANG K, WANG X, SONG C, et al. The role of lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment [J]. Theranostics, 2023, 13(6): 1774-1808.

[21] CHELAKKOT C, CHELAKKOT V S, SHIN Y, et al. Modulating glycolysis to improve cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2606.

[22] WU H, HUANG H, ZHAO Y. Interplay between metabolic reprogramming and post-translational modifications: from glycolysis to lactylation [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1211221.

[23] LI G, CHOI J E, KRYCZEK I, et al. Intersection of immune and oncometabolic pathways drives cancer hyperprogression during immunotherapy [J]. Cancer Cell, 2023, 41(2): 304-322.

[24] MA Y, ZHANG X, HAN X, et al. PDK1 regulates the progression of esophageal squamous cell carcinoma through metabolic reprogramming [J]. Mol Carcinog, 2023, 62(6): 866-881.

[25] WANG P, SUN J, SUN C, et al. BTF3 promotes proliferation and glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating GLUT1 [J]. Cancer Biol Ther, 2023, 24(1): 2225884.

[26] VUADENS F, RUFER N, KRESS A, et al. Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes [J]. Proteomics, 2004, 4(8): 2216-2220.

[27] HUH Y H, OH S, YEO Y R, et al. Swiprosin-1 stimulates cancer invasion and metastasis by increasing the Rho family of GTPase signaling [J]. Oncotarget, 2015, 6(15): 13060-13071.

[28] TU Y, ZHANG L, TONG L, et al. EFhd2/swiprosin-1 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 55: 263-271.

[29] FAN C C, CHENG W C, HUANG Y C, et al. EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14617.

[30] WANG R, LIANG L, MATSUMOTO M, et al. Reactive oxygen species and NRF2 signaling, friends or foes in cancer? [J]. Biomolecules, 2023, 13(2): 353.

[31] LIU Y E, SUN Y, GUO Y, et al. An overview: the diversified role of mitochondria in cancer metabolism [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(3): 897-915.

[32] LIU Y E, CHEN C, WANG X, et al. An epigenetic role of mitochondria in cancer [J]. Cells, 2022, 11(16): 2518.

[33] PEÑUELAS-HARO I, ESPINOSA-SOTELO R, CROSAS-MOLIST E, et al. The NADPH oxidase NOX4 regulates redox and metabolic homeostasis preventing HCC progression [J]. Hepatology, 2023, 78(2): 416-433.

[34] 张伟楠. 咪康唑通过抑制 PI3K/Akt/NOX4 通路诱导肺鳞癌细胞凋亡并增敏顺铂的机制研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2021.
ZHANG W N. Mechanism of miconazole inducing apoptosis and sensitizing cisplatin in lung squamous carcinoma cells by inhibiting PI3K/Akt/NOX4 pathway [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.

[35] SU X, YANG Y, GUO C, et al. NOX4-derived ROS mediates TGF-β 1-induced metabolic reprogramming during epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT/HIF-1 α pathway in glioblastoma [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5549047.

〔收稿日期〕2024-03-05

陶佳,何琳莉,王莉,等. 过表达 TFB1M 抑制肝癌细胞迁移和侵袭［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 76-82.
Tao J, He LL, Wang L, et al. Overexpression of TFB1M inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 76-82.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.009

过表达 TFB1M 抑制肝癌细胞迁移和侵袭

陶　佳[1,2],何琳莉[1,2],王　莉[1,2],戈鹏圣[3],蹇顺海[1,2*]

(1.川北医学院基础医学与法医学研究所,四川 南充　637100;2.川北医学院附属医院病理科,四川 南充　637100;
3.川北医学院附属医院肝胆外科,四川 南充　637100)

【摘要】　目的　分析线粒体转录因子 B1(transcription factor B1,mitochondrial,TFB1M)在肝癌细胞中的生物学作用,初步探讨其调控 HCC 恶性转移的分子机制。**方法**　基于 TCGA-LIHC(liver hepatocellular carcinoma)和 GEO 肝癌相关数据库分析 TFB1M 在肝癌中的表达水平及其与肝癌患者临床特征的关系;基于 TFB1M 表达水平中位值,将 TCGA-LIHC 样本分为 TFB1M 低表达组(n=170)和 TFB1M 高表达组(n=170),以高表达组为对照组,利用 GSEA 进行基因集富集分析;构建过表达 TFB1M 质粒,转染肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞。采用划痕愈合、Transwell 小室等检测过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响。**结果**　与正常肝组织相比,TFB1M 在肝癌组织中表达水平明显降低;且 TFB1M 表达水平与肝癌患者性别有关。GSEA 富集分析结果显示,TFB1M 低表达组主要与肝癌增殖增强基因集、肝细胞癌干性增强基因集和细胞外基质组装基因集有关。细胞生物学实验结果显示,与空载组相比,过表达 TFB1M 后,肝癌细胞迁移和侵袭能力均下降。**结论**　TFB1M 在肝细胞癌中呈显著低表达,过表达 TFB1M 能够显著抑制肝癌细胞迁移和侵袭。

【关键词】　肝细胞癌;线粒体转录因子 B1;细胞迁移;细胞侵袭
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0076-07

Overexpression of TFB1M inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion

TAO Jia[1,2], HE Linli[1,2], WANG Li[1,2], GE Pengsheng[3], JIAN Shunhai[1,2*]

(1. Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China.
2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637100.
3. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637100)

【Abstract】　Objective　To explore the biological effect of transcription factor B1, mitochondrial (TFB1M) on hepatocellular carcinoma (HCC) cells, and to explore the molecular mechanism of its regulation on malignant metastasis of HCC. **Methods**　The expression level of TFB1M in liver cancer and its relationship with clinical characteristics of patients with HCC was analyzed based on TCGA-LIHC and GEO databases. Based on the median expression level of TFB1M, the TCGA-LIHC samples were divided into low expression group of TFB1M (n=170) and high expression group of TFB1M (n=170), and GSEA was used for gene set enrichment analysis. The overexpressed TFB1M plasmid was constructed to transfect HepG2 and Huh7 cells. Cell migration and invasion were assessed by scratch healing and Transwell chamber assays. **Results**　The expression of TFB1M was significantly decreased in HCC, and the expression of TFB1M was related with gender in HCC. The results of GSEA analysis indicated that the low expression of TFB1M might be related to liver cancer subclass proliferation up gene set, stem cell hepatocellular carcinoma gene set, and extracellular matrix assembly gene set in HCC. Overexpression of TFB1M remarkably attenuated the migration and invasion activity of HCC cells. **Conclusions**　The expression of TFB1M was significantly decreased in HCC, and overexpression of TFB1M could attenuated the migration and invasion activity of HCC cells.

[**基金项目**]四川省科技计划项目(2018JY0501);南充市 2020 年市校科技战略合作专项(20SXQT0023)。
[**作者简介**]陶佳(1981—),女,硕士,研究方向:消化道恶性肿瘤临床病理研究。E-mail:taojia@nsmc.edu.cn
[**通信作者**]蹇顺海(1972—),男,硕士,副教授,研究方向:肿瘤病理学。E-mail:2051084695@qq.com

【Keywords】 hepatocellular carcinoma; TFB1M; cell migration; cell invasion
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝癌的发病率和死亡率位居消化系统恶性肿瘤第三位和第二位[1]。肝细胞癌是肝癌的主要亚型,约占肝癌的 85%~90%[1]。近年来随着乙型肝炎疫苗接种以及健康宣教的普及,我国肝细胞癌发病率开始出现下降趋势,但是肝细胞癌患者 5 年生存率仍然较低[2]。病毒感染、肝疾病以及生活方式与环境暴露是肝细胞癌发病的高危因素,但目前肝细胞癌发病机制仍不完全清楚。线粒体是 ATP 产生和活性氧产生的主要场所,其功能异常与恶性肿瘤的发生发展紧密相关[3]。此外,线粒体介导内源性凋亡异常、线粒体介导钙离子储存异常等,与肿瘤细胞凋亡抵抗直接相关[4-5]。线粒体转录因 B1(transcription factor B1, mitochondrial, TFB1M)是一个重要的线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)转录因子,其家族成员还包括 TFAM 和 TFB2M[6]。TFB1M 基因定位于染色体 6p14,蛋白质由 347 个氨基酸组成。有研究报道,新霉素致损 12 h,耳蜗听觉上皮细胞线粒体以及细胞核内 TFB1M 表达上调,提示 TFB1M 表达水平改变与听觉有关[7]。目前,TFB1M 在恶性肿瘤的研究报道较少。Mu 等[8]报道 TFB1M 在肝细胞癌中表达水平上调。基于此,深入研究 TFB1M 在肝细胞癌中的功能作用具有重要临床意义。本研究采用转染真核重组质粒过表达 TFB1M 水平,划痕愈合实验和 Transwell 小室实验检测肝癌细胞迁移和侵袭活性,结合生物信息学探讨 TFB1M 在肝癌细胞迁移过程中的功能作用,从而为肝细胞癌的发病机制提供理论基础,也为肝细胞癌治疗提供潜在作用靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞

人类肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞为本实验保存。用含 10%胎牛血清和 1%青链霉素的 DEME 培养基,于 5% CO_2 培养箱 37 ℃常规培养。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(Gibco, 12800017);胎牛血清(vivacell, C2830-0500);Lipofectamine 8000 转染试剂(碧云天, C0533);RNAiso Plus(TaKaRa, 9108);PrimeScript™ RT Master Mix(TaKaRa, RR036A);TB Green Premix EX Taq™ Ⅱ(TaKaRa, RR091A);TFB1M 抗体(Abclonal, A15231);alpha-Tubulin 抗体(Proteintech, 11224-1-AP);HRP 偶联的二抗(Proteintech, SA00001-2);Transwell 小室(Corning, CLS3422)。倒置显微镜(Olympus);细胞培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);定量 PCR 仪(Bio-Rad);高速冷冻离心机(eppendorf);超低温冰箱(eppendorf);超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 公共数据获取及功能富集分析

从 GDC 官网下载癌症基因组数据(the cancer genome atlas, TCGA)中肝细胞癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)转录组数据。通过 limma 包筛选差异表达基因。TCGA-LIHC 数据集纳入本研究肝癌样本 340 例,正常样本 50 例。GEO 官网搜索 GSE14520 和 GSE22058 肝癌数据集,下载转录组数据。下载基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)软件并安装。以 TFB1M 中位表达水平为分界线,将肝癌患者分为 TFB1M 低表达组和 TFB1M 高表达组。将上述两组的表达矩阵上传至软件,运行 GSEA。

1.3.2 细胞培养和细胞转染

用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于细胞培养箱常规培养肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞。待细胞处于对数生长期时,进行转染,步骤按照脂质体说明书进行。本研究实验分 2 组:空载组(转染空载质粒)和 TFB1M 过表达组(转染 TFB1M 真核重组质粒)。TFB1M 真核重组质粒和空载质粒由通用生物构建并提供。

1.3.3 qRT-PCR

提取 RNA, cDNA 合成步骤参照试剂盒说明书进行。采用 TB Green Premix 完成 PCR 扩增实验。扩增条件如下:95 ℃预变性 10 min;95 ℃变性 10 s,60 ℃复性和延伸 30 s,共计 40 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达水平。引物由生工合成,见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
TFB1M	上游(Forward):TTGCAGCCAATACAGGAAGC
	下游(Reverse):TGGGCTGTATCAAGGGAGTG
β-actin	上游(Forward):TGGCACCACACCTTCTACAA
	下游(Reverse):CCAGAGGCGTACAGGGATAG

1.3.4 免疫印迹(Western blot)

按照 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。采用 SDS-PAGE 进行垂直电泳,转膜,封闭。一抗 4 ℃孵育过夜(TFB1M(1∶800);tubulin(1∶5000)),TBST 清洗 3 次;二抗(1∶10 000)常温孵育 1 h,TBST 清洗 3 次。ECL 发光液孵育,曝光,拍照保存。

1.3.5 划痕愈合实验

取适量细胞接种于 6 孔板,待细胞处于对数生长期时,进行细胞转染。转染 6 h 后,用 100 μL 无菌枪头划痕,换无血清培养基培养,并将此时记为 0 h。分别在 0 h 和 72 h 采用倒置显微镜拍照。

1.3.6 Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭

细胞迁移实验:取适量细胞接种于 6 孔板,待细胞处于对数生长期时,进行细胞转染。转染 24 h 后,常规收集细胞,用 100 μL 无血清培养液重悬 10 000 个细胞,接种于 Transwell 上室。下室加入 600 μL 含 10%胎牛血清的细胞培养基。36 h 后,用棉棒擦除 Transwell 膜上表面的细胞,4%多聚甲醛固定 10 min,0.1%结晶紫染色 20 min,自来水冲洗,拍照。细胞侵袭实验:提前向 Transwell 上室铺 50 μL 基质胶,细胞培养箱孵育 4 h 后,弃液体。加入 100 μL 无血清培养基,细胞培养箱孵育 30 min 后,弃液体。后续步骤与细胞迁移步骤相同。

1.4 统计学方法

所有数据使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析,以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间比较采用非配对 t 检验,$P<0.05$ 为差具有统计学意义。

2 结果

2.1 TFB1M 在肝细胞癌中呈低表达

利用 TCGA-LIHC 数据库,分析 TFB1M 在 340 例肝癌组织中的表达水平。结果发现,与癌旁组织相比,TFB1M 在肝癌组织中表达水平显著降低($P<0.01$,图 1)。此外,与男性肝癌患者相比,TFB1M 在女性肝癌患者癌组织中表达水平显著降低($P<0.05$),而 TBF1M 表达水平与年龄、TNM 分期、Grade 分级等因素无关(表 2)。接下来,本研究利用 GSE14520 和 GSE22058 数据集再次验证 TFB1M 在肝细胞癌中的表达水平。与 TCGA 数据结果一致,TFB1M 在肝癌组织中表达水平均显著降低(均 $P<0.05$,图 1)。上述研究结果表明,TFB1M 在肝细胞癌中表达水平下调,且 TFB1M 表达水平与肝癌患者性别有关。

2.2 转染重组质粒对肝癌细胞 TFB1M 表达水平的影响

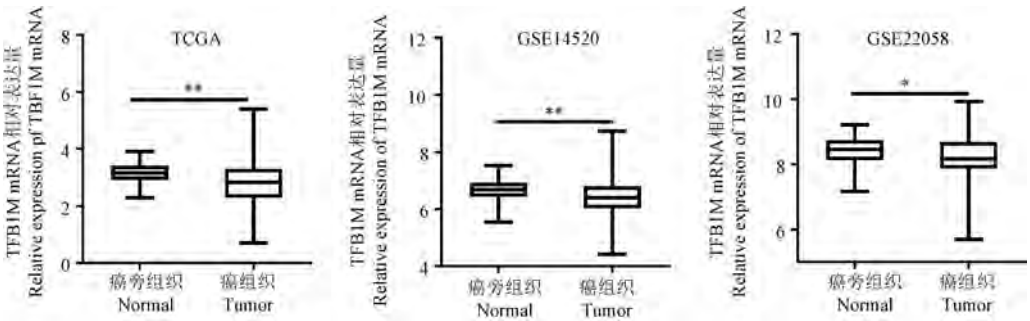
人类蛋白谱图(human protein atlas,HPA)数据库结果显示,TFB1M 在 24 种肝癌细胞系中表达水平不同,其中 TFB1M 在 HepG2 细胞系中表达水平较高,而在 Huh-7 细胞系中表达水平较低(图 2A)。基于此,本实验中挑取 HepG2 和 Huh-7 完成后续实验。如图 2B 所示,重组质粒经 SacI-XhoI 酶切后,获得的条带约 1124/5264 与预期 1124/5264 大小一致。酶切结果表明获得了含 TFB1M 基因全长的重组质粒。此外,对重组质粒进行双向测序表明质粒构建成功,碱基序列正确(图 2C)。

在肝癌 HepG2 和 Huh7 细胞中,与相应的空载组相比,转染 TFB1M 重组质粒 48 h 后,过表达 TFB1M 组 TFB1M mRNA 表达水平升高,分别升高(107.4±2.078)倍、(63.51±4.746)倍,差异均具有统计学意义(均 $P<0.01$,图 2D)。此外,免疫印迹也证实在 HepG2 和 Huh7 细胞中,转染重组质粒能够显著升高 TFB1M 蛋白水平(图 2E)。上述结果表明,过表达 TFB1M 重组质粒构建成功,且转染 TFB1M 真核重组质粒能够显著升高肝癌细胞中 TFB1M 表达水平。

表 2 TFB1M 表达与肝癌患者临床特征的关系

Table 2 Relationship between the expression of TFB1M and clinical factors in HCC

临床因素 Clinical factor	例 Case	TFB1M mRNA 表达量($\bar{x}\pm s$) mRNA expression of TFB1M($\bar{x}\pm s$)	P
性别 Gender			
男 Male	232	2.875±0.048	0.026
女 Female	108	2.684±0.072	
年龄(岁)Age(years)			
<60	157	2.861±0.059	0.837
≥60	163	2.775±0.054	
TNM 分期 TNM stage			
1+2	239	2.863±0.047	0.163
3+4	81	2.729±0.087	
T 分期 T stage			
T1+T2	252	2.844±0.046	0.206
T3+T4	88	2.729±0.078	
N 分期 N stage			
N0	238	2.812±0.048	0.938
N1+N2	102	2.819±0.074	
远端转移 Distant metastasis			
M0	243	2.808±0.046	0.8
M1	97	2.830±0.080	
Grade 分级 Grade classification			
1+2	214	2.864±0.052	0.224
3+4	121	2.762±0.063	

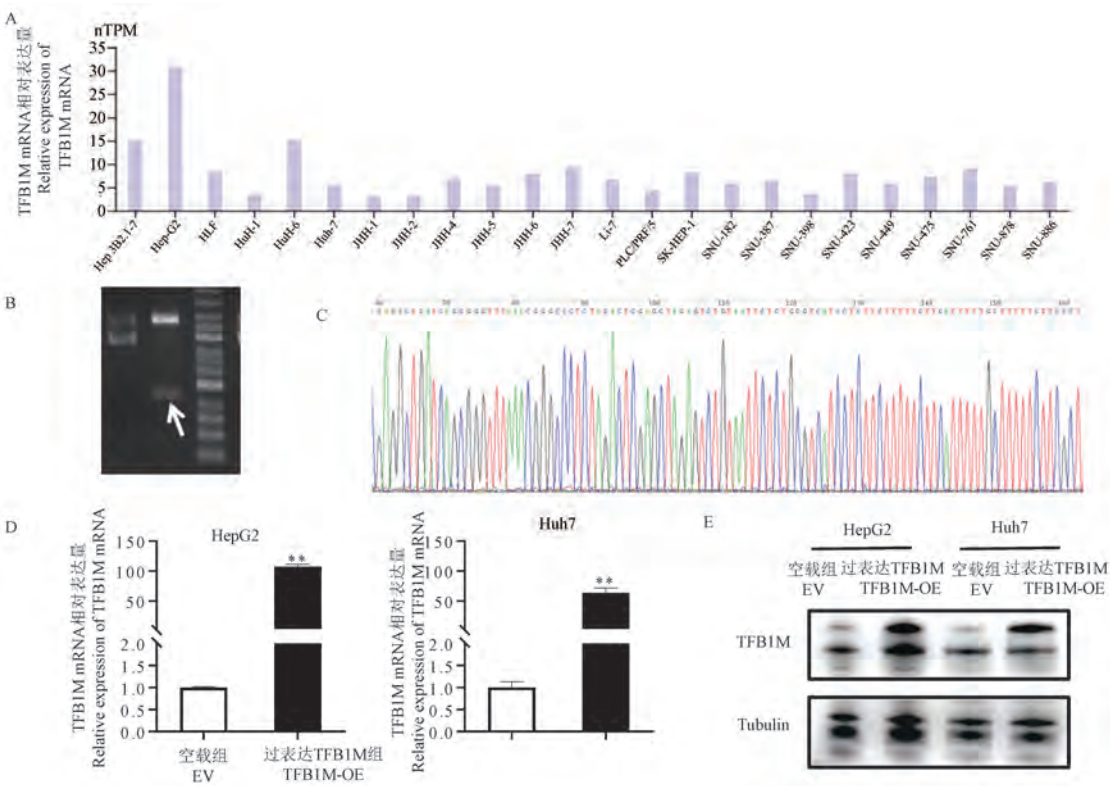


注：与癌旁组织组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 1　公共数据分析 TFB1M 在肝细胞癌中的表达水平

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

Figure 1　Analysis the expression of TFB1M in HCC via public datasets



注：A：HPA 数据库显示 TFB1M 在 24 种不同肝癌细胞系中表达水平；B：重组质粒经双酶切显示质粒构建正确，白色箭头指示双酶切后形成的 TFB1M 基因全长条带；C：重组质粒测序峰图；D：qPCR 检测 TFB1M mRNA 表达水平；E：Western blot 检测 TFB1M 蛋白水平。与空载组相比，$^{**}P<0.01$。

图 2　肝癌细胞中过表达 TFB1M 重组质粒验证

Note. A, HPA data showed the expression of TFB1M in 24 HCC cell lines. B, Enzyme digestion of the recombinant plasmid showed that the plasmid was constructed correctly and the white arrows indicated the full-length TFB1M band. C, Sequencing peak map of the recombinant plasmid. D, mRNA expression of TFB1M was detected by qPCR. E, Protein level of TFB1M was detected by Western blot. Compared with EV group, $^{**}P<0.01$.

Figure 2　Validation of TFB1M over-expression plasmid in HCC cells

2.3　基于生物信息学预测 TFB1M 功能作用

通过 R 包筛选 TFB1M 高表达组（170 例）和 TFB1M 低表达组（170 例）差异基因，对差异表达基因进行功能富集。结果显示，TFB1M 低表达组主要与肝癌增殖增强基因集、肝细胞癌干性增强基因集、和细胞外基质组装基因集有关（图 3）。

2.5　TFB1M 对肝癌细胞迁移的影响

基于生物信息学预测结果，本研究通过划痕愈合实验检测过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移的影响。结果显示，与空载组相比，过表达 TFB1M 后，HepG2

细胞的迁移能力降低约 38.89%；Huh7 细胞的迁移能力降低约 32.22%（图 4）。为进一步验证过表达 TFB1M 抑制肝癌细胞迁移，本研究采用 Transwell 小室实验检测过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移的影响。结果显示，在 HepG2 细胞中，空载组穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（80.0±2.0），过表达 TFB1M 组穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（25.0±1.0）。在 Huh7 细胞中，空载组穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（52.5±3.5），过表达 TFB1M 组穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（12.0±2.0）。过表达 TFB1M 后肝癌细胞迁移能力显著降低，其差异均具有统计学意义（均 $P<0.01$）。上述结果表明，过表达 TFB1M 能够显著抑制肝癌细胞迁移。

2.6 TFB1M 对肝癌细胞侵袭的影响

基于生物信息学预测结果，我们展开过表达 TFB1M 对肝癌细胞侵袭的影响。结果显示，在 HepG2 细胞中，空载组细胞浸润基质胶并穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（114.0±4.0），过表达 TFB1M 组细胞浸润基质胶并穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（45.0±1.0），其差异具有统计学意义（$P<0.01$，图 5A）。在 Huh7 细胞中，空载组细胞浸润基质胶并穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（127.0±2.0），过表达 TFB1M 组细胞浸润基质胶并穿过 Transwell 小室膜的细胞数为（46.5±2.5），其差异具有统计学意义（$P<0.01$，图 5B）。上述结果表明，过表达 TFB1M 后肝癌细胞侵袭活性减弱。

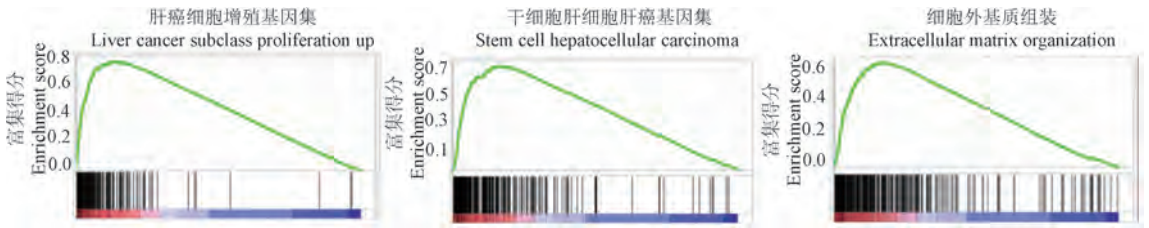
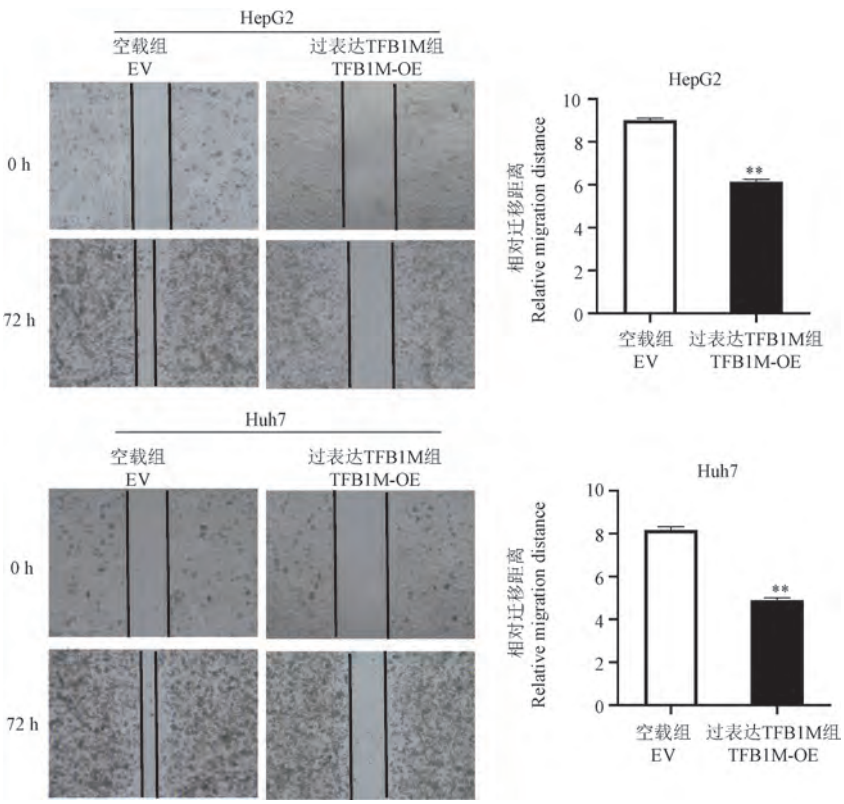


图 3 GSEA 预测 TFB1M 功能作用

Figure 3 GSEA predicts the function of TFB1M

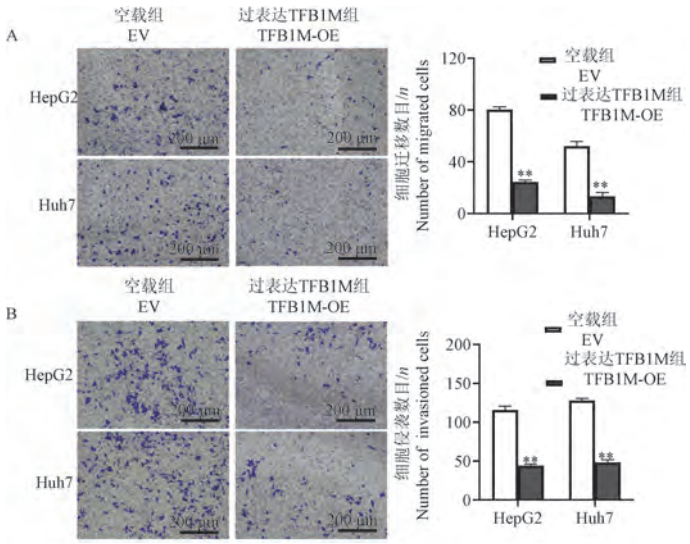


注：与空载组相比，** $P<0.01$。

图 4 过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移的影响

Note. Compared with EV group, ** $P<0.01$.

Figure 4 Effect of TFB1M over-expression on the cell migration in HCC cells



注：A：过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移的影响；B：过表达 TFB1M 对肝癌细胞侵袭的影响。与空载组相比，** $P<0.01$。

图 5　过表达 TFB1M 对肝癌细胞迁移和侵袭的影响

Note. A, Effect of TFB1M over-expression on the cell migration in HCC cells. B, Effect of TFB1M over-expression on the cell invasion in HCC cells. Compared with EV group, ** $P<0.01$.

Figure 5　Effect of TFB1M over-expression on cell migration and cell invasion in HCC cells

3　讨论

TFB1M 及其家族成员在多种恶性肿瘤中呈异常表达，包括肝细胞癌、结直肠癌、乳腺癌、胶质瘤等。有部分文献报道，TFB1M 在恶性肿瘤中呈高表达。Mu 等[8]报道 TFB1M 在肝细胞癌中呈显著高表达，且 TFB1M 高表达与肝癌患者生存不良呈正相关。Zografos 等[9]在研究男性乳腺癌血清蛋白标志物的研究中发现，TFB1M 呈异常表达。有研究报道 MTERF3 在乳腺癌细胞系中表达上调；且 MTERF3 表达水平与 TFB1M 呈正相关，提示 TFB1M 在乳腺癌细胞系中表达上调[10]。Franco 等[3]报道，在低级别胶质瘤组织中 TEFM mRNA 表达水平显著升高，且 TEFM 表达水平与 TFB1M 呈正相关，提示 TFB1M 在低级别胶质瘤中表达上调。但是也有研究报道，TFB1M 在恶性肿瘤中呈显著低表达。例如，杨世荣等[11]报道，TFB1M 在结直肠癌组织中表达水平降低，且 TFB1M 表达水平与结肠癌分期有关。高表达 TFB1M 结直肠癌患者预后较好[11]。与上述结果一致，本研究通过分析公共数据发现 TFB1M 在肝细胞癌中呈低表达。

TFB1M 在肿瘤细胞生长、迁移、侵袭和凋亡过程中发挥关键作用。Mu 等[8]报道，TFB1M 通过促进细胞周期进程、上皮-间质转化和抑制细胞凋亡，促进肝癌细胞生长和转移。在结直肠癌细胞中，过表达 TFB1M 后细胞增殖能力减弱[11]。然而，本研究发现过表达 TFB1M 后肝癌细胞迁移和侵袭活性降低。基于此，我们推测 TFB1M 在不同类型细胞中功能作用可能不同。作为线粒体转录因子家族成员之一，TFB1M 通过调控 mtDNA 转录，在线粒体生物发生和线粒体功能方面发挥关键作用。Franco 等[3]报道，褪黑素能够降低 TFB1M mRNA 表达水平，并干扰 mtDNA 转录。目前关于 TFB1M 在恶性肿瘤中的研究报道较少，但其家族成员 TFAM 在恶性肿瘤中的功能作用报道较多。TFAM 在肝癌组织中表达水平降低，且 TFAM 低表达肝癌患者总生存期和无病生存期均显著缩短[12]。刘永昌等[13]在肝细胞癌中发现，癌组织中 TFAM 蛋白表达阳性率降低，TFAM 阴性表达肝癌患者预后较差。而 Zhu 等[14]报道，TFAM 在肝细胞癌中表达水平无显著改变。基于此，我们推测不同研究团队报道 TFAM 在肝癌中表达水平变化的不一致性可能与样本纳入与排出标准不同有关。TFAM 表达水改变常导致线粒体生物发生和线粒体功能异常与恶性肿瘤发生进展紧密相关。Zhao 等[15]在肝癌细胞中报道，TFAM 表达水平增加后，线粒体质量和耗氧量均增加。Huang 等[16]报道过表达 TFAM 能够挽救由 ZZW-115 诱导的线粒体形态和功能改变、ROS 产生和细胞死亡。过表达天冬氨酸 β 羟化酶能够降低 H2AX 与 TFAM 相互作用，从而降低 TFAM 与线粒

体 DNA 的 D-loop 区域结合[17]。Huang 等[18]在 TFAM 缺失通过 mDia2 丙二酸化诱导核肌动蛋白组装促进肝癌转移的研究中发现,TFAM 缺乏可快速、稳定地诱导小鼠肝癌自发性肺转移。

综上所述,TFB1M 在肝细胞癌中呈低表达。过表达 TFB1M 后,肝癌细胞迁移和侵袭活性减弱。生物信息学预测 TFB1M 低表达组细胞外基质组装基因集评分较高。基于此,推测 TFB1M 可能通过影响细胞外基质,调控肝癌细胞迁移侵袭。但是,TFB1M 是如何调控细胞外基质,细胞外基质重塑异常等生物学事件在 TFB1M 介导的肝癌细胞迁移侵袭过程中发挥怎样的作用,有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 邱正良, 孙岩松, 赵太云, 等. 肝癌发生的分子机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(12): 776-778, 782.
QIU Z L, SUN Y S, ZHAO T Y, et al. Progresses in research of molecular mechanisms for hepatocarcinogenesis [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(12): 776-778, 782.

[3] FRANCO D G, MORETTI I F, MARIE S K N. Mitochondria transcription factor A: a putative target for the effect of melatonin on U87MG malignant glioma cell line [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1129.

[4] WINTER J M, YADAV T, RUTTER J. Stressed to death: Mitochondrial stress responses connect respiration and apoptosis in cancer [J]. Mol Cell, 2022, 82(18): 3321-3332.

[5] 杨一言, 高继萍, 续国强, 等. 非编码 RNA 调控口腔鳞状细胞癌葡萄糖代谢重编程的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 8(3): 91-97.
YANG Y Y, GAO J P, XU G Q, et al. Research progress on the regulation of non-coding RNA in glucose metabolism re-editing in oral squamous cell carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2022, 8(3): 91-97.

[6] SCARPULLA R C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 611-638.

[7] 杨大志, 王正敏, 李华伟, 等. 新霉素致损小鼠听觉上皮后线粒体转录因子 B1 与毛细胞凋亡的关系 [J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(2): 101-105.
YANG D Z, WANG Z M, LI H W, et al. Relationship between mitochondrial transcription factor B1 and hair cell apoptosis after neomycin-induced auditory epithelium damage in mice [J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(2): 101-105.

[8] MU J, TIAN Y, LIU F, et al. Mitochondrial transcription factor B1 promotes the progression of hepatocellular carcinoma via enhancing aerobic glycolysis [J]. J Cell Commun Signal, 2022, 16(2): 223-238.

[9] ZOGRAFOS E, ANAGNOSTOPOULOS A K, PAPADOPOULOU A, et al. Serum proteomic signatures of male breast cancer [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2019, 16(2): 129-137.

[10] WANG W S, ZI J J, SUN M T, et al. Expression of *MTERF3* gene in breast carcinoma and the relationship with clinicopathological characteristics [J]. Transl Cancer Res, 2020, 9(1): 173-186.

[11] 杨世荣, 陈艳琴, 白翔宇, 等. TFB1M 在结直肠癌中的表达及意义 [J]. 中国癌症防治杂志, 2019, 11(6): 492-497.
YANG S R, CHEN Y Q, BAI X Y, et al. Expression and significance of TFB1M in colorectal cancer [J]. Chin J Oncol Prev Treat, 2019, 11(6): 492-497.

[12] 吴丹, 何元方, 周幸春, 等. 敲低 TFAM 通过上调 ROS/ADAM17 促进可溶型 MICA 生成抑制 NK 细胞杀伤人肝癌细胞的作用 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(3): 257-264.
WU D, HE Y F, ZHOU X C, et al. Knocking down TFAM can promote the production of soluble *MICA* by up-regulating ROS/ADAM17, and inhibit NK cells from killing human hepatocellular carcinoma cells [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2021, 37(3): 257-264.

[13] 刘永昌, 郝志强, 赵玉成, 等. 肝细胞肝癌组织中 TFAM、PDLIM1 表达及与患者临床病理特征和预后的关系 [J]. 山东医药, 2023, 9(10): 6-10.
LIU Y C, HAO Z Q, ZHAO Y C, et al. Expression of TFAM and PDLIM1 in hepatocellular carcinoma and their relationships with clinicopathological characteristics and prognosis [J]. Shandong Med J, 2023, 9(10): 6-10.

[14] ZHU Y, XU J, HU W, et al. TFAM depletion overcomes hepatocellular carcinoma resistance to doxorubicin and sorafenib through AMPK activation and mitochondrial dysfunction [J]. Gene, 2020, 753: 144807.

[15] ZHAO Q, ZHANG C, ZHANG X, et al. ZNF281 inhibits mitochondrial biogenesis to facilitate metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 396.

[16] HUANG C, SANTOFIMIA-CASTAÑO P, LIU X, et al. NUPR1 inhibitor ZZW-115 induces ferroptosis in a mitochondria-dependent manner [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 269.

[17] TANG C, HOU Y, WANG H, et al. Aspartate β-hydroxylase disrupts mitochondrial DNA stability and function in hepatocellular carcinoma [J]. Oncogenesis, 2017, 6(7): e362.

[18] HUANG Q, WU D, ZHAO J, et al. TFAM loss induces nuclear actin assembly upon mDia2 malonylation to promote liver cancer metastasis [J]. EMBO J, 2022, 41(11): e110324.

〔收稿日期〕2024-03-27

王小晓. 医学研究中实验动物福利伦理审查现存问题之刍议［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 83-87.
Wang XX. Consideration of the issues related to the ethical review of laboratory animal welfare in medical research［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 83-87.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.010

医学研究中实验动物福利伦理审查现存问题之刍议

王小晓

（河南中医药大学第一附属医院 中心实验室,郑州　450000）

【摘要】 实验动物对维护人类健康发挥了重要作用。倡导实验动物福利伦理是科技进步和人类文明的双重体现,建立福利伦理审查制度则是实现实验动物福利伦理的有效保障。我国实验动物福利伦理建设近年来虽发展迅速,但现阶段仍存在诸多问题,需不断完善。本文基于对实验动物福利伦理相关理念的理解和认识,将医学研究中进行实验动物福利伦理审查时发现的一些问题进行了总结和论述,并提出个人建议,以供同行交流和借鉴。

【关键词】 医学研究;实验动物;福利伦理
【中图分类号】 R-33　**【文献标识码】** A　**【文章编号】** 1671-7856（2024）09-0083-05

Consideration of the issues related to the ethical review of laboratory animal welfare in medical research

WANG Xiaoxiao
(Central Laboratory, the First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000, China)

【Abstract】 Laboratory animals have played an important role in human health developments. Advocating the ethics and welfare of laboratory animals is a dual manifestation of technological progress and human civilization, and establishing an ethical review of laboratory animal welfare is an effective guarantee for achieving their welfare. Although the regulation of animal welfare ethics in China has developed rapidly in recent years, there are still many problems that need to be addressed. This article considers the understanding and recognition of the ethical concepts related to the welfare of laboratory animals. It summarizes and discusses some issues discovered during the ethical review of laboratory animal welfare in medical research, and puts forward personal suggestions for exchange and mutual reference.

【Keywords】 medical research; laboratory animals; ethics and welfare
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

在医学研究中,实验动物作为人类的“替身”和“替难者”,牺牲和奉献似乎是其与生俱来的命运和价值体现,那么我们是不是因此就可以无视实验动物的生命属性而按照人类的意愿任意使用和处置它们？如果不可以,在具体的使用过程中,实施者的边界又在哪里？随着实验动物使用数量和使用领域的增多,在世界范围内,这些命题显然已不只受到科研界的关注,而是引起了社会各界更广泛的讨论和争议,甚至在有些国家和地区由此还引发了激烈的社会矛盾和冲突。在此情况下,实验动物福利伦理的提出无疑为科研和道德之间架起了一座桥梁[1]。

［作者简介］王小晓(1974—),女,硕士,研究方向:中药药理及实验动物福利伦理。E-mail:mnwx2002@163.com

相较欧美发达国家,我国在实验动物福利伦理建设方面起步较晚,但发展比较迅速[2]。自 1988 年我国首部关于实验动物的行政法规《实验动物管理条例》颁布以来,时至今日,涉及实验动物生产和使用的各有关环节在国内均已有了较为完善的标准和指导原则。2018 年《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892-2018)的颁布则标志着我国实验动物的福利伦理审查制度已基本确立,实验动物福利伦理逐步从一种理念落实到了具体行为。

近年来,通过对国家政策法规及标准的不断学习及贯彻执行,我们已充分认识到在医学科研活动中将动物福利伦理理念贯穿始终是社会伦理道德和科技进步的双重体现。对于实验动物福利伦理委员会而言,审查和监管不是目的,如何将实验动物福利伦理理念落到实际工作中才是其设立的真正意义所在。为提升医学研究人员的实验动物福利伦理意识,促进实验动物福利伦理审查工作切实有效而非流于形式,本文基于对实验动物福利伦理的理解和认识,将在实验动物福利伦理审查工作中发现的一些问题进行了总结和论述,并提出个人建议,以供同行交流和借鉴。

1 医学研究中实验动物福利伦理审查现存问题

1.1 从业人员对实验动物福利伦理的内涵及其意义认识不足,意识不强

从理论上讲实验动物福利伦理实际上包涵了实验动物福利和实验动物伦理两层含义。前者是人类在保障实验动物健康和快乐生存权利的理念下为其提供的外部条件的总和,它涵盖了实验动物饲育、动物实验设计、动物实验操作及安乐死的整个过程;后者则是人类对待实验动物和开展动物实验所遵循的社会道德标准和原则理念,它所关注的是人类对实验动物所持态度的问题[3]。

实验动物做为一种“活的实验材料”,其具有与人类相同的感知能力,而科学研究势必要对他们造成不同程度和不同形式的伤害,因此倡导实验动物福利伦理实际上是在科学研究和减少动物痛苦之间达到一个多数人可以接受的平衡,其既是人类社会文明进步的体现,也是对生命的尊重,对人类情感的一种精神慰籍。同时,作为一个有血有肉的生命体,外界的任何刺激对实验动物的心理和生理均可产生不良影响,如不加以控制而随意为之,实验结果势必会造成偏差,进而影响结论或判断的正确性和客观性[4]。所以倡导实验动物福利伦理一方面是为了保护和关爱动物,平衡人们的情感和心理需求,体现人类文明;另一方面也是为了保证我们的研究成果更具有科学性、真实性、一致性、可靠性和可重复性,使这些特殊动物群体的牺牲更有价值。因此实验动物福利伦理其实具有人文和科学的双重属性。

但在现实工作中发现很多医学科研人员对实验动物福利伦理的认识还都相对比较肤浅,只是泛泛认为实验动物福利伦理就是对实验动物提供较好的照料,但具体怎么做似乎犹未可知,甚至有些人员粗浅地认为实验动物福利伦理审查只是表面形式而已,没有实际价值[5]。在这种错误意识指导下,再好的实验动物福利伦理制度和举措在具体实施中都很难施行和推广。因此如何让他们正确理解实验动物福利伦理的正确内涵及其意义是倡导和实现实验动物福利的首要任务。

1.2 从业人员对实验动物饲养和使用过程中涉及实验动物福利的具体内容缺乏认知

2006 年国家科学技术部发布了我国第一部关于实验动物福利伦理管理的规范性文件即《关于善待实验动物的指导性意见》,对实验动物的饲养管理、应用、运输等各环节提出了指导性意见。在此基础上,经过 10 多年的发展和实践,近年来,GB/T 35892-2018 实验动物 福利伦理审查指南、GB/T 35823-2018 实验动物 动物实验通用要求、GB/T 39760-2021 安乐死指南、GB/T 42011-2022 实验动物 福利通则等国家标准,RB/T 173-2018 动物实验人道终点评审指南、T/CALAS 7-2017 动物实验 生物安全通用要求等行业标准和团体标准先后颁布,为实验动物福利伦理的落实及审查内容给出了越来越具体和详尽的标准和建议。

通过对以上行政法规及标准的学习和领会,结合实际工作中的体会,我们在实验动物使用过程及福利伦理审查中要关注的内容应主要包括以下几个方面:(1)从业人员资质;(2)实验动物的选择和使用数量;(3)实验动物的来源和运输方式;(4)实验动物环境设施和饲养管理;(5)动物实验目的和意义;(6)实验方案中要重点体现动物捉拿和保定方式、动物造模方式、给药方法、手术过程、疼痛分级、麻醉剂的使用、镇痛管理、术后管理、取材方式、仁慈终点计划、安乐死方式等;(7)废弃物管理。对于福利伦理审查,除了文件审查,过程审核及项目

终结审核亦是审查工作的重要内容。

1.3 在项目的设计及实施过程中,科研人员对实验动物福利伦理相关的具体技术环节落实不够

“减少(reduction)”“替代(replacement)”“优化(refinement)”简称 3R 原则,是自 1959 年由英国两位科学家提出以来,就在世界范围内得到广泛认可的实验动物使用原则。其中“减少”是指在获得特定数量及准确信息的前提下,尽量降低实验动物的使用量;“替代”是指使用低等动物代替高等动物,或不使用动物而采用其他方法达到与动物实验相同的目的;“优化”是指在使用实验动物时,尽量减低非人道方法的使用频率或危害程度。在我国,“3R”原则于 2006 年由科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》中被首次提出:“善待实验动物包括倡导‘3R’原则,科学、合理、人道地使用实验动物。”目前科研活动是否遵循“3R”原则,已成为实验动物福利伦理审查的重要内容之一。但我们在实际工作中发现,相当一部分实验动物使用人员对“3R”原则的精神内涵知之甚少,鲜少有人会认真考虑实现“减少”“替代”“优化”的具体措施和运用,因此在进行方案设计时具有一定程度的盲从性,在实践过程中往往更重视实验数据的获取,而对于麻醉剂的合理使用、镇痛管理、术后管理、仁慈终点的设置、安乐死的实施等与实验动物福利伦理相关的技术环节很少会被慎重考虑和规范执行,这对科研质量的提升及对实验动物福利伦理的维护是极其不利的,也是造成我国相关科研成果在进行国际交流时被质疑的因素之一[5]。

1.4 实验动物福利伦理委员会的建设尚待加强和完善

GB/T 35892-2018《实验动物 福利伦理审查指南》的发布标志着我国实验动物福利伦理审查制度的确立。按照指南要求各实验动物使用许可单位虽先后成立了实验动物福利伦理委员会或实验动物管理委员会并开展了相应的审查工作,但在实际工作中,很多机构对实验动物福利伦理的认识仍然不足,重视程度不够,伦理委员会委员亦缺乏相应专业知识培训,因此实验动物福利伦理委员会往往并未切实起到指导和监管的责任,审查工作流于形式。尤其在项目进入实施阶段后,实验人员的行为很难被监管,加之科学研究过程中,难以预料的问题层出不穷,是否能遵循实验动物福利原则大都要靠使用者的职业素养和职业道德,所以如何进行过程管理和项目终结管理是我们应该考虑的一个重要环节,这也是避免动物福利流于形式,实现动物福利的关键所在。

1.5 实验动物科研平台软硬件建设不足,不能满足需求

实验动物的饲养和繁殖要求有相应的环境和设施及专用饲料和垫料,实验动物平台建设的规模和质量将直接影响着实验动物相关科研项目的进度、质量和实验动物福利实现的程度。近年来,随着国家对医药卫生领域投入的增加,医学科研领域对实验动物种类和数量的需求亦不断增加,但实验动物平台建设相对于当今医学科研发展的需求,存在着滞后性和地区不平衡性。具体表现在平台建设规模不足、环境设施不达标、饲料、垫料不符合标准、设备落后、技术更新慢及管理不规范等,这些因素无一不影响和制约着实验动物福利伦理的实现、科研质量的提高及科研成果的转化。

2 改进措施和建议

2.1 建立实验动物从业人员培训体系和考核机制

要建立实验动物从业人员培训体系和考核机制,切实加强实验动物相关政策法规及技术标准的宣贯及相关专业技术的培训,树立各级实验动物从业人员的正确认知和意识,并使其具备必须的理论知识及技术,从而确保其有能力规范完成科研工作。

自 1988 年《实验动物管理条例》颁布以来,在此基础上已发布的与实验动物福利伦理相关的行政法规、国家标准、团体标准、行业标准、地方标准及其他标准已有几十个。但这些政策法规、规范标准是否能落到实处,最终要靠各基层人员来完成,因此要重视实验动物从业人员培训体系和考核机制的建立,自上而下进行宣贯教育,压实责任主体,使参与实验动物生产和使用的相关人员均能够有机会、有渠道去及时获取和学习这些指导原则和实施规范,从而切实提高广大基层从业人员的实验动物福利伦理的意识和规范行为意识,由他管变为自管,才能真正将实验动物福利伦理落到实处,实现科技创新、伦理道德和科研质量三者的统一。

实验动物福利伦理的实现,还与从业人员的专业素质和能力密切相关,最基本的包括动物的饲养、捉拿、保定、给药、麻醉及实验动物设施环境的维护等具体环节,均需操作者要有娴熟、规范的技能,才能有效地减少对动物的伤害,同时保证科研

质量。因此在各机构内,要注意培养师资力量,建立适宜的培训体系和考核机制,确保每位从业人员在正式开始工作前,对自己所要从事的工作内容都有能力、有信心地去规范完成。

2.2 加强实验动物福利伦理委员会的制度化和法制化建设,使其能够切实承担起审查责任及督导作用

健全的制度体系和运行机制,是保证实验动物福利伦理委员会能够切实承担起审查责任及督导作用的重要保证。最近国家十部委联合发布的《科技伦理审查办法(试行)》通知中,明确提出"涉及实验动物的科技活动"应依照本办法进行科技伦理审查,这使得我国实验动物福利伦理审查制度进入了法制化建设阶段,其势必将对我国实验动物福利伦理审查制度的规范化建设起到积极的推动作用。该办法对伦理审查的责任主体、伦理委员会职责、委员会委员的能力和水平、审查程序(包括申请与受理、一般程序、简易程序、专家复核程序、应急程序)、监督管理等方面均有了较为完善的论述。相信随着该《办法》的进一步完善和推行,我国实验动物福利伦理审查工作将会越来越规范和有效。

2.3 加强动物实验平台的规范化建设,加快实验动物机构认证或认可步伐

动物实验平台的规范化建设是保证科研质量和实现实验动物福利的基础条件,实验室认证或认可是对实验平台软、硬件建设规范性的一种系统性评价。现今国际上比较认同的与实验动物相关的认证体系为美国实验动物饲养管理评估认证协会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)实施的认证,即 AAALAC 认证。近几年由中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)实验动物机构认可制度,简称 CNAS 实验动物机构认可亦逐渐在国内推广[6]。目前,经 CNAS 评审通过,有 8 家实验动物机构挂牌《实验动物质量保证条件和认可评价关键技术研究与示范》示范基地,包括中国科学院昆明动物研究所、中国疾病预防控制中心实验动物中心、北京大学实验动物中心等。通过认证或认可的机构在实验动物的管理和使用上显然均已达到国际标准,由其承担完成的科研成果在实验动物福利和质量上可得到更广泛的认可和肯定,对提高实验动物机构的国际地位和影响力,参与国际竞争具有深远影响[7]。

2.4 设立专项基金

设立专项基金,鼓励和支持实验动物福利伦理相关科研课题的立项和实施,为制定符合我国国情的实验动物福利制度及相关技术的开展提供科学依据。倡导实验动物福利伦理是人类文明的体现,亦是现代科技发展的结果,因此其具有人文和科技的双重属性,具有深刻的研究价值,其研究成果对指导制度的设立及实验方法的改进都具有非常重要的现实意义。另外,随着时代的变革,人类意识的改变,实验动物福利伦理的表现形式及要求一直在发生着变化,因此我们要以发展的眼光不断进行理论探讨和技术改革才能满足人类文明和现代科技发展的需要,使实验动物更好地为人类服务,使其生命价值得到更好体现。

3 总结

近年来,随着科技的迅速发展、国内及国际交流的加深,由于实验动物福利伦理引起的相关问题已逐渐受到国内外的重视。对于各从事科技活动的主体责任机构,应充分认识到实验动物福利伦理在科研活动中的重要意义,加强本单位从业人员的培训工作,以提高其伦理意识,提升其科研能力和水平,在科研活动中不违规操作并切实提高科研质量;其次加强实验动物福利伦理委员会的建设,积极开展科技伦理认证工作,使其能真正为科研活动的实施起到指导和监督的作用,及时防控科技伦理风险和生物安全风险的发生,为我国科技创新发展保驾护航

参考文献:

[1] 王贵平, 周正宇. 关于我国实验动物福利伦理的思考及建议[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 683-689.
WANG G P, ZHOU Z Y. Reflections and suggestions on the ethics and welfare of laboratory animals in China [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 683-689.

[2] 黄术兵. 中西实验动物伦理和福利发展比较研究 [J]. 医学与哲学, 2020, 41(17): 33-38.
HUANG S B. Comparative study on ethics and welfare of laboratory animals between China and the west countries [J]. Med Philos, 2020, 41(17): 33-38.

[3] 金玫蕾. 我国实验动物科学带来的动物伦理及福利问题[J]. 生命科学, 2012, 24(11): 1325-1329.
JIN M L. Ethic and welfare problems of laboratory animals science in China [J]. Chin Bull Life Sci, 2012, 24(11): 1325-1329.

[4] 刘晓宇, 卢选成, 鹿双双, 等. 推进我国实验动物福利技术的研究和应用[J]. 实验动物科学, 2021, 38(2): 61-66.
LIU X Y, LU X C, LU S S, et al. To advance the development of laboratory animal welfare technology in China [J]. Lab Anim Sci, 2021, 38(2): 61-66.

[5] 李闪闪, 郑小兰, 张新庆. 我国医学科研人员对实验动物伦理认知和态度分析[J]. 科学与社会, 2021, 11(2): 110-122.
LI S S, ZHENG X L, ZHANG X Q. Analysis of the current situation of medical researchers' knowledge and attitude towards laboratory animal ethics in China [J]. Sci Soc, 2021, 11(2): 110-122.

[6] 吴孝槐, 肖巧喆, 庞万勇, 等. CNAS 实验动物机构认可与 AAALAC 认证的比较分析[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(3): 237-243.
WU X H, XIAO Q Z, PANG W Y, et al. A comparative analysis of CNAS laboratory animal institutions accreditation and AAALAC certification [J]. Lab Anim Comp Med, 2022, 42(3): 237-243.

[7] 史光华, 贺争鸣, 李根平, 等. 我国实验动物机构认可制度的建立与实施[J]. 实验动物科学, 2020, 37(3): 53-59.
SHI G H, HE Z M, LI G P, et al. Establishment and implementation of the accreditation system for laboratory animal institutions in China [J]. Lab Anim Sci, 2020, 37(3): 53-59.

〔收稿日期〕2024-01-05

研究快报

综述:肠道微生物对血压的调控作用

高血压是困扰人类健康的一大难题,是心血管疾病的主要危险因素,其可显著增加心衰、卒中等疾病甚至有死亡的风险。近来研究表明,高血压的发生发展与肠道菌群的紊乱有关。本文概括了目前肠道菌群与高血压的互作研究,包括高血压疾病中肠道菌群的改变情况、肠道微生物的改变对高血压的影响、高血压中肠道菌群紊乱的指标、影响血压变化的微生物(属水平)。较低的肠道菌群多样性和较高的厚壁菌门/拟杆菌门比例可能是高血压疾病肠道菌群紊乱的指标。此外,本文进一步描述了肠道微生物调控高血压的潜在机制,即肠道菌群可能通过短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)、二水氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO)、激素、免疫反应影响血压的变化。最后本文总结了目前基于肠道微生物为靶点治疗高血压的常用方法,如粪菌移植、益生菌、益生元、抗生素及膳食补充剂。综上所述,本文全面论述了肠道微生物对血压的调控作用、机制及基于微生物为靶点潜在的治疗方法。本文系统梳理了能够改善高血压的潜在的微生物类群,为进一步研究肠道微生物在高血压发生发展中的作用提供了指导。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2022, 5(6):513-531. http://doi.org/10.1002/ame2.12233)。

田晓彦,杨文浩. 浅谈高校动物生物安全三级实验室管理与经验交流［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 88-93.
Tian XY, Yang WH. Discussion on the management and experience exchange of Animal Biosafety Level 3 Laboratories in universities［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 88-93.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.011

浅谈高校动物生物安全三级实验室管理与经验交流

田晓彦[1,2],杨文浩[1,2*]

(1.扬州大学兽医学院,江苏 扬州　225009;2.江苏省高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏 扬州　225009)

【摘要】 动物生物安全三级实验室(ABSL-3)作为国家新发再发传染病的生物安全体系基础支撑平台,为研究高致病性病原微生物的生物学特性、预防和治疗手段提供了至关重要的硬件基础。ABSL-3 实验室也为高校“产学研”结合提供了重要支撑。ABSL-3 实验室正常运行和科研工作顺利开展,离不开应急预案工作的精心策划和有效实施。此外,实验室合理的设计和布局也是规避和降低意外事故的关键因素。本文结合扬州大学 ABSL-3 建设管理实践,从应急预案准备工作入手对实验室建设布局、日常运行及污水处理、终末消毒具体措施和突发事件处置等方面的注意事项展开介绍,以期为今后操作各种病原微生物的生物安全实验室提供有益的参考。

【关键词】 动物生物安全三级实验室;应急准备;日常管理
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0088-06

Discussion on the management and experience exchange of Animal Biosafety Level 3 Laboratories in universities

TIAN Xiaoyan[1,2], YANG Wenhao[1,2*]

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China. 2. Collaborative Innovation Centre for Prevention and Control of Important Animal Diseases and Veterinary and Human Diseases in Universities in Jiangsu Province, Yangzhou 225009)

【Abstract】 Animal Biosafety Level 3 Laboratory (ABSL-3), as a basic support platform for the national biosafety system for emerging and re-emerging infectious diseases, provides a crucial infrastructure for the study of the biological characteristics of highly pathological pathogenic microorganisms, prevention and treatment means. The ABSL-3 laboratory also provides an important support for the university “industry-academia-research” combination. The normal operation of the ABSL-3 laboratory and the smooth development of scientific research work can not be separated from the careful planning and effective implementation of emergency preparedness work. In addition, the reasonable design and layout of the laboratory is also a key factor to avoid and reduce accidents. This paper combines Yangzhou University ABSL-3 construction and management practices, starting from the preparation of the emergency plan on the laboratory construction and layout, daily operation and sewage treatment, terminal disinfection of specific measures, and emergency disposal and other aspects of attention to be introduced, in order to provide a useful reference for the future operation of various pathogenic microorganisms biosafety laboratories.

【Keywords】 Animal Biosafety Level 3 Laboratory; emergency preparedness; daily management
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]江苏高校优势学科建设工程资助项目(334020024);江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心(205070019)。
[作者简介]田晓彦(1990—),女,实验师,硕士,研究方向:生物安全三级实验室管理及小动物疾病病原方面研究。
E-mail:006473@yzu.edu.cn
[通信作者]杨文浩(1990—),男,实验师,博士,研究方向:禽流感疫苗研发及免疫应答机制。E-mail:008465@yzu.edu.cn

近年来,高致病性禽流感、非典型肺炎(SARS)、新冠病毒等严重传染病引发了社会对生物安全的重视[1]。为应对新发再发传染病和保障生物安全,我国已经规划并建成一批高等级生物安全实验室,作为国家生物安全体系的基础支撑平台。2021 年实施的《中华人民共和国生物安全法》对病原微生物实验室生物安全做出了具体规定,其中也包括高等级病原微生物实验室。实验室生物安全也是保障我国生物安全的重要环节。实验室同时也是高校培养创新能力和操作能力人才的重要场所[2]。高校的 ABSL-3 实验室承担着多项国家级、省级科研项目,为我国传染病预防及治疗工作提供强有力的技术支撑。因此根据高致病性病原微生物特性,如何建立适合高校特色、行之有效的应急实验活动,最大程度地控制潜在风险,确保实验人员和周围环境的安全,保障实验室正常运转,除了实验室科学合理设计、硬件设施设备外,规范化的管理措施也是生物安全三级实验室安全运行的重要保障。

1 扬州大学动物生物安全三级实验室的建设与管理

1.1 扬州大学动物生物安全三级实验室基本情况

扬州大学动物生物安全三级实验室(以下简称扬州大学 ABSL-3)位于扬州大学文汇路校区内部,是江苏省内唯一拥有 ABSL-3 的高校。该实验室最初于 2007 年获得中国合格评定国家认可委员会(CNAS)的认可。2015 年,为满足日益增长的科研需求及符合国家生物安全实验室建筑技术规范(GB50346-2011)规定,实验室选址重建,新 ABSL-3 建为独立三层结构,楼层面积 460 平方米,整个实验室防护区的面积为 216 平方米。根据国务院颁布的《病原微生物实验室生物安全管理条例》、国家环境保护总局颁布的《病原微生物实验室生物安全环境管理办法》以及《高等级病原微生物实验室建设审查办法》等文件规定[3-4],新建的扬州大学 ABSL-3 经过国家发改委、科学技术部和江苏省环境保护厅的审批,实验室的关键防护设备设施经过第三方检测,符合《生物安全实验室建筑技术规范》的要求,通过 CNAS 重新认可[5]。扬州大学 ABSL-3 也按规定向农业农村部申请开展相关动物高致病性病原微生物实验活动。目前,该实验室内可授权操作的实验动物包括小鼠、家禽(鸡和鸭),成为江苏省高校内唯一拥有可进行动物实验的生物安全三级实验室的平台。扬州大学 ABSL-3 为高校内从事家禽高致病性禽流感病毒、新城疫病毒和非洲猪瘟病原体操作的科研人员提供一个安全可靠的研究环境。在开放使用期间,严格按照有关要求执行相关法律法规,确保实验室工作人员健康安全。自 2015 年起至今,实验室一直保持着安全稳定的运行状态,未曾发生任何安全事故。

1.2 扬州大学动物生物安全三级实验室的建设特点

扬州大学 ABSL-3 的建筑设计科学合理,内部布局得当,建设质量卓越。通过对设计的研究与实践,为今后同类实验室的建设提供一定参考。实验室建筑整体分 3 层:第一层是专门用于污水处理、危险废弃物暂存、配电以及二级实验室辅助区域;ABSL-3 位于建筑物二层,包括防护区(核心工作间、二缓、准备间、一缓、淋浴间等)和辅助区(监控室、消洗间、气瓶间等);第三层是设备管道层(包括空调系统、送排风系统、纯水处理系统等)。整个实验区布局合理紧凑,设施先进齐全。实验区的规划具有 5 大显著特征:一是功能区划分科学。经独立门禁系统进入 ABSL-3 核心区,依次通过一更、淋浴间、二更和缓冲间。负压控制从淋浴间开始,依次递增到核心区。每个房间门均有自动联锁和报警提示装置,如果相邻房间压力差值低于设置限值(例:核心间与二缓的压差≤-20 Pa),则会自动发出报警提示。二是实验室管道层设计人性化,满足使用需求。该层空间高 3.1 m,管道布局清晰可见,方便进行维修和检查以保障设备正常运转。三是实验室节能设计。面向高校服务的扬州大学 ABSL-3,为了满足高需求的科研实验活动和分组需求,ABSL-3 核心区分为两个独立的运行单元,可以根据实验需求作为一个整体同时运行,也可满足两种不同病原的独立操作需求。根据实验室建筑规范要求,在遭遇突发断水断电的情况下,实验室备有储水箱和 UPS 不间断电源。四是仪器的配置布局合理。实验室防护区内配有符合生物安全规定的专用饲养家禽隔离器、IVC 和多功能自动消毒洗手设施,可满足动物饲养及饮水需求。实验室核心间内配有家禽隔离器设备(共计 7 台)和鼠 IVC(72 笼)可满足科研分组试验需求,极大地提高实验室的使用效率。五是污水处理系统实用、安全可靠。扬州大学 ABSL-3 在风险评估的基础上,结合使用需求,在实验室一楼设置污水处理设施,采用高温或化学方法处理污水、污水处理罐容量为每台 1000 L,一

备一用,充分满足实验活动产生废水的处理需求。

1.3 制度完善、管理严格

重视实验室人员建设,建立一支责任心强、业务素质高的实验室人员队伍是做好管理工作的必要条件[6]。扬州大学 ABSL-3 管理人员共 23 名,其中 18 名拥有高级职称,均为黄大年教师团队中在兽医传染病方向表现出色的成员。该实验室除了为本校科研提供服务,还肩负着国家动物疫情监测、流行病学调查计划和向社会提供科研服务。

目前实验室已形成了一套完善的规章制度和规范的工作程序,包括仪器设备管理制度、工作人员制度、日常维护保养及突发事件处理制度等,这是降低实验室意外事故发生的关键要素之一[7]。保证每一个工作人员都能严格按照管理制度办事,从而实现人-机-料-法-环之间和谐统一[8]。为了确保实验室内的实验活动能够安全、有序地进行要严格落实实验室准入制。扬州大学 ABSL-3 主要面向学校内的师生,开展实验活动的师生均必须通过全面培训、考核,经考核合格取得实验室上岗证后才可以进入实验室工作。为了确保培训效果,培训分为集中和点对点培训方式。集中培训主要包括实验室所操作病原微生物的风险评估、实验技术操作规范、实验室安全设备设施、防护用品的正确使用、应急演练等。点对点培训,主要对首次参加培训的人员现场模拟跟踪。在实验室应急演练中,除了针对不同病原微生物发生生物安全风险时的防范措施外,还包括了实验室运行中可能发生的各种风险因素。此外,在实验过程中,如何处理人员突发的身体疾病也纳入到应急演练中。在日常运行时,实验室管理人员通过实时监控系统对操作人员是否遵守操作规程、个人防护、环境消毒工作等方面的现场监督管理,使培训效果得到保证。

2 实验室日常运行状态下的应急准备工作

2.1 样本和菌毒种的接收与保存方面

在 ABSL-3 样本和菌毒种管理中防范失窃、故意破坏和误用是一个至关重要的风险点,因此安保和监管的日常工作必须得到妥善处理,包括准入制度的有效实施以及“人防”和“技防”的有机结合[9]。为了确保生物材料的保存和使用的可追溯性,我们严格执行双人双锁的制度并设计相关登记表(生物危险材料(毒种)出入库记录表,生物危险材料(毒种)领用申请表,毒种台账登记表)全面覆盖毒种来源、去向。其次,在日常使用中:如遇菌毒种溢洒事故的发生,根据泄露的病原微生物特性在溢洒处理工具箱中选用合适的消毒剂和溢洒处理工具及标识牌。溢洒处理工具箱外部贴有“溢洒处理工具箱”的标识字样,存放在实验室指定位置。溢洒处理工具箱里面放有:(1)盛放有次氯酸钠(0.5%或 2.3%有效氯)消毒液的塑料桶;(2)不锈钢镊子,刷子、可高压的扫帚和簸箕,以及不锈钢的耐扎废物桶;(3)医用纱布和吸水纸巾;(4)用于盛放感染性溢洒物以及清理物品的专用收集袋或容器;(5)橡胶手套;(6)写有“禁止进入、溢洒处理”的警示标识。

2.2 实验室动物饲养状态下的应急准备工作

扬州大学 ABSL-3 的动物饲养和操作都在隔离器内进行,不直接暴露于实验室环境中,这大大降低生物安全风险。但是在实验操作过程中,如遇动物咬伤、针头刺伤情况,为确保人员的安全,在同伴帮助下立即将受伤部位的血液挤出,流水冲洗、并用实验室配置的医疗急救箱对伤口进行消毒预处理。如有必要送指定医院进行后续观察和治疗。如遇动物逃逸情况,应避免扩大污染区,及时捕捉逃逸动物,对污染环境按照紧急预案程序消毒。

2.3 处理危险废物的措施

ABSL-3 所产生的废弃物分为固体废弃物和污水两种,其中污水主要来源于淋浴、动物间自动洗手器、双扉高压灭菌器。必须对其进行有效处理才能保证实验室工作人员以及周边人群健康和环境不受到影响[10]。对于 ABSL-3 而言,采用有效的污水处理方法并实施安全排放监测措施,是不可或缺的。首先要结合病原微生物的特性进行风险评估,选择有效处理污水的方式[11]。扬州大学 ABSL-3 的污水消毒处理设备是专门设计和配置的,以处理实验室内各种污水,水源包括从多功能洗手器排出的消毒水,淋浴水以及双扉高压灭菌器产生的冷凝水。该设备采用两套独立的 1 吨不锈钢消毒罐系统,这种双系统设计不仅提供了持续的工作能力,而且确保在一套系统出现故障时,另一套系统可以立即接管,从而确保实验室的正常运作。这套系统可以自动切换,无需人工介入,进一步降低了操作复杂性和潜在的人为错误。在消毒方式方面,该设备提供了两种可选的消毒模式:电加热高温消毒和添加含氯消毒剂进行化学消毒。电加热高温消毒利用高温破坏病原微生物的结构,从而达到消毒目

的;而化学消毒则是通过添加含氯消毒剂,利用氯的强氧化性来灭活病原微生物。这两种消毒方式可以根据实验的具体需求和条件进行选择。

为了确认该污水消毒处理设备在实际应用中的消毒效果,实验室进行了专门的验证实验。在污水处理罐内的样品检测导管中放入已知病毒活性的禽流感病毒(AIV H9)和新城疫病毒(NDV AI4)各 1 支,体积为 1 mL。污水处理系统被设定为电加热模式,消毒参数设定为温度 90 ℃,时间 30 min。在污水处理罐内补充自来水,当水位达到水位计上限时,进水阀自动关闭,随后电加热系统启动。当水温加热到 90 ℃时,系统会维持该温度 30 min 以上确保有效消毒。之后,电加热系统自动停止。待水温自然冷却至 50 ℃时,设备的排水阀门自动开启,排放经过消毒处理的水。从污水处理罐检测导管中取出高温处理的病毒毒种管样品,进行表面消毒。在 ABSL-3 生物安全柜内打开样品管,接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每枚 0.1 mL,每组接种 5 枚。接种后每天照胚,取死亡鸡胚和 124 h 存活胚,取尿囊液进行血凝性(HA)检测,并对尿囊液盲传 2 代。HA 检测阳性,说明病毒灭活失败;连续 3 代 HA 检测阴性,则说明病毒 100%灭活。结果见表 1。

本试验的结果清晰地表明,当实验室污水经过高温加热处理(90 ℃,30 min),禽流感病毒和新城疫病毒可以被完全杀灭。基于病毒的性质,这种处理方式同样也能够杀灭非洲猪瘟病毒。这一方法确保了实验室污水在排放前经过有效处理,从而保障了排放的安全性。同时,在污水处理过程中对系统运行状态进行监控,做好记录并将其存档备查。其次,定期检查污水管道是否存在泄漏,并采取相应的预防措施来消除病原微生物意外泄漏的风险。

固体废弃物处理时,需要进行精细的分类、包装,经双扉高压灭菌处理后交由废弃物处理公司专业处理。其中动物尸体单独包装,经高压灭菌后送学校动物处理中心进行无害化处理。

表 1　污水高温处理对 AIV 和 NDV 的灭活效果

Table 1　Inactivation of AIV and NDV by high temperature processing of wastewater

病毒 Virus	HA 效价 HA titer		
	0 代 0th generation	1 代 1st generation	2 代 2nd generation
禽流感病毒 AIV(H9)	0	0	0
新城疫病毒 NDV(AI4)	0	0	0

2.4　清场、终末消毒

消毒是实验结束后保障实验人员、实验环境和外部环境安全的关键步骤。在实验活动中,每天实验结束后进行清场消毒,以确保其生物安全。实验活动周期结束后,对不能用于高压消毒处理的设备(如鸡隔离器)、实验室空间、地面和桌面进行终末消毒。扬州大学 ABSL-3 采用分步法进行实验室消毒,首先,第一步对隔离器内部空间采用甲醛熏蒸消毒,实验室外部空间进行紫外灯照射消毒,过夜通风后,第二步对实验室空间(含排风高效过滤器)采用 Bioquell 过氧化氢蒸汽发生器进行熏蒸消毒。同时用外接循环风机管道连接高效过滤原位消毒管道,对整个房间的高效一起消毒。为了确保其消毒效果应达到灭菌要求,实验室对终末消毒进行消毒效果验证。例如:在实验室内利用 Bioquell 过氧化氢灭菌生物指示剂(HPV-BI/英国,嗜热脂肪芽孢杆菌,载菌量≥10^6 CFU)布点,实验室消毒结束后,收集菌片(生物指示剂)。在生物安全柜中,无菌镊子取出菌片,加入到含 0.1 mol 硫代硫酸钠 PBS(中和剂,每支 0.5 mL)的无菌试管中,37 ℃中和作用 10 min,再加入 TSB 培养基,每支 5 mL,摇匀,56 ℃恒温培养(加水盘,保持湿润)。试验同时设置中和剂对照、阳性对照(无中和剂未消毒菌片)和阴性对照(无菌片)。进行消毒效果判定如表 2。

经消毒验证,我们实验室使用的 Bioquell Z-2 过氧化氢蒸汽消毒器能有效杀灭空气和管道中可能存在的细菌和病毒,且无二次污染风险。为了保证每次消毒效果,我们采用“专人”管理方式,由两名经过专业培训的固定工作人员全程负责消毒过程并记录消毒检测效果。

3　发生其他意外事故

ABSL-3 如遇电力故障、水灾和火灾情况,如何在保证生物安全的提前下去应对显得尤为重要。

3.1　电力故障

当电力出现故障时,其对实验质量(特别是动物实验)的影响是巨大的,更为重要的是,它极易导致生物安全事故的发生。ABSL-3 一些重要的关键防护设备,如生物安全柜、动物隔离设施、送排风系统等,都联接应急电源,在发生电力故障时保证不间断电源持续供电至少 30 min 以上。

表 2 实验室生物指示剂菌片布置与气体消毒后的细菌培养结果

Table 2 Bacterial culture results of laboratory bio-indicator bacteriophage arrangement with gas sterilization

生物指示剂(菌片)分布 Distribution of bio-indicator (bacterial piece)		56 ℃培养观察结果(1~7 d) 56 ℃ incubation observation results (1~7 d)						
动物实验室西区单元 West unit of the animal laboratory	东侧板壁 Eastside boardwall	-	-	-	-	-	-	-
	南侧板壁 Southside boardwalk	-	-	-	-	-	-	-
	西侧板壁 Westside boardwalk	-	-	-	-	-	-	-
	北侧板壁 Northside boardwalk	-	-	-	-	-	-	-
	地板表面 Floor surface	-	-	-	-	-	-	-
	解剖台内 Inside the dissecting table	-	-	-	-	-	-	-
	解剖台外 Outside the dissecting table	-	-	-	-	-	-	-
	IVC 外 Outside of IVC	-	-	-	-	-	-	-
	实验室排风高效循环风机末端 Laboratory exhausthigh efficiency circulating fan end	-	-	-	-	-	-	-
	鸡隔离器内 Inside of chicken isolator	-	-	-	-	-	-	-
	鸡隔离器外 Outside of chicken isolator	-	-	-	-	-	-	-
	鸡隔离器排风高效末端 Chicken isolator exhaust high efficiency end	-	-	-	-	-	-	-
中和剂对照 Neutralizer control		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
阳性对照 Positive control		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
培养基阴性对照(无菌片) Negative control of culture medium (sterile tablets)		-	-	-	-	-	-	-

注:“-”:培养基清朗,无细菌生长;“+”:培养基轻度浑浊;“++”:培养基中度浑浊;“+++”:培养基重度浑浊。

Note. “-”, Medium is clear with no bacterial growth. “+”, Medium is mildly turbid. “++”, Medium is moderately turbid. “+++”, Medium is heavily turbid.

3.2 水灾

在 ABSL-3 实验室发生供水管破裂、水管堵塞或自然水灾的情况下,应立即向学校保卫科有关部门报告,并尽最大努力将污染物和废弃物妥善安置在安全的场所,避免传播,同时立即向紧急服务人员汇报实验室内潜在的危险情况。

3.3 火灾

在实验室发生火灾时,实验人员需沉着冷静,理性判定火情状态,如火情小,则立即用实验室内配置的灭火器灭火,如火情较大不具备扑灭火情的能力,则立即 119 报警,并有序组织人员撤离实验室,以确保人员的安全。消防员灭火时,实验室人员需要明确告知可能存在的生物安全风险,特别是毒种存放地点。

在日常管理中也要注意以下:(1)定期进行防火巡查。首先对消防报警系统通讯设备、进行定期检测,以确保其功能正常,并使所有工作人员充分了解其运行情况。消防设施是否过期损坏,ABSL-3 内因仪器贵重且精密,只配置二氧化碳灭火器。其次,逃脱线路的标识是否清楚,以确保每个房间都有醒目的提醒。(2)培训人员,提升意识和能力。通过应急演练培训提升老师和学生的火灾防范意识,加强火灾应急响应能力,以及提高灭火器的使用水平。

4 结语

生物安全三级实验室为我们认识开发疫苗、诊断试剂等方面提供了重要的硬件设施保障条件。但是再好的硬件设施保障、再完美的防护条件,在实际操作层面上是无法取代人员自身的素质和责

任心,完善的管理措施能够有效地预防实验室生物安全事故的发生,是实验室安全、稳定、有效运行的重要保障。在我国现阶段的高校中,实验室生物安全是属于重中之重。为了确保实验室的安全、稳定和有效运行,我们需要不断完善应急措施,从实验人员培训、实验活动准入、设施设备运行、消毒和意外事故的预防与处理等多个方面加强实验室管理,以增强我们面对未知病原的信心和勇气。

参考文献:

[1] HUAN G X, XU W G, LI M Q, et al. Antiviral biomaterials [J]. Matter, 2021, 4(6):1892-1918.

[2] 孙书洪, 李华, 亓树艳, 等. “双一流”建设背景下高校生物实验室安全管理现状与对策 [J]. 实验室研究与探索, 2018, 37(11): 298-302.
SUN S H, LI H, QI S Y, et al. Current situation and countermeasures of safety management of biological laboratories in universities under the background of “double first-class” construction [J]. Res Explor Lab, 2018, 37(11): 298-302.

[3] 中华人民共和国国务院.《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院令第 424 号) [EB /OL]. (2004-11-12). https://www. gov. cn/gongbao/content/2 019/content _ 5468882. htm.
State Council of the People's Republic of China. Regulations on the Administration of Biosafety in Pathogenic Microorganism Laboratories (State Council Decree No. 424) [EB/OL]. (2004-11-12). https://www. gov. cn/gongbao/content/2 019/content_5468882. htm.

[4] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室生物安全通用要求: GB 19489-2008 [S]. 2009.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. General requirements for laboratory biosafety: GB 19489-2008 [S]. 2009.

[5] 国家发展改革委员会,科技部.《高级别生物安全实验室体系建设规划(2016-2025)》[EB/OL]. (2016-11-30). https://www. gov. cn/xinw en/2016-12/20/content 5150592. htm.
National Development and Reform Commission, Ministry of Science and Technology. High-level Biosafety Laboratory SystemConstruction Plan. [EB/OL]. (2016-11-30). https://www. gov. cn/xinwen/2016-12/20/content_5150592. htm.

[6] 陆兵, 李京京, 程洪亮, 等. 我国生物安全实验室建设和管理现状 [J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(1): 192-196.
LU B, LI J J, CHENG H L, et al. Construction and administration status of biosafety laboratory in China [J]. Res Explor Lab, 2012, 31(1): 192-196.

[7] 梁慧刚, 黄翠, 马海霞, 等. 高等级生物安全实验室与生物安全 [J]. 中国科学院院刊, 2016, 31(4): 452-456.
LIANG H G, HUANG C, MA H X, et al. High-level biosafety laboratory and biosafety [J]. Bull Chin Acad Sci, 2016, 31(4): 452-456.

[8] 刘枣, 吕文平, 汪超, 等. EH&S 管理体系在高校实验室生物安全管理中的应用研究 [J]. 创新创业理论研究与实践, 2020, 3(1): 151-152.
LIU Z, LYU W P, WANG C, et al. The research on EH & S system application in biosafety management of university laboratory [J]. Theory Pract Innov Entrepreneurship, 2020, 3(1): 151-152.

[9] 鲁冰清. 论生物安全法律规制的范式转变——从损害管理到风险治理 [J]. 吉首大学学报(社会科学版), 2021, 42(1): 34-42.
LU B Q. On the paradigm shift of legal regulation of biosecurity: from damage management to risk governance [J]. J Jishou Univ Soc Sci, 2021, 42(1): 34-42.

[10] 中华人民共和国固体废物污染环境防治法 [N]. 中华人民共和国全国人民代表大会常务委员会公报, 2020(2): 414-430.
Law of the People's Republic of China on Prevention and Control of Solid Waste Pollution of the Environment [N]. Bulletin of the Standing Committee of the National People's Congress of the People's Republic of China, 2020(2): 414-430.

[11] 陆兵. 实验室生物安全手册:第二版(修订版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
LU B. Laboratory biosafety manual: 2nd Edition (Revised) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2004.

〔收稿日期〕2023-10-30

石玉存,董小丽,侯效英,等. 腹泻动物模型及治疗药物研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 94-107.
Shi YC, Dong XL, Hou XY, et al. Research progress in diarrhea animal models and drug therapies［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 94-107.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.012

腹泻动物模型及治疗药物研究进展

石玉存[1,2],董小丽[1,3],侯效英[1,2],尹　凯[1,2],高　帆[1,4],吴国泰[2,3,4*]

(1.甘肃中医药大学 药学院,兰州　730000;2.陇药产业创新研究院,兰州　730000;
3.西北中藏药省部共建协同创新中心,兰州　730000;4.甘肃省中药药理与毒理学重点实验室,兰州　730000)

【摘要】 腹泻是临床常见并且多发的疾病,引发腹泻的因素也比较多,目前有关腹泻动物模型的研究方法也比较多,但在临床上治疗腹泻的药物种类有限,现有的一部分药物也只适用于单一因素的腹泻。因此构建及选择合适的腹泻动物模型不仅是深入研究腹泻发病机制的重要基础,也是临床筛选和评价全面防治腹泻药物的有效手段。本文综述功能性、细菌性、病毒性、症状性腹泻动物模型的建立和评价以及治疗药物研究进展,以期为腹泻有关的动物实验研究和药物防治提供参考依据。

【关键词】 腹泻;动物模型;药物治疗;研究进展
【中图分类号】 R-33　**【文献标识码】** A　**【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0094-14

Research progress in diarrhea animal models and drug therapies

SHI Yucun[1,2], DONG Xiaoli[1,3], HOU Xiaoying[1,2], YIN Kai[1,2], GAO Fan[1,4], WU Guotai[2,3,4*]

(1. School of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Longyao Industry Innovation Research Institute, Lanzhou 730000. 3. Collaborative Innovation Center for Northwest Chinese and Tibetan Medicine, Lanzhou 730000. 4. Gansu Provincial Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Diarrhea is a common and frequent disease in clinical practice. Many factors cause diarrhea, and numerous research method with animal models of diarrhea have been explored. Despite this, drugs for the treatment of diarrhea in clinical practice are limited, and some existing drugs are only suitable for diarrhea caused by a single factor. Therefore, the construction and selection of appropriate animal models of diarrhea are not only important for in-depth studies of the pathogenesis, but are also effective means for the clinical screening and evaluation of drugs for comprehensively preventing and treating diarrhea. This article reviews the literature on the establishment and evaluation of animal models of functional, bacterial, viral, and symptomatic diarrhea, as well as progress of therapeutic drug research, to provide a reference for animal experimental research into the prevention and treatment of diarrhea.

【Keywords】 diarrhea; animal model; drug therapy; research progress
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

腹泻(diarrhea)是由多病原、多因素引起的肠道疾病,主要特点为大便次数增多和粪便性状改变,出现稀便、水样粪便甚至脓血便,严重时可引起脱水和电解质紊乱,导致营养不良,身体虚弱,长期或

[基金项目]国家自然科学基金(82260772);甘肃省重点人才团队基金资助项目(2019-39);甘肃省自然科学基金项目(21JR11RA137);甘肃省药品监督管理局科研项目(2023GSMPA026)。
[作者简介]石玉存(1999—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理与毒理研究。E-mail:2747466796@qq.com
[通信作者]吴国泰(1978—),男,博士,副教授,研究方向:中药炮制药理与中药大健康产品研发。E-mail:1018830451@qq.com

者短期强烈腹泻可能导致死亡。腹泻在发展中国家每年造成 4.9%的 5 岁以下儿童死亡[1],WHO 把控制腹泻列为全球性战略[2]。在临床上常见的腹泻分为功能性腹泻、病毒性腹泻、细菌性腹泻和症状性腹泻。功能性腹泻一般是由胃肠功能失调所引起的连续排稀便或水样便,不伴有腹痛等不适症状;病毒性腹泻是一种由病毒引起的急性胃肠道传染病,会伴有轻微腹痛呕吐;细菌性腹泻是由各种感染肠道的细菌引起的一类感染性腹泻,伴有较高的发热腹痛;症状性腹泻是指由肠外感染或药物等引起腹泻。目前腹泻主要通过药物治疗,依据上述腹泻类型,治疗药物主要有中药制剂和相应的制剂,例如抗菌药物、肠粘膜保护剂、微生态制剂等,有些药物可单用或联合使用,疗效显著。由于腹泻的病因较多,病程复杂,因此构建科学合理的腹泻动物模型是开展止泻药物筛选和相应基础研究的重要方法。本文综述功能性、细菌性、病毒性、症状性腹泻动物模型的建立和评价以及治疗药物研究进展,以期为腹泻有关的动物实验研究和药物防治提供参考依据。

1 腹泻动物模型建立方法

1.1 建立功能性腹泻模型

1.1.1 使用刺激性泻药

刺激性泻药可以提高黏膜的通透性,使水和电解质等液体向肠腔渗透,促使肠内液体增多,引起腹泻[3]。常用的造模剂是番泻叶水煎液,主要成分为结合型蒽醌,在大肠及肝内代谢为大黄酸蒽酮及其衍生物,使小肠和结肠蠕动增强,肠上皮细胞通透性增加,引发腹泻[4]。管志伟等[5]在研究番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型的量-时-效关系时,将大鼠分空白组及低、中、高浓度组,分别给予相应浓度番泻叶灌胃建立大鼠腹泻模型,以稀便率和腹泻指数为主要评价指标,持续灌胃 4 周,模型大鼠出现不同程度体重增长变慢、毛色晦暗、肛周污秽、毛发结穗、扎堆蜷缩等现象,部分大鼠死亡,发现中浓度组 30%番泻叶(20 mL/kg)连续灌胃 2 周时模型效果理想,特点与临床症状较为一致。

刘翔燕等[6]制备番泻叶 1∶1 浓缩水提液,按照小鼠体重 0.2 mL/10 g 灌胃,每天 2 次,连续 3 d,模型组小鼠与正常组小鼠腹泻率与腹泻指数有显著性差异时提示造模成功。梁玲等[7]将 100%生药浓度番泻叶水每天上午按 0.20 mL/10 g 给小鼠灌胃,连续 6 d,小鼠排便次数增加、粪便稀糊状或不成颗粒状提示造模成功。滕久祥等[8]按照小鼠体重 10 mL/kg 灌胃番泻叶煎剂(浓度为 0.3 g/mL 生药),每天 1 次,连续 3 d,以滤纸上的污迹为标准,显示大便稀软甚至水样则提示成功建立急性腹泻模型。

番泻叶水煎液是常用造模剂,可在达到最优效果的同时保持低残留、安全性高及效果显著等优点。但番泻叶具有一定毒副作用,药性猛烈,如果使用不当会导致血清雌二醇水平明显升高,可产生药物依赖性。据临床报道,长期大剂量服用番泻叶及其制品可引起肠黏膜及神经丛损伤,同时伴有较多副作用,如过敏性休克、神经系统毒性、药物依赖性等[9]。

1.1.2 使用润滑性泻药

润滑性泻药发挥润滑作用并不在整个机体,而是主要在局部发挥作用,使粪便软化而导泻。常用造模剂是蓖麻油,研究表明,蓖麻油致腹泻可能影响水通道蛋白、Na/H 离子交换器、急性期蛋白的水平[10]。

唐兴刚等[11]在给药第 4 天晚上开始禁食不禁水,第 5 天给药后 0.5 h,给模型组、给药组小鼠灌胃 0.5 mL 蓖麻油造模,通过收集滤纸上小鼠总排便、正常便、软便、水样便、稀便等级,计算得出模型组小鼠腹泻评分和腹泻指数均极显著高于对照组,说明腹泻模型建立成功。陈艳芬等[12]连续 5 d 按照小鼠体重 20 mL/kg 灌胃 0.5% CMC-Na,每天 1 次,禁食 24 h 后给小鼠灌服蓖麻油(20 mL/kg)1 次,6 h 后观察到小鼠的大便变软、次数变多等腹泻现象则提示建模成功。闫彦芳等[13]采用蓖麻油对小鼠进行灌胃,每只 0.3 mL,将小鼠置于滤纸上,每小时换纸并计腹泻次数,观测 6 h,发现小鼠出现外形正常但水分多便、外形不正常的软便、水样便及黏液便,则说明造模成功。

由于蓖麻油致腹泻效果不及番泻叶,故采用蓖麻油建立腹泻动物模型的研究较少。蓖麻油具有一定的副作用,会引起恶心、呕吐,造成腹泻后便秘,干扰脂类营养物质的吸收。蓖麻油粘稠,提取工艺繁琐,可通过提高其提取技术水平为蓖麻油建立腹泻动物模型提供方便。

1.1.3 使用容积性泻药

容积性泻药吸收肠管内水分后膨胀,进而刺激肠蠕动,引起排便反射,造成腹泻。常用的造模剂是大黄水煎液,致泻部位主要在结肠,主要致泻成

分为大黄素和番泻苷。大黄口服后,在大肠被水解成苷元,苷元刺激肠黏膜及肠壁的神经丛,促进肠蠕动;大黄蒽酮可兴奋平滑肌上 M 胆碱受体,加快肠蠕动;大黄还可抑制肠平滑肌上 Na^+-K^+-ATP 酶,使肠腔转移至细胞内的钠离子减少,机械性刺激肠壁,使肠蠕动加快;综合上述多种机制,大黄具有较强的泻下作用。

程艳玲等[14]在研究止泻灵颗粒的药效学时用大黄建立小鼠脾虚腹泻模型,按照每只小鼠 0.2 mL 灌胃,第 1、3 天灌胃食醋,第 2 天灌胃 50%乙醇,第 4 天上午灌胃约 20%大黄水煎液,每只 0.4 mL,每天 1 次,雌性动物连续 11 d,雄性动物连续 12 d,模型组湿便个数比空白组显著增多,提示脾虚泄泻小鼠模型建立成功。赵艳玲等[15]给每只小鼠灌胃 1 kg/L 大黄煎剂 25 mL/(kg·h),连续 7 d 造模,观察记录滤纸上的动物排便情况,当出现食欲减退、稀便、活动减少、竖毛拱背、毛色失泽等症状则提示成功造模。丁家森等[16]给小鼠灌胃大黄水煎液(1 g/mL)2 mL,4 h 后观测,小鼠出现反应迟钝、活动量减少、粪便稀水样等症状,提示建模成功。

使用容积性泻药建立腹泻动物模型的方法较为常用,大黄因具有价廉、来源广等优点是最常用的造模剂。但不同的煎药方法和煎药时长制备的大黄水煎液对于动物的影响不同,不一定造成动物泻下,且灌服大黄水煎液或浸泡液不是单独伤脾,而是五脏同受其害,可能会影响到腹泻模型的成功建立[17-18]。

1.1.4 溃疡性结肠炎腹泻模型

溃疡性结肠炎是一种慢性非特异性肠道疾病,主要特征是直肠和结肠系膜下层出现炎症和溃疡,病机复杂且难以治愈,具有易复发、癌变风险高等特点,通常要求终生服药,其治愈的可能性小,因此建立溃疡性结肠炎动物腹泻模型对其发病机制及用药的研究非常有必要。常用模型建立方式有两种,分别是用乙酸和角叉菜胶建立溃疡性腹泻模型。

用乙酸制备溃疡性腹泻模型是利用乙酸使得结肠薄膜屏障结构被破坏,继而产生炎症[19]。造模方法是动物禁食不禁水后,用乙醚麻醉,将一定体积稀释的乙酸溶液从肛门注入肠腔,打开腹腔,将一定体积的乙酸注入结肠腔,然后用生理盐水或磷酸盐缓冲液冲洗,动物出现腹泻相关的临床症状时则表明造模成功[20]。乙酸容易诱导结肠炎,造模具有起效快、效果好、成本低、可控性和可重复性强等优点。但乙酸模型存在一定的自愈性,不适合建立慢性疾病模型[21]。

用角叉菜胶制备溃疡性腹泻模型是由于角叉菜胶为高分子硫酸化多糖,本身对肠道上皮细胞没有直接损伤作用,但水解后产物会引起多种动物结肠溃疡而出现腹泻。造模方法是用降解的不同浓度的角叉菜胶水溶液喂养实验动物,数周左右后会在盲肠、结肠及直肠出现溃疡。此法制备模型简单有效、持续时间较长、模型的稳定性较好,但角叉菜胶制备溃疡性腹泻模型病变部位集中于盲肠部位[22]。

1.1.5 肠易激综合征腹泻模型

肠易激综合征(irritable bowel syndrome,IBS)是以腹痛、腹胀、排便习惯改变及粪便性状异常为主要特点的一种功能性胃肠病[23]。肠易激综合征相关动物模型的指标评价方法较明确,制备方法主要包括刺激法(束缚应激、理化因素、多种方式联合)、番泻叶灌胃、母婴分离法、基因敲除法等[24]。

程斌等[25]采用乙酸联合束缚应激法诱导制备腹泻型肠易激综合征小鼠模型,先给予小鼠 3%乙酸溶液灌肠,使用异氟烷吸入麻醉,在距肛门 3~4 cm 的结肠中注入 200 μL 左右的 3%乙酸溶液,使肛门闭合 10 s,然后注入同等体积的生理盐水冲洗,将小鼠悬空,直到小鼠苏醒,3 d 后再重复 1 次,期间对小鼠进行 3 次束缚应激,每次 1 h,这种方式能够较好地模拟腹泻型肠易激综合征的肠道局部相关症状,与临床表现相符,具有较好的推广价值。徐孝平等[26]采用湿热应激复合番泻叶方法建立腹泻型 IBS 兔模型,在温度为 37~39 ℃,相对湿度为 100%的环境下每天湿热应激 4 h,连续应激 7 d,湿热期间不予饮食。第 7 天下午开始灌胃 10 mL/kg 致泻剂番泻叶煎剂,直至第 14 天结束,同时在造模期间饲料减半。

付怡茗等[27]采用电针与穴位注射法治疗腹泻型肠易激综合征小鼠,使用母婴分离、乙酸灌肠、番泻叶灌胃及夹尾刺激联合制备实验所需腹泻型肠易激综合征模型,新生幼鼠于出生后第 2 天进行不可预测性母婴分离,3 h/d,在第 12~26 天同时用 0.5%乙酸灌肠刺激,其后正常饲养至第 50 天进行灌胃番泻叶水煎液(29.4 g/100 mL),在自制束缚袋中对小鼠尾外侧 1/3 处行夹尾刺激,每天持续 5 min,持续至第 57 天结束,模型小鼠出现精神抑郁、排便异常、胃肠道功能紊乱且结肠组织进行 HE 染

色时无明显病理性改变表示造模成功。

在中医上按照辨证分型,常见的腹泻型肠易激综合征(IBS-D)证型有脾胃虚弱证、脾虚湿盛证、脾虚湿热证、肝郁脾虚证、脾肾阳虚证 5 种。脾胃虚弱证 IBS-D 是由于饮食失节、外感六邪,导致水谷运化失常,清浊混杂泻下。主要表现为大便溏泄、神疲乏力、食欲不振、面色萎黄、舌苔薄白、脉细[28]。脾虚湿盛证 IBS-D 病位在脾,病性为虚与湿,主要由于脾胃虚弱,运化水湿功能失常所致。临床以主要表现为大便时溏时泻、夹有黏液、食后腹胀、脘闷不舒、腹胀肠鸣、少食纳差、舌质淡、脉细弱等[29]。脾虚湿热证 IBS-D 由于“脾不运”和“脾不化”加之湿热困于中焦所致。主要表现为大便稀薄如水、臭秽、舌苔黄腻、脉滑数或濡数、小便短赤等[30]。

肝郁脾虚证 IBS-D 主要表现为腹痛即泻、便后缓解、苔薄黄腻、脉弦。动物模型应同时具备情志改变、腹泻的症状,采用多因素造模会使动物表现出内脏高敏感性和抑郁心态,造成肝郁状态,通过禁食禁水、日夜颠倒方式刺激动物,会改变动物胃肠动力造成脾虚状态,是目前肝郁脾虚型 IBS-D 模型的主要建立方法。多法联合造模虽然操作难度与复杂度较大、不可控因素更多,但可从病因病机上完善病证结合[31]。脾肾阳虚证 IBS-D 主要是由于脾气虚弱,运化功能失常,导致水湿、食积等困于肠道,久泻则肾失滋养,肾阳亏虚[32]。主要表现为腹痛即泻、多晨起时发作、腹部冷痛、得温痛减、饮食不振、畏寒肢冷。

1.2 建立细菌性腹泻模型

感染性腹泻病是流行最广泛、感染性最强的肠道传染病。肠道菌群与机体健康密不可分,在拮抗病原菌和维护肠黏膜屏障的完整性方面发挥重要作用。正常肠黏膜免疫系统对肠道菌群处于免疫耐受状态[33],而内外环境的改变会让肠道屏障作用降低,肠道菌群过度生长,从而造成肠道菌群失调腹泻。

1.2.1 大肠杆菌诱导腹泻模型

大肠杆菌是一种条件致病菌,在特定环境下能够引起机体发生胃肠道感染或多种局部组织器官感染,在腹腔注射大肠杆菌后,其结肠内总体菌群数量大量增加,致使肠道内容物微生物的动态平衡遭到破坏,导致腹泻。

董娟等[34]给模型组、给药组小鼠灌胃 0.3 mL 的 3%碳酸氢钠溶液 30 min 后再灌入 0.5 mL 的浓度 5×10^8 CFU/mL 致病性大肠杆菌混悬液,与空白组相比出现黏液便、稀便提示造模成功。马斌[35]选择致病性大肠杆菌 E1 建立小鼠腹泻模型,腹腔注射 4×10^8 CFU/mL 的大肠杆菌菌液 0.5 mL,发现小鼠出现粪便浆糊样、采食量减退、精神状态不佳以及对外界敏感度降低、嗜睡等症状,提示模型建立成功。赵荣山等[36]用一种致病性大肠杆菌菌株腹腔注射诱导小鼠腹泻,每 10 g 体质量给 0.2 mL,当出现倦怠、腹泻、寒战等临床表现时则表明建模成功。刘翠艳等[37]以 0.02 mL/g 剂量腹腔注射 7.5×10^7 CFU/mL 的 ETEC 菌液,连续 3 d,当小鼠出现精神萎靡、黄色软便或稀便等症状,且剖检病变发现肠壁变薄,肠组织结构被破坏,计算模型组小鼠的腹泻率高达 87.5%,提示造模成功。

制备病原菌腹泻动物模型时通常使用腹腔注射大肠杆菌造模,具有致泻率高、起效快、效果显著、耗时短等优点。但有关病原菌制备动物模型的研究报道较少,且大肠杆菌存在于动物肠道中,不易获得,使用时操作不当会造成感染,用量过大易致死。

1.2.2 金黄色葡萄球菌诱导腹泻模型

金黄色葡萄球菌主要损伤部位为小肠和结肠,其可黏附于肠道黏膜使其充血、水肿、炎性渗出,造成消化吸收障碍从而导致腹泻[38]。

赵凯科等[39]取 SPF 小鼠用 1×10^7 CFU/mL 金黄色葡萄球菌液灌胃,每只 0.3 mL,当小鼠出现精神萎靡,好卧懒动,大便次数增加及饮食减少等临床表现时建模成功。彭淑珍等[40]用浓度均为 1×10^9 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌腹腔注射小鼠,每只 0.5 mL,经观测并计算其致泻率为 30%时,则说明建模成功。

金黄色葡萄球菌不易获得,且用金黄色葡萄球菌建模时在同等条件下无论是灌胃还是腹腔注射,其致泻作用均不及大肠埃希氏菌、宋氏志贺氏菌等其他致病菌,因此用其造模的研究报道相对较少。

1.2.3 艰难梭菌诱导腹泻模型

艰难梭菌产毒株可以分泌毒素 A 和毒素 B,损坏肠道机械屏障,刺激炎症因子产生,促使中性粒细胞和淋巴细胞大量进入肠组织,使结肠黏膜发生炎性级联反应,最终导致假膜产生,从而引起各种程度不同的艰难梭菌相关性腹泻(*Clostridium* diffcile-associated diseases,CDAD)[41]。

杨斯琪[41]用艰难梭菌芽孢(3×10^8 CFU/d)给

小鼠连续灌胃 3 d,每隔 4 h 观察 1 次小鼠的表现,当出现大便次数变多,精神状态不佳等临床表现则提示建模成功。郭亚楠等[42]用艰难梭菌菌株 VPI10463 混悬液 2×10^4 CFU 灌胃小鼠,1 d 后小鼠出现便血、粥样便或大便次数增多等临床表现则表明 CDAD 小鼠模型成功建立。

利用病原菌感染动物制备腹泻模型的方式对于动物的损伤比较单一且效果明显,为腹泻模型建立提供了良好的方法,而且研究微生态制剂的保护作用必需制备肠道菌群失调动物腹泻模型,因此构建肠道菌群失调腹泻模型有助于研究其发病机制并进行药物针对性治疗。

1.3 建立病毒性腹泻模型

病毒能感染小肠黏膜上皮细胞取代正常的刷状缘细胞,降低消化酶活性,从而导致营养物质吸收障碍,水和电解质的转运失衡,引起腹泻[43]。制备病毒感染动物腹泻模型常用病毒有轮状病毒。胡长霞[44]用 MA104 细胞培养轮状病毒株,将乳鼠禁食 6 h 后给予 0.2 mL(2×10^8 CFU)的 KU 株轮状病毒,每天观察并记录乳鼠的腹泻只数及体重,发现模型组在第 3 天腹泻率达到高峰,体重明显下降,肠粘膜上皮细胞空泡样变,绒毛结构紊乱,提示模型建立成功。

有研究证实病毒可在种间传播,因此用病毒感染建立腹泻模型时若出现群发性感染,没有高效的预防措施能够完全阻止病毒传播。拜小强等[45]认为成熟的病毒分离、细胞培养技术和适配的动物模型是疫苗研制的前提,接种疫苗可以高效、经济的预防病毒。

1.4 建立症状性腹泻模型

症状性腹泻是由于肠道外的其他因素,诱发了腹泻症状,如因为过敏、气候原因、精神因素等不定因素引起的腹泻,也可以是肠道外的感染,刺激胃肠道出现腹泻症状,还可以是平常滥用抗生素,导致肠道菌群紊乱或者肠道运动功能紊乱出现腹泻,统称为症状性腹泻。它的特征主要是大便的次数增多或者性质改变,同时可伴有肠道外的症状,像发热、腹痛以及其他部位的感染,在临床上可能还会出现水电解质的紊乱、身体状况的失衡等。

1.4.1 抗生素诱导腹泻模型

长期使用或者滥用抗生素会导致胃肠功能紊乱,肠道菌群失调发生腹泻。常用的造模剂包括多种抗生素组成的混悬液。郭抗萧等[46]研究发现抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea,AAD)与肠道菌群的种类减少及部分致病菌的异常增殖有关,因为用抗生素造模会使肠道内的微生态平衡紊乱,从而肠道菌群的多样性下降。惠华英等[47]给小鼠灌胃硫酸庆大霉素和头孢拉定混合抗生素 0.35 mL/(只/次)制备腹泻小鼠模型,每天 2 次,持续 7 d,粪便变得稀、软、湿则表示小鼠腹泻模型制备成功。龙承星等[48]给小鼠用硫酸庆大霉素注射液和头孢拉定胶囊再加入无菌生理盐水配成浓度为 62.5 g/L 的抗生素混合液,每次 0.4 mL 灌胃,每天 2 次,持续 5 d,当小鼠粪便变得湿、稀、软时表示造模成功。詹扬等[49]用浓度为 0.4 g/mL 的硫酸庆大霉素和盐酸林可霉素各 50% 的复配液灌胃小鼠,每只 0.5 mL,每天 2 次,连续 6 d,小鼠出现黄绿色水样便,则说明造模成功。

抗生素诱导肠道菌群失调模型是研究抗生素诱导腹泻的关键,通常采用各种抗生素混悬液灌胃的方式来制备腹泻模型。由于抗生素混悬液灌胃有效果明显、时效快、用量好掌控等优点,抗生素成为相关性腹泻研究时必要的造模剂,建立抗生素诱导的相关性腹泻模型可以给肠道菌群的研究提供一定帮助。

1.4.2 迟发性动物腹泻模型

迟发性腹泻是化疗药盐酸伊立替康(CPT-11)常见副反应,CPT-11 在肝羧基脂酶作用下转化为活性代谢产物 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38),经肝内尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-GT)转化成非活性代谢产物 SN-38 葡萄糖醛酸(SN-38G),随胆汁排泄至肠腔,肠道中细菌的 β-葡萄糖醛酸酶又使之转变为活化的 SN-38 作用于肠道,产生肠毒性,造成迟发性腹泻[50]。

周圆[51]将健康雄性小鼠适应性饲喂高脂饲料 3 周,模型组连续 7 d 腹腔注射 CPT-11,每天 1 次,剂量为 50 mg/kg,每天观察小鼠的肛门,拍照记录,收集粪便,用尿粪便隐血试剂盒测定血便情况,小鼠出现皮毛污秽、潮湿、结块、身体发抖、肛门乌黑红肿等现象且抓拿时不挣扎表示造模成功。邓海燕[52]采用尾静脉注射 CPT-11 150 mg/(kg·d),连续用药 2 d,复制 CPT-11 模型,动物情绪易怒,出现迟发性腹泻临床表现表示造模成功。

CPT-11 为临床一线用化疗药物,最常见的毒副作用为严重腹泻引起肠毒性,使病人出现脱水、电解质失衡、感染以及代谢性酸中毒等症状,进而导

致脱水性休克、低血糖、肾功能衰竭、心脏疾病甚至最终死亡。CPT-11 静脉注射制备迟发性动物腹泻模型起效迅速,效果显著具有可控性,为迟发性腹泻的治疗研究提供良好的模型基础[51]。

1.5 其他

1.5.1 用寄生虫感染建立腹泻模型

寄生虫性腹泻主要是指一类寄生虫病,其寄生于肠道或邻近脏器内,并引起腹泻及相关症状等主要临床表现,主要经消化道感染,病因包括原虫性感染及蠕虫性感染。

周旭春等[53]用旋毛感染法制作小鼠感染后肠易综合征(PI-IBS)模型,每只小鼠灌服 0.2 mL 含 300 个旋毛虫幼虫的生理盐水,感染后第 8 周进行腹壁撤退反射和结肠传输试验,观察小鼠的胃肠动力状况、内脏敏感性以及局部炎症免疫反应等,小鼠出现胃肠动力减弱,内脏敏感性增高,末端回肠和近端结肠组织存在炎症细胞浸润和充血水肿则提示腹泻模型建立成功。

寄生虫感染诱导的 PI-IBS 动物模型具备肠易激综合征(irritable bowel syndrome,IBS)主要症状特征,模型稳定,制备简便,在 PI-IBS 研究中应用比较广泛。由于寄生虫类型繁多,包括贾地鞭毛虫、巴西日圆线虫、旋毛虫、隐孢子虫等,不同寄生虫感染建立的腹泻模型导致的临床效果,特点也不同[54],因此用寄生虫感染建立腹泻模型时需多方面考虑,选择最恰当的方式。

以上所综述的常见腹泻模型造模方法相互之间均有一定的差异性,不同造模方法存在不同的优缺点,同时不同造模方法对于实验动物的表现也有所不同。见表 1。

2 腹泻的药物治疗

目前,针对不同类型腹泻的治疗药物也较多,大致可分为中药制剂和相应的制剂等,还有一些药物通常单独使用,例如抗生素、蒙脱石散、复方嗜酸乳杆菌等,也有一些药物可以联合使用,疗效也很显著。

2.1 防治功能性腹泻的药物

2.1.1 中药制剂

针对上述评价方法中提到的 5 种证型的腹泻,临床上防治的中药复方也随之不同。吴静文等[55]探讨了四季健脾养胃膏治疗脾胃虚弱型功能性腹泻患者的疗效,研究结果显示临床效果佳,同时用药安全且方便,值得在临床上广泛推广。张聪伟等[56]评价健脾化湿和肠汤在临床治疗功能性腹泻脾虚湿盛证的有效性和安全性,最终显示疗效显著,安全且有效。王继衡[57]通过选取纳入标准的临床患者评价加味七味白术散治疗脾虚湿热型功能性腹泻的临床疗效,结果显示均有效且疗效维持方面效果较好。林志壕等[58]探讨珍素痛泻要方治疗肝郁脾虚型功能性腹泻的临床疗效,实验显示相比于双歧杆菌三联活菌胶囊,珍素痛泻要方治疗肝郁脾虚型功能性腹泻的临床疗效更加显著。罗布金模等[59]在临床上通过给脾肾阳虚型功能性腹泻患者服用参脂止泻汤探讨其疗效,发现治疗效果优于对照组,且复发率较低。

2.1.2 肠粘膜保护剂

以抗生素为主的腹泻治疗,长期使用会破坏肠粘膜屏障功能,进而导致继发肠源性感染,因此,保护肠粘膜屏障的完整性日益被重视[60]。肠粘膜保护剂(思密达蒙脱石)是一种源于蒙脱土的天然提取物,能够维护和修复受损的肠黏膜。蒙脱石散既发挥屏障作用又发挥防御作用,此药能均匀覆盖胃肠粘膜表面,修复炎症或溃疡肠粘膜,抑制细菌、病毒的吸附和固定,同时与粘液糖蛋白相互结合、修复,防御攻击因子,从而达到止泻的目的,它也不影响营养的正常吸收[61]。

2.2 防治细菌性腹泻的药物

2.2.1 抗菌药物

抗菌药物主要应用于一些感染性因素导致的急性腹泻,胡高峰[62]在研究四种抗菌药物(头孢唑肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢米诺)治疗儿童急性感染性腹泻的成本-效果时,最终得出头孢他啶治疗儿童急性感染性腹泻最经济有效。Lübbert[63]认为大环抗生素非达霉素可以降低艰难梭菌感染的复发率。但抗菌药物的长期使用会导致正常肠道菌群受到破坏,导致肠道代谢紊乱、肠道屏障功能改变及产生耐药性。胡佳艳等[64]研究发现抗生素可能从降低肠道微生物多样性、损害上皮屏障功能、影响细胞因子产生等多个方面引发 IBS,因此合理使用抗菌药物是控制腹泻的重要措施。对于大便次数多、发热、便血性腹泻、潜在免疫缺陷、高龄或显著合并症的重症患者,应考虑经验性抗生素治疗。

表 1 腹泻模型造模方法及优缺点

Table 1 Methods and advantages and disadvantages of diarrhea model construction

造模方法及造模剂 Modeling methods and modeling agents	造模成功的体征和特点 Signs and characteristics of successful modeling	模型的优点 Advantages of the model	模型的不足 Shortcomings of the model
功能性腹泻模型： Functional diarrhea model：			
番泻叶水煎液 Senna Leaf Water decoction	排便次数增加、粪便稀糊状或不成颗粒状、体重增长变慢、毛色晦暗、肛周污秽,毛发结穗、扎堆蜷缩等现象 Increased frequency of bowel movements, loose or non granular stool, slower weight gain, dull fur color, perianal pollution, hair clumping, curling up and other phenomena	低残留、简便、效果显著 Low residue, simple, and effective	毒副作用大、药性猛烈 Significant toxic side effects and strong medicinal properties
蓖麻油 Castor-oil	排便次数增多、形状稀粘液、颜色浅棕色、体重增长缓慢、出现外形正常但水分多便、外形不正常的软便、水样便及黏液便 Increased frequency of bowel movements, thin mucous shape, light brown color, slow weight gain, appearance of normal but watery stools, abnormal soft stools, watery stools, and mucous stools	药效缓和 Moderation of drug efficacy	影响其他营养物质的吸收、提取工艺繁琐 Absorption and extraction process of other nutrients are complicated and affect their absorption
大黄水煎液 Da Huang Water decoction	出现食欲减退、稀便、活动减少、竖毛拱背、毛色失泽、粪便稀水样等 Decreased appetite, loose stools, reduced activity, arched back of vertical hair, loss of color, watery stool, etc.	原料价廉、来源广 Low cost raw materials and wide sources	作用部位不单一,对模型成功有影响 Action site is not singular and has an impact on the success of the model
乙酸 Acet	出现弓背蜷卧、懒动厌食、体重普遍下降、大便次数增加、稀便或半稀便、部分潜血阳性或肉眼粘液脓血便、多有肛周体毛沾染痕迹 Symptoms include hunched back, laziness, loss of appetite, general weight loss, increased frequency of bowel movements, loose or semi loose stools, partially positive occult blood or mucous purulent bloody stools, and traces of perianal body hair contamination	起效快、效果好、成本低、可控性和可重复性强 Fast onset, good effect, low cost, strong controllability and repeatability	有一定的自愈性导致造模不稳定 There is a certain degree of self-healing, which leads to unstable molding
角叉菜胶 Carrageenan	在给药 1 周后出现体重减轻、腹泻、黏液便血等症,2~3 周肉眼可见在盲肠、结肠及直肠有许多针尖样大小的溃疡及出血点、光镜下显示出结肠粘膜发生溃疡,隐窝脓肿,黏膜及黏膜下层有淋巴、单核及中性粒细胞渗出 After one week of administration, symptoms such as weight loss, diarrhea, and bloody stools appeared. Within 2~3 weeks, numerous needle like ulcers and bleeding points were visible to the naked eye in the cecum, colon, and rectum. Under light microscopy, ulcers and crypt abscesses were observed in the colon mucosa, with lymphatic, mononuclear, and neutrophil exudate in the mucosa and submucosa	操作简单、重复性好、持续时间长 Simple operation, good repeatability, and long duration	损伤部位单一,多集中于盲肠部 Injury site is single and mostly concentrated in the cecum
母婴分离+乙酸灌肠+番泻叶灌胃及夹尾刺激 Mother infant separation + acetic acid enema + senna leaf gavage and tail clamping stimulation	出现精神抑郁、排便异常、胃肠道功能紊乱且结肠组织进行 HE 染色时无明显病理性改变 Mental depression, abnormal bowel movements, gastrointestinal dysfunction, and no significant pathological changes observed during HE staining of colon tissue	与临床症状相符合 Consistent with clinical symptoms	操作难度与复杂度较大、不可控因素多 Difficulty and complexity of the operation are high, and there are many uncontrollable factors
细菌性腹泻模型： Bacterial diarrhea model：			

续表1

造模方法及造模剂 Modeling methods and modeling agents	造模成功的体征和特点 Signs and characteristics of successful modeling	模型的优点 Advantages of the model	模型的不足 Shortcomings of the model
大肠杆菌悬液 *Escherichia coli* suspension	粪便浆糊样、采食量减退、精神状态不佳以及对外界敏感度降低,嗜睡、寒战等症状 Fecal consistency, decreased food intake, poor mental state, decreased sensitivity to external stimuli, symptoms such as drowsiness and chills	致泻率高、起效快、效果显著、耗时短 High diarrhea rate, fast onset, significant effect, and short time consumption	不易获得,容易造成感染 Not easy to obtain, prone to infection
金黄色葡萄球菌液 *Staphylococcus aureus* solution	小肠绒毛排列紊乱,大部分绒毛脱落,绒毛表面有炎性渗出,绒毛间质水肿,小血管扩张、充盈 Arrangement of small intestinal villi is disordered, with most villi shedding, inflammatory exudate on the villi surface, interstitial edema of villi, and dilation and filling of small blood vessels	耗时短 Short time consumption	不易获得、致泻效果不显著、起效慢 Not easy to obtain, insignificant laxative effect, slow onset of action
艰难梭菌芽孢 Clostridium difficile spore	出现便血、粥样便或大便次数增多、精神状态不佳等现象 Blood in the stool, porridge like stool or increased stool frequency, poor mental state, etc.	损伤比较单一、效果明显 Damage is relatively simple and the effect is significant	菌株不易获得 Strain is not easy to obtain
病毒性腹泻模型: Viral diarrhea model:			
轮状病毒株 Rotavirus strain	第 3d 致泻率达到最高,体重明显下降,肠粘膜上皮细胞空泡样变,绒毛结构紊乱 On the third day, the diarrhea rate reached its highest point, with a significant decrease in body weight, vacuolar changes in intestinal mucosal epithelial cells, and disordered villus structure	模型稳定 Model stability	容易导致病毒在种群间传播 Easy to cause virus transmission between populations
症状性腹泻模型: Symptomatic diarrhea model:			
硫酸庆大霉素注射液+头孢拉定胶囊+无菌生理盐水 Gentamicin sulfate injection +Cefradine capsules+sterile physiological saline	严重腹泻、翻毛严重、精神萎靡、畏冷、蜷缩、粪便变得湿、稀、软呈黄绿色水样便 Severe diarrhea, severe hair turning, mental lethargy, fear of cold, curling up, wet, thin, soft yellow green watery stool	效果明显、时效快、用量好掌控 Significant effect, fast delivery, easy control of dosage	操作复杂 Complex operation
盐酸伊立替康 Irinotecan	出现皮毛污秽、潮湿、结块、身体发抖、肛门乌黑红肿、情绪易怒等 Appearance of dirty, damp, clumped fur, trembling body, black and swollen anus, irritability, etc.	起效迅速,效果显著具有可控性 Rapid onset, significant effect, and controllability	毒副作用严重 Serious toxic side effects
其他: Other:			
原虫性感染及蠕虫性感染 Parasitic infection and helminth infection	出现胃肠动力减弱,内脏敏感性增高,末端回肠和近端结肠组织存在炎症细胞浸润和充血水肿 Weakened gastrointestinal motility, increased visceral sensitivity, inflammatory cell infiltration and congestion edema in the terminal ileum and proximal colon tissues	模型稳定、制备简便 Model stability and easy preparation	影响因素较多、选择范围大 There are many influencing factors and a wide range of choices

2.2.2 微生态制剂益生菌

含益生菌药物能增加腹泻患者肠道内有益菌的数量和活性,同时抑制细菌生长,使患者肠道内的菌群恢复平衡,从而缓解腹泻症状,治疗效果明

显且副作用小。金鑫等[65]研究益生菌制剂对抗生素诱导的腹泻模型小鼠肠道菌群的恢复作用,采用荧光定量 PCR 检测嗜酸乳杆菌 NCFM、乳双歧杆菌 Bi-07 和鼠李糖乳杆菌 HN001 等外源益生菌,发现这种益生菌制剂能明显改善小鼠腹泻情况,促进腹泻小鼠生长,显著恢复小鼠肠道菌群结构。贺璐[66]研究发现汉逊德巴利酵母菌能促进肠道内部分有益细菌的增殖,使有害菌的生长被抑制,以此调节肠道菌群平衡,促进肠道内部分细菌的生长,这部分细菌可分泌具有催化活性的乳糖酶,最终调节肠道乳糖酶活性达到治疗腹泻目的。

2.2.3 中药制剂

中药是含有多种有效活性成分的纯天然药物,具有高安全、低残留、低毒性、副作用小、不易产生耐药性等优势。多项研究表明中药复方、单味中药和中药有效成分对细菌性腹泻治疗有着独特的疗效,使得抗腹泻中药成为腹泻药物研究领域的热点[67]。

张亚辉[68]研究发现鹳榆止泻散对临床常见致病菌具有一定的抑菌活性,能够不同程度缓解腹泻小鼠临床症状,调节肠道菌群状态、恢复血常规指标,回调大肠杆菌腹泻小鼠 IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ 和 MPO 水平,减轻机体炎症反应,增强十二指肠组织 PCNA 和 EGFR 蛋白表达,促进肠黏膜损伤修复。赵宝凯等[69]研究发现金香颗粒主要通过抑制肠道蠕动、降低炎症所引起的损伤等作用来预防大肠杆菌性腹泻的发生。钟秋等[70]研究发现灌服复方诃子口服液后,实验组小鼠体重及采食量基本恢复正常,肠绒毛也恢复正常,肠腺变性消失、有增生,模型组小肠绒毛病变有所好转,但肠腺部分增生,各组小鼠腹泻症状均有所改善,说明复方诃子口服液可以抑制大肠杆菌,对大肠杆菌性腹泻具有治疗作用。

尚秋辰[71]研究发现白术多糖对大肠杆菌诱导的小鼠腹泻有一定防治效果,白术多糖可以调节肠道黏膜修复因子 EGFR 和 TGF-β_1,在早期促进肠道黏膜修复,中后期保护肠上皮细胞的微绒毛、线粒体、内质网等,促进细胞较快地恢复正常代谢,从而减缓腹泻症状,对腹泻小鼠的肠道有明显的保护作用,临床上常见的治疗腹泻的中药有效成分还有黄芪多糖、五味子多糖、西洋参多糖等。

2.3 联合用药

2.3.1 中药与化学药物联合

在临床上治疗艰难梭菌相关性腹泻主要用药为甲硝唑及万古霉素,在临床应用中发现,单个用某一种药物时仅能杀死菌体但很难清除芽孢,而且还会加重肠道菌群及肠道代谢紊乱[72]。马致洁等[73]用生姜泻心汤低剂量联合万古霉素治疗艰难梭菌小鼠腹泻模型,发现对毒素水平的抑制能力较稳定,且无复发迹象,并且实验发现联合用药比单味药治疗效果更好。Wultanska 等[74]通过体外实验研究发现,小檗碱对艰难梭菌表现出较强的抗菌活性,小檗碱联合万古霉素的分析也显示二者有协同抑制作用。由此可见,相对用单个西药治疗,中西药联合治疗腹泻效果更显著。

2.3.2 中药与益生菌制剂联合

与单用益生菌制剂或单用中药相比,中药联合益生菌制剂治疗腹泻的疗效更显著,所以临床相关研究报道较多。李春亭等[75]在研究中药联合益生菌对大肠杆菌性小鼠腹泻的保护作用中发现中药联合益生菌可降低小鼠腹泻指数、脾和肝器官指数,增加体重、进食量,使粪便形状颜色恢复正常并降低肠内大肠杆菌数、血清及小肠组织中 MPO 活性,从而对大肠杆菌性小鼠腹泻产生协同保护作用。Shao 等[76]通过建立抗生素相关性腹泻动物模型发现汉斯德巴氏酵母菌联合七味白术片可以克服菌群失调,同时还可以恢复肠粘膜菌群稳态。刘又嘉等[77]研究发现 25%超微七味白术散加 25%酵母组不但具有调整乳酸杆菌的作用,而且能促进酵母菌和乳酸杆菌的生长,保护肠道粘膜,增强机体免疫力和抵抗力,利于腹泻的治疗。

2.4 其他

李萍等[78]采用慢性束缚应激加番泻叶灌服法建立 IBS-D 模型,并选取“大肠俞”进行电针治疗,结果发现电针大肠俞能有效改善 IBS-D 小鼠肠道炎性因子含量,其镇痛效应可能与炎性因子相关。付怡茗等[27]研究发现穴位注射、电针均可改善肝郁脾虚型 IBS-D 小鼠状态,但电针在减轻小鼠腹泻症状、降低肠道敏感性方面优于穴位注射。常梦娟等[79]采用番泻叶建立小鼠腹泻模型,研究发现针刺可以抑制腹泻小鼠小肠推进,并对受损的小肠黏膜病理损伤有一定的改善作用。

止泻药常常和其他中药复方、益生菌制剂等联合使用,效果更佳。符红波[80]将益生菌和蒙脱石散联合,可促进患儿症状消退,调节胃肠道激素水平,抑制炎症反应,治疗腹泻效果更加明显。赵力芳[81]联合蒙脱石散和脾氨肽口服溶液治疗慢性腹泻患

儿,发现联合用药组各项腹泻临床指标消失时间较早,治疗效果较单一用药好。

3 讨论

目前关于腹泻动物模型的研究内容较为丰富,多集中于腹泻动物模型的建立以及腹泻治疗药物研究。腹泻动物模型的建立方法虽然越来越成熟但存在的问题也很多,例如建立肠道菌群失调腹泻模型,若采用单一的抗菌药物,模型会不稳定。在采用灌胃途径建立细菌性动物腹泻模型时,若没有对胃酸进行预处理常会导致造模失败。此外,在评价动物腹泻模型时也存在很多问题,大多数研究仅考虑腹泻指数、腹泻率等一些体外指标,但是未考虑肠道损伤、肠道菌群等体内指标,这使得腹泻动物模型评价标准缺乏科学性、统一性。

随着不断探索,腹泻的病因病机更加清晰,对治疗药物进行深入研究,能够为腹泻拓宽治疗渠道。现有的腹泻治疗药物多集中在抗生素、肠粘膜保护剂、微生态制剂益生菌等,已有研究发现天然药物提取物在治疗腹泻上表现出一定优势,但还需要进一步探索腹泻形成的确切机制以便找到药物治疗的精准靶点,才能加快药物研发从基础研究到临床应用的步伐,改善腹泻患者的生活质量,促进肠胃道健康事业的发展。

参考文献:

[1] 王珊. 农村典型地区的腹泻疾病负担及供水和卫生设施的成本效益研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2011.
WANG S. Study on the burden of diarrhea disease and the cost-benefit of water supply and sanitation facilities in typical rural areas [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2011.

[2] 谢立, 孙昼, 黄仁杰, 等. 婴幼儿冬季腹泻危险因素分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2007, 8(4): 356-359.
XIE L, SUN Z, HUANG R J, et al. Analysis of risk factors of diarrhea disease among infants in winter [J]. Chin Prev Med, 2007, 8(4): 356-359.

[3] 王敏. 便秘用药不可随意 [J]. 祝您健康, 2021, 42: 45-46.
WANG M. Constipation medication should not be used arbitrarily [J]. Good Health, 2021, 42: 45-46.

[4] 吴丹, 郑学宝. 番泻叶的研究概况 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4(11): 151-153.
WU D, ZHENG X B. General situation of research on senna leaves [J]. Asia Pac Tradit Med, 2008, 4(11): 151-153.

[5] 管志伟, 赵琼, 赵中和, 等. 番泻叶致幼龄大鼠腹泻模型量-时-效关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1806-1809.
GUAN Z W, ZHAO Q, ZHAO Z H, et al. Study on dose-time-effect relationship of diarrhea model in young rats induced by Folium sennae [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(8): 1806-1809.

[6] 刘翔燕, 宁柯铭, 刘鑫鑫, 等. 中药制剂珠蓼散对小鼠腹泻模型的防治作用 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(1): 14-17.
LIU X Y, NING K M, LIU X X, et al. The preventive and therapeutic effects of traditional Chinese medicine preparation Zhuliao Powder on diarrhea mouse model [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2020, 39(1): 14-17.

[7] 梁玲, 张建英, 周盈青, 等. 香诃止泻汤止泻作用的实验研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25(6): 44-46.
LIANG L, ZHANG J Y, ZHOU Y Q, et al. Experimental study on antidiarrheal effect of Xianghe antidiarrheal decoction [J]. China Ind Econ, 2019, 25(6): 44-46.

[8] 滕久祥, 彭芝配, 尹进, 等. 九香止泻肠溶片对急性腹泻模型小鼠腹泻指数及腹腔毛细血管通透性影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(6): 34-36.
TENG J X, PENG Z P, YIN J, et al. Effect of Jiuxiang Zhixie Granule on diarrhea index and permeability of abdomen capillary in acute diarrhea mice model [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2007, 27(6): 34-36.

[9] 孟彦彬, 鲁翔宇. 番泻叶化学成分与药理研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2023, 40(4): 333-336.
MENG Y B, LU X Y. Research progress on chemical constituents and pharmacology of *Senna* leaves [J]. J Chengde Med Univ, 2023, 40(4): 333-336.

[10] 陈文露, 彭新宇, 康桦华, 等. 黄芩汤治疗蓖麻油致小鼠腹泻的作用及机制研究 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1590-1599.
CHEN W L, PENG X Y, KANG H H, et al. Effect and mechanism of Huangqin Decoction in treatment of castor oil-induced diarrhea mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(5): 1590-1599.

[11] 唐兴刚, 罗胜军, 袁明贵, 等. 牡荆水提物对蓖麻油腹泻小鼠的治疗作用研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(2): 799-808.
TANG X G, LUO S J, YUAN M G, et al. Study on therapeutic effect of aqueous extract of *Vitex negundo* l. var. cannabifolia (sieb. et zucc.) hand.-mazz. on *Castor* oil induced diarrhea in mice [J]. China Anim Husb Vet Med, 2024, 51(2): 799-808.

[12] 陈艳芬, 梁万年, 江涛, 等. 肠乐胶囊治疗腹泻型肠易激综合征的药效学研究 [J]. 中成药, 2016, 38(3): 499-504.
CHEN Y F, LIANG W N, JIANG T, et al. Pharmacodynamics of Changle Capsules in the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(3): 499-504.

[13] 闫彦芳, 张壮, 赵可星, 等. 黄黄连赤石脂禹余粮汤对小鼠蓖麻油性腹泻及胃肠推进运动的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(2): 58-60.
YAN Y F, ZHANG Z, ZHAO K X, et al. Effects of the

Decoction of Yu-Huanglian Chi-Shizhi and Yu-Yuliang on Diarrhea in Mice and on the Activities of Stomach and Intestines [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2007, 13(2): 58-60.

[14] 程艳玲, 王晓波. 止泻灵颗粒药效学研究 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10): 624-625.
CHENG Y L, WANG X B. Pharmacodynamic study of zhixieling granules [J]. J Pharm Res, 2009, 28(10): 624-625.

[15] 赵艳玲, 王伽伯, 周旭, 等. 不同工艺制备的桃花止泻冲剂抗腹泻作用比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 38-40.
ZHAO Y L, WANG J B, ZHOU X, et al. Comparison of anti-diarrhea effects of Taohua Zhixie Granules prepared by different processes [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2009, 15(3): 38-40.

[16] 丁家森, 陆宇, 王志刚, 等. 土家族药红蜈蚣七与岩丸子复方水煎液对急性腹泻小鼠模型作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(16): 12-13.
DING J S, LU Y, WANG Z G, et al. Effect of decoction, hongwugongqi and Yanwanzi of the minority Tujian on diarrhea index in acute diarrhea mice model [J]. Asia Pac Tradit Med, 2016, 12(16): 12-13.

[17] 白世敬, 李峰, 马捷, 等. 功能性腹泻脾虚证动物模型的制作与评价思路初探 [J]. 河北中医, 2014, 36(4): 592-593, 597.
BAI S J, LI F, MA J, et al. Establishment and evaluation of animal model of functional diarrhea with spleen deficiency syndrome [J]. Soc Secur Stud, 2014, 36(4): 592-593, 597.

[18] 蒋萃, 李白雪, 袁世清, 等. 脾虚证大鼠模型的制备方法研究进展及评价 [J]. 环球中医药, 2018, 11(8): 1333-1336.
JIANG C, LI B X, YUAN S Q, et al. Research progress and evaluation in rat model of spleen deficiency syndrome [J]. J Arid Land Resour Environ, 2018, 11(8): 1333-1336.

[19] 曹玲芝. 建立动物腹泻模型的研究进展[A]. 中国畜牧兽医学会 2009 学术年会[C], 2009.
CAO L Z. Research progress in establishing animal diarrhea models [A]. Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Annual Conference 2009[C], 2009.

[20] 郭艳丽. 动物腹泻模型构建及进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(44): 38.
GUO Y L. Construction and progress of animal diarrhea model [J]. World Latest Med Inf, 2015, 15(44): 38.

[21] 石磊, 李军祥, 史瑞, 等. 溃疡性结肠炎的动物模型研究进展 [J]. 解放军医药杂志, 2020, 32(12):107-112.
SHI L, LI J X, SHI R, et al. Research progress of animal models of ulcerative colitis [J]. Med Pharm J Chin People's Liberation Army, 2020, 32(12):107-112.

[22] 何育佩, 杜正彩, 侯小涛, 等. 溃疡性结肠炎动物模型研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(2): 423-433.
HE Y P, DU Z C, HOU X T, et al. Research progress of animal models of ulcerative colitis [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2020, 22(2): 423-433.

[23] MAKKER J, CHILIMURI S, BELLA J N. Genetic epidemiology of irritable bowel syndrome [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(40): 11353-11361.

[24] 张薇, 郑倩华, 蒋一璐, 等. 肠易激综合征内脏高敏动物模型的研究现状 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5655-5658.
ZHANG W, ZHENG Q H, JIANG Y L, et al. Research status on animal models of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(11): 5655-5658.

[25] 程斌, 黄琴, 王军蒙, 等. 乙酸联合束缚应激诱导腹泻型肠易激综合征小鼠模型的制备 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 153-160.
CHENG B, HUANG Q, WANG J M, et al. Preparation of a mouse model of irritable bowel syndrome with diarrhea induced by acetic acid combined with restraint stress [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 153-160.

[26] 徐孝平, 徐剑钦, 黄俊杰, 等. WHBE 兔与日本大耳白兔腹泻型肠易激综合征模型的肠道菌群研究 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 165-173.
XU X P, XU J Q, HUANG J J, et al. Characterization of intestinal microflora in WHBE rabbit and Japanese white rabbit models of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(2): 165-173.

[27] 付怡茗, 魏晓彤, 柏寒, 等. 电针与穴位注射法治疗腹泻型肠易激综合征小鼠模型效果的比较研究 [J]. 中医药导报, 2021, 27(9): 47-51.
FU Y M, WEI X T, BAI H, et al. Comparative study on the effects of electroacupuncture and acupoint injection in the treatment of diarrheal irritable bowel syndrome in mice [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(9): 47-51.

[28] 田帝, 王垂杰. 中西医治疗功能性腹泻研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11): 222-224.
TIAN D, WANG C J. Research progress on the treatment of functional diarrhea by integrative Chinese and western medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2019, 21(11): 222-224.

[29] 徐博文, 徐海丰, 程晨. 参苓白术散加减对腹泻型肠易激综合征脾虚湿盛证患者血清胃肠激素水平的影响 [J]. 检验医学与临床, 2024, 21(4): 530-532, 537.
XU B W, XU H F, CHENG C. Effects of addition and reduction of Shenling Baishu Powder on serum gastrointestinal hormone levels in patients with diarrheal irritable bowel syndrome with spleen deficiency and dampness [J]. Lab Med Clin, 2024, 21(4): 530-532, 537.

[30] 王曼莉, 冷子妍, 孙志广. 腹泻型肠易激综合征(脾虚湿热证)治疗经验探析 [J]. 中国医药导刊, 2023, 25(5): 491-494.
WANG M L, LENG Z Y, SUN Z G. Experience in Treating diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (syndrome of spleen deficiency and damp-heat) [J]. Chin J Med Guide, 2023, 25(5): 491-494.

[31] 何宗卿, 经双双, 智沐君, 等. 基于数据挖掘的肠易激综合征动物模型应用特点分析 [J]. 中医研究, 2022, 35(5):70

-77.
HE Z Q, JING S S, ZHI M J, et al. Analysis of application characteristics of animal model of irritable bowel syndrome based on data mining [J]. Tradit Chin Med Res, 2022, 35(5):70-77.

[32] 屈玉华, 范润平, 陈敏, 等. 循经感传扶阳灸治疗腹泻型肠易激综合征(脾肾阳虚证)的临床疗效观察[J]. 四川中医, 2023, 41(11): 216-220.
QU Y H, FAN Y P, CHEN M, et al. Clinical therapeutic effect of acupuncture and moxibustion in the treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome (spleen and kidney yang deficiency) [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2023, 41(11): 216-220.

[33] 刘起胜, 刘怀, 彭微, 等. 菌群失调腹泻抗生素造模对小鼠肠黏膜的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(5): 501-504, 512.
LIU Q S, LIU H, PENG W, et al. The influence of antibiotic modeling on intestinal mucosa in dysbacteriotic diarrhea mice [J]. Chin J Microecol, 2015, 27(5): 501-504, 512.

[34] 董娟, 徐杰, 王新国, 等. 葛根对细菌性腹泻模型小鼠淋巴细胞水平和胃肠传输功能的影响研究 [J]. 陕西中医, 2020, 41(8): 1047-1050.
DONG J, XU J, WANG X G, et al. Effect of pueraria Lobata on lymphocyte level and gastrointestinal transport function in rats with bacterial diarrhea [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2020, 41(8): 1047-1050.

[35] 马斌. 猪源大肠杆菌小鼠腹泻模型的构建及防治用中药复方制剂的研制 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
MA B. Construction of a mouse diarrhea model of Escherichia coli of porcine origin and development of a Chinese medicine compound preparation for its prevention [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2021.

[36] 赵荣山, 杨会锁, 郝京生, 等. 小鼠细菌性腹泻模型的诱导方法 [J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(13): 1210.
ZHAO R S, YANG H S, HAO J S, et al. Induction of a mouse model of bacterial diarrhea [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2000, 9(13): 1210.

[37] 刘翠艳, 陈四玉, 孙桃桃, 等. 马齿苋-益生菌联用对热毒证小鼠腹泻的预防效果 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(2): 211-219.
LIU C Y, CHEN S Y, SUN T T, et al. Preventive effect of purslane combined with probiotics on heat-toxin syndrome diarrhea mice [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2018, 30(2): 211-219.

[38] 孔懿, 徐虹, 乔浦, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的医院内获得性抗生素相关性腹泻 [J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(9): 1420-1423, 1428.
KONG Y, XU H, QIAO P, et al. Hospital-acquired antibiotic-associated diarrhea due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Nosocomiology, 2018, 28(9): 1420-1423, 1428.

[39] 赵凯科, 韩军艳, 郑立, 等. 葎草醇提物对小鼠细菌性腹泻的治疗作用 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35(11): 1814-1818, 1823.
ZHAO K K, HAN J Y, ZHENG L, et al. Therapeutic effect on *Humulus scandens* alcohol extract on bacterial diarrhea of mice [J]. Chin J Vet Sci, 2015, 35(11): 1814-1818, 1823.

[40] 彭淑珍, 王义传, 王泽华. 小鼠细菌性腹泻病理模型的制作及痢血康对该模型的治疗作用 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2007, 37(4): 6-8.
PENG S Z, WANG Y C, WANG Z H. Establishing of pathologic model of mice germs diarrhea and curative effect of Lixuekang on that model [J]. Gansu Anim Husb Vet, 2007, 37(4): 6-8.

[41] 杨斯琪. 艰难梭菌相关性腹泻小鼠模型的构建 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
YANG S Q. Construction of mouse model of *Clostridium* difficile-associated diarrhea [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.

[42] 郭亚楠, 王君, 刘欣竹, 等. 基于 16S rDNA 测序分析启脾益肺方对艰难梭菌相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响 [J]. 时珍国医国药, 2021, 7(12):2843-2845.
GUO Y N, WANG J, LIU X Z, et al. Effect of Qipi Yifei recipe on intestinal flora of mice with Clostridium difficile-associated diarrhea based on 16S rDNA sequencing [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 7(12):2843-2845.

[43] 刘斯涛, 金菊花, 姜中其. 动物腹泻模型建立的研究进展 [J]. 当代畜牧, 2019, 36(9): 16-18.
LIU S T, JIN J H, JIANG Z Q. Advances in the establishment of animal diarrhea model [J]. Contemp Anim Husb, 2019, 36(9): 16-18.

[44] 胡长霞. 益生菌对轮状病毒性腹泻小鼠肠道屏障的影响及机制的探讨 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
HU C X. Effect of probiotics on intestinal barrier in mice with rotavirus diarrhea and its mechanism [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.

[45] 拜小强, 魏锁成. 牛轮状病毒动物模型建立及疫苗研制进展 [J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2020, 41(4): 32-37.
BAI X Q, WEI S C. Establishment of bovine rotavirus animal model and development of corresponding vaccine [J]. J Northwest Minzu Univ Nat Sci, 2020, 41(4): 32-37.

[46] 郭抗萧, 尹抗抗, 王欢, 等. 抗生素对小鼠菌群失调腹泻肠道菌群多样性的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(3): 249-252, 257.
GUO K X, YIN K K, WANG H, et al. The effect of modeling dysbacterial diarrhea with antibiotics on molecular diversity of intestinal microbiota in mice [J]. Chin J Microecol, 2014, 26(3): 249-252, 257.

[47] 惠华英, 申可佳, 李丹丹, 等. 七味白术散对抗生素所致腹泻小鼠肠道乳糖酶活性的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(10): 1126-1129.
HUI H Y, SHEN K J, LI D D, et al. Influence of Qiwei Baizhu Powder on the lactase activity in intestine of mice with diarrhea induced by antibiotics [J]. Chin J Microecol, 2018, 30(10): 1126-1129.

[48] 龙承星, 贺璐, 郭抗萧, 等. 超微七味白术散与酵母菌联用对菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响 [J]. 中国中西

医结合杂志, 2018, 38(1): 66-70.
LONG C X, HE L, GUO K X, et al. Effect of Qiwei Baizhu Powder combined with yeast on the intestinal bacteria diversity in dysbacteriotic diarrhea mice [J]. China Ind Econ, 2018, 38(1): 66-70.

[49] 詹扬, 万建华, 李颖萌, 等. 乳酸菌素片对抗生素相关性腹泻小鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国乳品工业, 2021, 49(8): 4-9, 36.
ZHAN Y, WAN J H, LI Y M, et al. Effects of *Lactobacillus* tablets on gut microbiota in antibiotic-associated diar-rhea model mice [J]. China Dairy Ind, 2021, 49(8): 4-9, 36.

[50] 孜瓦热古丽·努尔, 方若欣, 廖正凯. 肠道微生态与化疗疗效的相关性 [J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2019, 6(2): 161-166.
ZVARGULI N, FANG R X, LIAO Z K. The correlation between intestinal microecology and the efficacy of chemotherapy [J]. Electron J Metab Nutr Cancer, 2019, 6(2): 161-166.

[51] 周圆. 小柴胡汤干预化疗药物伊立替康所致迟发性腹泻的实验研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2017.
ZHOU Y. Experimental study on Xiaochaihu Decoction to intervene delayed diarrhea caused by chemotherapy drug irinotecan [D]. Guiyang: Guizhou Medical University, 2017.

[52] 邓海燕. 生姜泻心汤预防伊立替康迟发性腹泻的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
DENG H Y. Study on ginger Xiexin Decoction in preventing delayed diarrhea of irinotecan [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2007.

[53] 周旭春, 孙晓宁, 杨波, 等. 感染后肠易激综合征小鼠不同肠段肠黏膜热休克蛋白 70 的表达及意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(29): 1-6.
ZHOU X C, SUN X N, YANG B, et al. Role of differentially expressed heat shock protein 70 in various intestinal segments of mice in pathogenesis of post-infectious irritable bowel syndrome [J]. China J Mod Med, 2015, 25(29): 1-6.

[54] 臧凯宏, 秦红岩. 感染后肠易激综合征动物模型研究进展 [J]. 东南大学学报(医学版), 2016, 35(4): 598-601.
ZANG K H, QIN H Y. Research progress of animal models of irritable bowel syndrome after infection [J]. J Southeast Univ Med Sci Ed, 2016, 35(4): 598-601.

[55] 吴静文, 薛芳, 周孝清. 四季健脾养胃膏治疗脾胃虚弱型功能性腹泻的疗效及对心理健康的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2024, 10(4): 29-31.
WU J W, XUE F, ZHOU X Q. Therapeutic efficacy of Four Seasons Strengthening the Spleen and Nourishing the Stomach Cream in the treatment of functional diarrhea with spleen and stomach weakness and its effect on mental health [J]. Inn Mong J Tradit Chin Med, 2024, 10(4): 29-31.

[56] 张聪伟, 刘力, 唐旭东, 等. 健脾化湿和肠汤治疗功能性腹泻脾虚湿盛证临床研究 [J]. 陕西中医药大学学报, 2017, 40(4): 45-47, 70.
ZHANG C W, LIU L, TANG X D, et al. Clinical study on the treatment of functional diarrhea with spleen deficiency and dampness excess by Jianpi Huashi Hechang Decoction [J]. J Shaanxi Univ Chin Med, 2017, 40(4): 45-47, 70.

[57] 王继衡. 加味七味白术散治疗脾虚湿热型功能性腹泻的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
WANG J H. Clinical study on modified Qiwei Baizhu Powder in treating functional diarrhea of damp-heat type due to spleen Deficiency [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2020.

[58] 林志壕, 陈昀, 熊文生. 珍素痛泻要方治疗肝郁脾虚型功能性腹泻的临床疗效观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(11): 2508-2513.
LIN Z H, CHEN X, XIONG W S. Observation on the clinical efficacy of Zhen su Tongxie prescription for the treatment of functional diarrhea with liver depression and spleen deficiency syndrome [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2022, 39(11): 2508-2513.

[59] 罗布金模, 王璐, 许珂, 等. 参脂止泻汤治疗脾肾阳虚功能性腹泻疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志, 2023, 45(6): 59-61.
LUO B, WANG L, XU K, et al. Clinical observation of Shenzhi Zhixie Decoction in treating functional diarrhea with deficiency of spleen and kidney Yang [J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2023, 45(6): 59-61.

[60] 郭彤, 许梓荣, 赵晶晶. 一种新型肠粘膜保护剂——载铜蒙脱石对肠粘膜屏障功能影响的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 75-80.
GUO T, XU Z R, ZHAO J J. Effects of copper-exchanged montmorillonite on the intestinal mucosa barrier function [J]. Chin J Prev Vet Med, 2007, 29(1): 75-80.

[61] 吴云祥. 腹泻的临床药物治疗 [J]. 大家健康(中旬版), 2012, 6(9): 20-21.
WU Y X. Clinical pharmacotherapy of diarrhea [J]. For All Health, 2012, 6(9): 20-21.

[62] 胡高峰. 四种抗菌药物治疗儿童急性感染性腹泻的成本-效果分析 [J]. 海峡药学, 2023, 35(1): 72-74.
HU G F. Cost-effectiveness analysis of four kinds antibiotics for the treatment of acute infectious diarrhea in children [J]. Strait Pharm J, 2023, 35(1): 72-74.

[63] LÜBBERT C. Antimicrobial therapy of acute diarrhoea: a clinical review [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14(2): 193-206.

[64] 胡佳艳, 吕咪, 王凤云. 抗生素对肠易激综合征的影响及机制探讨 [J]. 中国全科医学, 2023, 26(21): 2666-2672.
HU J Y, LV M, WANG F Y. The exploration of the effects and mechanisms of antibiotics on irritable bowel syndrome [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(21): 2666-2672.

[65] 金鑫, 葛亚中, 敬璞, 等. 益生菌制剂对抗生素诱导腹泻模型小鼠肠道菌群的恢复 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 17-24, 16.
JIN X, GE Y Z, JING P, et al. The effects of probiotics on the restoration of intestinal microflora in a mouse model of antibiotic-induced diarrhea [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(7): 17-24, 16.

[66] 贺璐. 汉逊德巴利酵母菌对抗生素相关性腹泻小鼠肠道内容

物细菌的影响［D］. 长沙：湖南中医药大学，2019.
HE L. Effect of Hanson dbaly yeast on bacteria in intestinal contents of mice with antibiotic-associated diarrhea［D］. Changsha：Hunan University of Chinese Medicine，2019.

［67］ 陈影，李硕，苏萍，等. 中药抗腹泻的药效作用及机制研究进展［J］. 中国实验方剂学杂志，2019，25(21)：203-211.
CHEN Y，LI S，SU P，et al. Anti-diarrhea effect and mechanism of traditional Chinese medicine［J］. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2019，25(21)：203-211.

［68］ 张亚辉. 鹳榆止泻散对小鼠大肠杆菌性腹泻的治疗效果研究［D］. 兰州：甘肃农业大学，2019.
ZHANG Y H. Study on the therapeutic effect of stork elm antidiarrheal powder on *Escherichia coli* diarrhea in mice［D］. Lanzhou：Gansu Agricultural University，2019.

［69］ 赵宝凯，耿健，钟灵，等. 金香颗粒预防小鼠大肠杆菌性腹泻的效果观察［J］. 中国兽医杂志，2020，56(12)：108-112.
ZHAO B K，GENG J，ZHONG L，et al. Prophylaxis effect of Jinxiang Granule against mouse diarrhea caused by *Escherichia coli*［J］. Chin J Vet Med，2020，56(12)：108-112.

［70］ 钟秋，姜晓文，于文会，等. 复方诃子口服液治疗犊牛大肠杆菌性腹泻的研究［J］. 黑龙江畜牧兽医，2018(7)：108-112，250.
ZHONG Q，JIANG X W，YU W H，et al. Treatment of *Escherichia coli* diarrhea in calves by compound Myrobalan oral liquid［J］. Heilongjiang Anim Sci Vet Med，2018(7)：108-112，250.

［71］ 尚秋辰. 白术多糖对大肠杆菌腹泻模型小鼠肠道黏膜修复机理研究［D］. 扬州：扬州大学，2017.
SHANG Q C. Study on the mechanism of intestinal mucosal repair by polysaccharides of *Atractylodes macrocephala* on mice with Escherichia coli diarrhea model［D］. Yangzhou：Yangzhou University，2017.

［72］ 章从恩，马致洁，黄璐琦. 中西医治疗抗生素相关性腹泻的药物研究进展［J］. 中国医院用药评价与分析，2022，22(7)：769-774.
ZHANG C E，MA Z J，HUANG L Q. Progress of traditional Chinese and western medicine in the treatment of antibiotic-associated diarrhea［J］. Eval Anal Drug Use Hosp China，2022，22(7)：769-774.

［73］ 马致洁，吕治，于小红，等. 生姜泻心汤对感染难辨梭菌小鼠的治疗作用研究［J］. 中国医院用药评价与分析，2021，21(11)：1281-1285，1290.
MA Z J，LYU Z，YU X H，et al. Therapeutic effects of Shengjiang Xiexin Decoction on mice infected with *Clostridium* difficile［J］. Eval Anal Drug Use Hosp China，2021，21(11)：1281-1285，1290.

［74］ WULTANSKA D，PIOTROWSKI M，PITUCH H. The effect of berberine chloride and/or its combination with vancomycin on the growth，biofilm formation，and motility of *Clostridioides* difficile［J］. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2020，39(7)：1391-1399.

［75］ 李春亭，王沙沙，赵欣，等. 中药联合益生菌对大肠杆菌性小鼠腹泻的保护作用［J］. 中国畜牧兽医，2022，49(8)：3226-3234.
LI C T，WANG S S，ZHAO X，et al. Protective effect of traditional Chinese medicine combined with probiotics on *E. coli* diarrheain mice［J］. China Anim Husb Vet Med，2022，49(8)：3226-3234.

［76］ SHAO H，ZHANG C，WANG C，et al. Intestinal mucosal bacterial diversity of antibiotic-associated diarrhea（AAD）mice treated with *Debaryomyces hansenii* and Qiweibaizhu Powder［J］. 3 Biotech，2020，10(9)：392.

［77］ 刘又嘉，肖新云，邓艳玲，等. 七味白术散与酵母菌联用对菌群失调腹泻模型小鼠肠道乳酸杆菌多样性的影响［J］. 航天医学与医学工程，2016，29(3)：175-180.
LIU Y J，XIAO X Y，DENG Y L，et al. Effects of qiweibaizhusan combined with yeast on intestinal *Lactobacillus* diversity in dysbacteriotic diarrhea mice［J］. Space Med Med Eng，2016，29(3)：175-180.

［78］ 李萍，戴伟. 电针大肠俞对腹泻型肠易激综合征小鼠肠道炎性因子的影响［J］. 湖北中医药大学学报，2019，21(5)：13-16.
LI P，DAI W. Effect of Electro-acupuncture at BL25 acupoints on intestinal inflammatory factors in Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome mice［J］. J Hubei Univ Chin Med，2019，21(5)：13-16.

［79］ 常梦娟，张田宁，吴生兵，等. 针刺天枢大肠俞对腹泻模型小鼠肠运动的影响［J］. 中医药临床杂志，2013，25(4)：331-332.
CHANG M J，ZHANG T N，WU S B，et al. Effect of acupuncture at Tian Shu Dachangshu on intestinal movement in diarrhea model mice［J］. Clin J Tradit Chin Med，2013，25(4)：331-332.

［80］ 符红波. 益生菌联合蒙脱石散治疗小儿腹泻的疗效及对胃肠道激素和炎症因子的影响［J］. 中国煤炭工业医学杂志，2022，25(6)：654-658.
FU H B. Effect of probiotics combined with montmorillonite powder on infantile diarrhea and its influence on gastrointestinal hormones and inflammatory factors［J］. Chin J Coal Ind Med，2022，25(6)：654-658.

［81］ 赵力芳. 蒙脱石散联合脾氨肽口服溶液对慢性腹泻患儿的治疗效果及对免疫功能的影响［J］. 中国医药导刊，2022，24(10)：1004-1008.
ZHAO L F. Therapeutic effect of montmorillonite powder combined with spleen aminopeptide oral solution on children with chronic diarrhea and its influence on immune function［J］. Chin J Med Guide，2022，24(10)：1004-1008.

〔收稿日期〕2024-03-15

彭梦薇,吴耀松,刘高源,等. 中医药治疗乳腺癌相关抑郁发展的机制研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 108-116.
Peng MW, Wu YS, Liu GY, et al. Research progress on the use of Traditional Chinese Medicines to treat breast cancer-related depression and associated diseases［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 108-116.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.013

中医药治疗乳腺癌相关抑郁发展的机制研究进展

彭梦薇[1],吴耀松[1],刘高源[1],匡洛逸[1],罗紫龙[1],陈玉龙[1],刘　燕[1,2*]

(1.河南中医药大学,中医学院(仲景学院),河南省中医方证信号传导重点实验室,郑州　450046;
2.河南中医药大学,河南省豫药全产业链研发协同创新中心,郑州　450046)

【摘要】 乳腺癌诊断与治疗过程中出现以抑郁为主的病理性情绪变化,临床上称之为乳腺癌相关抑郁。大量的流行病学和临床研究已证实乳腺癌相关抑郁病情复杂且治疗难度大、预后差。现有临床治法大多是乳腺癌术后化疗服用抗抑郁药物,将乳腺癌和抑郁症作为两个独立的疾病进行治疗,存在效率低、不良反应强等诸多缺陷。而中医药凭借其多成分同时调控多通路、多靶点显著优势,在防治乳腺癌相关抑郁的方面具有独特价值。本文主要是从神经系统紊乱、炎症免疫反应、肠道菌群失调等方面对乳腺癌相关抑郁机制,以及中医药的治疗机制进行综述,以期对中医药治疗乳腺癌相关抑郁临床应用和研究提供一定的参考。

【关键词】 乳腺癌相关抑郁;发病机制;中医药治疗;综述
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0108-09

Research progress on the use of Traditional Chinese Medicines to treat breast cancer-related depression and associated diseases

PENG Mengwei[1], WU Yaosong[1], LIU Gaoyuan[1], KUANG Luoyi[1], LUO Zilong[1], CHEN Yulong[1], LIU Yan[1,2*]
(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine (Zhongjing College), Key Laboratory of Signal Transmission of TCM Formulas, Zhengzhou 450046, China. 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial Collaborative Innovation Center for R&D of Henan Pharmaceutical Industry Chain, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Pathological mood changes, mainly depression, occurring during the diagnosis and treatment of breast cancer are referred to as breast cancer-related depression (BCRD). Numerous epidemiological and clinical studies have confirmed that BCRD is a complex condition that is difficult to treat and has a poor prognosis. Most existing clinical treatments involve the use of postoperative chemotherapy for breast cancer, and antidepressant drugs, which treat breast cancer and depression as two independent diseases and have various disadvantages such as low efficiency and strong adverse reactions. Traditional Chinese Medicine (TCM) has a unique value in the prevention and treatment of BCRD via its ability to regulate multiple pathways and targets using multiple components at the same time. In this paper, we review the mechanism of BRCD and the therapeutic mechanisms of TCM from the aspects of neurological disorders, inflammatory immune response, and intestinal flora disorders, with a view to providing references for the clinical application and research of TCM in the treatment of BCRD.

【Keywords】 breast cancer-related depression; pathogenesis; Chinese medicine treatment; review
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]国家自然科学基金项目(82104717);河南省科技攻关重点研发与推广专项(202102310493,232102310443);河南省特色骨干学科中医学学科建设项目(STG-ZYXKY-2020028);河南省科技攻关(192102310160)。
[作者简介]彭梦薇(1996—),女,硕士研究生,研究方向:情志方证基础相关研究。E-mail:pengmengwei1@126.com
[通信作者]刘燕(1984—),女,博士,高级实验师,硕士生导师,研究方向:情志方证基础相关研究。E-mail:hnyan@163.com

乳腺癌是导致全球女性癌症致死的首要原因,2022 年乳腺癌全球发病率仅次于肺癌,占所有新发癌症病例的 11.6%[1]。抑郁症是一种以持久心境低落为主要特征的精神疾病,居全球患者自杀的 20 个主要原因之首。2015 年专家共识提出了“肿瘤相关抑郁”的概念,即在肿瘤诊断与治疗过程中出现以抑郁为主的病理性情绪变化[2]。严重的焦虑、抑郁等情志刺激能促进乳腺癌的发展、转移[3],而乳腺癌的确诊、手术后形体缺陷、后续射频和化疗等长期治疗可使患者长期承受巨大的心理压力,导致乳腺癌患者抑郁症患病率远高于普通人群,是最常见的并发症。在针对 47 424 名乳腺癌患者的荟萃分析中,研究显示乳腺癌患者的抑郁症发病率为 32.2%,远高于其他癌症中抑郁症的患病率[4]。对 282 203 例乳腺癌患者的研究分析中发现,抑郁与乳腺癌患者的复发率和全因死亡率增加有关。抑郁症使乳腺癌患者的死亡风险增加 30%[5]。因此深入研究乳腺癌相关抑郁(breast cancer related depression,BCRD)发生发展机制已成为乳腺癌防治工作的重中之重。

目前主流观点认为 BCRD 的发病机制与神经-免疫-肠道调节功能紊乱密切相关,是多通路多靶点紊乱相互作用的结果,但是其深层的生物学调控机制还有待进一步揭示。临床上对 BCRD 的治疗多采用手术、放化疗与抗抑郁药联合。但在治疗中存在临床症状改善缓慢、易复发及副作用多等缺陷。而中医在治疗 BCRD 上有得天独厚的优势,其多成分、多通路、多靶点的治疗特点正好契合了 BCRD 发病机制复杂的本质。同时,中医理论体系的整体观念和辨证论治指导下,中医药更加注重癌症患者的个性化治疗,在疾病动态进程中把握机体的阴阳平衡,与现代医学精准理疗理念相合。大量的临床研究以及体内外实验也验证了中医药在乳腺癌相关抑郁治疗中的显著疗效。

1 乳腺癌相关抑郁发病机制

随着乳腺癌和抑郁症此两种疾病之间的密切关系被越来越多的研究所揭示,关于 BCRD 的发生机制也进行了大量研究,研究发现 BCRD 的发病涉及机体神经-免疫-肠道在内的多系统功能障碍[6]。乳腺癌可增加抑郁的易感性,导致疾病预后不良。临床研究报道,乳腺癌化疗、激素治疗和靶向治疗后可使乳腺癌患者抑郁患病率增加[7],如有荟萃分析显示 5-氟尿嘧啶、表柔比星、环磷酰胺、阿霉素和紫杉烷引起不同程度的认知障碍[8],紫杉烷可显著增加乳腺癌患者抑郁症的患病率[9]。

1.1 神经系统紊乱

癌症患者可能通过其下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA axis)和单胺神经系统的信号传递引起了包括抑郁在内的神经症候群症状[10]。乳腺癌患者抑郁症状之间的显著性差异可能由神经内分泌系统激活 HPA 轴和五羟色胺(5-hydroxy tryptamine,5-HT)、多巴胺(dopamine,DA)、去甲肾上腺素(noradrenaline,NE)等单胺类递质紊乱导致[11]。Seok 等[12]研究结果发现,乳腺癌患者抑郁症状的诊断与 HPA 轴的过度活跃显著相关。体内实验研究显示,BCRD 大鼠海马出现明显病理改变,血浆中 HPA 轴相关指标促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropic hormone, ACTH)、皮质酮(corticosterone,CORT)的水平明显升高[13],该研究结果也在小鼠体内得到了进一步验证[14-15]。以上研究表明,BCRD 的发生与乳腺癌患者和动物机体内 HPA 轴过度激活以及神经的递质分泌紊乱有关。

1.2 免疫功能障碍

机体免疫功能障碍是乳腺癌和抑郁症的共同致病机制。实验研究观察到,乳腺癌荷瘤小鼠血液中炎症因子如白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)升高,且此类炎症因子水平的升高可能与乳腺癌荷瘤小鼠的抑郁行为呈正相关[16]。同时在临床研究中也观察到,BCRD 患者血清中的 IL-6、TNF-α 的水平显著升高,而 IL-1β、TNF-α、IL-6 的水平与患者抑郁程度成正比[17]。自然杀伤细胞(natural killer cell,NK)在机体免疫监控中发挥着重要作用,对早期的未经治疗的乳腺癌患者有积极的抗肿瘤作用,可被化疗激活并抑制乳腺癌转移[18]。NK 细胞、T 淋巴细胞($CD4^+$、$CD8^+$)的表达在晚期乳腺癌体内显著下降[19],而抑郁症患者体内 NK 细胞活性也显著降低[20]。体内研究也进一步证实,在接受慢性不可预知刺激的乳腺癌小鼠,其肿瘤、血液以及脾样本中,其 T 细胞和 NK 细胞的百分比均显著降低,髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)、肿瘤相关巨噬细胞(tumour-associated macrophages,

TAMs)比例上调[21-22]。

临床研究表明,情绪障碍的乳腺癌患者血液中 NK 细胞活性显著减弱[23]。乳腺癌术后化疗患者抑郁的发生与 NK 细胞、$CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$的表达呈负相关[24]。中度以上精神心理压力可以使乳腺癌组织中的 TAMs 和 MDSCs 明显增多[25]。荟萃分析结果显示乳腺癌术后抑郁患者体内 T 细胞亚群($CD3^+$、$CD4^+$、$CD4^+/CD8^+$)显著下降[26]。此一系列研究均表明乳腺癌引起的机体免疫系统紊乱也是患者出现抑郁症状的重要病理机制。

1.3 肠道菌群失调

乳腺癌可以下调机体肠道菌群中有益菌丰度,上调有害菌丰度,而此种改变与抑郁情绪密切相关。临床报道显示,乳腺癌患者抑郁症状与肠道菌群多样性下降及菌群组成紊乱有关。与非抑郁症乳腺癌患者相比,BCRD 患者肠道变形菌相对丰度增加,厚壁菌丰度降低,这表明变形菌的过度表达和较低的厚壁菌丰度可能与 BCRD 患者抑郁情绪有关[27]。乳腺癌荷瘤小鼠肠道菌群多样性发生显著变化,厚壁菌门/拟杆菌门的比值明显升高,而此种改变与小鼠的行为学改变有显著的相关性,厚壁菌门的相对丰度与旷场实验中心区域移动距离、糖水偏爱指数、高架十字迷宫开放臂的时间和进入开放臂次数呈负相关,而拟杆菌门的相对丰度与中心区域移动距离呈显著正相关[28]。以上研究均表明乳腺癌引起的肠道菌群紊乱也是患者出现抑郁症状的重要病理机制。

2 中医药对乳腺癌相关抑郁的调节作用

乳腺癌相关抑郁,归属于中医“郁证”范畴[29],其中最常见的病位证候要素为肝,其次是心、脾、肾,基本病机是情志失调,气机不畅。《傅青主女科》曰“乳头属足厥阴肝经,乳房属足阳明胃经”,肝胃二经与乳腺癌形成尤为相关。《外科正宗》中,陈实功提出乳腺癌的发病与长期忧郁伤肝,思虑伤脾,情志难抒,致使经络不通,气机郁滞有关。乳腺癌患者也常因情绪因素、手术放化疗的副作用以及长期服用药物导致体内雌激素水平降低等原因出现抑郁症状。因此 BCRD 的发生必然存在肝郁这一核心病机,与肝主疏泄、调畅情志功能关系最为密切。大量研究结果表明,疏肝解郁和疏肝健脾类中药能有效改善 BCRD 患者的身心症状[30]。探索 BCRD 发生发展之间的相关性以及中医药对于疾病发展的保护机制,可以为其防治及中医药的临床运用提供实验依据和新思路。

2.1 中药对乳腺癌相关抑郁神经内分泌系统紊乱的调节作用

2.1.1 调节 HPA 轴

HPA 轴是神经内分泌反馈调节系统的重要组成部分,由下丘脑室旁核、垂体前叶、肾上腺皮质构成。应激条件下,室旁核分泌 CRH 作用于垂体前叶,从而促进 ACTH 的释放。肾上腺皮质在 ACTH 的作用下合成糖皮质激素如 CORT 等应激激素,这些激素通过体循环到达靶器官,引起生理反应[31]。癌症可诱导下丘脑等处的炎症细胞因子长期激活,导致 HPA 轴功能亢进,糖皮质激素分泌过多,降低糖皮质激素受体的敏感性,破坏 HPA 轴的负反馈调节,导致海马区神经元障碍,从而诱发癌症相关抑郁[32]。中医药对 BCRD 有积极的干预作用。例如在乳腺癌癌前病变及慢性轻度不可应激大鼠模型中,中药复方金贝乳康片可通过降低 CORT 的表达,明显抑制大鼠肿瘤发病率,组织病理学观察结果显示,金贝乳康片组大鼠的癌前病变乳腺组织向一般增生转化[33]。柴胡疏肝散同样可抑制肝郁证乳腺癌荷瘤大鼠 HPA 轴功能的的亢进,降低 HPA 轴相关指标(CRH、ACTH、CORT)的表达,升高小鼠糖水偏嗜度,改善其抑郁样行为[34]。逍遥抗癌解郁方可显著抑制 HPA 轴的激活和肾上功能亢进,缓解 BCRD 小鼠抑郁样指征[35]。

2.1.2 调节单胺类神经递质

单胺类神经递质是包括 5-HT、DA、NE 在内的一类小分子生物胺,在人体外周及中枢系统中表达,可参与调控包括情绪在内的一系列重要的生理活动[36]。肿瘤通过分泌炎症因子调节 5-HT 合成吲哚氨 2,3 双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase,IDO),同时将色氨酸(tryptophan,Trp)转化为犬尿氨酸(kynurenine,KYN),KYN 可调节小胶质细胞的氧化应激及星形胶质细胞凋亡等反应,从而诱发机体的抑郁样行为[37-38]。BCRD 患者血浆中 Trp 的水平显著低于单纯乳腺癌患者[28],而 KYN/Trp 比例与抑郁严重程度呈正相关[39]。乳腺癌患者体内 KYN 的高表达能预测抑郁焦虑症状[40]。

DA 可在多巴胺-β-羟化酶的作用下转化生成 NE,BCRD 小鼠体内 DA、NE 的含量显著降低[41]。临床研究发现逍遥散加味可显著提高乳腺癌术后患者血清中 5-HT、NE、DA 的含量,降低抑郁量表评

分,减轻患者抑郁情绪[42]。逍遥抗癌解郁方可显著提升应激乳腺癌荷瘤模型小鼠血清中单胺类神经递质 NE、DA 和 5-HT 的表达水平,同时糖水实验、旷场实验、新奇摄食等行为学实验结果显示,小鼠抑郁样行为得到明显改善[43]。

2.2 中药对乳腺癌相关抑郁炎症免疫反应的调节作用

2.2.1 调节炎症因子

肿瘤相关抗原刺激免疫系统释放的一系列炎症细胞因子是导致乳腺癌患者抑郁的重要原因[44]。其中促炎因子的分泌可多通路作用于中枢神经系统,使小胶质细胞激活,神经元数量减少、可塑性降低,以及神经内分泌功能紊乱等,从而影响认知功能,导致抑郁发生[45]。研究显示,中药复方扶正解郁方可降低 BCRD 小鼠外周血中炎症相关因子 IL-6 的水平,改善肿瘤微环境[46]。临床观察显示,三黄煎剂能降低激素受体阳性乳腺癌以及三阴乳腺癌患者血清中促炎因子 IL-6、TNF-α 的含量,降低血清中氧化应激相关指标,缓解患者抑郁情绪和相关的应激症状[47-49]。桑毅婷[50]采用疏肝健脾方治疗乳腺癌肝郁脾虚证患者,结果显示,患者肝郁脾虚症状明显改善,抑郁、焦虑量表评分显著降低,TNF-α、IL-8 的水平抑制,免疫功能提高。

2.2.2 调节肿瘤浸润性淋巴细胞

MDSCs 是一群在肿瘤等病理条件下被激活和动员的、具有 T 细胞抑制功能的、骨髓来源的未成熟细胞。肿瘤细胞通常可影响祖细胞的分化过程,最终致使 MDSCs 积累,降低肿瘤免疫治疗的疗效。在中度抑郁症患者体内,MDSCs 可通过产生活性氧来抑制 T 细胞免疫,也可通过精氨酸酶抑制 T 细胞增殖[51]。研究显示,扶正解郁方能抑制乳腺癌合并抑郁障碍小鼠脾细胞中 MDSCs 增殖,减缓 $CD8^+$ T 细胞凋亡缓解[46]。中药复方疏肝健脾方可以通过下调 MDSCs、TAMs 细胞比例、降低 T 淋巴细胞凋亡来抑制肿瘤细胞活性,改善乳腺癌荷瘤小鼠的抑郁状态[52]。在乳腺癌患者治疗的临床研究中,柴氏逍遥散、甘麦大枣汤与逍遥散加减合方、调补肝肾消积疗法、可分别上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群($CD3^+$ 水平、$CD4^+$ 水平、$CD4^+/CD8^+$ 比值)的细胞比例,明显改善细胞免疫功能,有效缓解患者抑郁焦虑相关症状,明显降低乳腺癌患者的应激症状[53-55]。CXC 趋化因子配体 1(C-X-C motif chemokine ligand 1,CXCL1)具有促进 MDSCs 增殖、迁移和抗 $CD8^+$ T 细胞的功能[22]。BCRD 患者和动物体内的 CXCL1 显著上升[56],研究显示消癖颗粒可改善三阴乳腺癌巩固期患者的抑郁状态,降低其血清中 CXCL1 浓度[57]。以上研究表明,MDSCs 与 BCRD 患者肿瘤症状恶化和抑郁情绪有关,但是 MDSCs 是否是抑郁促乳腺癌进展的关键机制还需要更多的证据来证明(见表 1)。

2.3 中药对乳腺癌相关抑郁肠道菌群的调节作用

BCRD 的发病与肠道菌群组成的改变继而影响脑神经递质有关。肠道菌群中的益生菌有治疗和预防抑郁症的作用,如双歧杆菌其抗抑郁的机制可能与抗炎、调整 Trp 代谢、促进 5-HT、抑制 HPA 轴的激活有关[58]。研究显示,乳腺癌能影响肠道菌群多样性及结构组成,并通过 Trp/5-HT 途径影响小鼠神经递质的分泌从而影响小鼠抑郁样行为[28]。研究显示,中药复方柴氏逍遥散可降低厚壁菌门/拟杆菌比例,改变肠道菌群结构,提升脑神经递质水平,从而改善海马区的神经细胞排列,增加神经元数目,使脑结构趋于正常,使 BCRD 小鼠的抑郁行为得到改善,同时促进 Trp 流入脑,改变血浆氨基酸代谢再分布,从而改变肿瘤能量供给,缩小肿瘤体积,放缓肿瘤生长速度[59](见表 1)。

3 展望

综上可知,BCRD 的发病与机体神经-免疫-肠道等多系统功能障碍有关,其发病机制复杂,是多靶点同时综合作用的结果。荟萃分析显示,与常规治疗的患者相比,中药联合西医常规治疗的 BCRD 患者具有显著性更好的临床疗效且不良反应发生率远低于单纯的西医常规治疗[26],究其深层原因可能是因为中药治疗疾病往往是多种成分同时作用于多个靶点和多条通路综合治疗效果的反映。西药抗抑郁和肿瘤通常是成分明确,作用靶点较为单一。例如中药复方疏肝解郁中药通过神经内分泌系统和免疫功能,下调 CORT 水平,上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群,有效缓解患者抑郁焦虑相关症状,明显降低乳腺癌患者的应激症状[54]。柴氏逍遥散可同时调节机体炎症免疫反应、肠道菌群,上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群的细胞比例,下调厚壁菌门/拟杆菌比例,改变肠道菌群结构,提升脑神经递质水平,使脑结构趋于正常[53,59]。研究结果均一致说明中药能同时作用于多通路、多靶点,调动机体的多系统协同参与,对疾病进行综合调节,正好契合了乳腺

表 1 中药治疗乳腺癌相关抑郁治疗机制

Table 1 Mechanism of Traditional Chinese Medicine in treating breast cancer-related depression treatment

	干预对象 Subject of intervention	造模方式 Method of modeling	用药周期 Medication cycle	作用机制 Mechanism of action
金贝乳康片[33] Jinbei Rukang Table	SD 大鼠 Sprague Dawley (SD) rats	二甲基苯蒽(DMBA)联合 CUMS 及冷水刺激应激 7, 12-Dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) combined with Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) and cold water stimulation stress	每天 1 次,连续灌胃 1 个月 Once daily, administered by gavage for one month	降低大鼠血清中 CORT 的表达 Reduce the expression of CORT in rat serum
柴胡疏肝散[34] Chaihu Shugan Powder	Wistar 雌鼠 Wistar female rat	慢性束缚应激 Chronic restraint stress	每天 1 次,连续灌胃 14 天 Once daily, administered by gavage for 14 days	下调 HPA 轴相关指标(CRH、ACTH、CORT)提高 5-HT、DA、NE 的表达 Downregulate HPA axis markers (CRH, ACTH, CORT) and upregulate the expression of 5-HT, DA, NE
逍遥抗癌解郁方[35,43] Xiaoyao Kangai Jieyu Recipe	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	腋下注射 4T1 炎性乳腺癌细胞联合腹腔注射皮质酮(CORT) Subcutaneous injection of 4T1 inflammatory breast cancer cells combined with intraperitoneal injection of corticosterone (CORT)	每天 1 次,连续灌胃 3 周 Once daily, administered by gavage for 3 weeks	下调 HPA 轴相关指标(CRH、ACTH、CORT)的表达;上调血清 5-HT、DA 和 NE 的表达 Downregulate the expression of HPA axis markers (CRH, ACTH, CORT); upregulate the expression of serum 5-HT, DA, and NE
逍遥散加味[42] Modified Xiaoyao Powder	乳腺癌术后患者 Postmastectomy breast cancer patient	/	每天 1 剂,早晚分 2 次服用,连服 6 周 One dose per day, divided into two administrations in the morning and evening, for 6 weeks	上调乳腺癌术后患者血清中 5-HT、NE、DA 的含量 Upregulate the levels of serotonin 5-HT, NE, DA in the serum of postoperative breast cancer patients
扶正解郁方[46] Chinese Medicine SFJP Formula	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	CUMS 抑郁造模后腋下接种 4T1 细胞 Subcutaneous inoculation of 4T1 cells after Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) depression model	每天 1 次,连续灌胃 2 周 Once daily, administered by gavage for 2 weeks	下调 MDSCs、IL-6、上调脾 $CD8^+$ Downregulate MDSCs, IL-6, upregulate $CD8^+$ T cells in the spleen
三黄煎剂[47-49] Sanhuang Decoction	乳腺癌患者 Breast cancer patient	/	每天 1 剂,早晚分 2 次服用,连服 6 月 One dose per day, divided into two administrations in the morning and evening, for 6 mouths	下调血清中促炎因子 IL-6、TNF-α 的含量,降低血清中氧化应激相关指标 Downregulate the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in the serum, reduce the levels of oxidative stress-related indicators in the serum
疏肝健脾方[50] ShuGan Jianpi Recipe	乳腺癌术后患者 Postmastectomy breast cancer patient	/	每天 1 剂,早晚分 2 次服用,连服 8 周 One dose per day, divided into two administrations in the morning and evening, for 8 weeks	下调 TNF-α、IL-8 水平 Downregulate the levels of TNF-α, IL-8
疏肝健脾方[52] ShuGan Jianpi Recipe	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	CUMS 抑郁造模后腋下接种 4T1 细胞 Subcutaneous inoculation of 4T1 cells after Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) depression model	每天 1 次,连续灌胃 1 个月 Once daily, administered by gavage for one month	下调 MDSCs、TAMs 细胞比例、降低 T 淋巴细胞凋亡,下调 IL-6、IL-1β 的表达 Downregulate the proportion of MDSCs, TAMs, reduce T lymphocyte apoptosis, and downregulate the expression of IL-6 and IL-1β

续表1

	干预对象 Subject of intervention	造模方式 Method of modeling	用药周期 Medication cycle	作用机制 Mechanism of action
柴氏逍遥散[53] Chai's XiaoYaoSan	乳腺癌术后患者 Postmastectomy breast cancer patient	/	每天 1 剂,早晚分 2 次服用,连服 1 月 One dose per day, divided into two administrations in the morning and evening, for 1 mouth	上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群($CD3^+$ 水平、$CD4^+$ 水平、$CD4^+/CD8^+$ 比值)的细胞比例 Upregulate the proportion of NK cells and T lymphocyte subsets ($CD3^+$ level, $CD4^+$ level, $CD4^+/CD8^+$ ratio)
疏肝解郁中药[54] Shugan Jieyu medicine	乳腺癌术后患者 Postmastectomy breast cancer patient	/	每天 1 剂,连服 13 周 One dose per day, administered continuously for 13 weeks	上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群($CD3^+$ 水平、$CD4^+$ 水平、$CD4^+/CD8^+$ 比值)的细胞比例,下降 CORT 水平 Upregulate the proportion of NK cells and T lymphocyte subsets (including $CD3^+$ levels, $CD4^+$ levels, and the $CD4^+/CD8^+$ ratio), while downregulating CORT levels
调肝补肾消积疗法[55] Kidney Tonifying and Accumulation Eliminating	乳腺癌患者 Breast cancer patient	/	每天 2 袋,早晚分 2 次服用,连服 12 月 Two packets per day, administered twice daily in the morning and evening, for 12 months	上调 NK 和 T 淋巴细胞亚群($CD3^+$ 水平、$CD4^+$ 水平、$CD4^+/CD8^+$ 比值)的细胞比例,上调免疫球蛋白 IgG、IgM、IgA Upregulate the proportions of NK cells and T lymphocyte subsets ($CD3^+$ levels, $CD4^+$ levels, $CD4^+/CD8^+$ ratios), and increase the levels of immunoglobulins IgG, IgM, and IgA
消癖颗粒[57] Xiaopi granules	乳腺癌患者 Breast cancer patient	/	每天 1 剂,连服 3 月 One dose per day, administered continuously for 3 mouths	下调血清中 CXCL1 浓度 Downregulate the concentration of CXCL1 in the serum
柴氏逍遥散[59] Chai's XiaoYaoSan	BALB/c 小鼠 BALB/c mice	CUMS 结合慢性束缚应激腋下接种 4T1 细胞 Subcutaneous inoculation of 4T1 cells following Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) combined with chronic restraint stress	每天 1 次,连续灌胃 3 周 Once daily, administered by gavage for 3 weeks	下调厚壁菌门/拟杆菌比例,改变肠道菌群结构,提升脑神经递质水平,改善海马区的神经细胞排列,减少凋亡,增多神经元数目,脑结构趋于正常 Downregulate the ratio of *Firmicutes* to *Bacteroidetes*, alter the gut microbiota structure, elevate brain neurotransmitter levels, improve the arrangement of neuronal cells in the hippocampal region, reduce apoptosis, increase the number of neurons, and normalize brain structure

癌相关抑郁发病机制复杂的本质,可能为癌症相关抑郁症的治疗提供新的选择。

以上研究从多方面为 BCRD 的病理生理以及治疗之间的联系提供了证据,相关研究也取得了一定的进展,但中医药治疗 BCRD 的研究尚浅,关于中医药调节 BCRD 机制的研究仍然面对很大的挑战:一是关于中医药治疗 BCRD 的作用靶点和通路的研究并不充分,尤其是在中医药调节抑郁和乳腺癌两种症状之间的关联机制研究还有更多的深入空间。二是针对中医药治疗 BCRD,目前临床研究文献较少,对抑郁状态缺乏统一的标准,同时关于 BCRD 的诊断、造模、证候分型等,尚未建立全面、系统、权威的诊疗评价体系。需要大样本的临床流行病学调查来规范化辨证标准,为进一步探讨乳腺癌抑郁状态基本证候规律研究提供依据。三是既往关于 BCRD 的中医治疗机制研究重点多侧重于方剂对生

物效应的作用,忽略了中医“方证相关”辨证论治的规律。

所以以中医理论为指导,在大量临床研究的基础上,进一步深入探索 BCRD 中医病症的相关生物学基础以及中医药治疗机制仍是今后 BCRD 中医发病机制和治疗机制研究的主要方向。立足于中医理论基础上,依托现代研究手段,中西医结合,兼顾神经系统疾病的机制研究和生物信息学交叉学科等领域融合的研究趋势,加大中医药实验研究力度,充分发挥中医药优势,为治疗 BCRD 提供新策略。

参考文献:

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

[2] 中华中医药学会血液病分会. 肿瘤相关抑郁状态中医诊疗专家共识 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4397-4399.
Hematology Branch of Chinese Association of Chinese Medicine. Experts consensus on TCM diagnosis and treatment for tumor related depressive status [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 30(12): 4397-4399.

[3] DU P, ZENG H, XIAO Y, et al. Chronic stress promotes EMT-mediated metastasis through activation of STAT3 signaling pathway by miR-337-3p in breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 761.

[4] PILEVARZADEH M, AMIRSHAHI M, AFSARGHAREHBAGH R, et al. Global prevalence of depression among breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 176(3): 519-533.

[5] WANG X, WANG N, ZHONG L, et al. Prognostic value of depression and anxiety on breast cancer recurrence and mortality: a systematic review and meta-analysis of 282, 203 patients [J]. Mol Psychiatry, 2020, 25(12): 3186-3197.

[6] YU S, LI W, TANG L, et al. Depression in breast cancer patients: Immunopathogenesis and immunotherapy [J]. Cancer Lett, 2022, 536: 215648.

[7] NAKAMURA Z M, DEAL A M, NYROP K A, et al. Serial assessment of depression and anxiety by patients and providers in women receiving chemotherapy for early breast cancer [J]. Oncologist, 2021, 26(2): 147-156.

[8] HUEHNCHEN P, VAN KAMPEN A, BOEHMERLE W, et al. Cognitive impairment after cytotoxic chemotherapy [J]. Neurooncol Pract, 2020, 7(1): 11-21.

[9] IBRAHIM E Y, DOMENICANO I, NYHAN K, et al. Cognitive effects and depression associated with taxane-based chemotherapy in breast cancer survivors: a meta-analysis [J]. Front Oncol, 2021, 11: 642382.

[10] KIM H J, BARSEVICK A M, FANG C Y, et al. Common biological pathways underlying the psychoneurological symptom cluster in cancer patients [J]. Cancer Nurs, 2012, 35(6): E1-E20.

[11] THORNTON L M, ANDERSEN B L, BLAKELY W P. The pain, depression, and fatigue symptom cluster in advanced breast cancer: covariation with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system [J]. Health Psychol, 2010, 29(3): 333-337.

[12] SEOK J H, KIM L S, HONG N, et al. Psychological and neuroendocrinological characteristics associated with depressive symptoms in breast cancer patients at the initial cancer diagnosis [J]. Gen Hosp Psychiatry, 2010, 32(5): 503-508.

[13] 杨琴, 孟盼, 杨蕙, 等. HPA 轴紊乱致海马损伤与乳腺癌并发抑郁症相关性研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2176-2182.
YANG Q, MENG P, YANG H, et al. Correlation between damaged hippocampus induced by HPA axis disturbance and breast cancer complicated with depression in animal [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(12): 2176-2182.

[14] CHEN L, GONG W K, YANG C P, et al. Pten is a key intrinsic factor regulating raphe 5-HT neuronal plasticity and depressive behaviors in mice [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 186.

[15] 刘燕, 彭梦薇, 刘高源, 等. 4T1 乳腺癌细胞株接种联合慢性束缚应激诱导乳腺癌合并抑郁小鼠模型构建探索 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 36-44, 50.
LIU Y, PENG M W, LIU G Y, et al. Exploration of mouse model of breast cancer complicated with depression induced using4T1breast cancer cell inoculation combined withc hronic restraint stress [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 36-44, 50.

[16] YAN W, ZHU H, ZHANG P, et al. Heterotopic 4T1 breast cancer transplantation induces hippocampal inflammation and depressive-like behaviors in mice [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(8): 2955-2963.

[17] KHAN W A, KHAN M W A, SHERWANI S, et al. Depression enhanced the production of autoantibodies against 16α-hydroxyestrone-estrogen receptor adduct in breast cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 66: 251-259.

[18] KIM R, KAWAI, WAKISAKA M, et al. A potential role for peripheral natural killer cell activity induced by preoperative chemotherapy in breast cancer patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(4): 577-585.

[19] FERNANDEZ S V, MACFARLANE A W 4th, JILLAB M, et al. Immune phenotype of patients with stage IV metastatic inflammatory breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1): 134.

[20] CAÑAS-GONZÁLEZ B, FERNÁNDEZ-NISTAL A, RAMÍREZ J M, et al. Influence of stress and depression on the immune system in patients evaluated in an anti-aging unit [J]. Front Psychol, 2020, 11: 1844.

[21] MA W, LIU P, ZHENG J, et al. Immune and nonimmune

mechanisms mediate the mental stress-induced tumor growth in a xenograft model of breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 987.

[22] ZHENG Y, WANG N, WANG S, et al. Chronic psychological stress promotes breast cancer pre-metastatic niche formation by mobilizing splenic MDSCs via TAM/CXCL1 signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 129.

[23] KENNE SARENMALM E, MÅRTENSSON L B, ANDERSSON B A, et al. Mindfulness and its efficacy for psychological and biological responses in women with breast cancer [J]. Cancer Med, 2017, 6(5): 1108-1122.

[24] 徐璐, 朱佩祯, 陈银巧, 等. 乳腺癌术后化疗患者抑郁发生的危险因素及其与患者免疫状态的相关性 [J]. 浙江医学, 2021, 43(21): 2341-2344, 2348.
XU L, ZHU P Z, CHEN Y Q, et al. Risk factors of depression in breast cancer patients undergoing postoperative chemotherapy and their correlation with immune status [J]. Zhejiang Med J, 2021, 43(21): 2341-2344, 2348.

[25] 魏松之. 慢性压力调控肿瘤相关髓系细胞在乳腺癌进展中的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
WEI S Z. The mechanism of chronic stress regulating tumor-associated myeloid cells in breast cancer progression [D]. Nanchang: Nanchang University, 2022.

[26] WANG Y, LIU S, ZHANG Y, et al. Effect of traditional Chinese medicine on postoperative depression of breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1019049.

[27] MAITINIYAZI G, CAO X, CHEN Y, et al. Impact of gut microbiota on the association between diet and depressive symptoms in breast cancer [J]. Nutrients, 2022, 14(6): 1186.

[28] 古送汗·买提尼亚孜. 膳食营养成分对乳腺癌抑郁情绪的影响 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
GUDZHAN B. Effects of dietary nutritional ingredients on depressive symptoms in breast cancer [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[29] 中华中医药学会血液病分会, 中国民族医药学会血液病分会, 中国中西医结合肿瘤专业委员会, 等. 肿瘤相关抑郁中医诊疗专家共识 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(1): 12-17.
China Association of Chinese Medicine Blood Disease Branch, Hematology Branch of Chinese Ethnic Medicine Association, Chinese Cancer Committee of Integrated Traditional and Western Medicine, et al. Expert consensus statement on the diagnosis and treatment of cancer-related depression based on traditional Chinese medicine [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2023, 46(1): 12-17.

[30] 张玉, 孙士玲. 乳腺癌相关抑郁样人群开展肝主疏泄及蛋白组学试验的可行性分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(3): 10-16.
ZHANG Y, SUN S L. Feasibility analysis of liver catharsis and proteomics test in breast cancer-related depression-like population [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2023, 50(3): 10-16.

[31] DUARTE-ZAMBRANO F, BARRERO J A, MOCKUS I. Cerebrospinal fluid levels of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in MCI and dementia due to Alzheimer's disease: a systematic review [J]. Dement Neuropsychol, 2023, 17: e20230031.

[32] AHMAD M H, RIZVI M A, FATIMA M, et al. Pathophysiological implications of neuroinflammation mediated HPA axis dysregulation in the prognosis of cancer and depression [J]. Mol Cell Endocrinol, 2021, 520: 111093.

[33] 邓卫芳, 裴晓华, 樊英怡, 等. 金贝乳康片对乳腺癌癌前病变肝郁肾虚模型大鼠的干预作用 [J]. 中医杂志, 2012, 53(4): 327-330.
DENG W F, PEI X H, FAN Y Y, et al. Intervention with Jinbei rukang tablet on the liver qi stagnation and ki dney deficiency model of precancerous breast lesions [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 53(4): 327-330.

[34] 钱梦. 肝郁证雌性大鼠乳腺的癌前基因表达及柴胡疏肝散的干预作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
QIAN M. Changes in the precancerous genes of breast in female rats with syndrome of live depression and the intervention of Chaihu Shugan Powder [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.

[35] 杨琴. 乳腺癌并发抑郁症动物模型的建立与中药干预 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
YANG Q. Establishment of animal model of breast cancer complicated with depression and intervention of traditional Chinese medicine [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2018.

[36] JIANG Y, ZOU D, LI Y, et al. Monoamine neurotransmitters control basic emotions and affect major depressive disorders [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(10): 1203.

[37] BORTOLATO B, HYPHANTIS T N, VALPIONE S, et al. Depression in cancer: The many biobehavioral pathways driving tumor progression [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 52: 58-70.

[38] LEONARD B E. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? [J]. Acta Neuropsychiatr, 2018, 30(1): 1-16.

[39] HÜFNER K, OBERGUGGENBERGER A, KOHL C, et al. Levels in neurotransmitter precursor amino acids correlate with mental health in patients with breast cancer [J]. Psychoneuroendocrinology, 2015, 60: 28-38.

[40] PEREZ-TEJADA J, LABAKA A, VEGAS O, et al. Anxiety and depression after breast cancer: The predictive role of monoamine levels [J]. Eur J Oncol Nurs, 2021, 52: 101953.

[41] 杨蕙, 孟盼, 杨琴, 等. 4T1 炎性乳腺癌细胞接种联合皮质酮注射诱导乳腺癌并发抑郁症小鼠模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11): 21-26.
YANG H, MENG P, YANG Q, et al. 4T1 inflammatory breast cancer cell inoculation combined with corticosterone injection to establish a mouse model of breast cancer complicated with depression [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(11): 21-26.

[42] 肖锋. 逍遥散加味联合帕罗西汀辅助治疗乳腺癌术后抑郁的

临床效果［J］. 临床合理用药杂志, 2021, 14(13): 78-80.
XIAO F. Clinical effect of modified Xiaoyao Powder combined with paroxetine in adjuvant treatment of postoperative depression of breast cancer［J］. Chin J Clin Ration Drug Use, 2021, 14(13): 78-80.

[43] 孟盼, 黄会珍, 杨琴, 等. 逍遥抗癌解郁方对乳腺癌并发抑郁症模型小鼠抑郁样指征的影响［J］. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(11): 46-51.
MENG P, HUANG H Z, YANG Q, et al. Effects of Xiaoyao kang'ai Jieyu formula on depressive symptoms of mice with breast cancer related depression［J］. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2018, 25(11): 46-51.

[44] JOISTEN N, RUAS J L, BRAIDY N, et al. The kynurenine pathway in chronic diseases: a compensatory mechanism or a driving force?［J］. Trends Mol Med, 2021, 27(10): 946-954.

[45] OXENKRUG G F. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan-kynurenine metabolism［J］. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1199: 1-14.

[46] 张玉人. 扶正解郁方对抑郁障碍型乳腺癌所诱导的髓系抑制细胞的干预作用研究［D］. 北京: 北京中医药大学, 2011.
ZHANG Y R. Intervention effect of Fuzheng Jieyu recipe on myeloid inhibitory cells induced by depressive breast cancer［D］. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2011.

[47] 卞卫和, 陈佳静, 唐甜, 等. 三黄煎剂改善乳腺癌患者慢性应激状态 30 例临床研究［J］. 时珍国医国药, 2017, 28(10): 2458-2460.
BIAN W H, CHEN J J, TANG T, et al. Clinical study on Sanhuang Decoction improving chronic stress state of breast cancer patients in 30 cases［J］. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(10): 2458-2460.

[48] 刘玉芳. 三黄煎剂基于改善患者慢性应激调控乳腺癌机体微环境的临床研究［D］. 南京: 南京中医药大学, 2017.
LIU Y F. San Huang Decoction improves chronic oxidative stress and inflammatory microenvironment by means of endocrine therapy in breast cancer: clinical and experimental study［D］. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2017.

[49] 汤佳崶. 三黄煎剂改善三阴乳腺癌患者慢性应激与抗血管新生的临床研究［D］. 南京: 南京中医药大学, 2020.
TANG J Y. The clinical study of Sanhuang Decoction to ameliorate chronic stress and inhibit angiogenesis in patients with triple negative breast cancer［D］. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.

[50] 桑毅婷. 疏肝健脾方对乳腺癌术后患者抑郁、焦虑情绪及免疫相关因素的干预研究［D］. 北京: 北京中医药大学, 2020.
SANG Y T. Intervention study of Shugan Jianpi recipe on depression, anxiety and immune related factors in patients with breast cancer after operation［D］. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.

[51] WANG L, YU W B, TAO L Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells mediate immune suppression in spinal cord injury［J］. J Neuroimmunol, 2016, 290: 96-102.

[52] 高瑞珂. 疏肝健脾法治疗乳腺癌的疗效评价及对瘤前抑郁障碍小鼠乳腺癌作用机制研究［D］. 北京: 中国中医科学院, 2021.
GAO R K. Evaluation of therapeutic effect of soothing liver and strengthening spleen on breast cancer and study on its mechanism in mice with premalignant depression［D］. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.

[53] 黄蕾蕾. 运用柴氏逍遥散改善乳腺癌患者术后生存质量和免疫功能的临床研究［D］. 杭州: 浙江中医药大学, 2016.
HUANG L L. Using Chai Shi Xiaoyao Powder to improve life quality and immune function after surgery for breast cancer clinical research［D］. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2016.

[54] 李佩侻. 情志疗法在乳腺癌治疗中的应用之临床研究［D］. 南京: 南京中医药大学, 2010.
LI P X. Effect of emotion-regulation treatment of traditiona Chinese medicine on female breast cancer patients［D］. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2010.

[55] 孙学然. 调肝补肾消积疗法对晚期乳腺癌的疗效评价及莪术二酮抑制乳腺癌侵袭迁移的研究［D］. 上海: 上海交通大学, 2019.
SUN X R. Dissertation submitted to shanghai jiao tong university for thedegree of master［D］. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2019.

[56] CHEN J, LI J, QIAO H, et al. Disruption of IDO signaling pathway alleviates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behaviors and tumor progression in mice with breast cancer［J］. Cytokine, 2023, 162: 156115.

[57] 韦晓庆. 消癖颗粒改善三阴性乳腺癌巩固期患者生存质量的探索性研究［D］. 广州: 广州中医药大学, 2021.
WEI X Q. Exploratory study on Xiaopi Granule to improve the quality of life of patients with triple negative breast cancer in consolidation stage［D］. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.

[58] LI J, WANG J, WANG M, et al. *Bifidobacterium*: a probiotic for the prevention and treatment of depression［J］. Front Microbiol, 2023, 14: 1174800.

[59] 周喆. 基于靶向代谢和肠道菌群研究柴氏逍遥散治疗乳腺癌相关抑郁的作用机制［D］. 杭州: 浙江中医药大学, 2022.
ZHOU Z. Mechanism of Chai's XiaoYaoSan in the treatment of breast cancer-related depression based on targeted metabolism and gut microbiota［D］. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2022.

〔收稿日期〕2024-03-05

刘瑞頔,徐江雁,谢治深,等. STAT3 在糖尿病肾病中的作用机制研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 117-126.
Liu RD, Xu JY, Xie ZS, et al. Research progress in the mechanism of STAT3 in diabetic kidney disease［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 117-126.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.014

STAT3 在糖尿病肾病中的作用机制研究进展

刘瑞頔[1],徐江雁[1],谢治深[1],张效威[1],陈　洁[2],张振强[1*]

(1.河南中医药大学 中医药科学院,郑州　450046;
2.马来西亚管理与科技大学国际学术部,马来西亚雪兰莪州 莎阿南 47300)

【摘要】 信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)可调控细胞转化、增殖、存活等多种基因的表达,已成为癌症治疗的重要靶点。越来越多的研究表明,STAT3 的异常激活在糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)发生发展中发挥着重要作用。因此,本文将重点介绍 STAT3 在 DKD 中的治疗潜力,包括 STAT3 的结构、活性调控机制、在 DKD 中的异常激活作用机制以及研究现状的整理总结,以期为 DKD 发病机制研究以及新药研发提供参考。

【关键词】 糖尿病肾病;STAT3;作用机制
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0117-10

Research progress in the mechanism of STAT3 in diabetic kidney disease

LIU Ruidi[1], XU Jiangyan[1], XIE Zhishen[1], ZHANG Xiaowei[1], CHEN Jie[2], ZHANG Zhenqiang[1*]
(1. Academy of Chinese Medica Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. International Academic Affairs Department, Management and Science University, Negeri Selangor 47300, Malaysia)

【Abstract】 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is known to modulate the expression of genes related to cell transformation, proliferation, and survival, making it a significant target for cancer therapy. Recent research has also highlighted the crucial involvement of aberrant STAT3 activation in the pathogenesis of diabetic kidney disease (DKD). Accordingly, this article focuses on the therapeutic potential of targeting STAT3 in DKD. The structure of STAT3, its mechanisms of activity regulation, mechanisms of abnormal STAT3 activation in DKD, and a summary of the current research is provided. The review aims provide a reference for research into the pathogenesis of DKD and the development of new drugs.

【Keywords】 diabetic kidney disease; STAT3; mechanism
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病肾病(Diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病的微血管并发症之一,也是终末期肾病的主要原因[1]。我国糖尿病患病率约占据世界的四分之一[2-4],随着糖尿病发病率的不断上升,DKD 的发病率也逐年上升。DKD 发病机制复杂,多与纤维化、炎症、氧化应激、细胞衰老等有关[5-6]。目前,减缓

[基金项目]国家重点研发计划项目(2020YFE0201800);河南省重点研发计划项目(221111520300);河南省高校科技创新人才支持计划项目(22HASTIT048);河南省高等学校青年骨干教师项目(2021GGJS081);国家中医药管理局国际合作司中医药国际合作专项(0730-236132ZC0054/01-03)。
[作者简介]刘瑞頔(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治糖尿病肾病。E-mail:liu597243631@163.com
[通信作者]张振强(1971—),男,博士,教授,研究生导师,研究方向:中西医结合防治神经退行性疾病。
E-mail:zhang_zhenqiang@126.com

DKD 发展的治疗方法主要包括使用肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)抑制剂[7-9]、钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂[10-11]和盐皮质激素受体拮抗剂[12-13]。尽管这些疗法已经取得不小的进展,但依旧存在 DKD 持续发展等问题[14],患病率的不断上升提示我们需要继续探索新的途径,而新发现的分子途径可以为开发新疗法提供基础[15]。

信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)是一种细胞内的多功能转录因子[16],参与适应性免疫、胚胎发育、程序性细胞死亡等多种生物学过程[17-19]。STAT3 磷酸化进入细胞核,与 γ 干扰素激活序列启动子区域结合,并与核因子 Kappa 和缺氧诱导因子 1α 等辅助因子结合,诱导参与炎症、细胞增殖和存活的基因转录,发挥调节细胞转化、增殖、存活等方面的作用。激活的 STAT3 通过诱导细胞周期蛋白 D1、原癌基因蛋白质和存活蛋白表达上调[20];上调抗凋亡蛋白(如 Bcl-2、Bcl-XL 和 Mcl1)的表达[21];上调基质金属蛋白酶[22]、Twist1[23]、Snail 等蛋白的表达,参与癌细胞增殖、存活以及上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)[24-25]。因此,STAT3 的异常激活与癌症的发展存在密切联系,已经成为癌症的治疗靶点,并且取得了一定的进展[26]。近年来,大量的研究发现 STAT3 的异常激活同样存在于糖尿病肾病中[27-29],STAT3 可通过影响 Twist1 的表达来影响肉碱棕榈酰基转移酶 1α,导致脂肪酸氧化功能障碍,从而造成肾小管间质纤维化[30]。除此之外,STAT3 也可通过影响 Snail 来影响 EMT,Snail 是 E-钙粘蛋白的重要抑制剂,在 EMT 中起着重要作用[31]。提示 STAT3 在 DKD 的发生发展中发挥了关键作用。

本文对 STAT3 的结构进行分析,结合现代研究总结整理 STAT3 活性调控机制,及对 DKD 发生发展的调控作用,阐释 STAT3 在 DKD 中的重要作用以及治疗潜力,以期为 DKD 发病机制研究以及新药研发提供参考。

1 STAT3 结构与功能

STAT3 是 STAT 家族的成员,是一种由 770 个氨基酸组成的蛋白质,从 N 端到 C 端共含有 6 个保守的结构域:N 末端结构域(N-terminal domain,NTD)、螺旋卷曲结构域(coiled-coil domain,CCD)、DNA 结合结构域(DNA-binding domain,DBD)、连接结构域(linker domain, LD)、转录激活结构域(transactivation domain,TAD)、SRC 同源 2 结构域(Src homology 2,SH2)[32],见图 1。不同的结构域在信号转导以及转录因子激活的过程中都发挥着其各自的功能。见表 1。

2 STAT3 的活性调控

STAT3 参与了生物体内复杂多样的生命活动,并且受到严格调控,这种严格调控对健康至关重要[18,36],过度激活或者失活的 STAT3 都会导致如糖尿病、肠炎、肿瘤、肺炎、皮炎以及高血压等疾病[18]。STAT3 的异常激活在 DKD 中的重要性已经得到证实[37-38],正常人的肾组织中 p-STAT3 表达量很低,而通过对肾小球肾炎患者肾活检标本染色,发现在肾疾病患者的组织中,p-STAT3 的含量明显高于正常组,且主要存在于肾小球以及肾小管中[39],而通过对易患病变小鼠以及耐药小鼠的肾染色[40],均发现在肾病理状态前后有 p-STAT3 表达量显著上调的现象[27]。在 STAT3 活性降低且通过低剂量链脲佐菌素诱导 I 型糖尿病的小鼠模型中,STAT3 活性降低的小鼠模型相对于野生型小鼠来说,炎症指标明显减少,白蛋白尿、系膜扩张和胶原沉积均有减少[37,41]。而在加入 STAT3 抑制剂的动物模型中,可显著减轻链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的肾损伤[42-44]。STAT3 主要通过磷酸化、乙酰化、甲基化等其他翻译后修饰调节 STAT3 二聚化、核移位、转录活性等。

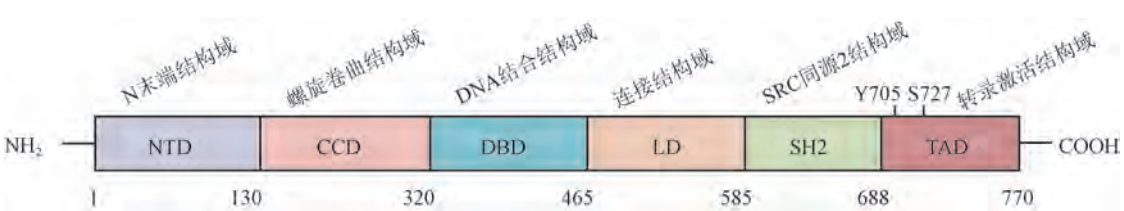


图 1 STAT3 结构示意图[19]

Figure 1 Schematic diagram of STAT3 structure

表 1 STAT3 结构域及其功能

Table 1 STAT3 domains and their functions

结构域 Structural domain	长度(氨基酸) Length (amino acid)	功能 Feature
N 末端结构域 N-terminal domain,NTD	1~130	参与蛋白质与蛋白质之间相互作用形成不同结构的二聚体复合物和负反馈调控、STAT3 核移位、以及协同 STAT3 与 DNA 结合的过程 Involved in protein-protein interactions to form dimer complexes of different structures and negative feedback regulation, STAT3 nuclear shift, and coordination of STAT3 binding to DNA
螺旋卷曲结构域 Coiled-coil domain,CCD	130~320	CCD 中的序列元件 R214/215 是 STAT3 核移位所必需的,因此在 STAT3 中,CCD 对于 SH2 结构域介导的受体结合以及随后的磷酸化、二聚体以及核移位有非常重要的作用[33-34] Sequence element R214/215 in CCD is required for STAT3 nuclear translocation, so CCD plays an important role in SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent phosphorylation, dimerization, and nuclear translocation in STAT3[33-34]
DNA 结合结构域 DNA-binding domain,DBD	320~465	用于识别结合靶基因调控区域的 DNA 序列 Used to identify DNA sequences that bind to regulatory regions of target genes
连接结构域 Linker domain,LD	465~585	连接 DBD 与 SH2 区域,以维持 DNA 结构域的稳定性 Linking the DBD to the SH2 region to maintain the stability of the DNA structural domains
转录激活结构域 Transactivation domain,TAD	585~688	TAD 中特定丝氨酸残基的磷酸化是实现 STAT3 最大转录活性所必需的 Phosphorylation of specific serine residues in TAD is required to achieve maximum transcriptional activity of STAT3
SRC 同源 2 结构域 Src homology 2,SH2	688~770	SH2 是 STAT 中最高度保守的结构域,具有高亲力,用于招募和激活 STAT3 分子,主要与磷酸化酪氨激酶相互作用,使 STAT3 发生磷酸化,磷酸化的 STAT3 相互作用形成二聚体[33, 35] SH2 is the most highly conserved structural domain in STAT with high affinity for recruiting and activating STAT3 molecules, interacting mainly with phosphorylated tyrosine kinases to phosphorylate STAT3, and phosphorylated STAT3 interacts to form dimers[33, 35]

2.1 磷酸化

STAT3 的磷酸化是其主要激活方式,磷酸化的 STAT3 相互作用形成二聚体。在未受刺激的细胞中,STAT3 严格受到负调节因子的调控,包括活化 STAT3 蛋白抑制蛋白[45]、细胞因子信号转导抑制因子、蛋白酪氨酸磷酸酶[46]和泛素酶,以维持 STAT3 在细胞质中的非活性状态[47]。当细胞受到刺激后,主要通过其上游配体(酪氨酸激酶、细胞因子、非受体酪氨酸激酶)诱导的 S727 位点的丝氨酸残基与 Y705 位点的酪氨酸残基的直接磷酸化而激活[48],激活的 STAT3 通过其 SH2 结构域与磷酸化氨基酸基团相互作用形成二聚体,并由输入蛋白 α3/β1(importin-α3/importin-β1)转移到细胞核中[26,49],结合到靶基因的启动子区域激活它们的转录,从而调控下游基因的表达,以此发挥其在疾病发生发展中的作用[50-51]。

2.2 乙酰化

STAT 家族能够在多个位置广泛乙酰化,STAT3 的乙酰化发生在 N 末端结构域的 K49 和 K87 位点以及 SH2 结构域的 K685 和 K631 位点,K49 和 K87 已经被确定为 HAT 腺病毒 E1A 相关的 300 kDa 蛋白(adenoviral E1A binding protein of 300 kDa,p300)和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的结合蛋白(CREB binding protein,CBP)的直接靶标,p300 介导 K87 位点的乙酰化,促进 STAT3-p300 相互作用,导致 STAT3 靶基因的反式激活,K685 乙酰化由 CBP/p300 催化,STAT3 乙酰化对 STAT3 的稳定二聚化、结合 DNA 的能力和转录调控至关重要[52-53]。研究发现,在使用组蛋白脱乙酰酶抑制剂后,细胞核内的 STAT3 蛋白增多[54-55],表明 STAT3 的乙酰化能够增加 STAT3 的核定位。

2.3 甲基化

STAT3 可以在 NTD 的 K49 位点以及 CCD 的 K140 和 K180 位点发生甲基化,果蝇 Zeste 增强子同源物 2(EZH2)能够催化 K49 以及 K180 的甲基化。STAT3K49 的甲基化发生在 STAT3Y705 磷酸化之后,研究发现,EZH2 对于磷酸化 STAT3 的亲和力大于未磷酸化的 STAT3,并且 EZH2 能够与启动子结合的 STAT3 磷酸化二聚体结合,增强其转录活性[56];STAT3 的 K180 位点甲基化先于 STAT3Y705

的磷酸化,EZH2 通过与 STAT3 结合并促进 K180 甲基化,通过保护 Y705 残基免于去磷酸化来增强 Y705 磷酸化,通过影响 STAT3 磷酸化来调节 STAT3 的转录活性[56];然而 STAT3K140 的甲基化却有着与 K49、K180 甲基化截然相反的作用,S727 位点磷酸化是 STAT3K140 甲基化的前提条件,组蛋白赖氨酸甲基化转移酶 SET9 负责 STAT3K140 的甲基化,而组蛋白赖氨酸特异性去甲基化酶 1 则负责其去甲基化,但这种甲基化是 STAT3 特定靶基因的负调节因子,因为它的阻断增加了大多数但不是全部 STAT3 靶基因的表达[57]。

3 STAT3 在 DKD 中的作用

近年来,在肾相关疾病中 STAT3 所起的调控作用引起了学者的广泛关注,越来越多的研究表明,STAT3 与纤维化、炎症、细胞衰老、凋亡等密切相关,在 DKD 发生发展过程中调控机制如图 2 所示。

3.1 促进纤维化

细胞外基质(extracellular matrix,ECM)沉积是肾纤维化的主要特征之一[58],DKD 早期细胞因子表达和 ECM 合成的上调与 STAT3 表达升高有关[59]。Tang 等[60]通过靶向降低 STAT3 的表达,可显著减少 ECM 沉积;在使用了 STAT3 抑制剂后,也能有效的减少 ECM 的沉积,证明 ECM 的沉积与 STAT3 有关,抑制 STAT3 能够改善 DKD 小鼠肾损伤和细胞中的促纤维化反应。ECM 核心成分包括胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白,p-STAT3 进入细胞核,与下游靶基因结合,通过靶基因启动子的激活或抑制控制 EMT 相关基因,调控纤连蛋白,促进 ECM 沉积[42]。对 STAT3 结合位点分析,鉴定出多个与成纤维细胞激活和促纤维化信号转导通路有关的基因,如 *Lcn*2、*Pdgfp*、*Timp*1 等[27]。肾小管 STAT3 的激活是导致成纤维细胞增殖和间质纤维化发展的一连串事件中的第一步,通过促进 STAT3 形成二聚体进入细胞核内,与下游靶基因 Snail1、Twist1 等结合,Snail1 能够与 E-钙粘蛋白启动子上游区域的 E-box 元件特异性结合并抑制靶基因启动子活性,Twist1 可调节 Cullin2 环状 RNA 以增加 EMT 中波形蛋白的表达[61],促进 EMT,进而导致纤维化的发生[62-64]。而抑制 STAT3 的激活能够改善糖尿病肾纤维化等病理变化[42-43,65]。

此外,STAT3 的激活能够影响 RAS 系统激活信号,血管紧张素 II(angiotensin II,Ang II)是 RAS 的其中之一,是导致 DKD 的病理原因之一[66]。Zheng 等[42]通过沉默 STAT3 以及使用 STAT3 抑制剂后观察到高糖诱导的血管紧张素转化酶,Ang Ⅱ受体 AT1 含量明显降低,表明 STAT3 的激活影响着 RAS 系统的激活。在 DKD 发展过程中,STAT3 激活上调 Ang II 活性,Ang II 主要通过特异性受体 AT1 诱导 TGF-β 表达,促进 ECM 相关蛋白(如纤连蛋白)的表达和合成,TGFβ 可诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化[67-69],最终导致纤维化。此外,STAT3 在

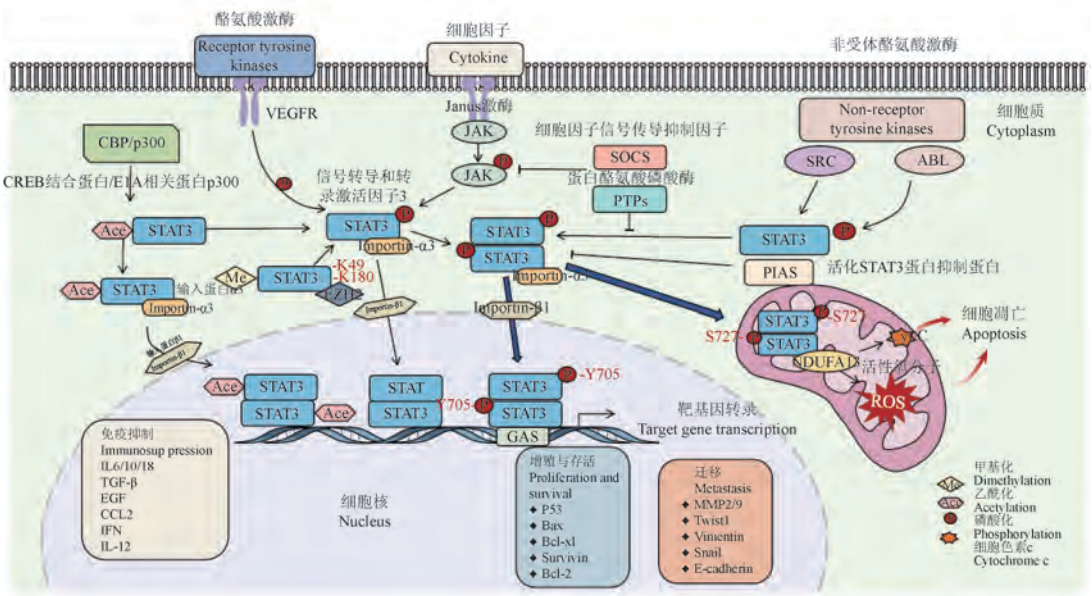


图 2 STAT3 活性调控示意图[19]

Figure 2 Schematic diagram of STAT3 activity regulation

金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1,TIMP1)的启动子区域含有结合位点,TIMP 为基质金属蛋白酶特异性抑制家族,能够抑制基质金属蛋白酶水解 ECM,导致 ECM 沉积,促进纤维化[70]。

3.2 引发炎症

在 DKD 的发生发展中,炎症也起到了非常重要的作用[71-72],STAT3 同样参与了炎症的发生。在高糖的刺激下,STAT3 表达增多,RAS 系统失调,刺激系膜细胞产生大量的 IL-6,而 IL-6 作为 STAT3 的上游,能够刺激酪氨酸激酶 JAK(janus kinase,JAK)激活[73-74],STAT3 在 JAK 的影响下磷酸化增多[75]。在 DKD 患者以及动物模型中,均发现细胞因子 IL-6 有明显的增多[76-77],IL-6 又刺激足细胞,导致足细胞肥大;中性粒细胞的浸润又进一步放大了炎症反应,从而又刺激 JAK/STAT3 通路的激活,进而影响 DKD 的进展。Ajay 等[78] 通过沉默检查点激酶 1(checkpoint kinase 1,Chk1)以及使用特异性抗体对 Chk1 进行免疫沉淀,发现 Chk1 在氧化应激后与肾小管上皮细胞中的 STAT3 结合,并且 STAT3 可与肾损伤分子 1(kidney injury molecule-1,KIM-1)的启动子结合并调节其转录,KIM-1 可通过介导肾小管上皮细胞摄取游离脂肪酸导致细胞内活性氧增多,直接引起间质炎症[79],随后导致肾纤维化[80]。

3.3 导致细胞衰老

细胞衰老主要表现为细胞周期阻滞、细胞形态异常增大,呈扁平状、端粒缩短等,DKD 与肾小管上皮细胞、足细胞、内皮细胞和系膜细胞的衰老均有密切的联系。通过基因组搜索肾衰老转录组的候选调节因子发现,STAT3 是结合肾年龄相关基因方面最强的调节因子之一,通过分析 STAT3 不同活性状态下靶基因如 *NNMT*、*NAMPT*、*MYC* 等表达情况发现,抑制 STAT3 活性后,基因表达的变化呈强负相关,证明 STAT3 与细胞衰老有密切的联系[81]。STAT3 可通过 S727 位点磷酸化进入线粒体内,与 NDUFA13 相结合,影响线粒体电子传递链(electron transport chain,ETC),导致线粒体内活性氧(reactive oxygen species,ROS)增多,mtDNA 损伤,促进细胞衰老。研究发现,抑制 STAT3 的活性能够有效延缓细胞衰老,在肾小球系膜细胞中,Ang II 促进细胞周期从 G1 期向 S 期过渡,导致细胞衰老[82-83],通过从沉默 STAT3 后则可延缓肾小球系膜细胞的衰老,在使用自噬抑制剂后也可起到类似的效果,证明 Ang II 诱导的过度自噬促进了细胞衰老,而通过抑制 STAT3 活性,mTOR 活性恢复,自噬活性降低,延缓衰老[84]。高糖环境下,肾小管上皮细胞中的盲肌样蛋白 1 表达受到抑制,miR-130a-3p 减少,miR-130a-3p 能够与 STAT3 的 mRNA 3'UTR 结合而负调控 STAT3,STAT3 的表达增多,衰老相关蛋白 β-半乳糖苷酶、P21 等上调,导致细胞衰老[43,85]。

3.4 诱导凋亡

凋亡普遍存在与生物界,正常状态和病理状态下均有发生,而 STAT3 在促进细胞凋亡和抑制细胞凋亡中均发挥着重要作用。STAT3 在多数癌症中存在组成型激活,具有抗凋亡的特性;在 DKD 的进展中,STAT3 具有促进凋亡的特性。STAT3 的 S727 位点磷酸化进入线粒体,能够与 ETC 复合物 I 中的组成部分 NDUFA13 相互作用,NDUFA13 的下调导致电子泄漏使线粒体 ETC 能力下降[17],线粒体 ROS 增多,诱导肾细胞凋亡[86];另外,线粒体 ETC 能力下降,也导致了线粒体膜电位的降低,细胞色素 c 释放,诱导细胞凋亡。

4 STAT3 抑制剂及其在 DKD 中的应用

目前针对 STAT3 的抑制剂主要分为两种,一种是直接抑制 STAT3,是指药物直接靶向作用于 STAT3 的不同结构域,从而阻断 STAT3 的二聚化、磷酸化、核移位等。另外一种则是抑制 STAT3 的上游,这是目前研究最多也是应用最广的一种抑制方式,其机制主要是通过与其上游成分发生作用,导致 STAT3 无法激活,从而达到抑制 STAT3 的目的,上游靶标目前研究较多的主要集中在 JAK、Src 和受体酪氨酸激酶[87]等,到目前为止,许多 STAT3 抑制剂在体内外实验中都取得了十分显著的效果,且部分抑制剂已经开展临床试验。见表 2。

除此之外,中医药治疗也是重要治疗手段之一,许多中药具有抗炎[94]、抗氧化和抗纤维化的作用,多种中药活性成分以及复方均被发现能够抑制 STAT3 表达[95]。见表 3。

5 小结与展望

越来越多的证据表明,STAT3 在 DKD 的发生发展中发挥着重要的作用[42,98-99],因此 STAT3 在治疗 DKD 上具有一定的潜力,到目前为止,尽管许多针对 STAT3 的抑制剂通过研究证明其有效性、显著性,也有一部分已经开启了临床试验,但是目前所研究的

表 2 STAT3 抑制剂研究进展

Table 2 Research progress on STAT3 inhibitors

抑制剂 Inhibitor	名称 Name	作用机制 Action mechanism	优缺点 Advantages and disadvantages	临床应用现状 Clinical application status
STAT3 直接抑制剂 Direct inhibitors of STAT3	Stattic	靶向结合 STAT3SH2 结构域,直接阻断 STAT3 磷酸化(Tyr705)、二聚化以及核移位[88] Targeted binding to the STAT3SH2 domain directly blocks STAT3 phosphorylation (Tyr705), dimerization, and nuclear translocation [88]	第一个非肽类小分子,但对于 JAK1/JAK2 磷酸化几乎没有效果 First non-peptide small molecule, but has little effect on JAK1/JAK2 phosphorylation	尚未有相关报道 There have been no reports
	S3I-201	可阻断 STAT3 的二聚化、STAT3-DNA 结合和转录活性[89] Blocks STAT3 dimerisation, STAT3-DNA binding and transcriptional activity[89]	S3I-201 有效抑制 STAT3DNA 结合活性,对 STAT1 和 STAT5 抑制作用弱。 S3I-201 effectively inhibited STAT3DNA binding activity and weakly inhibited STAT1 and STAT5.	Ⅱ期临床试验 Phase II clinical trial
	XYA-2	与 STAT3 的 SH2 结构域特异性相互作用,并抑制 IL-6 诱导的 STAT3 Tyr705 磷酸化和核转位[90] It interacts specifically with the SH2 domain of STAT3 and inhibits IL-6-induced STAT3 Tyr705 phosphorylation and nuclear translocation[90]	对多种胃癌细胞株有显著抑制活性,可能是用于治疗胃癌的有效 STAT3 抑制剂 It has significant inhibitory activity on a variety of gastric cancer cell lines, and may be an effective STAT3 inhibitor for the treatment of gastric cancer	尚未有相关报道 There have been no reports
	C188-9	靶向 STAT3 SH2 结构域的强效小分子[38, 91] Powerful small molecules targeting the STAT3 SH2 domain [38, 91]	溶解性差 Poor solubility	目前正在进行 I 期临床试验,用于治疗晚期癌症(NCT03195699) Currently in Phase I clinical trial for the treatment of advanced cancer (NCT03195699)
	YY002	能够同时抑制 STAT3Y705 和 S727 位点的磷酸化,是全球首款高活性双功能磷酸化抑制剂[92] World's first highly active bifunctional phosphorylation inhibitor capable of inhibiting phosphorylation at both the STAT3Y705 and S727 sites [92]	药物可口服、生物利用度高、体内毒副作用低 Drugs can be taken orally, have high bioavailability and low toxicity in the body	已开展临床Ⅰ期研究 Clinical phase I studies have been conducted
	BI608 (napabucasin)	选择性的与 STAT3 的 DBD 结构域结合的小分子抑制剂[93] Small molecule inhibitors that selectively bind to the DBD domain of STAT3 [93]	安全性良好 Good security	迄今为止唯一进入Ⅲ期试验的直接 STAT3 抑制剂 Only direct STAT3 inhibitor to enter Phase III trials to date
STAT3 上游抑制剂 Upstream inhibitors of STAT3	BP102	阻断 VEGF 受体的激活 Blocking the activation of VEGF receptors	安全性良好 Good security	已进入临床试验阶段 Has entered the clinical trial phase
	Itacitinib	抑制 JAK1 JAK1 inhibition	选择性抑制 JAK1 Selective inhibition of JAK1	已进入临床试验阶段 Has entered the clinical trial phase

抑制剂大部分是针对于癌症以及自身免疫疾病,临床上专门针对于肾疾病的抑制剂尚无报道,未来仍需要更多的努力来促进具有独特性以及有效性的新的化合物的鉴定,有望改变 DKD 的治疗现状。

表 3 中药活性成分及复方对 STAT3 的调节

Table 3 Regulation of STAT3 by active ingredients and compounds of traditional Chinese medicines

	名称 Name	作用机制 Action mechanism	来源 Source
中药活性成分 Active ingredient of Chinese medicine	雷公藤红素 Celastrol	直接结合 STAT3 蛋白 CCD 结构域的 Leu-207 和 SH2 结构域的 Gln-635/Val-637,抑制 STAT3 的磷酸化[96] Direct binding to Leu-207 of CCD domain of STAT3 protein and Gln-635/Val-637 of SH2 domain inhibited STAT3 phosphorylation[96]	雷公藤 Tripterygium wilfordii
	紫草素 Shikosin	阻断 JAK/STAT3 信号通路[97] Blocking the JAK/STAT3 signalling pathway[97]	紫草 Arneblae radix
	氧化苦参碱 Oxymatrine	通过降低炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-8 水平,升高 SOCS1 表达来抑制 JAK1、STAT3 表达 Suppression of JAK1 and STAT3 expression by decreasing the levels of inflammatory factors TNF-α、IL-6 and IL-8 and elevating SOCS1 expression	苦参、山豆根等 Radix Sophorae flavescentis, Sophorae tonkinensis radix et rhizome, etc.
中药复方 Traditional Chinese medicine compound	清热利湿饮 Qingre Lishi Yin	通过减少 IL-6、IL-8、IL-10 等炎症因子的分泌,抑制 JAK1、JAK2、p-STAT3 表达[97] Inhibits JAK1, JAK2, and p-STAT3 expression by reducing the secretion of inflammatory factors such as IL-6, IL-8, and IL-10[97]	经验复方 Clinical Chinese medicine compound
	加味凉血消风散 Modified Liangxue Xiaofeng Powder	抑制 JAK3、STAT3 基因以及蛋白表达,阻断 JAK3/STAT3 通路活性[97] Inhibits JAK3 and STAT3 genes and protein expression and blocks JAK3/STAT3 pathway activity[97]	《外科大成》 Surgical Dacheng
	健脾解毒汤 Jianpi Jiedu decoction	降低 STAT3 的表达,抑制 STAT3 磷酸化 Reduced STAT3 expression and inhibited STAT3 phosphorylation	经验复方 Clinical Chinese medicine compound

参考文献:

[1] ZHANG Y, JIN D, KANG X, et al. Signaling pathways involved in diabetic renal fibrosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 696542.

[2] LIU M, LIU S W, WANG L J, et al. Burden of diabetes, hyperglycaemia in China from to 2016: Findings from the 1990 to 2016, global burden of disease study [J]. Diabetes Metab, 2019, 45(3): 286-293.

[3] LI Y, TENG D, SHI X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study [J]. BMJ, 2020, 369: m997.

[4] WANG L, PENG W, ZHAO Z, et al. Prevalence and treatment of diabetes in China, 2013-2018 [J]. JAMA, 2021, 326(24): 2498-2506.

[5] WATANABE K, SATO E, MISHIMA E, et al. What's new in the molecular mechanisms of diabetic kidney disease: recent advances [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 570.

[6] HUNG P H, HSU Y C, CHEN T H, et al. Recent advances in diabetic kidney diseases: from kidney injury to kidney fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11857.

[7] DHAKARWAL P, AGRAWAL V, KUMAR A, et al. Update on role of direct renin inhibitor in diabetic kidney disease [J]. Ren Fail, 2014, 36(6): 963-969.

[8] YACOUB R, CAMPBELL K N. Inhibition of RAS in diabetic nephropathy [J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2015, 8: 29-40.

[9] YAN G, CHANG T, ZHAO Y, et al. The effects of *Ophiocordyceps sinensis* combined with ACEI/ARB on diabetic kidney disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Phytomedicine, 2023, 108: 154531.

[10] DAI Z C, CHEN J X, ZOU R, et al. Role and mechanisms of SGLT-2 inhibitors in the treatment of diabetic kidney disease [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1213473.

[11] GOHDA T, MURAKOSHI M. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors-miracle drugs for the treatment of chronic kidney disease irrespective of the diabetes status: lessons from the dedicated kidney disease-focused CREDENCE and DAPA-CKD trials [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13749.

[12] BARRERA-CHIMAL J, LIMA-POSADA I, BAKRIS G L, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists in diabetic kidney disease-mechanistic and therapeutic effects [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(1): 56-70.

[13] Al Dhaybi O, Bakris G L. Non-steroidal mineralocorticoid antagonists: Prospects for renoprotection in diabetic kidney disease[J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22 Suppl 1: 69-76.

[14] MIMA A. A narrative review of diabetic kidney disease: previous

and current evidence-based therapeutic approaches [J]. Adv Ther, 2022, 39(8): 3488-3500.
[15] MOHANDES S, DOKE T, HU H, et al. Molecular pathways that drive diabetic kidney disease [J]. J Clin Invest, 2023, 133(4): e165654.
[16] HORVATH C M. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals [J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(10): 496-502.
[17] YOU L, WANG Z, LI H, et al. The role of STAT3 in autophagy [J]. Autophagy, 2015, 11(5): 729-739.
[18] HILLMER E J, ZHANG H, LI H S, et al. STAT3 signaling in immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 31: 1-15.
[19] ZOU S, TONG Q, LIU B, et al. Targeting STAT3 in cancer immunotherapy [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 145.
[20] AL ZAID SIDDIQUEE K, TURKSON J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors [J]. Cell Res, 2008, 18(2): 254-267.
[21] FATHI N, RASHIDI G, KHODADADI A, et al. STAT3 and apoptosis challenges in cancer [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 117: 993-1001.
[22] BANERJEE K, RESAT H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review [J]. Int J Cancer, 2016, 138(11): 2570-2578.
[23] CHENG G Z, ZHANG W Z, SUN M, et al. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function [J]. J Biol Chem, 2008, 283(21): 14665-14673.
[24] LEE H, JEONG A J, YE S K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy [J]. BMB Rep, 2019, 52(7): 415-423.
[25] WENDT M K, BALANIS N, CARLIN C R, et al. STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas [J]. JAKSTAT, 2014, 3(1): e28975.
[26] SRIVASTAVA J, DIGIOVANNI J. Non-canonical Stat3 signaling in cancer [J]. Mol Carcinog, 2016, 55(12): 1889-1898.
[27] BIENAIMÉ F, MUORAH M, YAMMINE L, et al. Stat3 controls tubulointerstitial communication during CKD [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(12): 3690-3705.
[28] TAO J, MARIANI L, EDDY S, et al. JAK-STAT activity in peripheral blood cells and kidney tissue in IgA nephropathy [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2020, 15(7): 973-982.
[29] TAO J, MARIANI L, EDDY S, et al. JAK-STAT signaling is activated in the kidney and peripheral blood cells of patients with focal segmental glomerulosclerosis [J]. Kidney Int, 2018, 94(4): 795-808.
[30] SONG X, DU Z, YAO Z, et al. Rhein improves renal fibrosis by restoring Cpt1a-mediated fatty acid oxidation through SirT1/STAT3/twist1 pathway [J]. Molecules, 2022, 27(7): 2344.
[31] LIU J, ZHONG Y, LIU G, et al. Role of Stat3 signaling in control of EMT of tubular epithelial cells during renal fibrosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2552-2558.
[32] WANG H Q, MAN Q W, HUO F Y, et al. STAT3 pathway in cancers: Past, present, and future [J]. MedComm, 2022, 3(2): e124.
[33] LI X, JIANG W, DONG S, et al. STAT3 inhibitors: a novel insight for anticancer therapy of pancreatic cancer [J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1450.
[34] LIU Y, LIAO S, BENNETT S, et al. STAT3 and its targeting inhibitors in osteosarcoma [J]. Cell Prolif, 2021, 54(2): e12974.
[35] HU X, LI J, FU M, et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 402.
[36] ZHANG Y, WANG D, XU J, et al. Stat3 activation is critical for pluripotency maintenance [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1044-1051.
[37] LU T C, WANG Z H, FENG X, et al. Knockdown of Stat3 activity *in vivo* prevents diabetic glomerulopathy [J]. Kidney Int, 2009, 76(1): 63-71.
[38] PACE J, PALADUGU P, DAS B, et al. Targeting STAT3 signaling in kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2019, 316(6): F1151-F1161.
[39] ARAKAWA T, MASAKI T, HIRAI T, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(11): 3418-3426.
[40] LI F, MA Z, CAI Y, et al. Optimizing diabetic kidney disease animal models: Insights from a meta-analytic approach [J]. Animal Model Exp Med, 2023, 6(5): 433-451.
[41] 雷作熹, 罗仁, 董晓蕾, 等. STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(3): 163-165.
LEI Z X, LUO R, DONG X L, et al. Establishment of STZ-induced diabetic nephropathic rat model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2005, 13(3): 163-165.
[42] ZHENG C, HUANG L, LUO W, et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11): 848.
[43] FANG X, HUANG W, SUN Q, et al. Melatonin attenuates cellular senescence and apoptosis in diabetic nephropathy by regulating STAT3 phosphorylation [J]. Life Sci, 2023, 332: 122108.
[44] ZHANG Z, DENG S, SHI Q. Isoliquiritigenin attenuates high glucose-induced proliferation, inflammation, and extracellular matrix deposition in glomerular mesangial cells by suppressing JAK2/STAT3 pathway [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397(1): 123-131.
[45] CHUNG C D, LIAO J, LIU B, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3 [J]. Science, 1997, 278(5344): 1803-1805.
[46] TREMBLAY M L. On the role of tyrosine phosphatases as negative regulators of STAT signaling in breast cancers: new findings and future perspectives [J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(4): 312.

[47] WU M, SONG D, LI H, et al. Negative regulators of STAT3 signaling pathway in cancers [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 4957-4969.

[48] QIN J, SHEN X, ZHANG J, et al. Allosteric inhibitors of the STAT3 signaling pathway [J]. Eur J Med Chem, 2020, 190: 112122.

[49] CIMICA V, CHEN H C, IYER J K, et al. Dynamics of the STAT3 transcription factor: nuclear import dependent on Ran and importin-β1 [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20188.

[50] OTT N, FALETTI L, HEEG M, et al. JAKs and STATs from a clinical perspective: loss-of-function mutations, gain-of-function mutations, and their multidimensional consequences [J]. J Clin Immunol, 2023, 43(6): 1326-1359.

[51] YU H, PARDOLL D, JOVE R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11): 798-809.

[52] YUAN Z L, GUAN Y J, CHATTERJEE D, et al. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue [J]. Science, 2005, 307(5707): 269-273.

[53] TESORIERE A, DINARELLO A, ARGENTON F. The roles of post-translational modifications in STAT3 biological activities and functions [J]. Biomedicines, 2021, 9(8): 956.

[54] WANG R, CHERUKURI P, LUO J. Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11528-11534.

[55] WANG J, HUANG Z, JI L, et al. SHF acts as a novel tumor suppressor in glioblastoma multiforme by disrupting STAT3 dimerization [J]. Adv Sci, 2022, 9(26): e2200169.

[56] DASGUPTA M, DERMAWAN J K, WILLARD B, et al. STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(13): 3985-3990.

[57] YANG J, HUANG J, DASGUPTA M, et al. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(50): 21499-21504.

[58] 段艳华, 陈云祥, 郑高利, 等. 基于 TGF-β1/Smad 信号通路初步探讨虎杖醇提物对腺嘌呤诱导小鼠肾间质纤维化的改善作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(1): 10-19.
DUAN Y H, CHEN Y X, ZHENG G L, et al. Ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* attenuates renal fibrosis in a mouse model of adenine? induced renal injury through inhibiting TGF?β1/Smad signaling [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(1): 10-19.

[59] YUAN Q, TANG B, ZHANG C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 182.

[60] TANG M, CHEN Y, LI B, et al. Therapeutic targeting of STAT3 with small interference RNAs and antisense oligonucleotides embedded exosomes in liver fibrosis [J]. FASEB J, 2021, 35(5): e21557.

[61] MENG J, CHEN S, HAN J X, et al. Twist1 regulates vimentin through Cul2 circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 2018, 78(15): 4150-4162.

[62] XIE Q, ZHANG M, MAO X, et al. Matrix protein Tenascin-C promotes kidney fibrosis via STAT3 activation in response to tubular injury [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1044.

[63] BORZA C M, BOLAS G, BOCK F, et al. DDR1 contributes to kidney inflammation and fibrosis by promoting the phosphorylation of BCR and STAT3 [J]. JCI Insight, 2022, 7(3): e150887.

[64] NING X, ZHANG K, WU Q, et al. Emerging role of Twist1 in fibrotic diseases [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1383-1391.

[65] SUN H J, XIONG S P, CAO X, et al. Polysulfide-mediated sulfhydration of SIRT1 prevents diabetic nephropathy by suppressing phosphorylation and acetylation of p65 NF-κB and STAT3 [J]. Redox Biol, 2021, 38: 101813.

[66] CHAWLA T, SHARMA D, SINGH A. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy [J]. World J Diabetes, 2010, 1(5): 141-145.

[67] WOLF G, MUELLER E, STAHL R A, et al. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta [J]. J Clin Invest, 1993, 92(3): 1366-1372.

[68] WOLF G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway [J]. Kidney Int, 2006, 70(11): 1914-1919.

[69] MEZZANO S A, RUIZ-ORTEGA M, EGIDO J. Angiotensin II and renal fibrosis [J]. Hypertension, 2001, 38(3 Pt 2): 635-638.

[70] MATSUI F, BABITZ S K, RHEE A, et al. Mesenchymal stem cells protect against obstruction-induced renal fibrosis by decreasing STAT3 activation and STAT3-dependent MMP-9 production [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(1): F25-F32.

[71] RAYEGO-MATEOS S, RODRIGUES-DIEZ R R, FERNANDEZ-FERNANDEZ B, et al. Targeting inflammation to treat diabetic kidney disease: the road to 2030 [J]. Kidney Int, 2023, 103(2): 282-296.

[72] DONATE-CORREA J, FERRI C M, SÁNCHEZ-QUINTANA F, et al. Inflammatory cytokines in diabetic kidney disease: pathophysiologic and therapeutic implications [J]. Front Med, 2020, 7: 628289.

[73] JOHNSON D E, O'KEEFE R A, GRANDIS J R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248.

[74] FEIGERLOVÁ E, BATTAGLIA-HSU S F. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: From pathophysiology to therapeutic perspectives [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 37: 57-65.

[75] BROSIUS F C, TUTTLE K R, KRETZLER M. JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease [J]. Diabetologia, 2016, 59(8): 1624-1627.

[76] DALLA VESTRA M, MUSSAP M, GALLINA P, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16 (Suppl 1): S78-S82.

[77] SUZUKI D, MIYAZAKI M, NAKA R, et al. *In situ* hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 1995, 44(10): 1233-1238.

[78] AJAY A K, KIM T M, RAMIREZ-GONZALEZ V, et al. A bioinformatics approach identifies signal transducer and activator of transcription-3 and checkpoint kinase 1 as upstream regulators of kidney injury molecule-1 after kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(1): 105-118.

[79] MORI Y, AJAY A K, CHANG J H, et al. KIM-1 mediates fatty acid uptake by renal tubular cells to promote progressive diabetic kidney disease [J]. Cell Metab, 2021, 33(5): 1042-1061.

[80] HUMPHREYS B D, XU F, SABBISETTI V, et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis [J]. J Clin Invest, 2013, 123(9): 4023-4035.

[81] O'BROWN Z K, VAN NOSTRAND E L, HIGGINS J P, et al. The inflammatory transcription factors NFκB, STAT1 and STAT3 drive age-associated transcriptional changes in the human kidney [J]. PLoS Genet, 2015, 11(12): e1005734.

[82] ZHOU H, HUANG B, DU J, et al. Role of the JAK2/STAT pathway and losartan in human glomerular mesangial cell senescence [J]. Mol Med Rep, 2010, 3(3): 393-398.

[83] CAO D W, JIANG C M, WAN C, et al. Upregulation of miR-126 delays the senescence of human glomerular mesangial cells induced by high glucose via Telomere-p53-p21-Rb signaling pathway [J]. Curr Med Sci, 2018, 38(5): 758-764.

[84] YANG S, SUN D, WANG L, et al. The role of STAT3/mTOR-regulated autophagy in angiotensin II-induced senescence of human glomerular mesangial cells [J]. Cell Signal, 2019, 53: 327-338.

[85] JIANG X, RUAN X L, XUE Y X, et al. Metformin reduces the senescence of renal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy via the MBNL1/miR-130a-3p/STAT3 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 8708236.

[86] WAGENER F A D T G, DEKKER D, BERDEN J H, et al. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney [J]. Apoptosis, 2009, 14(12): 1451-1458.

[87] 黎勇玲, 孙振亮. STAT3 抑制剂抗肿瘤研究进展 [J]. 药学进展, 2022, 8(3): 226-231.
LI Y L, SUN Z L. Research progress in anti-tumor activities of STAT3 inhibitors [J]. Prog Pharm Sci, 2022, 8(3): 226-231.

[88] SCHUST J, SPERL B, HOLLIS A, et al. Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization [J]. Chem Biol, 2006, 13(11): 1235-1242.

[89] WANG Z, LI J A, XIAO W A, et al. The STAT3 inhibitor S3I-201 suppresses fibrogenesis and angiogenesis in liver fibrosis [J]. Lab Invest, 2018, 98(12): 1600-1613.

[90] GUAN X, YANG J, WANG W, et al. Dual inhibition of MYC and SLC39A10 by a novel natural product STAT3 inhibitor derived from *Chaetomium globosum* suppresses tumor growth and metastasis in gastric cancer [J]. Pharmacol Res, 2023, 189: 106703.

[91] JUNG K H, YOO W, STEVENSON H L, et al. Multifunctional effects of a small-molecule STAT3 inhibitor on NASH and hepatocellular carcinoma in mice [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(18): 5537-5546.

[92] CHEN H, BIAN A, ZHOU W, et al. Discovery of the highly selective and potent STAT3 inhibitor for pancreatic cancer treatment [J]. ACS Cent Sci, 2024, 10(3): 579-594.

[93] SHAH M A, YOSHINO T, TEBBUTT N C, et al. Napabucasin plus FOLFIRI in patients with previously treated metastatic colorectal cancer: results from the open-label, randomized phase III CanStem303C study [J]. Clin Colorectal Cancer, 2023, 22 (1): 100-110.

[94] DU H, HOU X, GUO Y, et al. Classic mechanisms and experimental models for the anti-inflammatory effect of traditional Chinese medicine [J]. Animal Model Exp Med, 2022, 5(2): 108-119.

[95] 杨帆, 曹晨, 方敬, 等. JAK-STAT 通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1485-1491.
YANG F, CAO C, FANG J, et al. Research progress on JAK-STAT pathway in diabetic nephropathy and intervention effect of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(5): 1485-1491.

[96] Correction to: celastrol attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling by targeting STAT3 [J]. Circ Res, 2022, 130 (3): e2.

[97] 胡怡, 武思仙, 刘栋, 等. 中医药调控 JAK-STAT 通路治疗银屑病的研究进展 [J]. 中成药, 2024, 46(2): 531-536.
HU Y, WU S X, LIU D, et al. Research progress of Chinese medicine regulating JAK-STAT pathway in the treatment of psoriasis [J]. Chin Tradit Pat Med, 2024, 46(2): 531-536.

[98] SALEM F, LI X Z, HINDI J, et al. Activation of STAT3 signaling pathway in the kidney of COVID-19 patients [J]. J Nephrol, 2022, 35(3): 735-743.

[99] PAN J, SHI M, GUO F, et al. Pharmacologic inhibiting STAT3 delays the progression of kidney fibrosis in hyperuricemia-induced chronic kidney disease [J]. Life Sci, 2021, 285: 119946.

〔收稿日期〕2024-04-16

贺晨菲,马驰远,冉春龙,等. 基于调控 AMPK 信号通路的中药治疗脑缺血再灌注损伤药理机制研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 127-136.
He CF, Ma CY, Ran CL, et al. Research progress on the AMPK signaling pathway-based pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 127-136.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.015

基于调控 AMPK 信号通路的中药治疗脑缺血再灌注损伤药理机制研究进展

贺晨菲[1,2],马驰远[1],冉春龙[1],程豪格[1,2],张　数[1,2],王森雨[1,2],宇翰林[1,2],刘向哲[1*]

(1.河南中医药大学第一附属医院脑病中心,郑州　450000;2.河南中医药大学第一临床医学院,郑州　450046)

【摘要】　脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)指脑血管缺血后血液再次恢复供应,导致脑组织进一步的损伤和功能障碍。目前,现代医学在 CIRI 的防治中取得了一定的进展,但仍然面临一些挑战和局限性。因此,寻找有效的干预措施来防治 CIRI 具有重要的临床价值。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)及其下游蛋白是治疗 CIRI 的重要靶点,在细胞能量稳态调节中起着关键作用。中药具有多靶点、多途径和多效应的特点,可以激活 AMPK 信号通路级联反应,通过调节细胞自噬、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等来治疗 CIRI,并取得一定成果。故文章总结了 AMPK 相关信号通路的结构与机制,详述其与 CIRI 的关系,并对中医药调控 AMPK 信号通路防治 CIRI 的研究现状进行系统性总结,以期为 CIRI 的中医防治及新药研发提供新的思路。

【关键词】　中药;AMPK 信号通路;脑缺血再灌注损伤;研究进展
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856 (2024) 09-0127-10

Research progress on the AMPK signaling pathway-based pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury

HE Chenfei[1,2], MA Chiyuan[1], RAN Chunlong[1], CHENG Haoge[1,2], ZHANG Shu[1,2], WANG Senyu[1,2], YU Hanlin[1,2], LIU Xiangzhe[1*]

(1. Department of Encephalopathy, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine First Clinical Medical College, Zhengzhou 450046)

【Abstract】　Cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) refers to the recovery of blood supply after cerebral ischemia, which leads to further damage and the dysfunction of brain tissue. Modern medicine has made some progress in the prevention and treatment of CIRI, but it still faces some challenges and limitations. Therefore, it is of great clinical value to find effective interventions to prevent and treat CIRI. AMP-activated protein kinase (AMPK) and its downstream proteins are important targets for the treatment of CIRI and play key roles in the regulation of cellular energy homeostasis. Traditional Chinese medicine for CIRI has multi-target and multi-pathway activities and multiple effects. It can activate a cascade of reactions in the AMPK signaling pathway and can be used to treat CIRI by regulating autophagy, oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis, and has achieved certain result. Therefore, this paper summarizes the

[基金项目]河南省科技攻关项目(242102311277);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药学科领军人才项目(豫卫中医函[2021]8 号);河南省中医药科学研究专项课题(2023ZXZX1077)。
[作者简介]贺晨菲(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治脑血管病研究。E-mail:hechenfei163@163.com
[通信作者]刘向哲(1966—),男,主任医师,教授,博士,博士生导师,研究方向:中医药防治脑血管病研究。
E-mail:liuxiangzhe@163.com

structure and mechanisms of the AMPK-related signaling pathway, elaborates on its relationship with CIRI, and systematically summarizes the research status of traditional Chinese medicine's ability to regulate the AMPK signaling pathway in the prevention and treatment of CIRI. This paper aims to provide new ideas for the prevention and treatment of CIRI using traditional Chinese medicine and the development of new drugs.

【**Keywords**】 traditional Chinese medicine; AMPK signaling pathway; cerebral ischemia-reperfusion injury; research progress

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

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)信号通路在细胞能量稳态调节中起到关键作用,与脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury,CIRI)神经元细胞凋亡、自噬和线粒体稳态关系密切,是治疗 CIRI 的重要靶点。AMPK 是一种异源三聚体复合物,由 α-催化亚基、β-调节亚基以及 γ-调节亚基组成[1]。哺乳动物分别由不同的基因表达两种亚型的 α-亚基(α1、α2)和 β-亚基(β1、β2),三种亚型的 γ-亚基(γ1、γ2、γ3),每个亚基的所有亚型以 1∶1∶1 的异源三聚体比率相互作用,产生 12 种组合[2]。在应激、饥饿、缺氧等情况下,腺苷酸(adenosine monophosphate,AMP)/三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)比例变化激活 AMPK,使 ATP 分解增加合成减少,维持机体能量平衡。另外,AMPK 复合物的上游激酶肝激酶 B1(liver kinase B1,LKB1)和 Ca^{2+}/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2(Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase 2,CaMKK2)也可以激活 AMPK[3]。AMPK 被激活后,可以调控上下游信号通路,改善缺血缺氧脑组织的物质能量代谢,减轻 CIRI(见图 1)。中药具有多成分、多途径、多靶点的作用,越来越多的中药单体、复方被证明可通过调控 AMPK 信号通路治疗 CIRI,但尚缺乏系统的总结归纳。因此,笔者对中医药调控 AMPK 信号通路防治 CIRI 进行梳理归纳,以期为中医药治疗 CIRI 提供有利的医学证据,指导临床治疗,并为新药研发提供参考。

1 中药通过调节 AMPK 信号通路调节细胞自噬治疗 CIRI

细胞自噬通过溶酶体降解途径去除细胞内受损的细胞质,使细胞能够在外源性能量供应不足时回收其自身的能量材料维持细胞内稳态[4]。研究表明,自噬能在 CIRI 中被激活,且具有双向调节的作用,适当的自噬可以修复受损的神经元,而过度的自噬可导致神经元凋亡[5]。UNC-51 样激酶 1

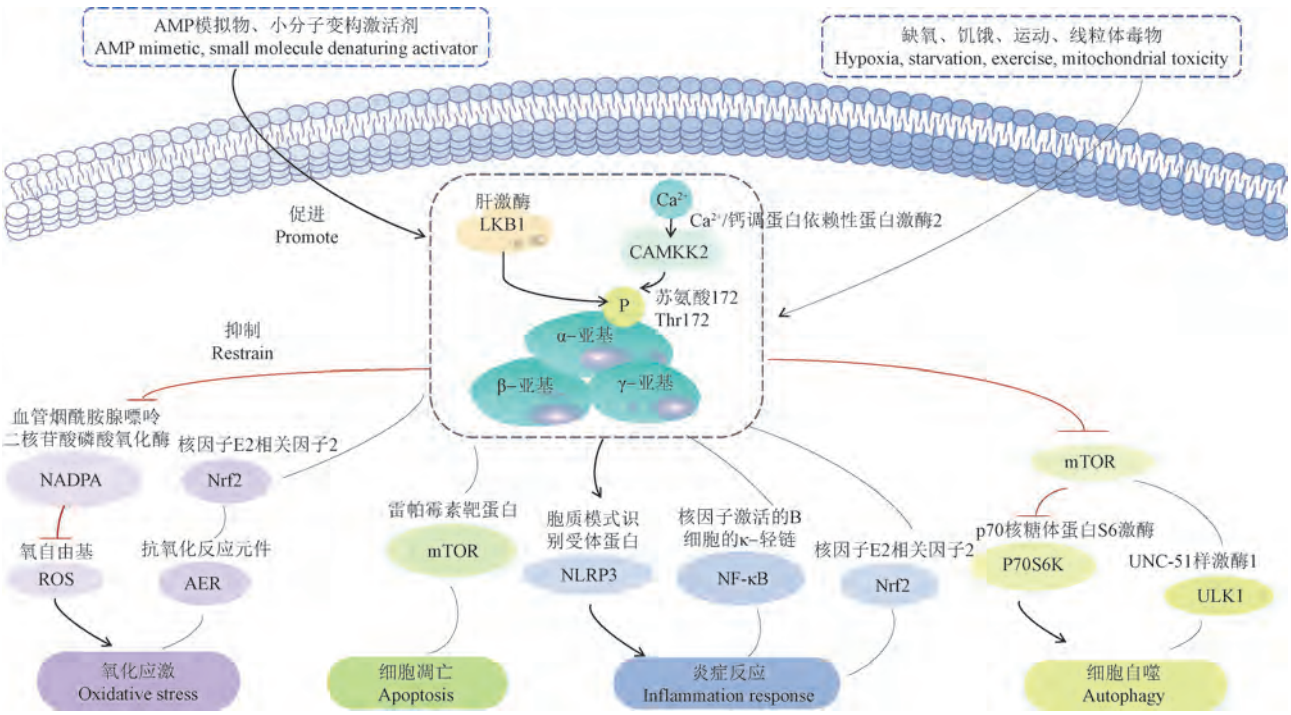


图 1 AMPK 信号通路机制图

Figure 1 Mechanism diagram of AMPK signaling pathway

(ULK-51-like kinase 1,ULK1)复合物是体内连接上游营养或能量感受器哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和 AMPK 与下游自噬体形成的桥梁。CIRI 促进 AMPK 活化,催化 ULK1 的丝氨酸磷酸化,进而启动自噬,满足细胞的能量供给[6-7]。

1.1 中药调节 AMPK 信号通路抑制自噬

马秀娟等[8]研究发现,补阳还五汤(黄芪、赤芍、当归、红花、桃仁、川芎、地龙)可通过抑制 AMPK 磷酸化,促进下游 mTOR 和 ULK1 的磷酸化,抑制细胞自噬,减少神经细胞凋亡。血小板内沉默信息调节因子 2 同系物 1(silent information regulator 2 homolog 1, SIRT1)是肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)去乙酰化的必需物质[9]。程巨萍等[10]研究表明,地黄饮子(熟干地黄、肉苁蓉、附子、五味子、麦门冬、菖蒲 、远志、巴戟、山茱萸、石斛、官桂、白茯苓)能提高大鼠脑组织 SIRT1 和 mTOR 蛋白表达,降低 p-AMPK 和 p-eNOS 蛋白表达,其机制可能是通过调节 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 通路信号表达,发挥脑组织保护作用。

葛根素是从葛根中提取的一种异黄酮类单体,在降低炎性因子的表达、减少星形胶质细胞的凋亡、抗神经元细胞凋亡等多个方面防治 CIRI[11]。最近研究发现,葛根素预处理后 p-AMPK 含量显著降低,p-mTOR 及 pS757-ULK1 含量显著提高,提示其可能通过调节 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路,抑制自噬来改善 CIRI[12]。表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3-O-gallate, EGCG)是最丰富和最有活性的多酚,占所有儿茶素的 50%~80%,具有抗增殖、抗氧化、促凋亡、抗血管生成和抗侵袭功能[13]。Wang 等[14]证明,EGCG 可抑制自噬,促进 AKT 和 mTOR 的磷酸化,同时抑制 AMPK 的磷酸化,进而保护脑神经。

中药复方补阳还五汤、地黄饮子可以抑制 AMPK 磷酸化,从而抑制自噬,减少神经细胞凋亡;葛根素通过调节 AMPK-mTOR-ULK1 信号通路抑制自噬,EGCG 促进 AKT 和 mTOR 的磷酸化来抑制自噬,均能发挥脑保护作用。然而,中药成分复杂,单一通路的研究不能全面解释其药效机制,仍需要进一步深入研究。

1.2 中药调节 AMPK 信号通路诱导自噬

AMPK/mTOR 已被公认为调节自噬的关键途径,AMPK 促进自噬,mTOR 抑制自噬,二者相互拮抗。片仔癀由麝香、牛黄、蛇胆、三七等组成,是明代皇家首次开出的中成药配方,该方已被中国药典正式列为治疗炎症性疾病的专利方。Huang 等[15]用脂多糖诱导 BV 2 小胶质细胞的体外实验证明,片仔癀治疗可使 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 和 p-mTOR/mTOR 蛋白水平明显升高,其自噬的调节作用与 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路相关。丁香酚主要是从丁香油中获得的一种酚类芳香族化合物[16]。Sun 等[17]证明,丁香酚给药能增高 CIRI 大鼠 p-AMPKα/AMPKα 比值,降低 p-mTOR/mTOR 和 p-P70S6K/P70S6K 比值,故丁香酚通过激活 AMPK/mTOR/P70S6K 途径诱导自噬来减轻脑神经损伤。红景天苷是从中药红景天中分离出的苯丙素糖苷类化合物,可以通过抑制细胞凋亡、抗氧化应激、调节自噬、保护血脑屏障等多种机制减轻 CIRI[18]。Li 等[19]研究证明,红景天苷通过调节 AMPK/TSC2/mTOR 通路诱导自噬缓解 CIRI,且具有剂量依赖性,高剂量红景天苷对脑损伤的治疗作用更为显著。山奈酚是具有多种药理作用的黄酮醇类化合物[20]。有研究证明山奈酚通过激活 AMPK,调控自噬相关蛋白,如上调 Bcl-2、Beclin-1 的表达和 LC3II/LC3I 的比值,下调 p62 的表达,有效减轻脑梗死面积[21]。

因此,中药复方片仔癀、丁香酚、红景天苷、山奈酚分别可以通过调节 AMPK/mTOR/ULK1、AMPK/mTOR/P70S6K、AMPK/TSC2/mTOR、激活 AMPK 信号通路诱导细胞自噬,进而减轻脑缺血再灌注损伤。

2 中药通过调节 AMPK 信号通路抑制氧化应激治疗 CIRI

氧化应激(oxidative stress,OS)是指机体受到有害刺激时,体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species,RNS)产生过多,氧化和抗氧化失衡,从而导致组织损伤[22-23]。CIRI 所引起的细胞内部环境发生改变,如能量代谢失衡、钙离子紊乱等会诱发氧化应激和线粒体功能障碍,并最终引起细胞凋亡级联反应[24]。核因子 E2 相关因子 2(nuclearfactor erythroidderived 2-like 2,Nrf2)是一种核转录因子,调节 ROS 解毒和抗氧化基因的表达[25]。研究表明,Nrf2 的上调有助于缓解缺血性脑卒中的急性损伤和功能恢复,AMPK 磷酸化可以促进 Nrf2 的活化,减少自由基的表达从而减轻 CIRI[26]。

桃叶珊瑚苷广泛存在于杜仲、车前草、玄参等中药,属于环烯醚萜苷类化合物,有抗氧化、抗衰老和抗炎等作用[27]。桃叶珊瑚苷能激活 AMPK/Nrf2 通路,上调 Nrf2 的表达,减少缺血级联反应期间 ROS 的产生,从而减轻氧化应激,抑制神经炎症[28]。

黄藤素,又名巴马汀,广泛存在于黄柏、黄连、延胡索等多种中药中,其药用记录最早记载于《本草纲目》。作为一种天然的异喹啉类生物碱,黄藤素具有良好的抗炎和抗氧化作用[29]。研究表明,黄藤素治疗能显著上调 CIRI 后 AMPK 的磷酸化和核 Nrf2 表达,减轻氧化应激、炎症反应和神经元凋亡[30]。

生物碱是植物中具有显著生物活性的天然有机化合物,木兰花碱是分布最广泛的天然季孢菌素生物碱[31]。研究发现,木兰花碱通过激活 SIRT1/AMPK 通路,抑制 CIRI 大鼠脑组织中 NO 和丙二醛表达,增加谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶,进而通过缓解脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)大鼠脑组织氧化应激反应、自噬和炎症反应来保护其神经细胞[32]。

竹节参皂苷是从中药竹节参提取出的三萜皂苷类成分,有促进自噬、抗炎和抗肿瘤等作用[33-34]。研究发现,竹节参皂苷通过激活 AMPK 和 SIRT1-1 来减轻 I/R 后 ROS 水平和线粒体损伤[35]。

连翘酯苷是连翘的主要活性成分之一,能降低细胞内 ROS 和丙二醛水平,具有减轻氧化应激、抗菌及抗病毒活性[36]。研究表明,连翘酯苷可通过 AMPK 激活 DAF-16/FOXO3 信号通路,进而降低 ROS 含量,抑制脑组织氧化应激,减轻 CIRI[37]。

CIRI 产生大量 ROS,导致 SOD 抗氧化能力不足,引发氧化应激反应,减轻脑缺血再灌注导致的氧化应激损伤具有重要的作用。桃叶珊瑚苷及黄藤素均可激活 AMPK/Nrf2 通路,上调 AMPK 的磷酸化和核 Nrf2 表达,减少 ROS 产生;木兰花碱及竹节参皂苷可激活 SIRT1/AMPK 通路,连翘酯苷通过 AMPK 调控 DAF-16/FOXO3 信号通路,同样发挥了减轻氧化应激的作用。

3 中药通过调节 AMPK 信号通路抑制炎症反应治疗 CIRI

脑血管闭塞后,内皮上的剪切应力改变和血液流变学改变立即激活炎症级联反应,神经元立即释放损伤相关分子,以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)、损伤相关的分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPs)等诱发炎症反应[38]。AMPK 可以通过抑制炎症因子的产生和 NF-κB、Nrf2 通路的活性,激活 p53 和 FOXO 等转录因子多种途径发挥抗炎作用,从而减轻 CIRI[37,39-40]。

清开灵注射液中的一些成分被认为是 AMPK/NLRP3 炎性体通路激活的关键调节剂,如异甘草素、胆酸和黄芩苷。Ma 等[41]发现经清开灵注射液腹腔注射后的 CIRI 模型大鼠脑组织中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,NLRP3)表达下降,p-AMPK/AMPK 水平升高,证明了清开灵注射液可以抑制 AMPK 介导的 NLRP3 炎症小体的激活抑制炎症反应,并缓解 CIRI。

黄芩素是黄芩中含量最高的黄酮类化合物之一。黄芩素给药能显著增强缺血大脑皮层中 AMPK 磷酸化和核 Nrf2 表达,下调核因子激活的 B 细胞的 κ-轻链增强(nuclear factor-κB,NF-κB)和血凝素样氧化低密度脂蛋白受体 1(lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, LOX-1)的表达及 AMPK/Nrf2 通路从而发挥抗炎抗氧化作用,减轻脑水肿,保护脑神经[42]。

叶下珠脂素是一种存在于叶下珠属植物中的天然产物,主要来源于珍珠草,具有抗氧化、抑制免疫等作用[43]。研究表明,叶下珠脂素可以通过抑制 AMPK 和 Nrf2 表达,降低 LOX-1、环氧化酶-2 和前列腺素 E 受体 2 的水平,减少炎症和相关氧化应激,减轻脑功能障碍和脑水肿[44]。

红花黄色素 B 是红花的主要活性成分,具有抗血栓、抗氧化、抗癌等多种药理作用[45]。体内外实验证实,红花黄色素 B 可诱导 AMPK 磷酸化,激活下游通路,抑制 NF-κB 表达,降低 IL-1、IL-6、TNF-α 和环氧化酶-2 水平,从而减轻炎症反应,减轻脑神经损伤[46]。

因此,清开灵注射液可以抑制 AMPK,抑制 NLRP3 炎症小体激活;黄芩素、叶下珠脂素通过抑制 AMPK/Nrf2 发挥抗炎抗氧化作用;红花黄色素通过抑制 NF-κB 表达,降低 IL-1、IL-6、TNF-α 和环氧化酶-2 水平,减轻炎症反应,从而发挥脑保护作用。

4 中药通过调节 AMPK 信号通路抑制细胞凋亡治疗 CIRI

细胞凋亡(apoptosis)是基因控制下的程序性死亡,对维持内环境的稳态和平衡具有重要意义。细胞死亡的方式包括细胞凋亡、焦亡、自噬、铁死亡、

铜死亡、坏死等十余种[47]。其中,细胞凋亡是缺血区域神经元死亡的关键机制,CIRI 可导致内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质聚集并触发内质网应激,严重和持续的内质网应激可能导致细胞凋亡信号传导途径中的必需分子 C/EBP 同源蛋白的转录增加,然后触发细胞凋亡[48]。体外氧-葡萄糖剥夺/复氧诱导后细胞凋亡增加,研究发现 miR-340-5p 可以调节 APPL1/LKB1/AMPK 通路,抑制 CEBPA-AS1 表达,减轻神经损伤[49]。因此,抑制或减轻细胞凋亡对 CIRI 有重要的治疗价值。

夏佛塔苷是主要存在于广金钱草中一种黄酮碳苷类化合物[50]。动物实验及体外实验均证实了夏佛塔苷可以增强自噬标志物 LC3 表达,降低 p62 表达,提高 pAMPK/AMPK 比率,并减弱 p-mTOR/mTOR 比率,减少大脑中动脉栓塞和体外氧-葡萄糖剥夺/复氧诱导大鼠的细胞凋亡和炎症反应,促进自噬,减轻 CIRI[51]。

胡黄连苷Ⅱ是是从胡黄连中提取的一种环烯醚萜类化合物,具有抗凋亡、抗炎、抗氧化应激等多种药理活性[52]。研究表明,胡黄连苷Ⅱ可能通过抑制 p38 MAPK 信号通路,减少细胞凋亡,减轻 CIRI[53]。

《本草拾遗》记载:“鼠尾草,性平。主诸痢,煮汁服,亦末服。”鼠尾草酚是迷迭香和鼠尾草植物多酚的主要成分,具有抗肿瘤、抗炎和抗氧化作用[54]。Xiao 等[55]对离体培养的原代神经元进行氧糖剥夺处理,采用反转录-聚合酶链反应方法检测炎症及凋亡相关基因信使核糖核酸水平,Western blot 测定总 AMPK 和磷酸化 AMPK 蛋白水平,发现鼠尾草酚可激活 AMPK,从而抑制细胞凋亡和炎症反应,保护原代神经元活性。

综上所述,夏佛塔苷、胡黄连苷Ⅱ、鼠尾草酚均可通过 AMPK 信号通路来整合并控制上游信号及下游基因表达,抑制细胞凋亡。中草药具有多靶点、多通路的特点,在 CIRI 的治疗中具有多方面的调节作用,随着相关通路研究的深入,可以为缺血性卒中的防治提供新的研究方向(详见表 1)。

表 1 中药调控 AMPK 治疗脑缺血再灌注损伤的药理机制

Table 1 Pharmacological mechanism of traditional Chinese medicine regulating AMPK in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury

中药成分/复方 Chinese medicine ingredients/compound	来源/主要成分 Source/main components	研究模型 Research model	作用信号通路 Signaling pathway of action	作用机制 Action mechanism
补阳还五汤[8] Buyanghuanwu Decoction	黄芪、赤芍、当归、红花、桃仁、川芎、地龙 Astragalus, Red peony, angelica, Safflower, Peach kernel, Chuanxiong, Eearthworm	SD 大鼠 SD rats	AMPK/mTOR/ULK1 信号通路 AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway	自噬↓ Autophagy↓
地黄饮子[10] Decoction of rehmanniae	熟干地黄、肉苁蓉、附子、五味子、麦门冬、菖蒲 、远志、官桂、白茯苓、巴戟、山茱萸、石斛 Rehmannia glutinosa, Cistanche deserticola, Aconite, Schisandra, Ophiopogon japonicus, Acorus calamus, Polygala tenuifolia, Cinnamon, White Poria, Morinda officinalis, Cornus officinalis, Dendrobium	SD 大鼠 SD rats	SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 信号通路 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS signaling pathway	自噬↓ Autophagy↓
葛根素[12] Puerarin	葛根 Pueraria lobata	SD 大鼠 SD rats	AMPK-mTOR-Ulk1 信号通路 AMPK-mTOR-Ulk1 signaling pathway	自噬↓ Autophagy↓
表没食子儿茶素-3-没食子酸酯[14] Epigallocatechin-3-O-gallate	绿茶 Green tea	C57 BL/6 小鼠 C57 BL/6 mice	AKT/AMPK/mTOR 信号通路 AKT/AMPK/mTOR signaling pathway	自噬↓ Autophagy↓

续表

中药成分/复方 Chinese medicine ingredients/compound	来源/主要成分 Source/main components	研究模型 Research model	作用信号通路 Signaling pathway of action	作用机制 Action mechanism
丁香酚[17] Eugenol	丁香 Elove	SD 大鼠 SD rats	AMPK/mTOR/P70S6K 信号通路 AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway	自噬↑ Autophagy ↑
红景天苷[19] Rhodioloside	红景天 Rhodiola	SD 大鼠 SD rats	AMPK/TSC2/mTOR 信号通路 AMPK/TSC2/mTOR signaling pathway	自噬↑ Autophagy ↑
山奈酚[21] Kaempferol	杜仲、连翘、迷迭香、银杏叶 Eucommia, Forsythia, Rosemary, Ginkgo leaves	SD 大鼠 SD rats	AMPK/mTOR 信号通路 AMPK/mTOR signaling pathway	自噬↑ 神经元凋亡↓ Autophagy ↑ Neuronal apoptosis ↓
桃叶珊瑚苷[28] Aucubin	杜仲、车前草、玄参 Eucommia, Plantain, Scrophularia	SD 大鼠 SD rats	AMPK/Nrf2 信号通路 AMPK/Nrf2 signaling pathway	氧化应激↓炎症反应↓ Oxidative stress ↓ Inflammatory response ↓
黄藤素[30] Palmatine	黄柏、黄连、延胡索 Phellodendron chinense, Coptis chinensis, Corydalis yanhusuo	C57BL/6J 小鼠 C57BL/6J mice	AMPK/Nrf2 信号通路 AMPK/Nrf2 signaling pathway	氧化应激↓炎症反应↓ Oxidative stress ↓ Inflammatory response ↓
木兰花碱[32] Magnolflorine	威灵仙、黄柏 Clematidis Radix Et Rhizoma, phellodendri chinensis cortex	SD 大鼠 SD rats	SIRT1/AMPK 信号通路 SIRT1/AMPK signaling pathway	氧化应激↓自噬↓炎症反应↓ Oxidative stress ↓ Autophagy ↓ Inflammatory response ↓
竹节参皂苷[35] Chikusetsu saponin V	竹节参 Panax japonicus	SD 大鼠 SD rats	AMPK 和 SIRT-1 信号通路 AMPK and SIRT-1 signaling pathway	氧化应激↓线粒体损伤 Oxidative stress ↓ Mitochondrial damage ↓
连翘酯苷 B[37] Forsythiaside B	连翘 Fructus forsythiae	SPF 小鼠 SPF mice	AMPK/DAF-16/FOXO3 信号通路 AMPK/DAF-16/FOXO3 signaling pathway	氧化应激↓ Oxidative stress ↓
清开灵注射液[41] Qingkailing injection	板蓝根、金银花、珍珠母、黄芩苷、栀子、胆酸、猪去氧胆酸、水牛角 Radix Isatidis, Flos Lonicerae, Concha Margaritifera Usta, Baicalin, Fructus gardeniae, Cholic acid, Hyodeoxycholic acid, and Cornu Bubaliand	SD 大鼠 SD rats	AMPK/NLRP3 信号通路 AMPK/NLRP3 signaling pathway	炎症反应↓ Inflammatory response ↓
黄芩素[42] Baicalein	黄芩 Scutellariae radix	SH-SY 5 Y 细胞/Wistar 大鼠 SH-SY 5 Y cells/Wistar rats	AMPK/Nrf2 通路 AMPK/Nrf2 signaling pathway	炎症反应↓氧化应激↓ Inflammatory response ↓ Oxidative stress ↓
叶下珠素[44] Phyllanthin	珍珠草 Pearl grass	Wistar 大鼠/SH-SY 5 Y 细胞 Wistar rats / SH-SY 5Y cells	AMPK/Nrf2 通路 AMPK/Nrf2 signaling pathway	炎症反应↓氧化应激↓ Inflammatory response ↓ Oxidative stress ↓
红花黄色素 B[46] Safflower yellow B	红花 Safflower	大鼠/PC 12 细胞 Rat/PC 12 cells	AMPK/NF-κB 信号通路 AMPK/NF-κB signaling pathway	炎症反应↓ Inflammatory response ↓
夏佛塔苷[51] Schaftoside	金钱草 Lysimachia christinae hance	SD 大鼠/HT 22 细胞 SD rats/HT 22 cells	AMPK/mTOR 信号通路 AMPK/mTOR signaling pathway	细胞凋亡↓炎症反应↓自噬↑ Apoptosis ↓ Inflammatory response ↓ Autophagy ↑

5 总结与展望

CIRI 是缺血性脑卒中重要的病理过程,因此寻求有效的生物保护剂势在必行。AMPK 信号通路作为一条维持细胞能量平衡、调节葡萄糖和脂肪酸代谢的经典通路,在细胞自噬、氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等病理过程中发挥重要作用。本文对 AMPK 信号通路与 CIRI 相关的抑制神经炎症、I/R 后 ROS 水平、线粒体损伤、改善脑梗死体积、减轻脑功能障碍和脑水肿等之间的关系进行探讨,发现 AMPK 信号通路的激活有利于抑制 CIRI 的发生与发展。我国Ⅰ类新药丁苯酞可通过 AMPK 调节线粒体融合与裂变从而减轻 CIRI[56],D-阿洛糖[57]、膜联蛋白 A1[58]、异氟醚[59]、脂联素肽[60]、1α,25-二羟维生素 D3[61]也被证明可通过调控 AMPK 治疗 CIRI,故以该通路为出发点研究药物治疗 CIRI 的作用机制具备一定的理论及研究基础,但相关研究多集中在动物及细胞实验,且目前的研究发现 CIRI 的防治药物临床疗效欠佳,这可能由于 CIRI 的病理机制复杂,针对某种单一的损伤机制来开发治疗药物难以取得满意的疗效。

CIRI 的西医治疗方法主要结合了药理和生理两种手段。在药理方面,药物选择包括氧自由基清除类药物、兴奋性氨基酸拮抗剂、钙离子通道阻滞剂、抗炎药物、基因药物以及天然药物等多种类型。在物理治疗方面,则采用了高氧疗法和亚低温疗法等[62],以达到减小脑梗死面积、减少神经元死亡的治疗目的,但动物实验中所发现的 CIRI 防治药物并不能在临床试验中获得理想的疗效。中医学对药物治疗 CIRI 的机制进行探索,主要有调节细胞自噬类方剂及中药提取物,如补阳还五汤、地黄饮子、葛根素、表没食子儿茶素-3-没食子酸酯、丁香酚、红景天苷、山奈酚;调节氧化应激类,如桃叶珊瑚苷、黄藤素、木兰花碱、竹节参皂苷、连翘酯苷 B;调节炎症反应类,如清开灵注射液、黄芩素、叶下珠素、红花黄色素 B;抑制细胞凋亡类,如夏佛塔苷、胡黄连苷Ⅱ、鼠尾草酚等。结果证实以上药物能够通过干预 AMPK 通路对 CIRI 发挥良好的治疗作用,为中医药防治 CIRI 患者提供明确的方向。

中医药靶向 AMPK 治疗 CIRI 可能是一种有效手段,具有极大的研究潜力和研究价值。然而现阶段尚存在诸多问题:(1)实验尚停留在动物实验阶段,缺乏大规模、多中心的临床试验和循证医学验证,使得确定这些单体及有效成分、复方的有效量、最佳剂量、安全性(包括潜在的副作用)和可行性具有挑战性;(2)中药复方药物相混合后化学成分复杂,阐明其机制仍需要多靶点、多成分、多组学的深入研究;(3)中药调控 AMPK 治疗 CIRI 的病理机制研究并不全面,例如,铁死亡是 CIRI 死亡模式的一种,现阶段中药抑制铁死亡治疗 CIRI 相关通路研究较多集中在 Nrf2/HO-1、AKT/GSK 3 β、SPHK1/mTOR 信号通路,尚缺乏 AMPK 相关通路的的研究;(4)目前中药靶向治疗 CIRI 的研究大多集中在单一信号通路,然而 CIRI 的病理过程复杂,涉及多种机制,需要对多靶点、多通路之间的交互作用进行更深层次的挖掘研究。

因此,本文提出以下几点建议:(1)加强临床试验与证据收集。开展大规模、多中心的临床试验,利用现代循证医学方法,系统收集和分析临床数据,为中药的疗效和安全性提供可靠证据;(2)深入中药复方及单体调控 AMPK 治疗 CIRI 机制的研究;利用多靶点、多成分、多组学的研究方法,整合多种技术从现代药理学、分子生物学和生物信息学技术等水平深入剖析中药复方药物治疗 CIRI 的药理机制,关注铁死亡等新型死亡模式在 AMPK 相关通路调控 CIRI 中的作用;(3)多靶点、多通路交互作用研究。CIRI 的病理过程复杂,中药研究需要关注多个靶点、多个通路之间的交互作用,利用网络药理学、系统生物学等方法构建中药作用网络,揭示其在 CIRI 治疗中的综合效应;(4)构建中药治疗 CIRI 标准化体系。在 CIRI 病证结合模型构建与评价、中药治疗 CIRI 药效评价指标优化、有效成分的筛选及临床转化等方向进行深入探索,为 CIRI 药物研究提供参考。综上,中药调控 AMPK 治疗 CIRI 还需更深层次、更多维度、更多层面的研究,为逐步完善中药调控 CIRI 的药理信息网络奠定基础及临床治疗 CIRI 患者提供更多新的思路和参考方向。

参考文献:

[1] WU S, ZOU M H. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4987.

[2] SAIKIA R, JOSEPH J. AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy [J]. J Mol Med, 2021, 99(11): 1539-1551.

[3] ASLAM M, LADILOV Y. Emerging role of cAMP/AMPK signaling [J]. Cells, 2022, 11(2): 308.

[4] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy

genes: a disease perspective [J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42.

[5] ZHANG D M, ZHANG T, WANG M M, et al. TIGAR alleviates ischemia/reperfusion-induced autophagy and ischemic brain injury [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 137: 13-23.

[6] TANG B, LUO Z, ZHANG R, et al. An update on the molecular mechanism and pharmacological interventions for ischemia-reperfusion injury by regulating AMPK/mTOR signaling pathway in autophagy [J]. Cell Signal, 2023, 107: 110665.

[7] CAO W, LI J, YANG K, et al. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress [J]. Bull Cancer, 2021, 108(3): 304-322.

[8] 马秀娟, 赵艳萌, 王文良, 等. 补阳还五汤通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路调控自噬减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(1): 147-152.
MA X J, ZHAO Y M, WANG W L, et al. Buyang Huanwu Decoction attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by regulating autophagy through AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2022, 38(1): 147-152.

[9] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132-141.

[10] 程巨萍, 戴奉德, 郑娅. 地黄饮子通过 SIRT1-AMPK-mTOR/eNOS 通路减轻老龄大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 浙江中医药大学学报, 2022, 46(11): 1189-1198.
CHENG J P, DAI F D, ZHENG Y. Dihuang yinzi alleviates cerebral Ischemia-reperfusion injury in aged rats through SIRT1-AMPK-MTOR/eNOS pathway [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2022, 46(11): 1189-1198.

[11] 韦克克, 张琛, 王雅婷, 等. 中药有效成分及配伍抗缺血性脑损伤诱导的神经血管单元损伤作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2951-2954.
WEI K K, ZHANG C, WANG Y T, et al. Research progress of effective components of traditional Chinese medicine and its compatibility against neurovascular unit injury induced by ischemic brain injury [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2019, 37(12): 2951-2954.

[12] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3127-3133.
HUANG Y G, WANG J F, DU L P, et al. Effect of puerarin on regulation of AMPK-mTOR signaling pathway to inhibit autophagy and alleviate focal cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(13): 3127-3133.

[13] NEGRI A, NAPONELLI V, RIZZI F, et al. Molecular targets of epigallocatechin-gallate (EGCG): a special focus on signal transduction and cancer [J]. Nutrients, 2018, 10(12): 1936.

[14] WANG L, DAI M, GE Y, et al. EGCG protects the mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy *via* the AKT/AMPK/mTOR phosphorylation pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 921394.

[15] HUANG Z, ZHOU X, ZHANG X, et al. Pien-Tze-Huang, a Chinese patent formula, attenuates NLRP3 inflammasome-related neuroinflammation by enhancing autophagy via the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 141: 111814.

[16] ULANOWSKA M, OLAS B. Biological properties and prospects for the application of eugenol-a review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7): 3671.

[17] SUN X, WANG D, ZHANG T, et al. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy *via* AMPK-mTOR-P70S6K pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 84.

[18] 徐浩群, 张文静, 娄原, 等. 红景天苷对脑缺血损伤的保护作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(15): 256-266.
Xu H Q, Zhang W J, Lou Y, et al. Progress on the protective effect and mechanism of rhodiola rosea glycosides on cerebral ischemic injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(15): 256-266.

[19] LI C, CHI J, DAI H, et al. Salidroside attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by regulating TSC2-induced autophagy [J]. Exp Brain Res, 2023, 241(1): 113-125.

[20] PERIFERAKIS A, PERIFERAKIS K, BADARAU I A, et al. Kaempferol: antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15054.

[21] YUAN Y, XIA F, GAO R, et al. Kaempferol mediated AMPK/mTOR signal pathway has a protective effect on cerebral ischemic-reperfusion injury in rats by inducing autophagy [J]. Neurochem Res, 2022, 47(8): 2187-2197.

[22] MOSSAD O, BATUT B, YILMAZ B, et al. Gut microbiota drives age-related oxidative stress and mitochondrial damage in microglia via the metabolite N^6-carboxymethyllysine [J]. Nat Neurosci, 2022, 25(3): 295-305.

[23] KOUTSALIARIS I K, MOSCHONAS I C, PECHLIVANI L M, et al. Inflammation, oxidative stress, vascular aging and atherosclerotic ischemic stroke [J]. Curr Med Chem, 2022, 29(34): 5496-5509.

[24] ZHANG B, ZHANG H X, SHI S T, et al. Interleukin-11 treatment protected against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 115: 108816.

[25] ZHOU F, WANG M, JU J, et al. Schizandrin A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by suppressing inflammation and oxidative stress and regulating the AMPK/Nrf2 pathway regulation [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(1): 199-209.

[26] YU J, WANG W N, MATEI N, et al. Ezetimibe attenuates oxidative stress and neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP pathway after MCAO in rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4717258.

[27] 李天敏, 王纯玉. HPLC 波长切换法同时测定车前草中桃叶珊瑚苷、大车前苷、木犀草苷的含量 [J]. 四川中医, 2021, 39(6): 47-51.
LI T M, WANG C Y. Simultaneous determination of aucubin,

plantamajoside and galuteolin in plantain by HPLC vavelength switching method [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(6): 47-51.

[28] ZHAO J J, ZHAO B, BAI X, et al. Aucubin promotes activation of AMPK and alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Cell Stress Chaperones, 2023, 28(6): 801-809.

[29] 赵宜丰, 甘利平, 赵红月, 等. 黄藤素的生物学功能及其生产应用 [J]. 饲料工业, 2023, 44(15): 12-18.
ZHAO Y F, GAN L P, ZHAO H Y, et al. Biological function of palmatine and its application in animal production [J]. Feed Ind, 2023, 44(15): 12-18.

[30] TANG C, HONG J, HU C, et al. Palmatine protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activation of the AMPK/Nrf2 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6660193.

[31] XU T, KUANG T, DU H, et al. Magnoflorine: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. Pharmacol Res, 2020, 152: 104632.

[32] LIANG H, CHANG X, XIA R, et al. Magnoflorine attenuates cerebral ischemia-induced neuronal injury via autophagy/Sirt1/AMPK signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2131561.

[33] 袁林, 梁晓晓, 罗颖, 等. 竹节参皂苷Ⅳa 抑制 THP-1 源性巨噬细胞泡沫化的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(10): 1051-1054.
YUAN L, LIANG X X, LUO Y, et al. Chikusetsu saponin Ⅳa mitigate foam production of THP-1 derived macrophages [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(10): 1051-1054.

[34] 梁宸, 周颖, 凡畅畅, 等. 竹节参皂苷Ⅳa 抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的研究 [J]. 药学学报, 2023, 58(9): 2677-2684.
LIANG C, ZHOU Y, FAN C C, et al. Inhibitory effect of *Panax japonicus* saponin Ⅳa on the proliferation of triple negative breast cancer cells [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(9): 2677-2684.

[35] ZHANG T, LI Z, QIN Z, et al. Neuroprotection of Chikusetsu saponin V on transient focal cerebral ischemia/reperfusion and the underlying mechanism [J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153516.

[36] 张哲, 吕毓, 黄攀豪. NF-κB 介导的连翘酯苷 B 对宫颈癌细胞增殖活性的抑制作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(4): 387-392.
ZHANG Z, LYU Y, HUANG P H. Forsythiaside B inhibits the proliferation activity of HeLa cells though transcription factor NF-κB [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2020, 25(4): 387-392.

[37] 陈兴, 王开万, 储德海, 等. 连翘酯苷 B 抑制小鼠脑缺血/再灌注引起的氧化应激损伤: 基于激活 AMPK/DAF-16/FOXO3 通路 [J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(2): 199-205.
CHEN X, WANG K W, CHU D H, et al. Forsythiaside B inhibits cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress injury in mice via the AMPK/DAF-16/FOXO3 pathway [J]. J South Med Univ, 2023, 43(2): 199-205.

[38] JURCAU A, SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23(1): 14.

[39] CAI J, CHEN X, LIU X, et al. AMPK: The key to ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2022, 237(11): 4079-4096.

[40] DUAN J, CUI J, YANG Z, et al. Neuroprotective effect of Apelin 13 on ischemic stroke by activating AMPK/GSK-3β/Nrf2 signaling [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 24.

[41] MA C, WANG X, XU T, et al. Qingkailing injection ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury and modulates the AMPK/NLRP3 Inflammasome Signalling pathway [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 320.

[42] YUAN Y, MEN W, SHAN X, et al. Baicalein exerts neuroprotective effect against ischaemic/reperfusion injury via alteration of NF-κB and LOX and AMPK/Nrf2 pathway [J]. Inflammopharmacology, 2020, 28(5): 1327-1341.

[43] JANTAN I, HAQUE M A, ILANGKOVAN M, et al. An insight into the modulatory effects and mechanisms of action of *Phyllanthus* species and their bioactive metabolites on the immune system [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 878.

[44] YUAN H, YANG Q, YANG B, et al. Phyllanthin averts oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemic-reperfusion injury through modulation of the NF-κB and AMPK/Nrf2 pathways [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2021, 40(1): 85-97.

[45] WANG C, GAO Y, ZHANG Z, et al. Safflower yellow alleviates osteoarthritis and prevents inflammation by inhibiting PGE2 release and regulating NF-κB/SIRT1/AMPK signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2020, 78: 153305.

[46] DU S, DENG Y, YUAN H, et al. Safflower yellow B protects brain against cerebral ischemia reperfusion injury through AMPK/NF-κB pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 7219740.

[47] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678-695.

[48] SUN X, LIU H, SUN Z, et al. Acupuncture protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis [J]. Mol Med, 2020, 26(1): 105.

[49] TU X, ZHANG H, CHEN S, et al. LncRNA CEBPA-AS1 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by sponging miR-340-5p regulating APPL1/LKB1/AMPK pathway [J]. FASEB J, 2022, 36(1): e22075.

[50] 魏雅芹, 王天云, 李雅婷, 等. UPLC-Q/TOF-MS/MS 法分析鉴定夏佛塔苷在小鼠体内的代谢产物 [J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2811-2820.
WEI Y Q, WANG T Y, LI Y T, et al. Metabolites of schaftoside in mouse plasma, bile, urine and feces after oral administration by UPLC-Q/TOF-MS/MS [J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(9): 2811-2820.

[51] ZHANG L, WU M, CHEN Z. Schaftoside improves cerebral

ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy and reducing apoptosis and inflammation through the AMPK/mTOR pathway [J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 31(12): 1343-1354.

[52] 蔡楠, 李晓璇, 赵利斌, 等. 胡黄连苷Ⅱ药理作用研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(1): 124-130.
CAI N, LI X X, ZHAO L B, et al. Research progress on pharmacological effects of picroside Ⅱ [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2022, 41(1): 124-130.

[53] 于竹芹, 汪贯习, 王潇璐, 等. 胡黄连苷Ⅱ干预脑缺血/再灌注损伤后 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的作用机制[J]. 解剖学报, 2021, 52(2): 196-204.
YU Z Q, WANG G X, WANG X L, et al. Effect and mechanism of picroside Ⅱ on p38 mitogen activated protein kinase signal transduction pathway after cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. Acta Anat Sin, 2021, 52(2): 196-204.

[54] O'NEILL E J, HARTOGH D J D, AZIZI K, et al. Anticancer properties of carnosol: a summary of *in vitro* and *in vivo* evidence [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 961.

[55] XIAO W C, ZHOU G, WAN L, et al. Carnosol inhibits cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting AMPK activation [J]. Brain Res Bull, 2023, 195: 37-46.

[56] 陈蕾, 王雪如, 黄杰, 等. AMPK 介导线粒体融合与裂变在丁苯酞抗小鼠脑缺血/再灌注损伤中的作用[J]. 中国新药杂志, 2022, 31(19): 1929-1935.
CHEN L, WANG X R, HUANG J, et al. Role of mitochondrial fusion and fission regulated by AMPK in the protective effects of dl-3-N-butylphthalide against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Chin J N Drugs, 2022, 31(19): 1929-1935.

[57] 罗耀文, 程俊凯, 张敏, 等. D-阿洛糖下调半乳糖凝集素-3 抑制 AMPK/mTOR 通路减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(9): 1467-1473.
LUO Y W, CHENG J K, ZHANG M, et al. D-allose alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by down-regulating galectin-3 inhibition of the AMPK/mTOR pathway [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(9): 1467-1473.

[58] XU X, GAO W, LI L, et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX-dependent AMPK-mTOR pathway [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 119.

[59] ZHAI J, LI N, ZHANG X, et al. Isoflurane enhances autophagy by activating AMPK/ULK1, inhibits NLRP3, and reduces cognitive impairment after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. J Mol Neurosci, 2023, 73(7/8): 549-562.

[60] LIU H, WU X, LUO J, et al. Adiponectin peptide alleviates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating AMPK/GSK-3β [J]. Exp Neurol, 2020, 329: 113302.

[61] LI Y, LI X, XU S, et al. 1, 25-D3 attenuates cerebral ischemia injury by regulating mitochondrial metabolism *via* the AMPK/AKT/GSK3β pathway [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 1015453.

[62] LI M, TANG H, LI Z, et al. Emerging treatment strategies for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Neuroscience, 2022, 507: 112-124.

〔收稿日期〕2024-03-08

雍盛,金大成,董信春,等. 恶性间皮瘤动物模型的研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 137-145.
Yong S, Jin DC, Dong XC, et al. Research progress on animal models of malignant mesothelioma［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 137-145.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.016

恶性间皮瘤动物模型的研究进展

雍　盛[1,2],金大成[2],董信春[2],苟云久[2*]

(1.甘肃中医药大学 第一临床医学院,兰州　730000;2.甘肃省人民医院 胸外科,兰州　730000)

【摘要】 恶性间皮瘤(malignant mesothelioma,MM)病例罕见且潜伏期长,临床上很难开展研究。动物模型的建立对于 MM 实验研究开展以及机制阐明具有重要意义。常见的动物模型主要包括自发性、诱发性、移植性和基因工程模型,但不同动物模型的适用范围各有不同。本文通过回顾国内外近十年来 MM 动物模型相关的实验研究,从造模方法、造模结果、模型优缺点 3 个方面总结和分析 4 种 MM 相关动物模型构建的最新进展,为基于动物模型开展的 MM 基础研究提供参考依据。

【关键词】 恶性间皮瘤;动物模型;小鼠;大鼠;基因工程
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0137-09

Research progress on animal models of malignant mesothelioma

YONG Sheng[1,2], JIN Dacheng[2], DONG Xinchun[2], GOU Yunjiu[2*]
(1. the First Clinical Department of Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.
2. Department of Thoracic Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Malignant mesothelioma cases are rare and have a long incubation period, making the disease a difficult subject to clinically research. Animal models of malignant mesothelioma are crucial for experimental research and elucidating the pathogenesis of malignant mesothelioma. Common animal models include spontaneous, inducible, transplantable, and genetically engineered models, but the applicability of different animal models varies. This article reviews studies related to the establishment of animal models of malignant mesothelioma published in the past 10 years. Recent progress made in the establishment of four animal models of malignant mesothelioma is summarized from three aspects: modeling method, modeling result, and model advantages and disadvantages. This review summarizes and analyzes the current progress made in the establishment of animal models of malignant mesothelioma and thus provides a reference for basic malignant mesothelioma research using animal models.

【Keywords】 malignant mesothelioma; animal models; mice; rat; genetic engineering
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

恶性间皮瘤(malignant mesothelioma,MM)是一种与石棉暴露密切相关的罕见癌症,主要发生在胸膜、腹膜、心包和睾丸鞘膜等体腔浆膜层。其中约 80%起源于胸膜,称为恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma,MPM)。由于起病隐匿,临床表现非特异性,大部分 MPM 患者确诊时已为晚期,诊断后中位生存期约为 10.3 个月,治疗选择有限且预后差,5 年生存率仅为 5%~15%[1]。流行病学数据显示,2016 年我国 MPM 新发病例 330 例,发病率约为 0.086/100 000,MPM 死亡病例 215 例,死亡率

[基金项目]甘肃省科技计划项目基金资助(21JR7RA673)。
[作者简介]雍盛(1996—),男,硕士研究生,研究方向:恶性胸膜间皮瘤的治疗及机制。E-mail:1172214536@qq.com
[通信作者]苟云久(1974—),男,博士,主任医师,教授,硕士生导师,研究方向:恶性胸膜间皮瘤的治疗及机制。E-mail:gouyunjiu@163.com

约为 0.056/100 000[2]。该病临床罕见且潜伏期长,诊断数据不足容易导致误诊,改善 MM 的早期诊断和治疗策略已经成为当前研究的焦点[3]。动物模型在 MM 研究中发挥着重要作用,不仅克服了 MM 潜伏期长、病程长和发病率低的缺点,还避免了人体实验的风险及研究伦理问题,在深入理解 MM 发病机制、开发早期诊断工具、测试潜在治疗干预措施等方面具有重要意义。常见的 MM 动物模型包括自发性、诱发性、移植性和转基因 MM 动物模型等,但不同动物模型的适用范围各有不同。本文回顾国内外近十年已发表的 MM 动物模型相关实验研究,从造模方法、造模结果、模型优缺点等 3 个方面进行总结和分析,旨在为基于动物模型开展的 MM 基础研究提供参考依据。

1 自发性 MM 动物模型

自发性 MM 在犬类中较为常见[4]。犬类被认为是评估新药和治疗方法的重要动物模型,因为它们会自然发生与人类肿瘤非常相似的疾病,包括 MM[5]。犬类的 MM 主要发生在胸膜及心包膜,这与人类 MM 的主要发病部位相似[6-7]。相比之下,Fischer344 雄性大鼠的自发性 MM 主要发生在睾丸鞘膜,并可扩散至整个腹腔,但很少侵及胸腔组织[8]。这种大鼠模型的发病率为 0.2%~5%,最常见的组织学形态为上皮样亚型,未见肉瘤样亚型。

自发性动物模型的优点在于减少了人为因素的干扰,使动物 MM 的发生过程更接近人类 MM 的自然状态。一项美国研究推测,到 2040 年后几乎所有的人类 MM 病例都将是自发性病例[9]。尽管自发性动物模型在未来 MM 研究中具有重要应用价值,但由于这些模型是在长期繁殖过程中因遗传基因随机突变而产生,发病率低且呈散发性,模型来源难以获取,通常仅见于孤立的病例报告。此外,研究方案的不标准化和有限的病例数量也使后续研究面临挑战。

2 诱发性 MM 动物模型

2.1 石棉诱发的 MM 动物模型

石棉是一种纤维状的天然硅酸盐矿物,因其耐火和绝缘性能广泛应用于多种建筑材料中。石棉主要分为蛇纹石石棉(温石棉)和角闪石石棉两类,后者包括青石棉、铁石棉、阳起石、透闪石和直闪石石棉。石棉纤维可通过淋巴系统长期沉积在胸膜和腹膜组织中,导致慢性炎症并释放致突变的氧自由基,从而引发 MM[10]。

研究表明,青石棉和铁石棉与 MM 死亡病例密切相关[11]。目前,青石棉是诱发性 MM 模型的主要诱导物。2014 年,Xu 等[12]研究了 *BRCA*1 相关蛋白 1(*BRCA*1 associated protein-1,*BAP*1)突变是否促进石棉诱导的 MM 发展,建立了 *Bap*1$^{+/-}$基因敲除小鼠模型。他们将青石棉注入 25 只 8~10 周龄雄性 FVB 背景的 *Bap*1$^{+/-}$基因敲除小鼠和野生型小鼠体内,单次剂量为 0.8 mg,每 3 周注射 1 次,持续 12 周,随访至 87 周龄。结果显示,与野生型小鼠相比,青石棉诱导的 *Bap*1$^{+/-}$基因敲除小鼠 MM 发病率显著增加(73% *vs* 32%),疾病进展加快,肿瘤更具侵袭性,石棉暴露 20 周后小鼠腹部出现肿胀,同时伴有胰腺、肝、肠道平滑肌和肺部的侵犯。此后,大多数研究都采用基因工程小鼠作为石棉诱导 MM 模型。Napolitano 等[13]研究了 *BAP*1 突变个体中石棉剂量和 MM 致癌的关系,建立了 *Bap*1$^{+/-}$基因敲除小鼠模型,将青石棉注入 50 只 10~12 周龄 C57BL/6 背景的 *Bap*1$^{+/-}$基因敲除小鼠和野生型小鼠体内,分为高剂量(0.5 mg)组和低剂量(0.05 mg)组,每周注射 1 次,持续 10 周,随访 13 个月。结果显示,与野生型小鼠相比,低剂量石棉诱导的 *Bap*1$^{+/-}$小鼠 MM 发病率增加(36% *vs* 10%),高剂量石棉的 *Bap*1$^{+/-}$小鼠 MM 发病率更高(60% *vs* 28%)。结论表明,即使暴露于最低剂量石棉,*BAP*1 突变个体的 MM 风险仍显著增加,可能是由于 *BAP*1 突变导致石棉诱导的炎症反应变化。Kadariya 等[14]为了评估炎症是否是石棉诱发 MM 发展的必要条件,建立了半胱天冬酶相关募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-associated recruitment domain,ASC)敲除小鼠模型,将青石棉注入 29 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 背景的 *Asc* 敲除小鼠和野生型小鼠体内,单次剂量为 0.4 mg,每 3 周注射 1 次,持续 24 周。结果显示,与野生型小鼠相比,青石棉诱导的 *Asc* 敲除小鼠 MM 发病率降低(55% *vs* 80%),成瘤潜伏期延长(66.2 周 *vs* 61.6 周),炎性细胞因子释放减少。结论表明,炎症小体有助于石棉诱导的 MM 发展,但缺乏 *Acs* 并不足以预防石棉诱导的 MM。

Okazaki 等[15]研究了透闪石和直闪石石棉的细胞毒性,建立了 MM 大鼠模型。他们将 1 mg 透闪石注射到 6 周龄的 Fischer344 杂交大鼠体内,4 周后发

现腹膜呈弥漫性增厚,而直闪石仅在腹膜表面引起了局部的纤维化和肉芽肿。这表明透闪石比直闪石更具致癌性。Luo 等[16]评估了青石棉和温石棉对 *BRCA*1 种系突变个体 MM 发展的影响,建立了 *BRCA*1 突变大鼠模型。他们将青石棉或温石棉注射到 19 只 Sprague-Dawley 背景的 $Brca1^{L63X/+}$ 突变大鼠体内,在第 5、6、7 周分别以 3、3、4 mg 剂量给药,随访 110 周。结果显示,$Brca1^{L63X/+}$ 突变大鼠和野生型大鼠的 MM 发病率无显著差异(70.2% vs 72.9%),但温石棉诱导的雄性 $Brca1^{L63X/+}$ 突变大鼠的中位生存时间显著短于野生型大鼠(494 d *vs* 571 d)。这可能是温石棉快速溶解过程中释放了更多活性铁,导致有毒羟基自由基形成[17]。

Fisher 等[18]研究了运动对延缓石棉相关疾病发展的潜力,建立了转基因小鼠模型。他们将青石棉注入 29 只 6~20 周 C57BL/6 背景的 MexTAg 转基因小鼠体内,单次剂量为 3 mg,每 4 周注射 1 次,持续 8 周。结果显示,这些转基因小鼠的成瘤潜伏期约 43 周,中位生存时间为 45.3 周。

小鼠和大鼠是构建诱发性 MM 疾病模型的常用实验动物。小鼠在出生后平均 6 周龄进入青春期,8~12 周龄达到成年阶段[19]。因此,实验研究通常选择 6~8 周龄的小鼠。与其他动物相比,小鼠的基因组和人类基因组非常相似,是研究人类肿瘤疾病的理想动物模型[20]。此外,小鼠体型小,繁殖周期短,饲养方便。然而,MM 小鼠模型的研究中也存在问题。一项对 FVB 背景的 *Bap*1 突变小鼠无干预监测 31 个月的研究[21]发现,与 43 只野生型小鼠相比,93 只 *Bap*1 突变小鼠中的肿瘤自发率显著增加(58% *vs* 9%)。这种自发性肿瘤高倾向性可能影响石棉诱发率的准确性。此外,C57 背景的小鼠诱发率较低(≤10%)。需要进一步完善小鼠模型[22-24]。相比之下,大鼠体型较大,操作更为方便,适合外科手术、组织或血液样本采集[25]。除了常规品系的小鼠和大鼠之外,也有研究采用 MexTAg 转基因小鼠进行 MM 造模。MexTAg 转基因小鼠不会发生自发性 MM,且其他肿瘤发生率低。同时,转基因的靶向表达导致石棉诱导的转基因小鼠 MM 发病率更高,疾病进展速度更快,相对于野生型小鼠 20%~30%的发病率,MexTAg 转基因小鼠 MM 发病率可达 100%,发病时间从 50~100 周提前到 20~40 周[26]。此外,性别差异也会影响模型构建。有研究显示,雄性鼠类在石棉纤维等诱导剂的暴露条件下,疾病进展会显著加快[27]。

2.2 碳纳米管诱发的 MM 动物模型

碳纳米管(carbon nanotubes,CNT)是由石墨烯片层卷曲形成的圆柱体结构,根据石墨烯片层数量,分为单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes,SWCNT)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes,MWCNT)。MWCNT 可进一步分为直线型和缠结型。由于 CNT 的纤维状尺寸和生物持久性类似于石棉,其对人体健康具有潜在危害。

为了验证 MWCNT 是否具有类似石棉的致癌潜力,2014 年 Rittinghausen 等[28]对 400 只雄性 Wistar 大鼠进行了测试,分为高剂量(5×10^9 WHO fibers)组和低剂量(1×10^9 WHO fibers)组,并与 0.1×10^9 WHO fibers 铁石棉诱导的大鼠进行 2 年对比观察。结果显示,MWCNT 诱导的大鼠 MM 发病率为 40%~98%,其组织学特征和免疫组化标记物与铁石棉诱发 MM 的结果一致,证明 MWCNT 具有与石棉类似的致癌性。然而,由于该研究采用腹腔注射方式,缺乏吸入暴露 MWCNT 的数据,因此对人类 MM 风险评估并不适用。为了克服腹腔注射的局限,Suzui 等[29]采用经气管肺内喷雾(trans-tracheal intrapulmonary spraying,TIPS)的方式,将 MWCNT 吸入 38 只 10 周龄 Fischer344 雄性大鼠体内,单次剂量 0.125 mg,每周 4 次,持续 2 周,随访 109 周。结果显示,大部分 MWCNT 停留在大鼠肺泡并诱发了肺肿瘤(37%),而 MM 发病率较低(16%)且局限于心包胸膜。其他研究也发现 MWCNT 诱导的大鼠 MM 好发于纵隔附近[30]。可能与纵隔尾部的心后胸膜褶皱(retrocardiac pleural folds,RPFs)是致癌颗粒主要的淋巴引流部位有关[31]。

除了对 MWCNT 与石棉的致癌潜力对比评估外,近年来也有研究关注 MWCNT 不同理化性质亚型的致癌性。Sakamoto 等[32]比较了 7 种 MWCNT 的致癌性,将 MWCNT 注入 92 只 10 周龄雄性 Fischer344 大鼠体内,单次剂量 1 mg/kg,观察 52 周。结果显示,长且厚的直线型 MWCNT 诱导的大鼠 MM 发病率远高于短且薄的缠结型 MWCNT(100% *vs* 5%)。Sato 等[33]比较了气相生长碳纤维(vapor grown carbon fibers,VGCF)VGCF™-H 和 MWCNT 的致癌性,将它们通过 TIPS 吸入 189 只 10 周龄 Fischer344 大鼠体内,以 0、0.016、0.08 和 0.4 mg/kg 的单次剂量,每周 1 次,持续 8 周,随访 2 年。结果显示,MWCNT 组的 MM 发病率远高于

VGCF™-H 组(57% *vs* 2%)。MWCNT 诱发的 MM 小鼠模型也有报道。Chernova 等[34]采用经胸膜腔原位诱导的方式,在 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠中成功诱导 MM(10%~25%)。与暴露于石棉的人类 MM 发病率(15%~37%)较为一致[35]。

MWCNT 诱发的 MM 动物模型研究多以大鼠为研究对象。Wistar 大鼠的肿瘤自发率为 0%~4%,Fischer344 大鼠的自发性 MM 主要局限于睾丸鞘膜且较为罕见[36]。大鼠模型的 MM 低自发率可以尽可能排除对诱导结果的干扰。有研究报道,MWCNT 诱导的 MM 大鼠模型最快在 24 周便可成功构建,42 周时 MM 发病率高达 83%。这与石棉诱导的 MM 基因工程小鼠模型发病率类似[37]。

目前 MWCNT 的诱导方式尚无统一标准。腹腔注射诱导的 MM 模型药物耐受性较强,可以观察到 MM 所有的形态学特征,因此是最常用的诱导方式[38]。其优点是制作方法简单,实验条件及因素容易控制,能够在短时间内根据研究需要复制实验所需模型。尽管腹膜 MM 仅占人类 MM 疾病的 10%,但在基因组谱和肿瘤发生机制方面与胸膜 MM 具有一定程度的相似性[39]。缺点是腹腔注射不同于真实的人体暴露,忽略了肺泡内巨噬细胞对致癌纤维的清除,可能遗漏其他相关病理。

除了腹腔注射外,胸腔注射和气管吸入等诱导方式各有优势。胸腔注射可以直接作用于胸膜间皮细胞,大大缩短了诱发时间。但是这种方法需要精确地将物质注入胸腔内,因此对操作者的技术要求较高。气管吸入更类似于人类的暴露途径,适用于人类 MM 的风险评估。但气道吸入的诱导物必须经历由肺转移至胸膜处易位积累这一间接过程,导致其诱发的肺肿瘤比 MM 更常见[40]。气道吸入需要特定的安全设备,其实用性受到限制。此外,大鼠鼻腔中的过滤作用会将较小或较短的纤维颗粒物沉积在气道之外。TIPS 作为一种改进的气道吸入方式更具应用前景,它绕过上呼吸道将纤维直接输送至肺部。气管吸入适合探究空气中纤维的潜在致癌性,而 TIPS 更适用于研究致癌纤维暴露后的体内生物反应。

2.3 蔗糖铁诱发的 MM 动物模型

铁作为血红蛋白的组成部分,是哺乳动物体内含量最多且必需的重金属。然而,过量的铁与 MM 的致癌作用有关。2015 年,Minami 等[41]基于既往文献经验成功建立了铁诱导 MM 大鼠模型。他们将 5 mg/kg 蔗糖铁和 83.5 mg/kg 次氮基三乙酸(nitrilotriacetic acid,NTA)通过腹腔注入 10 只雄性 Wistar 大鼠体内,每周 5 次,持续 12 周,并随访 2 年。结果显示,蔗糖铁诱发的大鼠 MM 发病率为 50%,主要发生在腹膜和睾丸鞘膜处。NTA 作为铁螯合剂,可以促进芬顿反应,显著缩短 MM 的致癌时间[27]。

铁诱导 MM 大鼠模型为 MM 研究提供了新的视角,但在过去十年中,仅有这一项研究采用蔗糖铁作为诱导物,因此,未来的相关研究需要进一步开发和评估这一模型。尽管 MM 的发生与铁超载具有相关性,但采用蔗糖铁诱导 MM 大鼠模型得出的研究结论,仍建议在石棉诱导 MM 模型上进一步验证。

2.4 呋喃诱发的 MM 动物模型

呋喃是一种已知的肝毒物,通过口服途径接触后对啮齿动物具有毒性作用[42]。2017 年,Von Tungeln 等[43]开展了一项研究,他们将呋喃以 2 mg/kg 的单次剂量通过灌胃方式给予 50 只 7 周龄雄性 Fischer344 大鼠,每周 5 次,持续 12 周,并随访 2 年。结果显示,与空白对照组相比,呋喃处理组的大鼠 MM 发病率增加(12% *vs* 4%),主要发病部位集中在睾丸及附睾。此外,呋喃还诱发了胆管癌,单核细胞白血病以及胆管纤维化等非肿瘤性肝病变。

该研究结果表明,呋喃与睾丸及附睾 MM 的发病具有显著相关性,但其具体发病机制尚不清楚。值得注意的是,呋喃还诱发了多种其他疾病,这可能限制了其作为 MM 动物模型的标准化应用。此外,通过灌胃方式诱导 MM 并非常规方法,MM 和消化道暴露的直接联系不明确,其诱发效果难以预测和评估。尽管呋喃在诱发 MM 方面表现出一定的潜力,但其多种非特异性毒性效应以及不常规的诱导方式使其在 MM 动物模型构建中的应用存在局限性。未来的相关研究可以探讨呋喃诱导 MM 的具体机制,并评估其在不同实验条件下的适用性,以优化其在 MM 动物模型中的应用。

3 移植性 MM 动物模型

3.1 细胞系移植模型

细胞系是从人或动物的原代细胞中建立的,可以在体外的可控条件下反复繁殖。根据细胞系的来源,移植性动物模型可分为鼠源细胞系同种移植和人源细胞系异种移植。

AB1 是来自 BALB/c 小鼠的 MM 细胞系,其在拷贝数变异方面与人类 MM 具有显著的相似性,而

CDKN2A 基因缺失这一人 MM 的典型改变在小鼠同源区中也同样缺失,因此,AB1 可被视为人类上皮样 MM 的模型[44]。Mezzapelle 等[45]的研究显示,经腹腔移植 AB1 的 BALB/c 小鼠在 2~3 周内便能通过超声检测出肿瘤肿块。Digifico 等[46]则采用经胸腔内植入的方法,使用表达荧光素酶的细胞以精确量化体内肿瘤负荷,在细胞系移植后第 7 天便能进行干预研究,组织学检查证实,MM 沿胸膜生长并扩散至肺部浅表区域,但在胸腔外未发现肿块。

MSTO-211 H 是常用的人源性细胞系之一,主要用于药物疗效的评价[47]。研究发现,13 种 MM 细胞系中仅有 3 种能在小鼠体内形成肿瘤,其中 MSTO-211 H 的成瘤效果最佳[48]。Lui 等[49]利用 MSTO-211 H 建立的小鼠模型测试免疫治疗的疗效,体内成像显示胸腔注入后第 2 天便检测到异种移植物,第 3 天便进行了疗效评价。Schelch 等[50]对 MSTO-211 H 移植小鼠模型的肿瘤负荷进行量化,当体积达到 250 mm^3 时才进行干预研究。

稳定的 MM 细胞系衍生的移植物具有高通量数据和几乎无限的生长潜力,操作简单且易于维护,被广泛用作临床前模型。目前,cellosaurus 细胞库已收录了 541 种 MM 细胞系的信息,然而,MM 细胞系作为移植物也存在一些不足之处。同种移植模型所需的鼠源 MM 细胞系大多是经腹膜注射石棉诱导成功后提取,市售的鼠源 MM 细胞系难以获取,而自主建立诱发性 MM 模型所需时间周期较长,可能影响后续实验的开展。异种移植模型为了避免宿主的免疫排斥反应,通常需要使用免疫缺陷小鼠作为载体。这使得它们无法提供人体内复杂的肿瘤-免疫相互作用。大多数移植性 MM 模型是将细胞系经皮下注入动物体内,虽然可轻松观察肿瘤生长和测量治疗反应,但肿瘤在解剖学上无关部位的快速发展可能阻碍正常的基质发育和免疫细胞入侵[51]。相比之下,经胸膜或腹膜注入更符合人类肿瘤的解剖学发展,但需要掌握高级技术及处理并发症,且需提供基于荧光的小动物成像等技术来克服无法直接观察和测量肿瘤生长的局限。相比于 MM 细胞系,原代 MM 细胞是更好的移植物选择,因为它们与原始肿瘤的分子和组织学特征更为相似[52]。然而,原代细胞生长潜力有限且分离过程中易污染,培养成本较高,这限制了其广泛使用。

3.2 患者来源的异种移植物(patient derived xenograft,PDX)模型

PDX 模型通过将患者的肿瘤组织直接植入免疫缺陷小鼠体内进行开发,能够保持患者的表观遗传异常,并与人类原发 MM 的侵袭性相关。Yang 等[53]在 4 只裸鼠体内根据不同的接种瘤细胞剂量分别建立早、晚期 MPM 动物模型。低剂量(100 μL)癌细胞组在接种后第 14 天解剖,体内可见灰白质韧的癌结节散布于脾、肾、肠系膜等表面,高剂量(200 μL)癌细胞组在接种后第 69 天解剖,体内可见腹腔转移瘤融合成团,质硬,脏器广泛受累,全程小肠和结肠系膜瘤化,并见新生血管和血性腹腔积液。

PDX 模型的构建主要依赖患者的手术标本,但由于 MM 病例罕见,样本较难获取。Chen 等[54]开发了一种新的建模技术,通过 CT 扫描初筛胸膜增厚的患者,进行超声引导胸膜活检,经病理学分析确诊后再行造模,1 年成功获取了 5 例 MM 样本并构建出 2 例 PDX 模型(成功率 40%)。

PDX 模型不仅能更好地模拟临床肿瘤样本,还适用于生物标志物检测和药物筛选。Offin 等[55]从手术切除样本、活检和胸腔积液等不同组织来源建立 PDX 模型,在 75 次总尝试后,造模的成功率为 29%。该模型与配对肿瘤样本在关键标志物(BAP1、WT1、间皮素、PD-L1)和基因组改变的表达上高度一致,其中 BAP1 表达一致性为 100%。Potter 等[56]的研究也证实,PDX 模型与原始 MM 患者样本具有相似的化学脆弱性,79% 的 PDX 模型可重现 MM 患者样本的药物敏感性,肿瘤生长达到研究的预定体积(150~250 mm^3)均≤21 d。

PDX 模型高度接近患者肿瘤的原发特征,避免了细胞系体外克隆扩增导致的分子信息不一致,是 MM 生物学和治疗研究中特别有价值的工具。然而,构建 PDX 模型需要保持新鲜的肿瘤组织标本,且由于 MM 病例罕见,样本难以获取可能是其研究的最大阻碍。其次,肿瘤建立在免疫抑制的小鼠体内,可能无法对刺激适应性免疫系统的新疗法进行评估。另外,免疫缺陷小鼠的价格昂贵,且肿瘤形成所需的时间较长。

4 基因工程 MM 动物模型

基因工程动物模型通过基因编辑技术改变动物的特定基因片段,实现基因敲除、引入突变或外源基因,从而获得基因编辑动物。

在 MM 研究中,*BAP1*、*NF2* 和 *CDKN2A* 基因的突变或缺失是最常见的遗传病变[57]。Kukuyan 等[58]利

用锌指核酸酶技术对小鼠的 *Bap*1、*Nf*2 和 *Cdkn*2*a* 基因进行条件敲除。研究发现,单独敲除这 3 种基因很少引起 MM,但 *Bap*1 的失活与 *Nf*2 或 *Cdkn*2*a* 的缺失产生协同作用,在约 20%的双基因敲除小鼠中驱动 MM 的发展,在 3 种基因敲除小鼠中 MM 发病率高达 85%,且发病迅速,成瘤潜伏期仅为 12 周。

PTEN 和 *TP*53 基因的失活可以驱动 MM 的快速进展[59]。Marqués 等[60]利用同源重组法建立了 *Pten* 和 *Trp*53 缺失的小鼠模型,导致了肉瘤样型 MM 发展(15/26,57%),其中 14 只 MM 小鼠出现肉眼可见的转移(腹膜内、脾、肾、肝、胃肠道),中位生存期仅为 10.9 周。

*HMGB*1 在驱动 MM 生长中也起着关键作用。Suarez 等[61]的研究发现,与野生型小鼠相比,*Hmgb*1 敲除小鼠的 MM 发病率降低(64% *vs* 97%),中位生存时间延长(450 d *vs* 308 d),并且体内的 MM 更小,大部分没有浸润腹部器官,仅在其表面生长。

基因工程小鼠可以无需诱导或移植便可自发产生 MM。与石棉诱导的小鼠模型相比,基因工程小鼠模型的 MM 发病率更高,中位生存期更短[62]。虽然基因工程小鼠作为一种临床前模型可以更精确地模拟疾病的遗传背景和分子机制,但其开发时间较长,且由于只有较少的基因被修饰,具有比 PDX 模型更少的异质性。此外,基因工程 MM 小鼠模型中最常见的是肉瘤样亚型,这与人类 MM 最常见的上皮样亚型不同[63]。

5 展望

MM 是一种与石棉暴露密切相关的罕见而致命的癌症,主要影响体腔内的间皮细胞。由于其发病机制复杂且诊治困难,建立有效的动物模型对于深入研究该疾病的生物学特性和探索新的治疗策略至关重要。

MM 相关动物模型主要包括自发性、诱发性、移植性和基因工程 4 种类型。随着全球范围内石棉禁令的实施,未来人类 MM 自发病例的比例可能增加,因此自发性动物模型具有一定的潜在研究价值。诱发性 MM 动物模型在长期研究中得到了进一步改进,例如,将石棉暴露与特定基因改造结合,开发新的诱导物如 MWCNT,以及替代气管吸入的方法如 TIPS。构建诱发性 MM 模型的具体方法总结见表 1。在移植性MM动物模型中,PDX模型能更好地

表 1 恶性间皮瘤诱发性动物模型总结

Table 1 Summary of induced animal models of malignant mesothelioma

诱导物 Inducer	动物种类 Animal species	性别 Gender	周龄 Week age	方法 Method	频率 Frequency	单次剂量 Dosage	样本数 Sample statistics	诱发率 Induced rate
青石棉 Crocidolite	FVB mice	♂	8~10	腹腔注入[12] Intraperitoneal injection	3 周 1 次,持续 12 周 Once 3 weeks, for 12 weeks	0.8 mg	25	32%
	FVB *Bap*$^{+/-}$ mice						25	73%
	C57BL/6 mice	/	10~12	腹腔注入[13] Intraperitoneal injection	1 周 1 次,持续 10 周 Once a week, for 10 weeks	0.05 mg	50	10%
	C57BL/6 *Bap*$^{+/-}$ mice					0.5 mg	50	28%
						0.05 mg	25	36%
						0.5 mg	25	60%
	C57BL/6J mice	♂	6~8	腹腔注入[14] Intraperitoneal injection	3 周 1 次,持续 24 周 Once 3 weeks, for 24 weeks	0.4 mg	26	80%
	C57BL/6J *Acs*$^{+/-}$ mice						29	65%
	C57BL/6J *Acs*$^{-/-}$ mice						29	55%
	C57BL/6 MexTAg mice	♂+♀	6~20	腹腔注入[18] Intraperitoneal injection	4 周 1 次,持续 8 周 Once 4 weeks, for 8 weeks	3 mg	29	/
	Sprague-Dawley rats	♂+♀	/	腹腔注入[16] Intraperitoneal injection	1 周 1 次,持续 3 周 Once a week, for 3 weeks	3~4 mg	16	75%
	Sprague-Dawley *Brca*1$^{L63X/+}$ rats						19	53%
透闪石 Tremolite	F344xBN F1 rats	♂+♀	6	腹腔注入[15] Intraperitoneal injection	单次 Single	1 mg	14	57%
温石棉 Chrysotile	Sprague-Dawley rats	♂+♀	/	腹腔注入[16] Intraperitoneal injection	1 周 1 次,持续 3 周 Once a week, for 3 weeks	3~4 mg	21	71%
	Sprague-Dawley *Brca*1$^{L63X/+}$ rats						18	89%
铁石棉 Amosite	Wistar rats	♂	/	腹腔注入[28] Intraperitoneal injection	单次 Single	10^8 WHO fibers	50	66%
多壁碳纳米管 Multiwalled carbon nanotubes	Wistar rats	♂	/	腹腔注入[28] Intraperitoneal injection	单次 Single	1x10^9 WHO fibers	200	79%
						5x10^9 WHO fibers	200	86%
	Fischer344 rats	♂	10	气管注入[29] Intratracheal instillation	1 周 4 次,持续 2 周 Four times a week, for 2 weeks	0.125 mg	38	16%

续表1

诱导物 Inducer	动物种类 Animal species	性别 Gender	周龄 Week age	方法 Method	频率 Frequency	单次剂量 Dosage	样本数 Sample statistics	诱发率 Induced rate
	Fischer334 rats	♂	10	腹腔注入[32] Intraperitoneal injection	单次 Single	1 mg/kg	51	100%
							41	5%
	Fischer344 rats	♂+♀	10	气管注入[33] Intratracheal instillation	1 周 1 次,持续 8 周 Once a weeks,for 8 weeks	0.016 mg/kg	60	5%
						0.08 mg/kg	60	32%
						0.4 mg/kg	69	86%
	C57BL/6 mice	♀	8	胸腔注入[34] Intrapleural injection	单次 Single	1 mg	4	25%
						0.5 mg	5	20%
						0.2 mg	12	8%
蔗糖铁 Ferric saccharate	Wistar rats	♂	/	腹腔注入[41] Intraperitoneal injection	1 周 5 次,连续 12 周 Five time a weeks,for 12 weeks	5 mg/kg	10	50%
呋喃 Furan	Fischer344 rats	♂	7	灌胃[43] Gavage	1 周 5 次,连续 12 周 Five time a weeks,for 104 weeks	2 mg/kg	50	12%

保留肿瘤异质性和模拟治疗反应,逐渐取代了传统的细胞系移植模型,广泛应用于精准医疗和个体化治疗。随着基因编辑技术的进步,基因工程动物能够精确模拟特定基因突变,加快模型构建,为研究 MM 分子靶点提供了强有力的工具。目前,基因工程动物模型常用于研究多个基因在 MM 中的协同作用或相互关系。

尽管基于 MM 动物模型进行了许多临床试验,但试验成果很少从模型研究转化为临床应用。当前的动物模型在模拟人类 MM 发病过程、评估疗效等方面仍存在一些局限性。一方面,常用的石棉或碳纳米管等纤维诱发的动物模型虽能模拟人类 MM 的发生,但不能完全再现疾病在人体的所有特征,且诱导模型发病周期长、个体差异大,无法精确控制病变部位。移植模型中,肿瘤的快速生长会阻碍正常基质发育和免疫细胞侵袭,对肿瘤微环境造成影响。基因工程模型虽然可以针对特定分子机制进行研究,但忽视了环境因素的作用。另一方面,动物与人类在解剖结构、生理功能、肿瘤微环境等方面存在差异,模型中观察到的药物疗效往往难以直接推广到临床应用。

随着 3D 细胞模型技术的球状体和类器官问世,动物模型作为临床前模型工具面临着一定的挑战,但 MM 动物模型在未来的研究中仍有很大发展空间。首先,针对动物模型的多样化和精准化进一步开发,如模拟 MM 不同亚型的模型,结合单细胞测序技术构建更为精准的基因工程模型等。其次,随着免疫治疗在肿瘤治疗中的崛起,开发能够模拟 MM 免疫微环境的动物模型将有助于研究免疫治疗的机制,评估新型治疗措施的疗效。最后,应加强基础研究和临床应用的结合,未来研究可以基于大数据和人工智能技术,整合分析动物模型和临床病例的数据,提高研究效率和结论准确性的同时,也有助于基础研究的成果转化和推广。

综上所述,动物模型为 MM 的研究和治疗提供强有力的支持。不同动物模型都有其自身的优势和局限性,应根据研究目的合理选择适用的动物模型。

参考文献:

[1] BOU-SAMRA P, CHANG A, AZARI F, et al. Epidemiological, therapeutic, and survival trends in malignant pleural mesothelioma: a review of the National Cancer Database [J]. Cancer Med, 2023, 12(11): 12208-12220.

[2] 赫捷, 魏文强. 2019 中国肿瘤登记年报 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020.
HE J, WEI W Q. 2019 annual report of china tumor registry [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2020.

[3] BERTIN B, ZUGMAN M, SCHVARTSMAN G. The current treatment landscape of malignant pleural mesothelioma and future directions [J]. Cancers, 2023, 15(24): 5808.

[4] UZAL F A, PLATTNER B L, HOSTETTER J M. Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals [M]. 6th ed. Philadelphia: Saunders Ltd, 2015.

[5] ZEIRA O, GHEZZI E, PETTINARI L, et al. Case report: microfragmented adipose tissue drug delivery in canine mesothelioma: a case report on safety, feasibility, and clinical findings [J]. Front Vet Sci, 2020, 7: 585427.

[6] MOBERG H L, GRAMER I, SCHOFIELD I, et al. Clinical presentation, treatment and outcome of canine malignant mesothelioma: a retrospective study of 34 cases [J]. Vet Comp Oncol, 2022, 20(1): 304-312.

[7] LAJOINIE M, CHAVALLE T, FLOCH F, et al. Outcome of dogs treated with chemotherapy for mesothelioma: a retrospective clinical study on 40 cases and a literature review [J]. Vet Comp Oncol, 2022, 20(4): 825-835.

[8] TOKARZ D A, GRUEBBEL M M, WILLSON G A, et al.

Spontaneous primary pleural mesothelioma in Fischer 344 (F344) and other rat strains: a retrospective review [J]. Toxicol Pathol, 2022, 50(2): 167-175.

[9] PRICE B. Projection of future numbers of mesothelioma cases in the US and the increasing prevalence of background cases: an update based on SEER data for 1975 through 2018 [J]. Crit Rev Toxicol, 2022, 52(4): 317-324.

[10] CARBONE M, YANG H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(3): 598-604.

[11] VISONÀ S D, BERTOGLIO B, FAVARON C, et al. A postmortem case control study of asbestos burden in lungs of malignant mesothelioma cases [J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 875.

[12] XU J, KADARIYA Y, CHEUNG M, et al. Germline mutation of Bap1 accelerates development of asbestos-induced malignant mesothelioma [J]. Cancer Res, 2014, 74(16): 4388-4397.

[13] NAPOLITANO A, PELLEGRINI L, DEY A, et al. Minimal asbestos exposure in germline BAP1 heterozygous mice is associated with deregulated inflammatory response and increased risk of mesothelioma [J]. Oncogene, 2016, 35(15): 1996-2002.

[14] KADARIYA Y, MENGES C W, TALARCHEK J, et al. Inflammation-related IL1β/IL1R signaling promotes the development of asbestos-induced malignant mesothelioma [J]. Cancer Prev Res, 2016, 9(5): 406-414.

[15] OKAZAKI Y, MISAWA N, AKATSUKA S, et al. Frequent homozygous deletion of Cdkn2a/2b in tremolite-induced malignant mesothelioma in rats [J]. Cancer Sci, 2020, 111(4): 1180-1192.

[16] LUO Y, AKATSUKA S, MOTOOKA Y, et al. BRCA1 haploinsufficiency impairs iron metabolism to promote chrysotile-induced mesothelioma via ferroptosis resistance [J]. Cancer Sci, 2023, 114(4): 1423-1436.

[17] GUALTIERI A F, LUSVARDI G, ZOBOLI A, et al. Biodurability and release of metals during the dissolution of chrysotile, crocidolite and fibrous erionite [J]. Environ Res, 2019, 171: 550-557.

[18] FISHER S A, PEDDLE-MCINTYRE C J, BURTON K, et al. Voluntary exercise in mesothelioma: effects on tumour growth and treatment response in a murine model [J]. BMC Res Notes, 2020, 13(1): 435.

[19] 陈玥, 苏丹, 贵文娟, 等. 实验动物与人类年龄相关性研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 116-122.
CHEN Y, SU D, GUI W J, et al. Advances in research on the correlation of ages between laboratory animals and humans [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 116-122.

[20] 王硕, 苏杭, 袁经权, 等. 实验小鼠在癌症研究中的应用及其进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(9): 63-67.
WANG S, SU H, YUAN J Q, et al. Application and recent advances of laboratory mouse in cancer research [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(9): 63-67.

[21] KADARIYA Y, CHEUNG M, XU J, et al. Bap1 is a bona fide tumor suppressor: genetic evidence from mouse models carrying heterozygous germline Bap1 mutations [J]. Cancer Res, 2016, 76(9): 2836-2844.

[22] BLUM W, HENZI T, CHÂTEL-SOULET H E, et al. Absence of calretinin protein expression in malignant mesotheliomas from asbestos-exposed $NF2^{+/-}$ mice and mouse mesothelioma cell lines from various mouse strains [J]. Biomark Res, 2018, 6: 19.

[23] HUAUX F, D'URSEL DE BOUSIES V, PARENT M A, et al. Mesothelioma response to carbon nanotubes is associated with an early and selective accumulation of immunosuppressive monocytic cells [J]. Part Fibre Toxicol, 2016, 13(1): 46.

[24] REHRAUER H, WU L, BLUM W, et al. How asbestos drives the tissue towards tumors: YAP activation, macrophage and mesothelial precursor recruitment, RNA editing, and somatic mutations [J]. Oncogene, 2018, 37(20): 2645-2659.

[25] 张乐颖, 徐威, 左琴. 浅谈国外实验大鼠资源的开发与利用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1512-1518.
ZHANG L Y, XU W, ZUO Q. Brief review of the cultivation and utilization of rat resources [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1512-1518.

[26] ROBINSON C, WALSH A, LARMA I, et al. MexTAg mice exposed to asbestos develop cancer that faithfully replicates key features of the pathogenesis of human mesothelioma [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(1): 151-161.

[27] JIANG L, AKATSUKA S, NAGAI H, et al. Iron overload signature in chrysotile-induced malignant mesothelioma [J]. J Pathol, 2012, 228(3): 366-377.

[28] RITTINGHAUSEN S, HACKBARTH A, CREUTZENBERG O, et al. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats [J]. Part Fibre Toxicol, 2014, 11: 59.

[29] SUZUI M, FUTAKUCHI M, FUKAMACHI K, et al. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors [J]. Cancer Sci, 2016, 107(7): 924-935.

[30] HOJO M, MAENO A, SAKAMOTO Y, et al. Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats [J]. Part Fibre Toxicol, 2022, 19(1): 38.

[31] PEREIRA A S, GRANDE N R. Particle clearance from the canine pleural space into thoracic lymph nodes: an experimental study [J]. Lymphology, 1992, 25(3): 120-128.

[32] SAKAMOTO Y, HOJO M, KOSUGI Y, et al. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats [J]. J Toxicol Sci, 2018, 43(10): 587-600.

[33] SATO K, FUKUI H, HAGIWARA Y, et al. Difference in carcinogenicities of two different vapor grown carbon fibers with different physicochemical characteristics induced by intratracheal instillation in rats [J]. Part Fibre Toxicol, 2023, 20(1): 37.

[34] CHERNOVA T, MURPHY F A, GALAVOTTI S, et al. Long-fiber carbon nanotubes replicate asbestos-induced mesothelioma with disruption of the tumor suppressor gene Cdkn2a (Ink4a/arf)

[J]. Curr Biol, 2017, 27(21): 3302-3314.
[35] BERRY G, REID A, ABOAGYE-SARFO P, et al. Malignant mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom (Western Australia) after more than 50 years follow-up [J]. Br J Cancer, 2012, 106(5): 1016-1020.
[36] BLACKSHEAR P E, PANDIRI A R, TON T V, et al. Spontaneous mesotheliomas in F344/N rats are characterized by dysregulation of cellular growth and immune function pathways [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(5): 863-876.
[37] HOJO M, YAMAMOTO Y, SAKAMOTO Y, et al. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins [J]. Cancer Sci, 2021, 112(6): 2185-2198.
[38] JOHNSON B W, TAKAHASHI K, CHENG Y Y. Preclinical models and resources to facilitate basic science research on malignant mesothelioma-A review [J]. Front Oncol, 2021, 11: 748444.
[39] HILTBRUNNER S, FLEISCHMANN Z, SOKOL E S, et al. Genomic landscape of pleural and peritoneal mesothelioma tumours [J]. Br J Cancer, 2022, 127(11): 1997-2005.
[40] XU J, ALEXANDER D B, FUTAKUCHI M, et al. Size-and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes [J]. Cancer Sci, 2014, 105(7): 763-769.
[41] MINAMI D, TAKIGAWA N, KATO Y, et al. Downregulation of TBXAS1 in an iron-induced malignant mesothelioma model [J]. Cancer Sci, 2015, 106(10): 1296-1302.
[42] BATOOL Z, XU D, ZHANG X, et al. A review on furan: Formation, analysis, occurrence, carcinogenicity, genotoxicity and reduction methods [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(3): 395-406.
[43] VON TUNGELN L S, WALKER N J, OLSON G R, et al. Low dose assessment of the carcinogenicity of furan in male F344/N Nctr rats in a 2-year gavage study [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 99: 170-181.
[44] WAHLBUHL E, LIEHR T, RINCIC M, et al. Cytogenomic characterization of three murine malignant mesothelioma tumor cell lines [J]. Mol Cytogenet, 2020, 13: 43.
[45] MEZZAPELLE R, RRAPAJ E, GATTI E, et al. Human malignant mesothelioma is recapitulated in immunocompetent BALB/c mice injected with murine AB cells [J]. Sci Rep, 2016, 6: 22850.
[46] DIGIFICO E, ERRENI M, MANNARINO L, et al. Important functional role of the protein osteopontin in the progression of malignant pleural mesothelioma [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1116430.
[47] DELL'ANNO I, MELANI A, MARTIN S A, et al. A drug screening revealed novel potential agents against malignant pleural mesothelioma [J]. Cancers, 2022, 14(10): 2527.
[48] CALVET L, DOS-SANTOS O, SPANAKIS E, et al. YAP1 is essential for malignant mesothelioma tumor maintenance [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 639.
[49] LUI K S, YE Z, CHAN H C, et al. Anti-PD1 does not improve pyroptosis induced by γδ T cells but promotes tumor regression in a pleural mesothelioma mouse model [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1282710.
[50] SCHELCH K, EMMINGER D, ZITTA B, et al. Targeting YB-1 via entinostat enhances cisplatin sensitivity of pleural mesothelioma *in vitro* and *in vivo* [J]. Cancer Lett, 2023, 574: 216395.
[51] HESDORFFER M, BATES-PAPPAS G E. Caring for patients with mesothelioma: principles and guidelines [M]. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2019.
[52] OEY H, DANIELS M, RELAN V, et al. Whole-genome sequencing of human malignant mesothelioma tumours and cell lines [J]. Carcinogenesis, 2019, 40(6): 724-734.
[53] YANG Z R, LIN Y L, ZHANG J, et al. Establishment and characterization of patient derived xenograft model of malignant peritoneal mesothelioma in nude mice [J]. Chin J Pathol, 2020, 49(2): 162-167.
[54] CHEN Z, YANG C, GUO Z, et al. A novel PDX modeling strategy and its application in metabolomics study for malignant pleural mesothelioma [J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1235.
[55] OFFIN M, SAUTER J L, TISCHFIELD S E, et al. Genomic and transcriptomic analysis of a diffuse pleural mesothelioma patient-derived xenograft library [J]. Genome Med, 2022, 14(1): 127.
[56] POTTER D S, DU R, BOHL S R, et al. Dynamic BH3 profiling identifies pro-apoptotic drug combinations for the treatment of malignant pleural mesothelioma [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2897.
[57] HMELJAK J, SANCHEZ-VEGA F, HOADLEY K A, et al. Integrative molecular characterization of malignant pleural mesothelioma [J]. Cancer Discov, 2018, 8(12): 1548-1565.
[58] KUKUYAN A M, SEMENTINO E, KADARIYA Y, et al. Inactivation of *Bap*1 cooperates with losses of *Nf*2 and *Cdkn*2*a* to drive the development of pleural malignant mesothelioma in conditional mouse models [J]. Cancer Res, 2019, 79(16): 4113-4123.
[59] SEMENTINO E, MENGES C W, KADARIYA Y, et al. Inactivation of Tp53 and Pten drives rapid development of pleural and peritoneal malignant mesotheliomas [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(11): 8952-8961.
[60] MARQUÉS M, TRANCHANT R, RISA-EBRÍ B, et al. Combined MEK and PI3K/p110β inhibition as a novel targeted therapy for malignant mesothelioma displaying sarcomatoid features [J]. Cancer Res, 2020, 80(4): 843-856.
[61] SUAREZ J S, NOVELLI F, GOTO K, et al. HMGB1 released by mesothelial cells drives the development of asbestos-induced mesothelioma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(39): e2307999120.
[62] SHAMSEDDIN M, OBACZ J, GARNETT M J, et al. Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma [J]. Thorax, 2021, 76(11): 1154-1162.
[63] JEAN D, JAURAND M C. Mesotheliomas in genetically engineered mice unravel mechanism of mesothelial carcinogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 2191.

〔收稿日期〕2024-03-07

李慧,董新刚,李伟峰. 调节性细胞死亡在血管性痴呆中的作用及中医药调控机制概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 146-156.
Li H, Dong XG, Li WF. Overview of traditional Chinese medicine's role in regulating the mechanism of regulatory cell death in vascular dementia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 146-156.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.017

调节性细胞死亡在血管性痴呆中的作用及中医药调控机制概述

李 慧[1],董新刚[2],李伟峰[1*]

(1.河南中医药大学康复医学院,郑州 450046;2.河南中医药大学第一附属医院,郑州 450046)

【摘要】 血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种由大脑损伤所引起的神经退行性疾病,其发病机制尚未完全明确。现有大量研究表明,凋亡、焦亡、自噬、铁死亡以及铜死亡等调节性细胞死亡(regulated all death,RCD)的发生机制与 VD 病理机制有关。因此,明确这些细胞死亡发生机制与 VD 病理机制之间的联系,阐述 RCD 在疾病发病机制中的作用,对于 VD 的防治具有重要意义。本文就 5 种 RCD 的发生机制在 VD 中的作用展开综述,并总结了近几年中药通过干预这几种 RCD 防治 VD 的研究进展,以期为进一步挖掘治疗 VD 的潜在靶点及中药新药的开发提供参考。

【关键词】 血管性痴呆;调节性细胞死亡;串扰机制;铁死亡;铜死亡;中药防治
【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0146-11

Overview of traditional Chinese medicine's role in regulating the mechanism of regulatory cell death in vascular dementia

LI Hui[1], DONG Xingang[2], LI Weifeng[1*]
(1. Rehabilitation Medcine College Hennian University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.
2. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 Vascular dementia (VD) is a neurodegenerative disease caused by brain injury. Research on the processes leading to its occurrence is lacking depth. In recent years, it has been proposed that regulatory cell death (RCD) mechanisms, including apoptosis, pyroptosis, autophagy, ferroptosis, and cuproptosis, are related to the pathological mechanisms of VD. Therefore, studies aiming to explain the links between the mechanisms of regulatory death and the pathology of VD would be beneficial to our understanding of VD. This article provides a review of the roles of five mechanisms of RCD in VD and summarizes the recent progress made in researching the treatment of VD with traditional Chinese medicine, providing a resource for the development of new traditional Chinese medicine drugs.

【Keywords】 vascular dementia; regulatory cell death; crosstalk; ferroptosis; cuproptosis; traditional Chinese medicine prevention and treatment
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]河南省科技发展计划(242102310514);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY1006);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY1028);河南省中医药科学研究专项课题重大专项(2022ZYZD05);第七批全国名老中医药专家学术经验继承工作项目(豫中医函〔2022〕3 号)。
[作者简介]李慧(2001—),女,硕士研究生,研究方向:中医脑病。E-mail:lihui08220012@163.com
[通信作者]李伟峰(1978—),男,副主任医师,博士,研究方向:中医脑病临床与实验研究。E-mail:1143001868@qq.com

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种与心、脑血管功能密切相关的神经退行性疾病[1]。各种危险因素导致的出血、缺血性脑损伤以及脑灌注不足[2],均可导致 VD。VD 作为第二大痴呆类型,近年来患病率呈上升趋势[3-4]。然而目前 VD 的发病机制尚不完全明确,还没有 VD 的标准治疗方法[5]。多项研究表明由脑灌注不足引起的神经细胞死亡、神经炎症异常等造成的皮质和海马中的神经元丢失或损伤是 VD 病理机制的关键因素[6-7],与 VD 的发生发展密切相关。调节性细胞死亡(regulated all death,RCD)[8]是受基因调控的细胞死亡形式,涵盖大量蛋白和相关信号通路的级联。RCD 涵盖的多个细胞死亡方式参与血管性痴呆的病理机制过程,包括凋亡、焦亡、自噬以及近几年提出的铁死亡和铜死亡。明确这些细胞死亡造成神经元损伤的相关靶点和信号通路与 VD 病理机制之间的联系,从而减轻神经元的损伤有望成为防治 VD 的重要手段。

中医将 VD 归为“痴呆”“呆病”等疾病。诸多医家认为痰浊、瘀血痹阻脑络,日久致肾精亏虚是本病的基本病机[9]。基于此病机,中医药近年来在防治 VD 的临床研究和药理研究中有显著成果,同时中医药具有“多靶点、多途径、多环节”来改善 VD 认知功能障碍和脑血管致病因素的优势[10]。但目前中医药治疗 VD 的内在靶点尚不完全明确。因此,本文就 RCD 的发生机制及其在 VD 中的作用机制、串扰联系展开综述,并总结了近几年中药单复方通过调控 RCD 相关作用靶点和信号通路防治 VD 的研究,以期为进一步挖掘治疗 VD 的潜在靶点及中药新药的开发提供参考。

1 血管性痴呆中调节性细胞死亡的作用

1.1 凋亡与 VD

细胞凋亡(apoptosis)是指神经细胞在多种因素的刺激作用下,激活凋亡相关的信号通路,活化相应的凋亡调节因子,导致神经细胞的死亡[11]。其可通过内、外源性和内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)等途径发生。

内源性细胞凋亡主要由氧化应激、DNA 损伤等刺激致使细胞稳态失衡引起,线粒体外膜通透性(mitochondrial outer membrane permeabilization,MOMP)是该途径的关键节点,由 B 淋巴细胞瘤-2(B cell-lymphoma,Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)等凋亡相关基因调控[12]。Bax 和 Bcl-2 以及其他促凋亡蛋白聚集、镶嵌在线粒体细胞膜上,MOMP 促使线粒体释放核酸内切酶(endonuclease G,ENDOG)、细胞色素 C(cytochrome C,Cyt C)等促炎因子。Cyt C 被释放到胞质后,凝聚凋亡酶激活因子-1(APAF-1)和半胱天冬酶 9 前体(pro-caspase 9),并与其形成复合体[13],同时切割激活 Caspace-9,活化的 Caspace-9 负责下游效应物半胱天冬酶 3/7(Caspase-3/7)的活化,进而导致细胞凋亡的发生。细胞膜上的死亡受体是诱发外源性细胞凋亡的关键因素,死亡受体在其配体水平下降到阈值以下时被激活,如肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor,TNFR)与相应配体结合后,进而其发生构象变化,允许细胞质衔接蛋白如 Fas 相关死亡域蛋白(Fas-associated death domain,FADD)介导 Caspase-8 前体活化,进而促使 Caspase-3 前体活化,诱导细胞死亡[14]。许多研究发现 VD 模型大鼠脑中的神经元凋亡存在于海马 CA1 区[15]。经基础研究发现,在 VD 大鼠模型中,Bcl-2/Bax 蛋白的比例明显下降,提示 Bcl-2/Bax 比例失衡造成的神经元损伤可能是 VD 发生的病理机制[16]。Caspase-3 是神经凋亡细胞重要的蛋白标志物。Wang 等[6]经研究证实,在 VD 大鼠模型的脑中都能检测到裂解的 caspase 蛋白。Guan 等[17]研究发现通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)信号通路可以显著降低 VD 模型大鼠海马区 Bcl-2/Bax 比例以及 Caspase-3 的含量,降低神经元损伤,改善学习记忆功能。这些研究证明两条细胞凋亡途径均参与了 VD 的发生发展。

ERS 介导的细胞凋亡通路,主要指的是在缺氧、应激、感染等各种危险因素的作用下,导致 ERS 中未折叠或折叠错误的蛋白质积累,并进一步激活了未折叠蛋白反应,造成内质网功能异常,从而诱导了神经细胞的死亡。Xu 等[18]研究发现在双侧颈总动脉阻断(BCCAO)大鼠 VD 模型中,发现 ERS 相关通路蛋白激酶 R 样内质网激酶/真核生物起始因子 2α/活化转录因子 4/增强子结合蛋白同源蛋白(PERK-eIF2α-ATF2-CHOP)轴的激活显著增强,同时也检测到另一种促细胞死亡途径,c-Jun 应激激活蛋白激酶(JNK-cJun)活性的增强。经研究证明 E_2 给药可以显著降低 Caspase-3/8/12 的活性,其可作为一种神经保护剂,通过抑制 ERS 诱导的神经细胞

凋亡,进而减轻 VD 的症状[18]。Guo 等[19]在氧葡萄糖剥脱再复养(OGD/R)细胞模型以及大脑中动脉闭塞和再灌注(MCAO/R)的大鼠模型中,检测到 ERS 启动同时激活 PERK 及其信号通路,导致了细胞内 Caspase-3、Caspase-12 和 Bax 水平增加以及 Bcl-2 水平降低,最终导致神经元的凋亡,证实了 PERK 信号通路诱导的细胞凋亡和 VD 的病理机制相关。同时已有研究表明,靶向药物可以通过激活 PI3K/AKT/Nrf2 信号通路抑制氧化损伤,从而减少神经元的凋亡,改善 VD 症状[20]。以上研究表明,抑制细胞凋亡能有效改善 VD,通过对神经细胞凋亡机制在 VD 中作用机制的研究,为靶向细胞凋亡治疗 VD 提供新思路。

1.2 自噬与 VD

细胞自噬是在神经元中主要作用是对功能异常的细胞器和蛋白质聚集体进行降解。其主要分为 3 个阶段:形成自噬体、自噬体融合以及和溶酶体形成自溶体、自溶体中底物的降解[21]。自噬相关蛋白如 Beclin-1、P62 和 LC 3 等是自噬重要的标志物。自噬、自噬相关基因及其调节机制广泛参与神经系统相关疾病多方面的生理及病理过程,包括神经元突触的可塑性、神经细胞的死亡、神经元的损伤与丢失等[22],其与 VD 的发生、发展密切相关。

正常的自噬对细胞有利[23],但过高或者过低的自噬活动都不利于细胞的存活。有研究显示,脑血流量(cerebral blood flow,CBF)失调是血管性疾病的常见特征,而慢性低灌注不足(chronic cerebral hypoperfusion,CCH)是 CBF 不足后的常见症状,被认为是 VD 的病理生理基础[24]。在慢性脑灌注不足的状态下,大量功能障碍的神经元和蛋白质积累,导致自噬的激活。随着缺血状态的持续,自噬的活性会加大,造成缺血性损伤,并导致神经元细胞的死亡[25],进而诱发 VD 的发生。研究表明,在双血管闭塞法建立的 VD 模型小鼠中,可以观察到细胞内自噬相关蛋白 Beclin-1、LC 3 II/I 表达较假手术组明显上调,而 P62 等蛋白的水平明显下降,在应用相关药物治疗后,可以显著观察到自噬相关蛋白水平的下降,减轻神经元损伤[26]。同时 Yang 等[27]研究证实雌激素能抑制自噬,同时起到减轻 VD 认知障碍和神经元损伤的作用。Xu 等[28]经研究证明通过增强神经保护作用,可以减轻因 CCH 导致的异常自噬造成的突触可塑性的损伤,从而改善 VD 患者的学习记忆能力。Zhao 等[29]通过实验表明激活假定激酶 1/E3 泛素连接酶(PINK 1/Parkin)信号通路,可以显著减轻 VD 模型大鼠海马 CA1 区的神经元自噬,改善 VD 模型大鼠的缺血性脑损伤。抑制自噬相关靶点可以通过减轻神经细胞损伤,改善神经元突触的可塑性来改善 VD 症状,因此靶向自噬为 VD 提供新的治疗方案。

1.3 焦亡与 VD

焦亡是一种伴有炎症发生的细胞调节性死亡形式。由各种危险因素,造成各种炎症体的形成,随后是炎症体与凋亡相关斑点样蛋白(ASC)的聚集结合,引起 Caspase-前体活化,再进一步去激活胞质中的白细胞介素(IL)-1β、IL-18 和消皮素 D(gasdermin D,GSDMD)。GSDMD-N(GSDMD 的活性形式)随后将剪切细胞膜,促使细胞的破裂伴有促炎因子的释放,诱导细胞死亡[30]。除经典焦亡途径外,还存在依赖 Caspase-4/5/11 的非经典焦亡途径。

在 VD 中,细胞焦亡会导致神经元的损伤、缺失和脑功能的损伤。其中由 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP 3)炎性小体介导的神经元焦亡已被证明参与各种神经系统疾病的发展[31-32],包括 VD、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)、脑缺血再灌注损伤等。已有研究表明,通过调控 NLRP 3 炎性小体信号通路可抑制下游焦亡相关炎性因子 Caspase-1、GSDMD-N 的表达,减轻炎症反应,改善 VD[33]。Zhang 等[34]通过体内和体外实验研究发现 ChemR 23 的激活可抑制 NLRP 3 炎性小体诱导的神经元焦亡,减轻炎症反应,并通过 PI3K/AKT/Nrf2 信号通路改善认知功能。Zhu 等[35]通过通过培养 BV-2 小胶质细胞进行体外实验研究,证明通过抑制脾酪氨酸激酶/活性氧(Syk/ROS)信号通路,可以降低小胶质细胞的活性,抑制小胶质细胞焦亡相关调控因子 NLRP 3、ASC 和 Caspase-1 的表达,从而减少细胞死亡,减轻神经元的损伤。有研究证明慢性脑灌注不足可引起多个脑区,尤其是海马区的 NLPR 和黑色素瘤缺乏因子 2(AIM2)炎性小体的表达和活化增加,同时 AIM2 炎性小体会促进 VD 模型小鼠中的神经可塑性降低[36]。在双侧颈总动脉狭窄(BSCA)小鼠模型中发现,AIM2 的基因敲除可以抑制皮质和海马神经元的焦亡,改善慢性脑灌注不足造成的 VD 认知障碍[37-38]。以往研究表明,NLRP、AIM2 等细胞焦亡相关炎性小体部分通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子 κB

(NF-κB)信号传导导致缺血性卒中后神经元细胞死亡[39]。以上研究证明,NLPR 3、AlM2 等炎性小体介导的焦亡信号通路有望成为治疗 VD 的关键靶点,但需进一步研究证实。

1.4 铁死亡与 VD

铁是细胞存活的关键,其参与氧运输、DNA 生物合成、ATP 合成,作为线粒体三羧酸循环中各种蛋白质的辅助因子并参与介质的传递。由铁依赖性的氧化应激驱动的死亡形式称之为铁死亡[40-41]。不同于以往常见的 RCD,铁死亡(ferroptosis)有着不同的形态学和生化生理特征。铁死亡的形态学特征表现为细胞质膜破裂,线粒体萎缩,细胞核大小正常,细胞器肿胀并伴有囊泡的形成,染色质不聚集[42]。其生化特征主要表现为胱氨酸/谷氨酸转运体系的抑制、细胞内铁超负荷引起的 ROS 的积累以及脂质过氧化的增加[43]。

铁死亡的发生涉及许多分子代谢机制调控。细胞外的 Fe^{3+} 经相关转铁蛋白进入到细胞内,并被还原为 Fe^{2+},储存于细胞内不稳定铁库中。在各种危险因素的作用下,铁库内的 Fe^{2+} 释放,与细胞内存在的过氧化物发生芬顿反应,产生具有氧化能力的自由基。当胞内 Fe^{2+} 过载时,在酯氧合酶和 Fe^{2+} 的催化下,细胞膜磷脂的多不饱和脂肪酸与胞内产生的自由基作用,生成过量脂质过氧化物,导致细胞死亡[44]。同时,细胞内产生的过量脂质过氧化物大部分由谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase 4, GPX4)清除[45]。细胞膜上存在的 System Xc-由 SLC3A2 和 SLC7A11 组成,该系统将谷氨酸(glutamate)转出细胞,同时将等量的胱氨酸(cystine)转运至细胞内并被还原为半胱氨酸,协助谷胱甘肽(glutathione,GSH)的生成。当 System Xc-功能受到影响时,会阻碍 GSH 的合成。同时 GPX4 清除脂质过氧化物需要 GSH 的参与[46],GSH 的生成减少会使细胞内产生的脂质过氧化物堆积,造成细胞的氧化应激,诱发铁死亡。

VD、AD 等神经性退行性疾病的机制研究中发现,其神经元的损伤和神经突触的丢失等病理机制与铁死亡密切相关[47-48]。Du 等[49]在双侧颈总动脉闭塞的 VD 大鼠模型中发现,CCH 导致 VD 大鼠脑内铁离子的积累,大量铁离子的堆积最终会导致神经细胞的氧化应激引起神经元的损伤,而在大鼠海马 CA1 区检测到大量堆积的铁离子和神经元的损伤情况。同时 Tuo 等[50]经实验研究证实铁螯合剂能减轻大鼠模型中的缺血再灌注损伤。提示铁死亡可能是 VD 发生发展的潜在机制。Nrf 2 是减轻细胞损伤的关键靶点,同时也是铁死亡的关键调节因子[51]。研究表明,核因子红细胞 2 相关因子 2(Nrf2)可以促进 GSH 和 GPX4 的表达,增加细胞的抗氧化系统的能力,另一方面,Nrf2 还能通过促进细胞内铁离子的转运,减少细胞内铁离子的堆积,从而抑制细胞铁死亡的发生[52]。天麻素(Gastrodin,GAS)经证实可以通过 Nrf2/HO-1 信号通路改善氧化应激和铁死亡[53]。同时有研究发现,AS 能显著提高 BCCAO 模型小鼠 GSH 的含量,显著上调 Nrf2 和 GPX4 的表达,下调环氧合酶 2(COX 2)和 elch 样 ECH 相关蛋白(Keap1)的表达,其证明 GAS 通过激活 Nrf2/Keap1-GPx4 信号通路抑制海马神经元的铁死亡,减少神经元损伤,改善 VD 大鼠的学习功能[54]。综上,铁死亡可以作为 VD 的治疗靶点,目前主要是通过抑制铁死亡脂质过氧化物的产生,减轻氧化应激途径来改善神经元的损伤,未来将进一步研究铁死亡其他调控途径,为 VD 的预防和治疗开辟新的前景。

1.5 铜死亡与 VD

铜是人体最重要的微量元素之一,同时也是细胞中所需酶的辅助因子和结构的重要组成部分[55]。体内铜含量过高或过低均有危害,低水平的铜不利于机体生长发育[56],而高水平的铜离子会对血管内皮和神经元造成损害[57]。经研究证实,阻断已知的细胞死亡形式,铜离子仍可诱导细胞的死亡。铜死亡(cuproptosis)这一概念在 2022 年被首次提出,铜死亡不同于以往的细胞死亡形式,其主要是由于 Cu^{2+} 经转运蛋白进入细胞内,被铁氧还蛋白 1(ferredoxin 1,FDX1)蛋白还原为 Cu^{+},细胞内的 Cu^{+} 与线粒体三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TCA)中的脂化酶结合,导致蛋白质的聚集,同时促使铁硫蛋白的水平下降,致使细胞发生蛋白质毒性应激,造成细胞的死亡[58-59]。

作为一种新型的调节性细胞死亡方式,关于铜死亡与神经退行性疾病的相关研究尚处于初级阶段[60]。大脑是机体内仅次于肝的含铜量最多的器官,并且在大脑海马和皮质中都能检测到高水平的铜含量[61]。铁硫蛋白大量缺失引起的线粒体功能障碍是铜死亡发生的主要机制之一[59],同时有研究证实大脑海马神经细胞的线粒体功能障碍引起的神经元损伤以及氧化应激是 VD 发生发展的关键机

制[62]。因此有理由推断高浓度的大脑海马内的铜含量引起的铜死亡与 VD 的发生及不良预后有关,然而目前还并没有铜死亡在治疗 VD 方面相关作用机制的研究。基于以上,卓桂锋等[63]推测铜死亡也存在于 VD 的发生发展过程,利用机器学习等生物信息学方法分析 VD 相关基因和铜死亡之间的联系,并预测和分析中药干预靶点,结果显示,二氢硫辛酸转乙酰基酶(DLAT)、ATP 酶 α/β(ATP7B)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(DLD)等铜死亡相关基因在 VD 患者中表达异常,鱼鳔胶、海蛤壳等中药有望成为治疗 VD 的潜在药物,然而其是否可以通过抑制铜死亡相关调控通路来治疗 VD,还需进一步研究证实。抑制铜死亡相关靶点为预防和治疗 VD 提供新的思路。

2 RCD 之间的串扰机制

虽然不同的 RCD 在整体的调控机制上各不相同,但它们在分子水平上相互级联,互相连接,几种 RCD 之间的串扰是不可避免且必须的。例如,凋亡和自噬的发生机制存在复杂的串扰关系。正常水平的自噬可以通过降低细胞内 P62 的水平,进而减少活性氧的产生,减轻细胞凋亡[8],同时自噬相关蛋白 Beclin-1 诱导细胞色素 C 从线粒体中释放,因此过度的自噬促进细胞凋亡发生[64]。相反 Bcl-2 是凋亡中的关键蛋白,通过抑制 Beclin-1 作用,从而抑制细胞异常自噬的发生[65]。在外源性细胞凋亡中,Caspase-8 参与组成死亡诱导信号复合体 DISC,促进细胞凋亡发生[14],同时 Caspase-8 活化后也可以起到切割 GSDMD 的作用,诱导细胞焦亡[66]。因此 Caspase-8 在凋亡、焦亡中都是关键的调控因子。活性氧(ROS)在几种细胞死亡中起着连接作用,ROS 介导的脂质过氧化通过破坏线粒体外膜结构诱发凋亡和自噬,而 ROS 介导的自噬通过调节转铁蛋白受体来增加细胞内的铁离子含量,诱导铁死亡[67]。RCD 之间的机制串扰如图 1 所示。同时有研究显示铁死亡的关键调节因子 GSH、GPX4 也可以充当细胞内的铜螯合剂,减轻铜死亡,相反铜离子可以通过诱导 GPX4 的降解促进铁死亡,铜离子相关螯合剂可以起到抑制铁死亡的作用,证实了铁死亡和铜死亡发生机制间存在串扰关系[68],如图 2 所示。然而 RCD 之间的串扰机制在 VD 中的作用相关研究较少,其具体的调控机制还尚未明确,寻找不同 RCD 之间共同的调控靶点不仅利于更深入理解细胞死亡方式,还有益于发现药物防治 VD 的新靶点,是未来的主要研究方向。

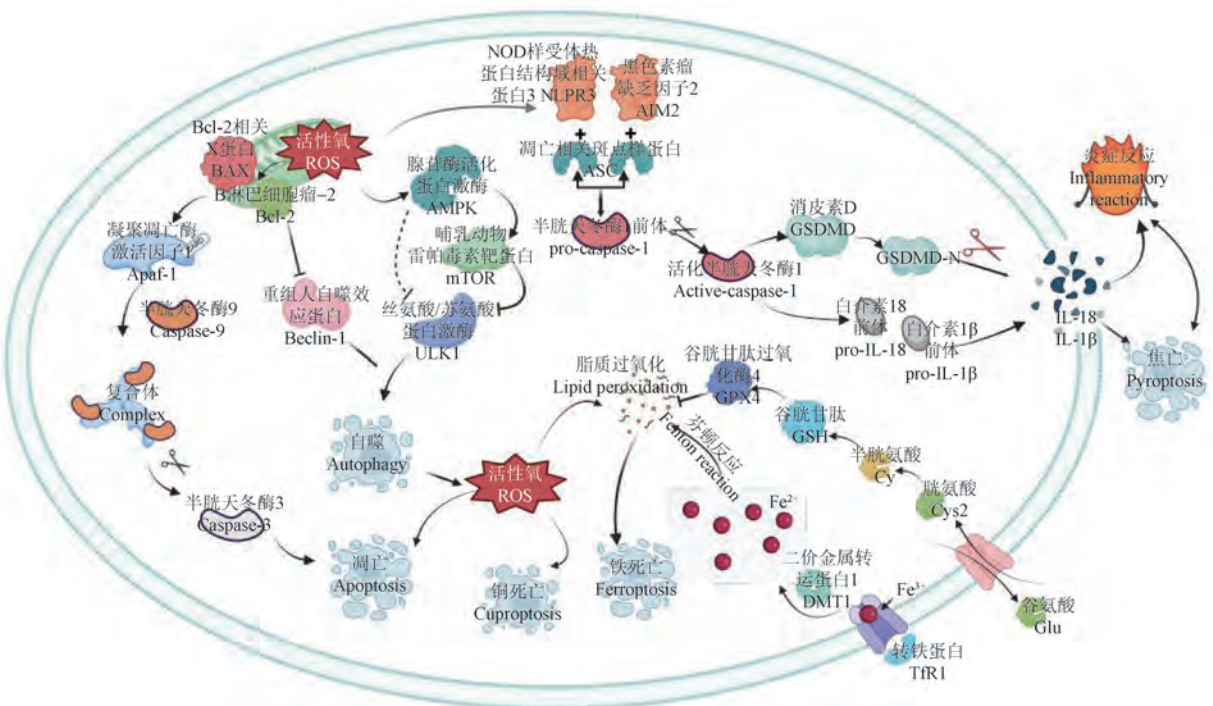


图 1 RCD 之间的机制图及串扰

Figure 1 Mechanism diagram and crosstalk between RCDs

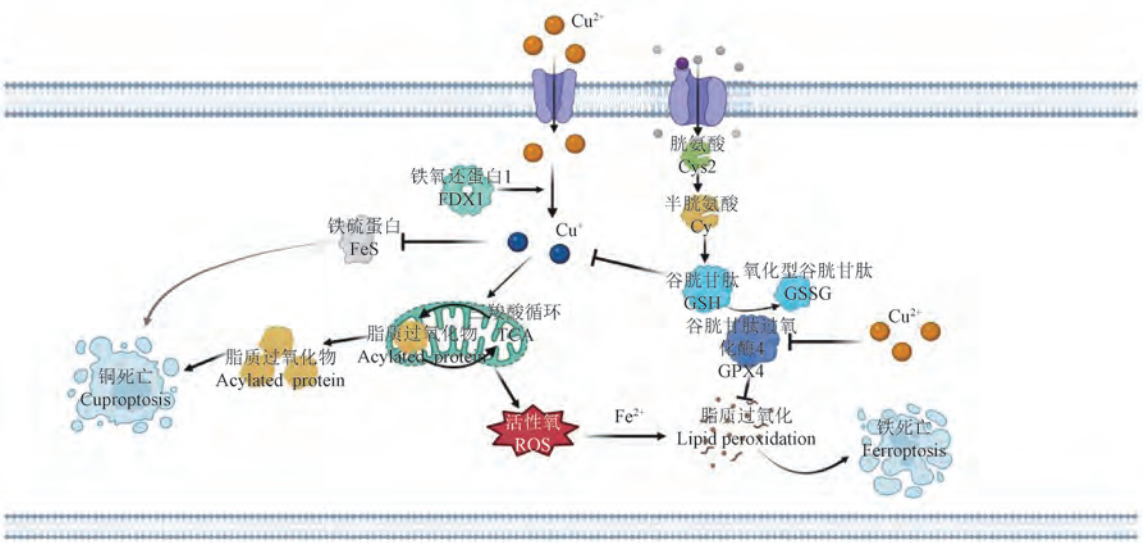


图 2　铜死亡和铁死亡串扰机制图

Figure 2　Crosstalk Mechanism of cuproptosis and ferroptosis

3　中医药调控 RCD 相关靶点干预 VD

近年来,中医药在防治 VD 的研究中虽有较多成果,但其治疗 VD 的相关靶点还未完全明确。由以上总结得出神经细胞的死亡造成的神经元的损伤和丢失,以及神经元突触结构的改变是 VD 发生发展的重要机制。因此研究神经细胞死亡的相关靶点和信号通路调控机制对于 VD 新药的开发有重要的指导价值。

VD 的基本病机在中医理论中为“肾精阴虚,於阻脑络”,与痰浊和瘀血密切相关。因此 VD 的治法治则多以“活血化瘀,通络去浊,滋肾填精”为主。中药天麻具有祛风通络,平抑肝阳的功效。Chen 等[20]通过建立双侧颈总动脉结扎(2-VO)VD 大鼠模型,经体内实验研究证实天麻提取物天麻素通过上调 PI3K/AKT/Nrf2 信号通路,可减轻氧化损伤,从而减少神经元的凋亡。Chen 等[69]采用永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)所致 VD 大鼠模型进行体内实验,研究结果表明天麻素可通过抑制 Ca^{2+}/CaMKII 信号通路减轻 VD 患者的自噬功能障碍,减少神经元丢失,从而改善 VD 患者的认知功能。

滋肾活血方由国医大师刘祖贻创立[70],方中何首乌、枸杞为君药,有滋补肝肾之效;桑椹子、益智仁共为臣药,可起到滋肾补血的作用;丹参、五味子、葛根、石菖等均为佐药;使药为郁金、山楂,有祛瘀止血的功效。以上诸药合用,可起到活血通络,滋阴补肾的良好功效[71]。Yao 等[72]采用双侧颈总动脉结扎法(2-VO)建立 VD 大鼠模型的体内实验,以及在体外建立氧糖剥夺(OGR)损伤的神经血管单元(NVU)细胞模型,药物组采用滋肾活血方干预,结果显示滋肾活血方可上调 miR-124-3p 的表达,抑制神经细胞焦亡,从而对 VD 大鼠 NVU 神经元损伤有保护作用。同时 Zhao 等[29]也通过建立 2-VO 大鼠 VD 模型证实滋肾活血方可通过上调 PINK 1/Parkin 信号通路,显著减轻 VD 模型大鼠海马 CA1 区的神经元自噬,起到神经保护作用。

中药单复方通过调节程序性细胞死亡途径治疗 VD 的研究颇多,涉及多种不同的通路和靶点,总结有近几年中药单复方及中药有效成分调节 RCD 相关靶点及信号通路治疗 VD 的研究,见表 1。

4　总结与展望

血管性痴呆是一种由大脑损伤所引起的神经退行性疾病,其病理机制过程中存在多种形式的 RCD,目前不少研究阐明了多种 RCD,如凋亡、自噬、焦亡、铁死亡以及铜死亡等,与 VD 之间的联系密切。主要以 RCD 造成海马区的神经元的损伤和丢失、神经突触结构的改变,进而引起认知功能障碍的机制研究为主。因此明确 RCD 调控机制,抑制 VD 发生发展过程中 RCD 的作用,对于 VD 的防治具有重要意义。

VD 在中医理论中属“痴呆”“呆病”等范畴,诸多医家多认为本病病位在脑,涉及心、肝、肾三脏,属本虚标实之证[84]。痰浊、瘀血痹阻脑络,日久致肾精亏虚是本病的基本病机,并据此提出了诸多理论和学说[85],如王永炎院士提出了“毒损脑髓、脑

表 1 近五年中药调控 RCD 相关靶点及信号通路治疗 VD 的研究汇总

Table 1 Summary of research on traditional Chinese medicine regulating RCD related targets and signaling pathways for VD treatment in the past five years

调节性细胞死亡类型 RCD types	中药名称 Traditional Chinese medicine	主要成分 Main components	实验模型 Experimental model	相关分子/通路 Related molecules/pathways	参考文献 Reference
细胞凋亡 Apoptosis	琥珀 Succinum	乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts	HT22 细胞葡萄糖氧剥离(OGD)模型 HT22 cell OGD model	糖原合成酶激酶 3β/β-连环蛋白 GSK 3β/β-catenin	[73]
	益髓复勇汤 Yisui Fuyong tang	熟地黄、山茱萸、党参等 Radix Rehmanniae Praeparata, Cornus officinalis, Radix Astragali	改良 Pulsinelli 四血管闭塞法 VCI 大鼠模型 Modified Pulsinelli four-vessel occlusion method	脑源性神经营养因子-酪氨酸蛋白激酶受体 B、B 淋巴细胞瘤-2 BDNF-TrkB, Bcl-2	[74]
	参知健脑方 Shenzhi Jiannao formula	人参、知母、赤芍 Panax ginseng, Anemarrhena asphodeloides, Paeonia anomala subsp	永久性闭塞双侧颈总动脉结扎(2-VO)模型 VD 大鼠、谷氨酸诱导 PC12 细胞模型 Permanent occlusion of bilateral common carotid artery ligation (2-VO) model in VD rats and glutamate induced PC12 cell model	磷酸化蛋白激酶 AKT1 抗体、磷酸化蛋白激酶、半胱天冬酶 3 INS, p-AKT1, AKT1, caspase-3	[75]
	当归芍药散 Danggui-Shaoyao San	当归、芍药、白术等 Angelica sinensis, peony, Atractylodes macrocephala	永久性闭塞双侧颈总动脉结扎大鼠 VD 模型 2-VO model in VD rats	IκB 激酶/核因子 κB IKK/NF-κB	[76]
	当归 Angelica sinensis 羌活 Notopterygium root	欧前胡素 Imperatorin	海马 HT22 细胞缺氧低血糖模型 Hippocampal HT22 cell hypoxia hypoglycemia model	核因子 E2 相关因子 2/抗氧化反应元件 Nrf2/ARE	[77]
	石菖蒲 Acorus tatarinowii	β-细辛醚 β-asarone	双血管闭塞 VD 大鼠模型 2-VO model in VD rats	环磷酸腺苷/蛋白激酶 A/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白、Beclin-1、LC3、P62 蛋白 cAMP/PKA/CREB, Beclin-1, LC3, P62	[26]
细胞自噬 Autophagy	滋肾活血汤 Zishen Huoxue Decoction	何首乌、枸杞、丹参 Polygonum multiflorum, wolfberry, Danshen	2-VO 模型 VD 大鼠 2-VO model in VD rats	PTEN 诱导激酶 1/帕金蛋白 PINK 1/Parkin	[29]
	积雪苷 Asiaticoside	积雪苷 Asiaticoside	2-VO 模型 VD 大鼠 2-VO model in VD rats	LC 3 II、Beclin-1 蛋白、哺乳动物雷帕霉素靶标通路 LC 3 II、Beclin-1 mTOR pathway	[78]
	天麻 Rhizoma Gastrodiae	天麻素 Gastrodin	2-VO 模型 VD 大鼠 2-VO model in VD rats	磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B PI3K/AKT	[20]
	滋肾活血汤 Zishen Huoxue Decoction	何首乌、枸杞、丹参 Polygonum multiflorum, wolfberry, Danshen	2-VO 模型 VD 大鼠;OGD 细胞模型 2-VO model in VD rats; OGD cell model	血清微小 RNA(miRNA)-124-3p miR-124-3p	[72]

续表1

调节性细胞死亡类型 RCD types	中药名称 Traditional Chinese medicine	主要成分 Main components	实验模型 Experimental model	相关分子/通路 Related molecules/pathways	参考文献 Reference
细胞焦亡 Pyroptosis	人参皂苷 Ginsenoside	20(S)-原人参二醇(PDD) 20 (S)-Protopanaxadiol (PPD)	2-VO 模型 VD 大鼠 2-VO model in VD rats	NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3、凋亡相关斑点样蛋白 NLRP3, ASC	[79]
铁死亡 Ferroptosis	黄连 Coptis chinensis	小檗碱 Berberine	大鼠海马神经元 ODG 模型 Rats hippocampal neurons ODG model	过氧化物酶体增殖物活化受体 γ、核因子 κB PPAR-γ, NF-κB	[80]
	石斛多糖 Dendrobium nobile polysaccharides	多糖、石斛生物碱 Polysaccharides, Dendrobium alkaloids	2-VO 模型 VD 大鼠 2-VO model in VD rats	谷胱甘肽、xCT、谷胱甘肽过氧化物酶 4、PSD-95 蛋白 GSH, xCT, GPX4, PSD-95	[81]
	天麻 Rhizoma Gastrodiae	天麻素 Gastrodin	BCCAO 大鼠 VD 模型 BOCCA model in VD rats	核因子-红细胞 2 相关因子 2/Keap 1-谷胱甘肽过氧化物酶 4 Nrf2/Keap1-GPX4	[54]
	佛手散 Fo-Shou-San	当归、川芎 Angelica sinensis, Ligusticum chuanxiong	右侧单侧颈总动脉闭 VD 大鼠模型 Ruccao model in VD rats	核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 Nrf2/HO-1	[82]
	脑泰方 Naotaifang	黄芪、川穹 Huangqi, Chuanqiong	BV2 小胶质细胞的氧糖剥夺再复氧模型 BV2 microglia OGD/R model	骨形态发生蛋白 6/SMADs 蛋白 BMP 6/SMADs	[83]

络”学说,蔡圣朝倡导“温阳补肾”理论以及黎少尊教授根据中医古代典籍、文献记载及临证心得,提出了“三元络脑”学说等。中医药在防治 VD 中具有“多靶点、多途径、多环节”的优势,许多中药单体及其有效成分、中药复方,例如参知健脑方、黄连、天麻等可以通过相关信号通路和靶点调控减轻细胞死亡,减少海马神经元损伤,改善 VD 学习记忆能力。

然而对于血管性痴呆中多种 RCD 的机制研究,目前仍有很多需要进一步研究仍未解决的问题:现有的研究中,虽然已经初步证明 RCD 与 VD 的机制联系,以及中药通过调控 RCD 改善 VD 症状,但实验仍停留在基础实验阶段,尚未通过临床研究进一步证实,仍需要进一步进行临床实验,全面研究中药调控 RCD 的有效机制,确保药物开发的安全性和有效性,提高科研严谨性;随着研究的进一步深入,更多形式的 RCD 正在被探索,近期发现的双硫死亡、泛凋亡等在 VD 方面研究较少,其是否可以成为中药防治血管性痴呆的有效靶点,还需基础和临床实验的深入研究;RCD 之间的串扰机制在 VD 中的作用相关研究较少,其具体的调控机制还尚未明确,寻找不同 RCD 之间共同的调控靶点,研究难度较大,是未来的主要研究方向。

本课题组根据第四批全国名老中医药专家黎少尊教授治疗本病的经验方,前期经小样本临床研究证实痴呆健脑方(由薯蓣丸、通窍活血汤化裁而来)可以明显改善 VD 患者的学习记忆功能[86],课题组下一步将继续基于 RCD 调控机制的相关信号通路和靶点,探究痴呆健脑方治疗 VD 的机制,寻找中药防治 VD 的潜在靶点。

参考文献:

[1] MORGAN A E, MC AULEY M T. Vascular dementia: From pathobiology to emerging perspectives [J]. Ageing Res Rev, 2024, 96: 102278.

[2] 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.

[3] The Lancet Public Health. Reinvigorating the public health response to dementia [J]. Lancet Public Health, 2021, 6(10): e696.

[4] BIR S C, KHAN M W, JAVALKAR V, et al. Emerging concepts in vascular dementia: a review [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2021, 30(8): 105864.

[5] KUANG H, ZHOU Z F, ZHU Y G, et al. Pharmacological

treatment of vascular dementia: a molecular mechanism perspective [J]. Aging Dis, 2021, 12(1): 308-326.

[6] WANG X X, ZHANG B, XIA R, et al. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(18): 9601-9614.

[7] MA X, WANG Y, SHI Y, et al. Exosomal miR-132-3p from mesenchymal stromal cells improves synaptic dysfunction and cognitive decline in vascular dementia [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 315.

[8] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(3): 486-541.

[9] 陆佳婧, 侯瑜超, 黄思维, 等. 从发病机制概述针刺治疗血管性痴呆的研究进展 [J]. 世界中医药, 2023, 18(17): 2556-2559, 2564.
LU J J, HOU Y C, HUANG S W, et al. Acupuncture in treating vascular dementia: a review from pathogenesis [J]. World Chin Med, 2023, 18(17): 2556-2559, 2564.

[10] BAI X, ZHANG M. Traditional Chinese medicine intervenes in vascular dementia: traditional medicine brings new expectations [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 689625.

[11] NÖSSING C, RYAN K M. 50 years on and still very much alive: 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics' [J]. Br J Cancer, 2023, 128(3): 426-431.

[12] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.

[13] HU Y, BENEDICT M A, DING L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis [J]. EMBO J, 1999, 18(13): 3586-3595.

[14] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-oh my! the many ways a cell can die [J]. J Mol Biol, 2022, 434(4): 167378.

[15] ZHAO T, FU Y, SUN H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Ba_x/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia [J]. IUBMB Life, 2018, 70(1): 60-70.

[16] WANG Z, ZHANG Z, LIU J, et al. *Panax Ginseng* in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. J Ginseng Res, 2023, 47(4): 506-514.

[17] GUAN T, XIAO Y, XIE X, et al. Dulaglutide improves gliosis and suppresses apoptosis/autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in vascular dementia rats [J]. Neurochem Res, 2023, 48(5): 1561-1579.

[18] XU C, DAI Y, BAI J, et al. 17β-oestradiol alleviates endoplasmic reticulum stress injury induced by chronic cerebral hypoperfusion through the Haemoglobin/HIF 1α signalling pathway in ovariectomized rats [J]. Neurochem Int, 2021, 148: 105119.

[19] GUO M M, QU S B, LU H L, et al. Biochanin A alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and p38MAPK signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 646720.

[20] CHEN Y X, YANG H, WANG D S, et al. Gastrodin relieves cognitive impairment by regulating autophagy via PI3K/AKT signaling pathway in vascular dementia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 671: 246-254.

[21] ZHANG X, WEI M, FAN J, et al. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons [J]. Autophagy, 2021, 17(6): 1519-1542.

[22] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.

[23] YANG Z, LIN P, CHEN B, et al. Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5) [J]. Autophagy, 2021, 17(10): 3048-3067.

[24] RAJEEV V, FANN D Y, DINH Q N, et al. Pathophysiology of blood brain barrier dysfunction during chronic cerebral hypoperfusion in vascular cognitive impairment [J]. Theranostics, 2022, 12(4): 1639-1658.

[25] WANG W, QIAO O, JI H, et al. Autophagy in vascular dementia and natural products with autophagy regulating activity [J]. Pharmacol Res, 2021, 170: 105756.

[26] NING Z, ZHONG X, WU Y, et al. β-asarone improves cognitive impairment and alleviates autophagy in mice with vascular dementia via the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155215.

[27] YANG Y, ZHAO L, LI N, et al. Correction to: estrogen exerts neuroprotective effects in vascular dementia rats by suppressing autophagy and activating the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2021, 46(9): 2505.

[28] XU L, QU C, LIU Y, et al. The environmental enrichment ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment by activating autophagy signaling pathway and improving synaptic function in hippocampus [J]. Brain Res Bull, 2023, 204: 110798.

[29] ZHAO Z, XIE L, SHI J, et al. Neuroprotective Effect of Zishen Huoxue Decoction treatment on Vascular Dementia by activating PINK1/Parkin mediated Mitophagy in the Hippocampal CA1 Region [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117172.

[30] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.

[31] HAN C, YANG Y, GUAN Q, et al. New mechanism of nerve injury in Alzheimer's disease: β-amyloid-induced neuronal pyroptosis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(14): 8078-8090.

[32] SUN R, PENG M, XU P, et al. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) regulates NLRP3-mediated neuronal pyroptosis following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 330.

[33] WARD R, LI W, ABDUL Y, et al. NLRP3 inflammasome

inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia [J]. Pharmacol Res, 2019, 142: 237-250.

[34] ZHANG Y, ZHANG J, ZHAO Y, et al. ChemR23 activation attenuates cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting NLRP3 inflammasome-induced neuronal pyroptosis [J]. Cell Death Dis, 2023, 14(11): 721.

[35] ZHU J, DU J, KOU W, et al. Probucol protects against brain damage caused by intra-neural pyroptosis in rats with vascular dementia through inhibition of the Syk/Ros pathway [J]. Aging, 2024, 16(5): 4363-4377.

[36] CHEN J, SHU S, CHEN Y, et al. AIM2 deletion promotes neuroplasticity and spatial memory of mice [J]. Brain Res Bull, 2019, 152: 85-94.

[37] POH L, FANN D Y, 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] POH L, RAZAK S M B A, LIM H M, et al. AIM2 inflammasome mediates apoptotic and pyroptotic death in the cerebellum following chronic hypoperfusion [J]. Exp Neurol, 2021, 346: 113856.

[39] FANN D Y, LIM Y A, CHENG Y L, et al. Evidence that NF-κB and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1082-1096.

[40] DENG F, ZHENG X, SHARMA I, et al. Regulated cell death in cisplatin-induced AKI: relevance of *myo*-inositol metabolism [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2021, 320(4): F578-F595.

[41] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149(5): 1060-1072.

[42] TONG L, YU H, HUANG X, et al. Current understanding of osteoarthritis pathogenesis and relevant new approaches [J]. Bone Res, 2022, 10(1): 60.

[43] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379.

[44] HE Y J, LIU X Y, XING L, et al. Fenton reaction-independent ferroptosis therapy via glutathione and iron redox couple sequentially triggered lipid peroxide generator [J]. Biomaterials, 2020, 241: 119911.

[45] HUANG X, SONG Y, WEI L, et al. The emerging roles of ferroptosis in organ fibrosis and its potential therapeutic effect [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109812.

[46] ZHAO Y Y, YANG Y Q, SHENG H H, et al. GPX4 plays a crucial role in fuzheng kang'ai decoction-induced non-small cell lung cancer cell ferroptosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 851680.

[47] ADENIYI P A, GONG X, MACGREGOR E, et al. Ferroptosis of microglia in aging human white matter injury [J]. Ann Neurol, 2023, 94(6): 1048-1066.

[48] OU M, JIANG Y, JI Y, et al. Role and mechanism of ferroptosis in neurological diseases [J]. Mol Metab, 2022, 61: 101502.

[49] DU S Q, WANG X R, XIAO L Y, et al. Molecular mechanisms of vascular dementia: what can be learned from animal models of chronic cerebral hypoperfusion? [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(5): 3670-3682.

[50] TUO Q Z, LEI P, JACKMAN K A, et al. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke [J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(11): 1520-1530.

[51] LIU L, VOLLMER M K, KELLY M G, et al. Reactive gliosis contributes to Nrf2-dependent neuroprotection by pretreatment with dimethyl fumarate or Korean red ginseng against hypoxic-ischemia: focus on hippocampal injury [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(1): 105-117.

[52] JI Y, ZHENG K, LI S, et al. Insight into the potential role of ferroptosis in neurodegenerative diseases [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1005182.

[53] JIANG T, CHENG H, SU J, et al. Gastrodin protects against glutamate-induced ferroptosis in HT-22 cells through Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Toxicol In Vitro, 2020, 62: 104715.

[54] LI Y, ZHANG E, YANG H, et al. Gastrodin ameliorates cognitive dysfunction in vascular dementia rats by suppressing ferroptosis via the regulation of the Nrf2/Keap1-GPx4 signaling pathway [J]. Molecules, 2022, 27(19): 6311.

[55] KIM B E, NEVITT T, THIELE D J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(3): 176-185.

[56] GOODMAN V L, BREWER G J, MERAJVER S D. Copper deficiency as an anti-cancer strategy [J]. Endocr Relat Cancer, 2004, 11(2): 255-263.

[57] LUTSENKO S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways [J]. Curr Opin Chem Biol, 2010, 14(2): 211-217.

[58] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. Science, 2022, 375(6586): 1254-1261.

[59] OLIVERI V. Selective targeting of cancer cells by copper ionophores: an overview [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 841814.

[60] GROMADZKA G, TARNACKA B, FLAGA A, et al. Copper dyshomeostasis in neurodegenerative diseases-therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9259.

[61] KARDOS J, HÉJA L, SIMON Á, et al. Correction to: Copper signalling: causes and consequences [J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 80.

[62] CALABRESE V, GIORDANO J, SIGNORILE A, et al. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: Roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection [J]. J Neurosci Res, 2016, 94(12): 1588-1603.

[63] 卓桂锋, 陈炜, 朱健敏, 等. 血管性痴呆铜死亡关键差异基因的生物信息学分析及防治中药筛选 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7120-7129.
ZHUO G F, CHEN W, ZHU J M, et al. Bioinformatics analysis of cuproptosis in vascular dementia and screening of traditional Chinese medicine for prevention and treatment [J]. Chin Tradit

Herb Drugs, 2023, 54(21): 7120-7129.

[64] BISWAS U, ROY R, GHOSH S, et al. The interplay between autophagy and apoptosis: its implication in lung cancer and therapeutics [J]. Cancer Lett, 2024, 585: 216662.

[65] KIST M, VUCIC D. Cell death pathways: intricate connections and disease implications [J]. EMBO J, 2021, 40(5): e106700.

[66] BEDOUI S, HEROLD M J, STRASSER A. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(11): 678-695.

[67] WANG B, WANG Y, ZHANG J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis [J]. Arch Toxicol, 2023, 97(6): 1439-1451.

[68] MAO C, WANG M, ZHUANG L, et al. Metabolic cell death in cancer: Ferroptosis, cuproptosis, disulfidptosis, and beyond [J]. Protein Cell, 2024: pwae003.

[69] CHEN T T, ZHOU X, XU Y N, et al. Gastrodin ameliorates learning and memory impairment in rats with vascular dementia by promoting autophagy flux via inhibition of the Ca^{2+}/CaMKII signal pathway [J]. Aging, 2021, 13(7): 9542-9565.

[70] 张媛婷, 胡宗仁, 谢乐, 等. 滋肾活血方治疗肾阴虚血瘀型血管性痴呆的临床观察 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(1): 151-155.
ZHANG Y T, HU Z R, XIE L, et al. Efficacy of zishen Huoxue prescription in the treatment of vascular dementia of kidney-Yin deficiency and blood stasis type [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2022, 34(1): 151-155.

[71] 赵梓婷, 伍大华, 张秀丽, 等. 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠海马 CA1 区线粒体自噬的调节及神经元再生的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 8(20): 45-52.
ZHAO Z T, WU D H, ZHANG X L, et al. Effect of zishen Huoxue prescription on regulation of mitophagy and neurogenesis in hippocampal CA1 region of 2-VO rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 8(20): 45-52.

[72] YAO T, XIE L, XIE Y, et al. Protective effects of Zishen Huoxue recipe against neuronal injury in the neurovascular unit of rats with vascular dementia by interfering with inflammatory cascade-induced pyroptosis [J]. Neuropeptides, 2023, 102: 102358.

[73] WEI C, ZHU Z, ZHENG J N, et al. Chinese medicine, succinum, ameliorates cognitive impairment of carotid artery ligation rats and inhibits apoptosis of HT22 hippocampal cells *via* regulation of the GSK3β/β-catenin pathway [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 867477.

[74] GONG T, LUO Z, HUANG L, et al. Effect and mechanism of yisui fuyongtang (YSFYT) decoction on cognitive function and synaptic plasticity in rats with vascular cognitive impairment [J]. J Immunol Res, 2022, 2022: 1709360.

[75] TIAN D, GAO Q, LIN J, et al. Uncovering the mechanism of the Shenzhi Jiannao formula against vascular dementia using a combined network pharmacology approach and molecular biology [J]. Phytomedicine, 2021, 90: 153637.

[76] CAI H, CAI T, ZHENG H, et al. The neuroprotective effects of Danggui-Shaoyao San on vascular cognitive impairment: involvement of the role of the low-density lipoprotein receptor-related protein [J]. Rejuvenation Res, 2020, 23(5): 420-433.

[77] LIAO X, ZHANG Z, MING M, et al. Imperatorin exerts antioxidant effects in vascular dementia via the Nrf2 signaling pathway [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 5595.

[78] GUO M, XU J, WANG S, et al. Asiaticoside reduces autophagy and improves memory in a rat model of dementia through mTOR signaling pathway regulation [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(3): 645.

[79] WANG X, SHI Y J, NIU T Y, et al. Neuroprotective effect of 20(S)-Protopanaxadiol (PPD) attenuates NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis in vascular dementia rats [J]. Neurosci Lett, 2023, 814: 137439.

[80] ZHAO Y, LI Z, LU E, et al. Berberine exerts neuroprotective activities against cerebral ischemia/reperfusion injury through up-regulating PPAR-γ to suppress NF-κB-mediated pyroptosis [J]. Brain Res Bull, 2021, 177: 22-30.

[81] MING M, HU W, XIE G, et al. *Dendrobium nobile* polysaccharides attenuates ferroptosis and improves cognitive function in vascular dementia rats [J]. Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2023, 38: 15333175231185236.

[82] WANG J, SHI J, XIAO Y, et al. Fo-Shou-San ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment in mice by regulating *NRF2*/*HO*-1 pathway against ferroptosis [J]. J Integr Neurosci, 2023, 22(2): 41.

[83] LIAO J, WEI M, WANG J, et al. Naotaifang formula attenuates OGD/R-induced inflammation and ferroptosis by regulating microglial M1/M2 polarization through BMP6/SMADs signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115465.

[84] 陈昭, 吴林, 蓝雪琳, 等. 血管性痴呆发病机制中西医研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(1): 40-44.
CHEN Z, WU L, LAN X L, et al. Research progress on pathogenesis of vascular dementia in traditional Chinese medicine and western medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2022, 24(1): 40-44.

[85] 王逢猛, 盖朋朋, 刘蓓, 等. 血管性认知障碍的中医药治疗进展 [J]. 中医临床研究, 2023, 15(9): 83-85.
WANG F M, GAI P P, LIU B, et al. A review on treating vascular cognitive impairment in TCM [J]. Clin J Chin Med, 2023, 15(9): 83-85.

[86] 李伟峰, 芦锰, 董新刚. 痴呆健脑方辅助西医常规疗法治疗轻中度血管性痴呆临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(3): 100-103.
LI W F, LU M, DONG X G. Clinical study on Chidai Jiannao Decoction combined with western routine therapy for treatment of mild to moderate vascular dementia [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2021, 28(3): 100-103.

〔收稿日期〕2024-04-30

曹盼夏,彭紫凝,李剑,等. 冠心病痰瘀互结证中巨噬细胞代谢与免疫作用研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 157-164.
Cao PX, Peng ZN, Li J, et al. Research progress on macrophage metabolism and immune function in coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 157-164.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.018

冠心病痰瘀互结证中巨噬细胞代谢与免疫作用研究进展

曹盼夏[1],彭紫凝[3],李　剑[2],吴　鸿[1*]

(1. 河南中医药大学第二临床医学院,郑州　450002;2. 郑州人民医院,郑州　450002;
3. 云南中医药大学第一临床医学院,昆明　650000)

【摘要】 冠心病在中医学中属“胸痹心痛、真心痛”等范畴,脂质代谢紊乱和炎症反应可作为“痰、瘀”的生化表象,贯穿疾病始终。巨噬细胞的能量代谢与其免疫功能密切相关,是调节冠心病代谢紊乱和炎症反应的重要因素。本文综述了巨噬细胞在冠心病病理生理中的角色,讨论了这些代谢途径如何影响巨噬细胞的免疫反应,以及它们如何通过能量代谢途径影响疾病,深入探讨巨噬细胞能量代谢的不同模式,特别是促炎的 M1 型和抗炎的 M2 型巨噬细胞在冠心病痰瘀互结证中的代谢特性及其免疫调节功能。为理解冠心病痰瘀互结证的病理机制和开发新的治疗策略提供理论指导。

【关键词】 巨噬细胞;能量代谢;冠心病痰瘀互结证;免疫调节
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0157-08

Research progress on macrophage metabolism and immune function in coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome

CAO Panxia[1], PENG Zining[3], LI Jian[2], WU Hong[1*]

(1. the Second Clinical Medical College of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China. 2. Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450002. 3. the First Clinical Medical College of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000)

【Abstract】 In traditional Chinese medicine, coronary heart disease falls under the categories of “chest impediment and heart pain” and “true heart pain”, with lipid metabolism disorder and the inflammatory response acting as biochemical manifestations of “phlegm and stasis” throughout the disease. The energy metabolism of macrophages is closely related to their immune function and is an important factor in regulating the metabolic disorder and inflammatory responses in coronary heart disease. This article reviews the role of macrophages in the pathophysiology of coronary heart disease. We discuss how these metabolic pathways affect the immune responses of macrophages and influence the disease. We delve into the different modes of macrophage energy metabolism in coronary heart disease, especially the metabolic characteristics and immune regulatory functions of pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages in the syndrome of phlegm and blood stasis. This provides a theoretical guidance for understanding the pathogenic mechanism of the syndrome of phlegm and

[基金项目]河南省科技攻关项目(232102310403);河南省高校重点科研项目(23A360013)。
[作者简介]曹盼夏(1993—),女,博士,研究方向:中医药防治心血管疾病。E-mail:cp312579211@163.com
[通信作者]吴鸿(1974—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病。E-mail:kevin5me@126.com

blood stasis in coronary heart disease and developing new treatment strategies.

【Keywords】 macrophages; energy metabolism; coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome; immune regulation

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

冠心病(coronary heart disease,CHD)是心血管疾病中的一种高发病症,其核心病理变化为冠状动脉发生粥样硬化斑块,引发心肌缺血[1]。巨噬细胞作为动脉斑块的主要组成部分,不仅在炎症反应过程中扮演重要角色,同时还具备免疫调节功能。近年来的研究表明,巨噬细胞的能量代谢状态与其免疫功能密切相关,能量代谢的改变会直接影响巨噬细胞的活化状态和功能,从而在 CHD 的进展中起到决定性作用。

CHD 属中医“胸痹心痛、真心痛”,为本虚标实之证,痰瘀互结是其最主要的证型之一。巨噬细胞能够通过改变能量代谢方式进行表型转换,使其在病理状态下呈现不同的活性,进而参与 CHD 血液循环障碍、代谢紊乱和炎症反应等“痰、瘀”形成过程。这种代谢变化不仅体现中医的“瘀阻”现象,也强调了调节巨噬细胞代谢状态在治疗 CHD 中的潜在重要性。因此,本文将综述巨噬细胞的能量代谢如何在 CHD 痰瘀互结证中调节免疫反应,并探讨促炎的 M1 型与抗炎的 M2 型巨噬细胞的代谢特性及其对疾病进程的影响。

1 巨噬细胞能量代谢与 CHD

巨噬细胞是免疫系统中关键的白细胞类型,主要负责吞噬病原体、清除死亡细胞,并在免疫调节和组织修复中发挥重要作用。巨噬细胞的能量代谢不仅支持其生存和功能执行,更通过不同的代谢状态直接调控其在疾病中的免疫响应。在 CHD 的病理环境下,巨噬细胞能够根据不同的病理阶段和微环境需求,改变代谢方式,使之从促炎的 M1 型向促进组织修复的 M2 型转变,或反之,并利用这种代谢的可塑性干预 CHD 的发生发展。

1.1 巨噬细胞能量代谢路径的免疫调节功能

巨噬细胞作为免疫系统中的关键细胞,其能量代谢状态直接影响其免疫功能[2]。生理条件下,巨噬细胞一般处于静息状态,主要利用氧化磷酸化(oxidative phosphorylation,OXPHOS)产能,维持其监控功能和基本免疫反应[3]。然而,面临感染或炎症刺激时,它们会迅速切换为糖酵解代谢途径,这种代谢方式能够使巨噬细胞快速地产生能量,以增强其吞噬作用、产生炎症介质(如细胞因子和化学因子)并有效参与炎症反应[4]。

巨噬细胞的极化状态决定它们在免疫作用中的功能定位,也是调节机体免疫反应性质和强度的关键因素。极化主要分为两种,其中,M1 型巨噬细胞以糖酵解作为主要产能方式,支持其产生大量促炎细胞因子如肿瘤坏死因子-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),以快速响应感染和促进炎症反应[5]。此外,这种糖酵解依赖的能量供应方式也与 M1 型巨噬细胞在抗肿瘤和感染防御中的活跃角色相符[6]。而 M2 型巨噬细胞则依赖于有氧呼吸,特别是线粒体氧化磷酸化和脂肪酸氧化(fatty acid oxidation,FAO),其产生的抗炎因子如白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)和转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)有助于调节免疫反应,促进组织修复和纤维化[7]。这种能量代谢方式的高效性支持 M2 型巨噬细胞在长期免疫调节中的功能。这种高效的能量代谢方式不仅维持了 M2 型巨噬细胞的存活,还增强了它们在长期免疫调节中的功能。研究发现,改变 M2 型巨噬细胞的代谢特征和生物能量状态,将其从 FAO 转向糖酵解后,M2 型巨噬细胞的免疫抑制功能减弱,并促进肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫反应[8]。相反,柑橘类水果中的黄酮类化合物 Didymin 通过促进 FAO,将促炎的 M1 型巨噬细胞转变为抗炎的 M2 型巨噬细胞,显著改善了急性和慢性结肠炎小鼠的临床症状[9]。因此,巨噬细胞的能量代谢不仅是其生存和免疫功能的能源基础,也是其在免疫反应中适应和调节的关键因素。

1.2 免疫代谢调节对 CHD 的作用

免疫代谢调节在 CHD 的病理进程中起着关键作用,尤其是通过调节巨噬细胞的功能和活性。巨噬细胞作为免疫系统的重要组成部分,其能量代谢状态能显著影响它们在炎症和免疫反应中的角色,从而直接影响 CHD 的发展和进程。CHD 的病理基础在于动脉粥样硬化,在动脉粥样硬化的过程中,巨噬细胞的能量代谢方式从依赖 OXPHOS 转变为糖酵解,这种转变支持它们在炎症环境中的快速反

应和活化[10]。激活的巨噬细胞通过吞噬氧化的低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)转变为泡沫细胞,从而加速斑块的形成与扩大[11]。动物实验揭示,当巨噬细胞的代谢方式被诱导为糖酵解时,细胞内脂质的吸收与积累、促炎细胞因子的表达均有所增加,导致动脉粥样硬化模型小鼠的主动脉斑块面积显著扩大,并伴随更多病变组织的出现[12]。此外,巨噬细胞代谢状态的改变进一步加剧了局部炎症反应,增加了斑块不稳定及其破裂的风险,可能触发心肌梗塞、心绞痛等急性冠状动脉事件。临床研究表明,激活的巨噬细胞是评估 CHD 斑块稳定性的重要指标,与内膜糜烂、脂质斑块的长度、狭窄程度以及斑块稳定性紧密相关[13]。而且,巨噬细胞向糖酵解代谢转变会促进泡沫细胞形成,使患者冠状动脉粥样硬化负荷加重、高危斑块特征及心血管事件风险增高;相反,抑制巨噬细胞的糖酵解代谢可减少新斑块形成,提高斑块稳定性,降低心血管风险事件的发生率[14]。因此,通过调节巨噬细胞的代谢途径,特别是抑制糖酵解代谢,可以有效降低新斑块的形成,增加现有斑块的稳定性,从而减少心血管事件的发生,巨噬细胞的代谢调节为治疗 CHD 提供了一种潜在的策略。

2 巨噬细胞在 CHD 痰瘀互结证的病理特征及其代谢机制

CHD 在中医中常归类为“胸痹心痛”或“真心痛”,痰瘀互结证是 CHD 最主要的实证,巨噬细胞的能量代谢异常在 CHD 痰瘀互结证中不仅表现为“痰”的代谢紊乱与促炎、促“瘀”的病理过程,而且通过它们的免疫调节功能影响疾病的长期进展和临床表现,为中医“痰瘀互结”病机理论与现代医学病理学之间构建了重要的联系。

2.1 痰瘀互结证的中医理解与现代医学表现

CHD 属“胸痹心痛、真心痛”等病的范畴,而痰瘀互结证是其最主要的实证。传统医学认为,“痰瘀互结”是一个描述痰浊、血瘀相互作用和相互促进的病理状态的术语。《景岳全书痰饮》言:“痰涎本皆血气,若化失其正,则脏腑病,津液败,而血气即成痰涎。”痰湿源自饮食水谷,因转化不当,积聚于体内,其重浊粘稠的特性易于阻滞气血经脉,使得血液循环受阻,形成血瘀。血瘀又会进一步妨碍气血的运行,加重了痰湿的积累,痰瘀互相促进,形成一个恶性循环,从而导致疾病的发生。基于全国 21 个省市自治区的 40 家医院调查发现,8129 例冠心病患者中,血瘀和痰浊是最常见的实性证素,并且实性证素(如血瘀和痰浊)的严重程度高于虚性证素(如气虚和阴虚),显示出“实重于虚”的特点[15]。越来越多的 CHD 患者呈现痰瘀互结的特点,CHD 的病机也已从“阳微阴弦”演变为痰瘀互生互衍的状态[16-17]。痰浊与瘀血既是 CHD 的病理结果[18],也是致病因素,二者可相互促进,相互发展,痰浊致瘀,瘀血生痰,痰瘀互结贯穿 CHD 始终并成为重要病机。

临床研究发现,CHD 痰证患者出现了更高的血脂表达水平,提示脂质代谢紊乱是“痰”证的关键[19]。而血瘀证患者的凝血系统活性增高,且血栓形成较多[20-21],表明凝血因子的异常、血小板的活化和血液流变学异常可视为“瘀”的表现。脂质代谢异常可刺激血管内皮细胞,引发炎症反应,基础炎症因子的相互作用增高血粘稠度,导致血液流动受阻,血流动力学的改变使更多脂质沉积在血管内壁,进而募集更多的免疫细胞与受损的内皮细胞一起形成血栓、斑块,堵塞血管,造成心肌缺血、心绞痛的出现[22]。因此,痰瘀互结不仅在中医理论中占据重要地位,也在现代医学中表现为脂质代谢异常、血液流变学异常、凝血系统的活性增高,以及炎症因子的释放等病理现象。痰浊与血瘀相互作用,不仅促进了病理状态的形成,也为冠心病等疾病的防治提供了重要的理论基础和治疗靶点。

2.2 痰瘀互结证的巨噬细胞能量代谢特征及临床表现

痰瘀互结证的复杂性涉及到“痰”和“瘀血”在心脉的相互作用,这种相互作用不仅导致局部微环境的失衡,还促进了疾病进程中的脂质沉积、血液循环障碍等多个生物学机制的激活。在这一背景下,巨噬细胞的能量代谢特征尤其重要,尤其是在促炎的 M1 型与抗炎的 M2 型巨噬细胞中的代谢活动差异,如图 1 所示。这些差异性体现了巨噬细胞如何通过其代谢途径影响疾病的发展与治疗。

2.2.1 M1 型巨噬细胞

M1 型巨噬细胞是在 Th1 细胞因子如 γ-干扰素(interferon-γ,IFN-γ)的影响下激活的,通常与促炎反应相关。M1 巨噬细胞的能量代谢主要依赖于糖酵解过程,即使在氧气充足的情况下,也倾向于进行无氧糖酵解,这种现象称为“Warburg 效应”。无氧糖酵解能快速提供能量,支持其炎症介质的产生和释放,还能使巨噬细胞能更有效地吞噬脂质,造

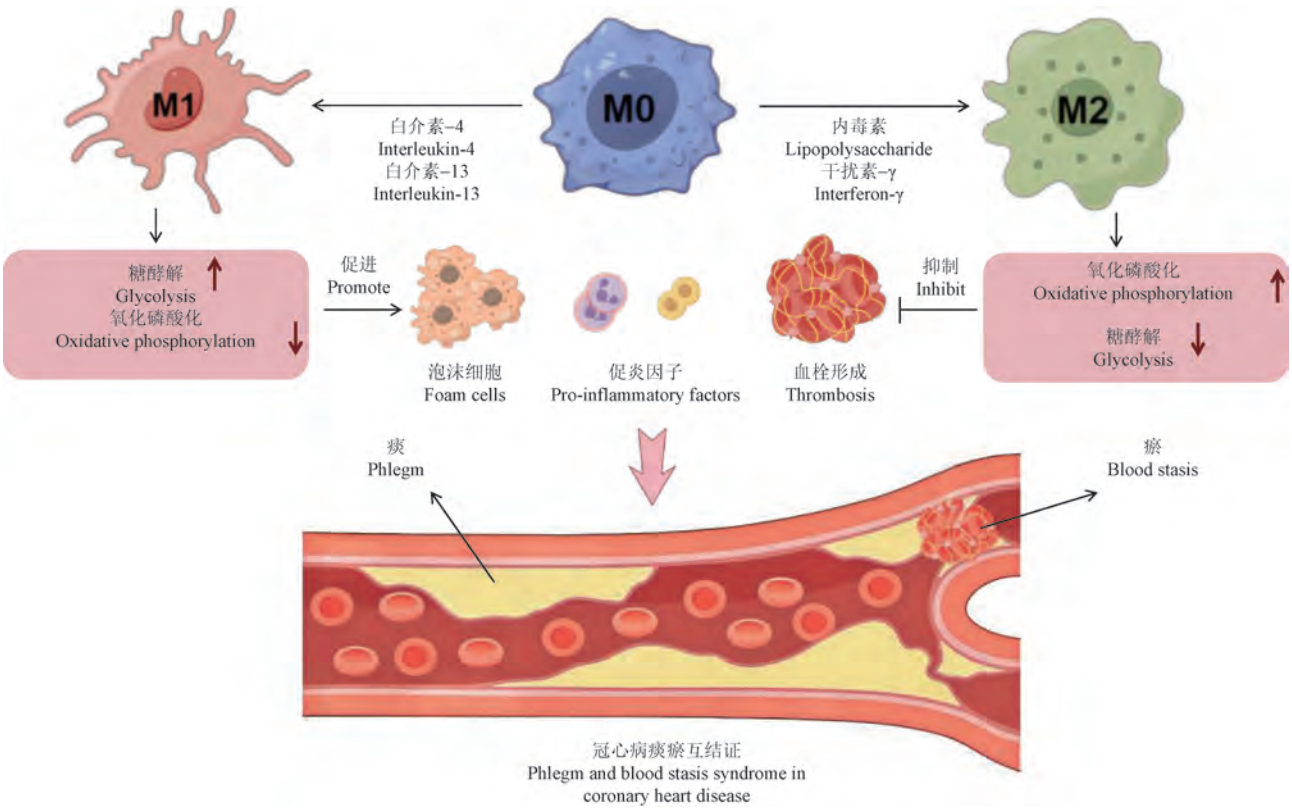


图 1 CHD 痰瘀互结证中的巨噬细胞能量代谢特征

Figure 1 Characteristics of macrophage energy metabolism in phlegmand blood stasis syndrome of coronary heart disease (CHD)

成细胞内脂质的积累[23]。这些促炎介质和脂质沉积在 CHD 痰瘀互结证中加剧动脉斑块发生发展,促进“血瘀”和“痰浊”的形成。动物实验揭示,当巨噬细胞糖酵解代谢增加时,M1 型巨噬细胞和泡沫细胞明显增多,促炎因子的表达增高,导致动脉粥样硬化模型小鼠的主动脉斑块面积显著扩大,并伴随更多病变组织的出现[12]。研究发现,M1 型巨噬细胞的有氧糖酵解增加,促进促炎细胞因子(如 TNF-α 和 IL-1β)的释放,可增加血管内皮的通透性,导致更多炎症细胞(包括血小板和白细胞)的吸附和渗透。同时,促炎细胞因子如 TNF-α 和 IL-1β 可直接作用于血小板,增加其活化和聚集,加剧了血液流变学的改变,从而增加了急性冠脉综合症和其他血栓性事件的风险[24]。此外,糖酵解过程支持 M1 型巨噬细胞释放基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)的亚型 MMP-1、MMP-3 和 MMP-9,这可能导致斑块纤维帽内的胶原纤维被分解,从而引起斑块的不稳定[13]。临床研究表明,巨噬细胞向糖酵解代谢增强会促进泡沫细胞形成,使患者冠状动脉粥样硬化负荷加重、高危斑块特征及心血管事件风险增高;相反,抑制巨噬细胞的糖酵解代谢可减少新斑块形成,提高斑块稳定性,降低心血管风险事件的发生率[14]。事实上,动脉斑块中 M1、M2 型巨噬细胞数量均较外周正常组织明显增多,稳定斑块中以 M2 型为主,而不稳定斑块中以 M1 型居多,其分布于内膜易破裂的肩部区,释放更多促炎因子,加剧炎症反应,导致斑块破裂出血和血栓形成[25]。总之,M1 型巨噬细胞与动脉粥样硬化中的炎症过程密切相关。它们通过释放各种炎症介质促进脂质在泡沫细胞中的积累,加速斑块形成。M1 型的促炎表型与脂质负荷状态相关,这种状态有助于斑块的不稳定性。

2.2.2 M2 型巨噬细胞

M2 巨噬细胞是免疫系统中的一种反炎和组织修复型巨噬细胞,与 M1 型巨噬细胞倾向于进行糖酵解不同,M2 型巨噬细胞通过更有效率的 OXPHOS 过程来产生能量,这有助于支持它们在组织修复和抗炎反应的长期活动。研究发现,增强 OXPHOS 后,M2 型巨噬细胞能够更有效地进行抗炎介质(如 IL-10)的合成和分泌,这有助于缓解心肌缺血后的

炎症状态。同时,这些抗炎因子还能改善局部微环境,促进心肌细胞的存活和心脏功能的恢复[26]。FAO 是 M2 型巨噬细胞 OXPHOS 的主要形式之一,M2 型巨噬细胞通过增强 FAO,能够激活胆固醇运出途径,如 ATP 结合盒转运蛋白 A1 和 ATP 结合盒转运蛋白 G1,这有助于降低巨噬细胞内的胆固醇负荷,减少泡沫细胞的形成,从而抑制动脉粥样硬化斑块的发展[27]。另外,M2 型巨噬细胞还可以通过 FAO 激活产生大量的抗炎因子(如 IL-10 和 TGF-β),这些细胞因子不仅具有抗炎作用,还能促进胶原蛋白的合成和沉积,有助于加强斑块内的细胞外基质结构。这种加固作用可以减少斑块的脆弱性,防止斑块破裂,从而维持斑块的整体稳定性[28]。相反,CHD 痰瘀互结证中巨噬细胞的促炎活化,抑制了 FAO,导致脂质代谢紊乱和持续性炎症反应,并对血管功能和血液流变学指标造成不利影响[29]。进一步的研究表明,M2 型巨噬细胞在斑块早期出现,其内的 FAO 和 OXPHOS 活性急剧提升,并展示出较高的吞噬功能。随着病变环境的改变,细胞代谢方式随之转变,FAO 能力的丧失导致其向 M1 极化并促进动脉粥样硬化斑块进展[30]。相反,促进巨噬细胞的 M2 型极化,可降低 CHD 小鼠血脂水平,抑制炎症反应,并诱导斑块消退[31]。因此,使 M1 型细胞的代谢方式转变为 M2 型方式,可能使 M1 巨噬细胞恢复原始 M2 表型的特征,有利于逆转 CHD 病变。

3 巨噬细胞能量代谢在 CHD 痰瘀互结证中的治疗作用

在 CHD 痰瘀互结证的治疗中,巨噬细胞的能量代谢调节发挥着关键作用。通过调控巨噬细胞从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型的转变,不仅可以减轻炎症和改善血液循环,而且还有助于增加动脉粥样硬化斑块的稳定性,减少心脏事件的风险。

3.1 CHD 痰瘀互结证的诊疗现状

传统医学在 CHD 痰瘀互结证的诊断过程中,重视通过患者的症状和舌象进行辨证。在符合 CHD 基本诊断的条件下,主要依据病人的临床症状和体征进行辩证,如胸闷、胸痛、咳痰、脉弦或滑等[32]。此外,舌象(如舌质暗、舌下静脉曲张等)能够进一步确认痰瘀互结证的诊断。研究发现,相对于 CHD 血瘀证患者,痰瘀互结证患者的舌色可能呈现较浅的青紫色,舌苔颜色偏向更为浅淡光亮的青黄色[33],这些舌象特征揭示了“痰”和“血瘀”在体内的互相作用及其对气血流通的影响。除中医诊断方法外,现代医学还采用血液检测、心脏超声和冠状动脉造影等技术来确认冠状动脉疾病的存在及其严重性。这些方法有助于识别动脉中的物理阻塞和心脏的整体功能[34]。

根据 CHD 中医证候临床流行病学调查发现,CHD 患者的痰瘀互结证的比例随病程的发展呈现逐渐增加的趋势,且与随着病程进展和严重程度呈正相关,病情越重,证候特征愈发明显。该证候在老年及男性患者中更为普遍,且不同地区的流行程度存在差异,这些差异可能与生活习惯和饮食文化相关[16]。因此,中医治疗主要通过使用活血化瘀、化痰散结的中药方剂(如瓜蒌薤白半夏汤、血府逐瘀汤等)及针灸、推拿等方法,调整体内气血运行,清除痰瘀,以缓解心脏病症[35]。现代医学对 CHD 的治疗主要包括药物治疗(如抗血小板药物、降脂药物等)、外科手术(如冠状动脉旁路移植或经皮冠状动脉介入治疗),以及生活方式的调整(如戒烟、合理饮食、适量运动等)[32]。此外,现代临床治疗策略也趋向于结合中医药治疗原则与西医治疗手段,如在药物治疗方面,除了传统中药外,也包括中成药的使用,例如丹蒌片因其效果显著而被频繁使用[35]。这种综合治疗方法有助于改善患者的心血管功能,减轻病症。目前,对 CHD 痰瘀互结证更深入的理解的研究仍在进行中,基因组学和生物标志物研究的进展开始影响 CHD 及其中医证型如痰瘀互结证的治疗方式。此外,还需要更多的临床研究来验证各种治疗方法的效果,以及它们在不同类型和阶段的 CHD 患者中的适用性和安全性[36]。

3.2 巨噬细胞能量代谢调节治疗痰瘀互结证的机制与潜力

在针对 CHD 痰瘀互结证的治疗策略中,调整巨噬细胞的能量代谢路径已成为关注的焦点。这类治疗手段可能涉及应用药物或小分子抑制剂,靶向特定的代谢通道。例如,通过抑制糖酵解路径可以降低促炎 M1 型巨噬细胞的活性,或通过促进 OXPHOS 增强抗炎 M2 型巨噬细胞的功能[37-38]。同时,对缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)、雷帕霉素靶点蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)以及磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt)等关键信号通路的调节也被视为有效的治疗途径。其中,PI3K/Akt 通路通过促

进 mTOR/HIF-1α 轴的活化,推动巨噬细胞代谢向糖酵解倾斜,进一步影响 M1 型极化[39-40]。除此之外,利用代谢产物或其拮抗剂,如乳酸或乳酸的拮抗剂,来调节巨噬细胞的代谢状态及其免疫功能,亦是探索中的治疗方法[41]。

巨噬细胞的能量代谢过程与氧化应激的应对、脂质代谢的调控及细胞因子与化学因子的生成紧密相关,这些要素共同作用于“痰、瘀”等病邪的生成、交互作用以及其转化过程中的虚实变化。通过改变巨噬细胞的代谢模式,调整其激活状态和免疫功能,可以有效降低促炎细胞因子的释放,纠正脂质代谢的失衡,促使斑块稳定,从而抑制痰瘀相结的现象,延缓 CHD 的发展。

4 小结

CHD 在中医学中被视为“胸痹心痛”“真心痛”等疾病,其中代谢异常和炎症反应是“痰、瘀”现象的关键表现,这些病理特征在疾病的整个过程中起着核心作用。近年来,研究发现巨噬细胞的能量代谢异常是导致血液循环障碍、代谢紊乱和炎症反应的重要因素,这一发现为理解 CHD 的病理机制提供了新的视角。这不仅有助于深入理解 CHD 的发病机制,也为开发新的治疗策略提供了理论基础和临床指导。本综述阐述了巨噬细胞在 CHD 的背景下,代谢变化及其对免疫功能的影响,即促炎的 M1 型和抗炎的 M2 型巨噬细胞展现出不同的代谢特征,以及不同代谢方式对巨噬细胞免疫功能的调节作用。这些发现强调了代谢途径在调节巨噬细胞功能和炎症反应和代谢异常中的核心作用,有助于更好地理解 CHD 痰瘀互结证病理机制,为疾病的早期诊断和预后评估提供新的生物标志物。

目前,巨噬细胞能量代谢研究的局限性主要在于其复杂性和多变性,以及目前对其精确调控机制的理解尚不完全。巨噬细胞在不同组织环境和疾病状态下展现出高度的可塑性和代谢多样性,这使得理解和操纵其代谢途径变得复杂。此外,目前的研究多集中在体外实验和动物模型上,其结果可能无法完全适用于人类。对于临床应用而言,如何精确调节巨噬细胞的代谢状态,同时避免影响正常免疫功能和产生不良反应,是一个重要挑战。未来的展望包括更深入地理解巨噬细胞在不同病理条件下的代谢特性,开发更为精确和安全的代谢调节策略,以及将这些研究成果转化为有效的临床治疗方法。此外,结合代谢组学、转录组学和蛋白质组学等多组学方法,可以更全面地揭示巨噬细胞代谢调控的网络,为发现新的治疗靶点和策略提供更多可能。

参考文献:

[1] GUDMUNDSSON E F, BJÖRNSDOTTIR G, SIGURDSSON S, et al. Carotid plaque is strongly associated with coronary artery calcium and predicts incident coronary heart disease in a population-based cohort [J]. Atherosclerosis, 2022, 346: 117-123.

[2] COLLINS S L, OH M H, SUN I H, et al. mTORC1 signaling regulates proinflammatory macrophage function and metabolism [J]. J Immunol, 2021, 207(3): 913-922.

[3] NOTTI R Q, YI F, HEISSEL S, et al. The resting state of the human T-cell receptor [J]. bioRxiv, 2023, 8(554360): 1-53.

[4] WANG W, ZHENG F, LIN C, et al. Changes in energy metabolism and macrophage polarization: Potential mechanisms of arsenic-induced lung injury [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 204: 110948.

[5] MENG M, CAO Y, ZHANG Y, et al. HnRNPA2B1 aggravates inflammation by promoting M1 macrophage polarization [J]. Nutrients, 2023, 15(7): 1555.

[6] GUNASSEKARAN G R, POONGKAVITHAI VADEVOO S M, BAEK M C, et al. M1 macrophage exosomes engineered to foster M1 polarization and target the IL-4 receptor inhibit tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages into M1-like macrophages [J]. Biomaterials, 2021, 278: 121137.

[7] CHEN C, TANG Y, ZHU X, et al. P311 promotes IL-4 receptor-mediated M2 polarization of macrophages to enhance angiogenesis for efficient skin wound healing [J]. J Invest Dermatol, 2023, 143(4): 648-660. e6.

[8] LV Q, XING Y, LIU Y, et al. Didymin switches M1-like toward M2-like macrophage to ameliorate ulcerative colitis via fatty acid oxidation [J]. Pharmacol Res, 2021, 169: 105613.

[9] HINSHAW D C, HANNA A, LAMA-SHERPA T, et al. Hedgehog signaling regulates metabolism and polarization of mammary tumor-associated macrophages [J]. Cancer Res, 2021, 81(21): 5425-5437.

[10] LI L, MOU J, HAN Y, et al. Calenduloside e modulates macrophage polarization via KLF2-regulated glycolysis, contributing to attenuates atherosclerosis [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 117: 109730.

[11] KING S D, CAI D, FRAUNFELDER M M, et al. Surfactant protein A promotes atherosclerosis through mediating macrophage foam cell formation [J]. bioRxiv, 2023: 2023.03.23.533959.

[12] ZHANG L, LI L, LI Y, et al. Disruption of COMMD1 accelerates diabetic atherosclerosis by promoting glycolysis [J]. Diab Vasc Dis Res, 2023, 20(1): 14791641231159009.

[13] LIN C. Early diagnosis and treatment of coronary heart disease with image features of optical coherence tomography under adaptive segmentation algorithm [J]. Comput Math Methods Med, 2022, 2022: 1261259.

[14] KARPOUZAS G A, PAPOTTI B, ORMSETH S, et al. Serum cholesterol loading capacity on macrophages is linked to coronary atherosclerosis and cardiovascular event risk in rheumatoid arthritis [J]. RMD Open, 2022, 8(2): e002411.

[15] 毕颖斐, 王贤良, 赵志强, 等. 冠心病现代中医证候特征的临床流行病学调查 [J]. 中医杂志, 2017, 58(23): 2013-2019.
BI Y F, WANG X L, ZHAO Z Q, et al. Clinical epidemiological investigation on current syndrome characteristics of coronary heart disease in Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 58(23): 2013-2019.

[16] 王传池, 许伟明, 江丽杰, 等. 11 383 例健康人群及冠心病不同阶段患者痰瘀互结证分布规律的多中心横断面研究 [J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 494-504.
WANG C C, XU W M, JIANG L J, et al. Distribution of phlegm and stasis binding pattern in healthy subjects and all stages of coronary heart disease: a multi-centered, cross-sectional study of 11 383 cases [J]. J Tradit Chin Med, 2021, 62(6): 494-504.

[17] 王传池, 吴珊, 江丽杰, 等. 1990—2020 年我国冠心病中医证的流行病学调查研究概况 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(12): 1883-1893.
WANG C C, WU S, JIANG L J, et al. Research situation of traditional Chinese medicine clinical epidemiological investigation of coronary heart disease in China from 1990 to 2020 [J]. J Basic Chin Med, 2020, 26(12): 1883-1893.

[18] 钟森杰, 李静, 王陵军, 等. 基于痰瘀相关理论探讨冠心病脂质浸润机制及痰瘀同治的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1431-1437.
ZHONG S J, LI J, WANG L J, et al. Research advances in mechanism of lipid infiltration of coronary heart disease and simultaneous treatment of phlegm and blood stasis based on phlegm-blood stasis correlation theory [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(6): 1431-1437.

[19] 周秀莉, 苏文, 崔天盆, 等. 不同性别冠心病患者体质与脂质代谢异常关系研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2804-2806.
ZHOU X L, SU W, CUI T P, et al. Study on the relationship between constitution and abnormal lipid metabolism in patients with coronary heart disease of different sexes [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(11): 2804-2806.

[20] 张省委, 梁倩倩, 寿好长, 等. 冠心病血瘀证患者凝血检验指标分析 [J]. 北京中医药, 2021, 40(12): 1379-1380.
ZHANG S W, LIANG Q Q, SHOU H C, et al. Analysis of coagulation indexes in patients with coronary heart disease of blood stasis syndrome [J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2021, 40(12): 1379-1380.

[21] 孟昊, 周琦, 刘红旭, 等. 血小板小微粒在冠心病血瘀证中的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5500-5503.
MENG H, ZHOU Q, LIU H X, et al. Study on small platelet microparticles in blood-stasis syndrome of coronary heart disease [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(9): 5500-5503.

[22] SALAZAR J, PIRELA D, NAVA M, et al. Specialized proresolving lipid mediators: a potential therapeutic target for atherosclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6): 3133.

[23] MERKLEY S D, MOSS H C, GOODFELLOW S M, et al. Polystyrene microplastics induce an immunometabolic active state in macrophages [J]. Cell Biol Toxicol, 2022, 38(1): 31-41.

[24] SUKKAR S G, BASSETTI M. Induction of ketosis as a potential therapeutic option to limit hyperglycemia and prevent cytokine storm in COVID-19 [J]. Nutrition, 2020, 79/80: 110967.

[25] CHEN Z, ZHUO R, ZHAO Y, et al. Oleoylethanolamide stabilizes atherosclerotic plaque through regulating macrophage polarization via AMPK-PPARα pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 524(2): 308-316.

[26] YANG Y, JOHNSON J, TROUPES C D, et al. MiR-182/183-Rasa1 axis induced macrophage polarization and redox regulation promotes repair after ischemic cardiac injury [J]. Redox Biol, 2023, 67: 102909.

[27] Mei J, Xu F Q, Zhou Q B, et al. Tetramethylpyrazine and paeoniflorin synergistically attenuate cholesterol efflux in macrophage cells via enhancing ABCA1 and ABCG1 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022(1): 1-8.

[28] SHI W, HUANG Y, YANG Z, et al. Reduction of TMAO level enhances the stability of carotid atherosclerotic plaque through promoting macrophage M2 polarization and efferocytosis [J]. Biosci Rep, 2021, 41(6): BSR20204250.

[29] YANG G, LIU C, LIU L C, et al. Mechanisms of traditional Chinese medicine formulas and active ingredients in regulation of macrophage subsets involved in inflammation and repair of coronary heart disease [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(12): 3255-3262.

[30] SHEN L, CHEN W, DING J, et al. The role of metabolic reprogramming of oxygen-induced macrophages in the dynamic changes of atherosclerotic plaques [J]. FASEB J, 2023, 37(3): e22791.

[31] HUANG H, SUN Z, XU J, et al. Yang-Xin-Shu-Mai granule alleviates atherosclerosis by regulating macrophage polarization via the TLR9/MyD88/NF-κB signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116868.

[32] 胡镜清. 痰瘀互结证新论 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(1): 12-13, 115.
HU J Q. New discussion on phlegm and blood stasis syndrome [J]. J Basic Chin Med, 2023, 29(1): 12-13, 115.

[33] 陈聪, 洪静, 宋雪阳, 等. 冠心病痰瘀互结证舌诊图像特征

参数分析[J]. 中医杂志, 2019, 60(16): 1395-1400.
CHEN C, HONG J, SONG X Y, et al. Analysis of image characteristic parameters of tongue diagnosis of coronary heart disease with phlegm and blood stasis syndrome [J]. China J Chin Mater Med, 2019, 60(16): 1395-1400.

[34] LIU R, JIANG L J, YANG Y, et al. Study on syndrome differentiation strategy of phlegm and blood stasis syndromes of coronary heart disease based on expert consultation on medical cases [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(9): 9940-9952.

[35] 吴珊, 王传池, 林明欣, 等. 近 30 年中医药治疗冠心病痰瘀互结证用药概况分析[J]. 中医杂志, 2022, 63(17): 1685-1690.
WU S, WANG C C, LIN M X, et al. Analysis of the medications in treating coronary heart disease with binding of phlegm and stasis syn-drome by traditional Chinese medicine in recent 30 years [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(17): 1685-1690.

[36] 李增, 张明雪. 精准医学背景下冠心病痰瘀互结证辨治研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(9): 38-42.
LI Z, ZHANG M X. Research progress on syndrome differentiation and treatment of phlegm and blood stasis syndrome of coronary heart disease under the background of precision medicine [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2022, 24(9): 38-42.

[37] 刘继军, 于林君, 王博, 等. 沙格列汀激活 AMPK-PPARα 途径促进巨噬细胞向 M2 型极化减轻动脉粥样硬化的作用研究[J]. 实用药物与临床, 2022, 25(4): 295-301.
LIU J J, YU L J, WANG B, et al. Saxagliptin activating the AMPK-PPAR α pathway to promote M2 polarization ofmacrophages to reduce atherosclerosis [J]. Pract Pharm Clin Remedies, 2022, 25(4): 295-301.

[38] 钟耕瑞, 付萌萌, 王小波, 等. Pim1 调控巨噬细胞 M1 型极化介导血管内皮细胞炎症在 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(12): 2113-2121.
ZHONG G R, FU M M, WANG X B, et al. Role of Pim1 in regulating M1 macrophage polarization and vascular en? dothelial inflammation in atherosclerosis of $ApoE^{-/-}$ mice [J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(12): 2113-2121.

[39] 陈卓, 林城, 张换换, 等. 紫草素通过 HSP90/PKM2/HIF-1α 介导脂多糖诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症反应[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(6): 800-807.
CHEN Z, LIN C, ZHANG H H, et al. Shikonin mediates lipopolysaccharide-induced inflammatory response of $RAW_{264.7}$ macrophages by HSP90/PKM2/HIF-1α [J]. J Shanxi Med Univ, 2023, 54(6): 800-807.

[40] 马佳睿, 徐芳芷, 左惠演, 等. PI3K/AKT 通过激活糖酵解促进巨噬细胞 M1 极化[J]. 中国心血管杂志, 2023, 28(2): 145-151.
MA J R, XU F Z, ZUO H Y, et al. PI3K/AKT promotes M1 polarization of macrophages by activating glycolysis [J]. Chin J Cardiovasc Med, 2023, 28(2): 145-151.

[41] 杨颖颖, 黄瑾, 刘新宇, 等. 乳酸调控小鼠巨噬细胞 M2 型极化的关键靶点分子筛选[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10): 2041-2048.
YANG Y Y, HUANG J, LIU X Y, et al. Screening of key target molecules for lactic acid regulation of M2-type polarization of mouse macrophages [J]. Chin J Immunol, 2023, 39(10): 2041-2048.

〔收稿日期〕2024-04-18

吴晓婷,轩昂,沈娟. 线粒体损伤在炎症性肠病中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 165-171.
Wu XT, Xuan A, Shen J. Research progress on the role of mitochondrial damage in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 165-171.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.019

线粒体损伤在炎症性肠病中的研究进展

吴晓婷,轩　昂,沈　娟*

(广东药科大学,广东省药物生物活性物质重点实验室,广州　510006)

【摘要】 炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一种严重危害人类健康的慢性复发性肠道炎症疾病。其发病机制尚不明确,可能涉及遗传、免疫和环境等多种因素。近年来,越来越多的研究表明线粒体损伤与功能异常在 IBD 的发生发展中发挥着重要作用。本综述对炎症性肠病中线粒体损伤的相关研究进行了全面回顾和梳理,重点探讨线粒体氧化应激损伤、自噬功能障碍、动力学紊乱、呼吸功能缺陷对 IBD 的影响,尝试寻找其潜在治疗靶点,旨在为 IBD 的科学防治提供新依据。

【关键词】 炎症性肠病;线粒体;损伤;功能障碍
【中图分类号】 R-33　**【文献标识码】** A　**【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0165-07

Research progress on the role of mitochondrial damage in inflammatory bowel disease

WU Xiaoting, XUAN Ang, SHEN Juan*
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic and relapsing inflammatory disorder of the gastrointestinal tract that poses a significant threat to human health. The pathogenesis of IBD remains unclear and is believed to involve various factors, including genetics, immune dysregulation, and environmental triggers. Recent evidence has highlighted the role of mitochondrial damage and dysfunction in the development of IBD. This article provides a comprehensive review and overview of studies related to the role of mitochondrial damage in IBD, focusing on the effects of mitochondrial oxidative stress damage, autophagy dysfunction, kinetic disturbances, and respiratory defects. The aim is to identify potential therapeutic targets and provide new insights for the scientific prevention and treatment of IBD.

【Keywords】 inflammatory bowel disease; mitochondria; impairment; dysfunction
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一组以慢性复发性肠道炎症为特征的疾病,包括克罗恩病(Crohn's disease,CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)。其病理特征主要表现为肠道粘膜对多种炎症因子出现异常反应,从而导致肠上皮炎性浸润和坏死[1]。据统计,欧美等发达国家 IBD 的发病率已经超过了 0.3%,同时发展中国家的 IBD 发病率也呈现逐年升高的趋势[2]。IBD 不仅会

[基金项目]2023 年广东省自然科学基金-面上项目(2023A1515011931)。
[作者简介]吴晓婷(1997—),女,硕士研究生,研究方向:代谢病和炎症性疾病的临床研究和治疗。E-mail:wuxting56@163.com
[通信作者]沈娟(1981—),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:代谢病和炎症性疾病的临床研究和治疗。
E-mail:Shenjuan0412@126.com

降低病人的生活质量,同时也会给全球的医疗体系带来沉重的财政负担[3]。当前,针对 IBD 的治疗以药物为主,手术为辅。药物治疗以控制病情,减轻炎症反应,改善肠道功能为主要目标,手术适用于肠道狭窄、出血、肠穿孔等严重患者[4]。然而,现阶段尚无根治 IBD 的方法。此外,其发病机制尚未完全明确,可能与免疫异常、基因遗传、肠道感染、环境变化等多种因素有关[5]。因此,深入研究 IBD 的病理作用机制,发现新的干预策略和治疗靶点,有望为 IBD 的治疗开辟新途径。

越来越多的研究表明,线粒体损伤与 IBD 的发生发展密切相关,两者间存在复杂且多元的关系,包括能量代谢障碍、炎症反应和肠道微生物失衡等,这表明调控线粒体功能可能成为 IBD 治疗的重要策略[6]。因此,本综述首次尝试从线粒体氧化应激损伤、自噬功能障碍、动力学紊乱、呼吸功能缺陷等方面,系统阐述 IBD 中线粒体损伤的分子机制,旨在完善 IBD 的防治方案。

1 线粒体概述

1.1 线粒体结构和功能

线粒体是一种由外膜、内膜、基质及特殊 DNA 等组成的细胞器,对维持细胞的正常生理功能起着至关重要的作用。线粒体除了合成 5'-三磷酸腺苷(adenosine 5'-triphosphate,ATP)外,还参与细胞内 Ca^{2+} 信号传导、应激和代谢信号转导、细胞凋亡诱导以及其他代谢反应[7]。线粒体外膜(outer mitochondrial membrane,OMM)和线粒体内膜(inner mitochondrial membrane,IMM)均由双层磷脂分子构成。OMM 为线粒体内含物与胞浆隔离提供保障,小分子和离子可以自由地通过孔道进入线粒体,而大分子物质必须通过膜转运体才能实现跨膜转运。IMM 上不仅存在驱动 ATP 生成的电子传递链复合物(electron transport chain,ETC),还存在内膜转位酶(translocase of the inner membrane,TIMs),负责向线粒体基质运输离子、蛋白等,形成蛋白浓度梯度,驱动电子传递链,维持线粒体正常功能。IMM 的褶皱叫做嵴,这些嵴增加了为细胞提供能量所需的 ATP 生成表面积。线粒体的基质位于 IMM 内部,基质中含有多种酶及蛋白质,参与线粒体的氧化磷酸化、脂肪酸氧化等多种代谢过程[8]。线粒体还参与其他多种代谢过程,如合成细胞膜的组成部分、维护细胞结构的稳定、氨基酸代谢、核苷酸代谢等。线粒体 DNA(mito-chondrial DNA,mtDNA)负责编码一些线粒体所需的蛋白质,对线粒体的功能和自我复制具有重要作用,保证线粒体的遗传信息得以准确复制。而且许多疾病如炎症性疾病、衰老等相关症状,都与 mtDNA 损伤或突变密切相关[9]。深入研究 mtDNA 的编码机制和功能,有助于揭示生命活动的奥秘,并为疾病防治提供新思路。

1.2 线粒体损伤类型

线粒体在细胞内发挥着重要的生理作用,其损伤或功能异常可影响细胞及机体的能量代谢,并与炎性疾病的发生发展密切相关。线粒体损伤主要包括线粒体氧化应激损伤、自噬异常、动力学紊乱(线粒体融合与分裂异常)和呼吸功能缺陷。线粒体功能异常又可进一步加剧线粒体损伤。线粒体是细胞氧化磷酸化和 ATP 生成的重要场所,同时也是活性氧(reactive oxygen species,ROS)产生的主要场所[10]。然而,当线粒体受到损伤时,会引发一系列复杂的反应,产生大量的 ROS。这些 ROS 会进一步加剧线粒体的损伤,形成一个恶性循环。这一过程涉及多种因素,如氧化应激、能量代谢紊乱等[11]。此外,虽然线粒体具有自我修复的能力,但在损伤严重时,ROS 过量生成,使线粒体的功能持续恶化,进一步影响细胞的能量代谢。ROS 是一种非常活跃的自由基,能与 DNA 分子发生反应,造成 DNA 断裂和氧化修饰等损伤,进而导致基因突变,激活多条信号通路促进细胞生长、侵袭和转移,抑制细胞凋亡,导致癌变[12]。同时,线粒体 ROS 可向细胞外释放,并参与炎症反应[13]。

线粒体自噬是细胞内一种自我清除损伤线粒体的机制,在维持细胞正常能量代谢方面发挥着重要作用。研究发现,线粒体自噬受 PTEN 诱导激酶 1(PTEN-induced putative kinase 1,Pink1)和 E3 泛素蛋白连接酶(Parkin)调节。在线粒体损伤时,Pink1 被整合到 OMM 中并招募胞质 Parkin,Parkin 介导线粒体运动受限,阻止线粒体融合,促进线粒体膜蛋白泛素化,启动线粒体溶酶体降解途径[14]。同时,线粒体功能异常(去极化、过度折叠蛋白、线粒体 ROS 蓄积)会刺激自噬受体介导线粒体进入自噬小体[13,15]。线粒体自噬功能异常可导致受损线粒体清除能力下降、堆积加剧,进一步加重损伤[14]。此外,线粒体通过融合和分裂来维持正常线粒体形态和细胞代谢,线粒体动力学紊乱可引起线粒体损伤,并影响细胞功能[16-17]。线粒体融合使线粒体可

以在一定压力下进行缓冲,弥补彼此之间的不足,从而产生功能正常的线粒体。研究发现,线粒体融合蛋白 1(mitofusin 1,MFN1)、MFN2 基因敲低会导致线粒体碎片化,进而影响线粒体功能[18-19]。视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy protein1, OPA1)基因敲除也可导致线粒体融合障碍和片段化[18]。线粒体分裂使受损的线粒体被运输至溶酶体,而健康的部分则会被重新整合到线粒体网络中。研究发现,动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1,DRP1)是线粒体分裂的主要调节因子[20]。DRP1 过表达加速线粒体分裂并导致大量线粒体碎片化,而敲除 DRP1 则会抑制线粒体分裂[14]。线粒体融合与分裂的稳态维持不仅是机体多种生理、病理修复活动的基础,也有助于细胞清除受损和功能失调的线粒体[21]。

线粒体呼吸功能障碍与线粒体损伤关系密切。线粒体作为细胞内的“能量工厂”,线粒体呼吸链的正常运作对于维持细胞生命活动至关重要。线粒体呼吸链,也称为电子传递链,是细胞将还原型辅酶 I(nicotinamide adenine dinucleotide,NADH)和黄素腺嘌呤二核苷酸递氢体(flavine adenine dinucleotide reduced,FADH2)彻底氧化生成水和 ATP 的连续传递链。在这一过程中,线粒体通过氧化磷酸化过程,将二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)转化为 ATP,为细胞提供所需的能量。当线粒体呼吸链功能异常(如 mtDNA 突变、线粒体膜蛋白缺陷等)时,会影响电子传递及质子泵的转运,导致 ATP 生成不足,造成细胞能量供应不足,进而影响细胞的正常代谢活动[22]。此外,线粒体呼吸链功能障碍会引发氧化应激反应。线粒体呼吸链受损时,电子传递过程受阻,电子泄露增加,导致 ROS 的生成增多,会进一步损伤线粒体结构和功能,形成恶性循环[23]。因此,深入研究线粒体呼吸功能障碍的机制和干预措施,对于维护细胞健康、预防和治疗相关疾病具有重要意义。

2 线粒体损伤在 IBD 中的作用

2.1 线粒体氧化应激损伤与 IBD

众多研究表明,线粒体氧化应激损伤在 IBD 的发生发展中起到关键作用。氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡,导致 ROS 产生过多,从而引发组织损伤和疾病[24]。在正常情况下,ROS 的产生和清除处于动态平衡状态,不会对细胞造成损伤。然而,在 IBD 动物模型的病变肠黏膜中,长期的氧化应激作用导致线粒体生物学功能和稳态失衡,进而引发 ROS 的产生显著增加,破坏了原有的平衡状态[13]。当 ROS 生成过多时,它们会攻击肠上皮细胞,导致细胞膜的损伤和功能的紊乱,加剧 IBD 中的炎症反应,进一步引起组织损伤[25]。另外,IBD 动物模型中的病变肠粘膜与固有层 ROS 生成增加,可促进巨噬细胞和中性粒细胞的进一步浸润,并导致过量炎症细胞因子的释放,从而导致持续的炎症反应[26]。此外,线粒体内的还原型辅酶 II(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,NADPH)对维持细胞氧化还原平衡至关重要。而异柠檬酸脱氢酶 2(isocitrate dehydrogenase 2,DH2)在此过程中起着关键作用,它能够促进线粒体内的烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸($NADP^+$)转化为 NADPH。自噬调节因子 Rubicon 作为 NADPH 氧化酶复合物的调节因子,在细胞自噬和炎症反应中也发挥着不可或缺的作用。一项针对 Rubicon 的研究深入探讨了线粒体 ROS 对炎症性肠病的影响[27]。该研究发现,在受到脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激后,Rubicon 能够与小鼠骨髓巨噬细胞的外膜线粒体(OMM)上的还原型辅酶叶绿醇发生相互作用。在这一过程中,ROS 的水平会上升,同时线粒体复合体 III 的亚基表达会出现下调,这表明线粒体活性下降。这一发现为我们更深入地理解线粒体 ROS 在 IBD 中的作用提供了新的视角。

在 IBD 患者体内,由于肠道炎症的持续存在,ROS 产生增加,导致肠道黏膜细胞受损,进一步加剧炎症反应。因此,抗氧化治疗成为 IBD 治疗的重要手段之一。研究表明,抗氧化剂能够减轻 IBD 长期氧化应激导致的肠道黏膜损伤,抑制炎症反应,从而改善 IBD 患者的病情[28-29]。Dashdorj 等[30]发现线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 可降低白细胞介素 1β(interleukin 1β, IL-1β)、IL-18 的释放,抑制 NLRP3 炎性小体活化,保护线粒体结构,减轻氧化应激,改善 DSS 诱导的肠炎。此外,有研究发现,抗氧化剂 Mito-TEMPO 同样能够有效改善线粒体的氧化应激损伤[31-32]。据 Alula 等[27]的研究结果显示,经过 Mito-TEMPO 治疗后,不仅能够显著减轻氧化应激的程度,还能够使 IL-17/IL-23 的表达水平以及脂代谢和凋亡相关基因的表达恢复到正常状态。这些发现为线粒体氧化应激损伤的治疗提供了新思路。另有研究发现,在 CD 患者的活动性病变中,

氧化应激的蛋白质产物富集与内质网应激标志物,如葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78,GRP78)、转录因子 C/EBP 的同源蛋白 CHOP 和肌醇酶 1α(inositol-requiring enzyme 1α,IRE1α)呈正相关,说明内质网应激导致内质网-线粒体相关膜(mitochondria-associated membranes,MAM)的改变和线粒体损伤[33]。氧化应激在 IBD 的发病过程中具有重要影响,使用抗氧化剂和抗炎药物可以有效缓解炎症反应,深入了解氧化应激机制将有助于发掘更具针对性的治疗策略。

2.2 线粒体自噬功能障碍与 IBD

线粒体自噬与 IBD 关系密切,肠上皮细胞的线粒体自噬失调是肠道免疫功能障碍的主要诱因,进而导致严重氧化应激反应及肠道炎症[19]。过度刺激或基因突变可能是线粒体自噬失调的诱发因素,导致线粒体自噬相关蛋白的功能异常,进而影响细胞的能量供应和代谢,最终使肠上皮通透性增加,引发炎症反应。研究发现,免疫相关鸟苷三磷酸酶 M 蛋白(immune-related guanosine triphosphatase M protein,IRGM/Irgm1)和自噬相关基因 16 样蛋白 1(autophagy-related 16-like 1,ATG16L1)是自噬机制的关键分子,其基因多态性与 IBD 的发生和发展密切相关。Singh 等[34]发现 IRGM 蛋白可能存在于线粒体内膜或基质中,细胞 IRGM 基因敲除后,线粒体异常伸长,导致线粒体分裂和自噬功能障碍。另外敲除 ATG16L1 基因的小鼠结肠样本中嵴结构缺失、透明度增加和肿胀、圆形外观的异常线粒体数量也明显增多,并且伴随 ROS 水平升高[35]。这些研究表明 IRGM/Irgm1 和 ATG16L1 基因的敲除会导致线粒体自噬功能异常,使细胞无法有效地清除受损或老化的线粒体。这种情况会进一步引起 ROS 生成增多,从而增加个体罹患炎症性肠病的风险。

此外,近年来发现的 Nix 蛋白是属于 Bcl-2 家族中的 BH3-only 促凋亡蛋白,与线粒体自噬机制密切相关。Nix 与微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,MAP1LC3)结合,诱导线粒体自噬,维持细胞稳态。研究发现,在 Nix 与细胞色素 C 共同定位的 UC 患者中,其线粒体自噬过程明显增强;同时,在 Nix 基因缺陷的小鼠中,其线粒体自噬功能会受到损害,从而更容易罹患 DSS 诱导的结肠炎[36]。抗增殖蛋白(prohibitin,PHB)是一种多功能的蛋白质,参与了线粒体的呼吸调控及自噬调控。前期研究发现,PHB 主要分布在肠上皮细胞线粒体内,在 IBD 组织中表达降低[37]。此外,有研究发现肠道上皮细胞中 PHB 缺失可引起线粒体功能紊乱、线粒体自噬功能障碍,导致肠粘膜炎症细胞因子表达升高,加剧肠道炎症反应[38]。最新研究发现,随着疾病的发展,UC 患者肠道细胞中线粒体损伤和自噬的程度不断加重,加剧细胞能量代谢障碍[21]。总之,在 IBD 疾病进展过程中,线粒体自噬功能受到损害,这一变化致使受损线粒体在细胞内大量积聚,并加剧了细胞内氧化应激,进一步加剧肠道组织的炎症反应和损伤程度。因此,针对线粒体自噬功能的调控,有望为 IBD 的防治提供新的策略。

2.3 线粒体动力学紊乱与 IBD

线粒体动力学是细胞内重要的生物过程,涉及线粒体的融合和分裂,影响线粒体形态和结构,对细胞能量代谢至关重要。有研究发现,以线粒体融合与分裂障碍为代表的线粒体动力学失衡是引起胃肠功能紊乱的重要原因,可导致多种炎症因子表达增多,加重肠道炎症反应[39]。具体来说,线粒体融合与分裂障碍会导致线粒体形态异常、功能下降,进而引起氧化应激反应增强。在这一过程中,会产生过量的 ROS,这些 ROS 会对细胞内的蛋白质、脂质和 DNA 造成损害,进而引发细胞凋亡或坏死。在这种情况下,肠道上皮细胞受损,肠道屏障功能减弱,导致肠道炎症的发生和发展。此外,线粒体动力学失衡还可能影响自噬过程,导致受损线粒体无法被及时清除,进一步加重肠道炎症[40]。

线粒体通过不断地融合与分裂,维持着动态平衡,以确保细胞的能量供应和代谢需求。然而,当这种平衡被打破时,线粒体的功能就会受到影响,进而引发一系列细胞功能障碍。研究发现,使用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt,DSS)和 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesufonic acid,TNBS)诱导小鼠结肠炎模型的结肠组织细胞中存在明显的线粒体动力学失衡,这种失衡可能导致细胞的能量代谢紊乱、氧化应激反应加剧以及炎症反应的持续恶化[41]。此外,一项研究对小鼠结肠组织中多种与线粒体融合与分裂相关蛋白质的 mRNA 表达量进行了深入检测。结果显示,这些蛋白质可能在 IBD 的发生和发展过程中发挥重要作用[42]。另外一项研究发现 DSS 诱导的结肠炎小鼠和野生型小鼠相比以及 UC 患者的结肠组织和健康对照组相比,疾病组线粒体碎片化程度更高,表明线粒体裂

变与炎症反应之间存在相关性[33]。此外,前期研究报道,线粒体裂变抑制剂 P110 能改善实验型小鼠结肠炎,通过上调线粒体分裂融合基因表达、抑制 DRP1 磷酸化、减少线粒体碎片形成,改善线粒体呼吸和短脂肪酸氧化和长脂肪酸氧化[43]。Mancini 等[19]也发现 P110 治疗炎症性肠病是通过改善 DSS 诱导的线粒体分裂和融合功能障碍来缓解炎症反应的。因此,维持线粒体融合与分裂的动态平衡对 IBD 的治疗至关重要。

2.4 线粒体呼吸功能缺陷与 IBD

线粒体呼吸链是细胞能量产生的核心途径,其中氧化磷酸化是关键步骤。正常情况下,线粒体通过氧化磷酸化生成细胞生命活动所需的能量,以维持细胞功能的正常运行。然而,在 IBD 患者的肠道细胞中,线粒体呼吸链复合物的活性受到严重影响,使 ATP 产生不足,导致肠道细胞的能量代谢紊乱。研究发现,IBD 患者和动物模型中的线粒体复合物水平和活性高低与线粒体酶活性之间存在密切关系。线粒体复合物是由多个亚基组成的大型蛋白质复合物,它们参与电子传递链的各个环节,将 NADH 和 FADH2 彻底氧化生成水、ATP 和热量[44-45]。线粒体酶活性受到多种因素的影响,包括基因变异、环境因素、氧化应激等。在 IBD 患者和动物模型中,由于肠道炎症的持续存在,使线粒体受到氧化应激等损伤,从而导致线粒体酶的活性降低,线粒体复合物的活性也会相应下降,进一步加剧了线粒体的功能障碍,形成恶性循环。在一例 UC 病例中,该患者的结肠活检显示线粒体呼吸链复合物 II、III 和 IV 的活性降低 50% ~ 60%[46]。Schneider 等[47]对成人和儿童 IBD 患者肠道组织中线粒体呼吸链复合物的活性进行了深入研究,也得到了类似结果。此外,Haberman 等[6]发现活动性 UC 患者直肠组织中线粒体复合体 I 的活性降低以及线粒体膜电位下降、转录共激活因子 PPARγ 结合蛋白 1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α, PGC1α)的表达下降,从而导致线粒体呼吸功能异常,进一步加剧肠道组织损伤。另外,在一项蛋白质组学研究中发现,DSS 诱导的猕猴结肠炎模型组与对照组相比,线粒体功能相关蛋白的表达明显下降,包括氧化磷酸化、脂肪酸代谢和三羧酸循环等相关通路蛋白[48]。这些研究结果进一步证实了线粒体呼吸功能异常在 IBD 发病过程中起重要作用。

抗氧化治疗可以减轻 IBD 肠道炎症环境中的氧化应激反应,清除 ROS,保护线粒体免受攻击,从而改善线粒体的呼吸功能。研究发现,吲哚美辛诱导的结肠炎大鼠使用抗氧化剂 MitoTEMPO 联合治疗后,大鼠结肠组织中的线粒体呼吸控制率(respiratory control ratio,RCR)、线粒体复合物 I 和 IV 的活性升高[49]。最近的研究报道了一种与长链非编码 RNA 有关的损害线粒体呼吸功能的新机制。具体来说,Sosnovski 等[50]发现核定位的长链非编码 RNA 在 IBD 患者肠上皮细胞中表达降低,使线粒体膜电位降低且线粒体 ROS 产生增加,导致线粒体呼吸谱降低和三羧酸循环代谢物减少。总之,线粒体呼吸功能异常导致肠道细胞的能量代谢紊乱,是 IBD 发病机制中的一个重要环节。通过深入研究这一现象,我们可以更好地理解 IBD 的发病机制,为开发新的治疗策略提供有力支持。

3 小结

炎症性肠病是一种与肠上皮细胞能量缺失密切相关的疾病,与肠上皮细胞的线粒体损伤密切相关。线粒体损伤与 IBD 之间的关联可能与多种因素有关,多种刺激和环境因素均可扰乱线粒体功能。研究表明,线粒体氧化应激损伤、自噬功能障碍、动力学紊乱以及呼吸链缺陷等都会导致线粒体损伤。线粒体损伤会进一步导致线粒体功能障碍和细胞能量代谢障碍,从而加重 IBD 肠道炎症反应和组织损伤。然而,IBD 肠道组织线粒体损伤应激的主要刺激因素目前尚未明确。此外,线粒体损伤在 IBD 作用机制中的研究仍处于初级阶段。因此,未来仍需深入的研究阐明线粒体损伤在 IBD 发病过程中的具体作用机制,阐明两者间的分子作用机制,对于寻找 IBD 新的干预靶点、优化治疗方法以及提高临床诊治水平具有重要意义。

参考文献:

[1] NAMBU R, MUISE A M. Advanced understanding of monogenic inflammatory bowel disease [J]. Front Pediatr, 2020, 8: 618918.

[2] YALCHIN M, BAKER A M, GRAHAM T A, et al. Predicting colorectal cancer occurrence in IBD [J]. Cancers, 2021, 13 (12): 2908.

[3] ENGEL K, HOMSI M, SUZUKI R, et al. Newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease: the relationship between perceived psychological support, health-related quality of life, and disease activity [J]. Health Equity, 2021, 5(1): 42-

48.
[4] MIZOGUCHI E, LOW D, EZAKI Y, et al. Recent updates on the basic mechanisms and pathogenesis of inflammatory bowel diseases in experimental animal models [J]. Intest Res, 2020, 18(2): 151-167.
[5] 侯晓婷, 孟欢, 薛佳辰, 等. 关于炎症性肠病发病机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9): 138-148.
HOU X T, MENG H, XUE J C, et al. Research progress in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9): 138-148.
[6] HABERMAN Y, KARNS R, DEXHEIMER P J, et al. Ulcerative colitis mucosal transcriptomes reveal mitochondriopathy and personalized mechanisms underlying disease severity and treatment response [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 38.
[7] ROSSI A, PIZZO P, FILADI R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: a functional triangle in bioenergetics [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(7): 1068-1078.
[8] WANG Y, PALMFELDT J, GREGERSEN N, et al. Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex [J]. J Biol Chem, 2019, 294(33): 12380-12391.
[9] SANCHEZ-CONTRERAS M, KENNEDY S R. The complicated nature of somatic mtDNA mutations in aging [J]. Front Aging, 2022, 2: 805126.
[10] ALMANSA-ORDONEZ A, BELLIDO R, VASSENA R, et al. Oxidative stress in reproduction: a mitochondrial perspective [J]. Biology, 2020, 9(9): 269.
[11] JUAN C A, PÉREZ DE LA LASTRA J M, PLOU F J, et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 4642.
[12] HALLIWELL B, ADHIKARY A, DINGFELDER M, et al. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage *in vivo* [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(15): 8355-8360.
[13] ABUDU Y P, SHRESTHA B K, ZHANG W, et al. SAMM50 acts with p62 in piecemeal basal-and OXPHOS-induced mitophagy of SAM and MICOS components [J]. J Cell Biol, 2021, 220(8): e202009092.
[14] MA K, CHEN G, LI W, et al. Mitophagy, mitochondrial homeostasis, and cell fate [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 467.
[15] KAGEYAMA S, GUDMUNDSSON S R, SOU Y S, et al. p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 16.
[16] XIE J H, LI Y Y, JIN J. The essential functions of mitochondrial dynamics in immune cells [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(7): 712-721.
[17] MADAN S, UTTEKAR B, CHOWDHARY S, et al. Mitochondria lead the way: mitochondrial dynamics and function in cellular movements in development and disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 781933.
[18] GAO S, HU J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out [J]. Trends Cell Biol, 2021, 31(1): 62-74.
[19] MANCINI N L, GOUDIE, XU W, et al. Perturbed mitochondrial dynamics is a novel feature of colitis that can be targeted to lessen disease [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 10(2): 287-307.
[20] LOSÓN O C, SONG Z, CHEN H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(5): 659-667.
[21] LIANG H, ZHANG F, WANG W, et al. Heat shock transcription factor 2 promotes mitophagy of intestinal epithelial cells through PARL/PINK1/parkin pathway in ulcerative colitis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 893426.
[22] NOLFI-DONEGAN D, BRAGANZA A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101674.
[23] MOON S J, DONG W, STEPHANOPOULOS G N, et al. Oxidative pentose phosphate pathway and glucose anaplerosis support maintenance of mitochondrial NADPH pool under mitochondrial oxidative stress [J]. Bioeng Transl Med, 2020, 5(3): e10184.
[24] VONA R, PALLOTTA L, CAPPELLETTI M, et al. The impact of oxidative stress in human pathology: focus on gastrointestinal disorders [J]. Antioxidants, 2021, 10(2): 201.
[25] BHATTACHARYYA A, CHATTOPADHYAY R, MITRA S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases [J]. Physiol Rev, 2014, 94(2): 329-354.
[26] RANDHAWA P K, SINGH K, SINGH N, et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(4): 279-288.
[27] ALULA K M, JACKSON D N, SMITH A D, et al. Targeting mitochondrial damage as a therapeutic for ileal Crohn's disease [J]. Cells, 2021, 10(6): 1349.
[28] STAN M S, VOICU S N, CARUNTU S, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of a Thuja occidentalis mother tincture for the treatment of Ulcerative Colitis [J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(9): 416.
[29] WU Q, LUO Y, LU H, et al. The potential role of vitamin e and the mechanism in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease [J]. Foods, 2024, 13(6): 898.
[30] DASHDORJ A, JYOTHI K R, LIM S, et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorates experimental mouse colitis by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines [J]. BMC Med, 2013, 11: 178.
[31] TAMBE P K, QSEE H S, BHARATI S. Mito-TEMPO mitigates 5-fluorouracil-induced intestinal injury via attenuating mitochondrial oxidative stress, inflammation, and apoptosis: an *in vivo* study [J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(4): 2091-2102.

[32] CHEN J W, MA P W, YUAN H, et al. mito-TEMPO attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in noise-induced hearing loss via maintaining TFAM-mtDNA interaction and mitochondrial biogenesis [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 803718.

[33] CHOJNACKI A K, NAVANEETHA KRISHNAN S, JIJON H, et al. Tissue imaging reveals disruption of epithelial mitochondrial networks and loss of mitochondria-associated cytochrome-C in inflamed human and murine colon [J]. Mitochondrion, 2023, 68: 44-59.

[34] SINGH S B, ORNATOWSKI W, VERGNE I, et al. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12 (12): 1154-1165.

[35] MATSUZAWA-ISHIMOTO Y, SHONO Y, GOMEZ L E, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium [J]. J Exp Med, 2017, 214(12): 3687-3705.

[36] VINCENT G, NOVAK E A, SIOW V S, et al. Nix-mediated mitophagy modulates mitochondrial damage during intestinal inflammation [J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 33(1): 1-19.

[37] THEISS A L, JENKINS A K, OKORO N I, et al. Prohibitin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor-kappa B nuclear translocation via the novel mechanism of decreasing importin alpha3 expression [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(20): 4412-4423.

[38] JACKSON D N, PANOPOULOS M, NEUMANN W L, et al. Mitochondrial dysfunction during loss of prohibitin 1 triggers Paneth cell defects and ileitis [J]. Gut, 2020, 69(11): 1928-1938.

[39] NOVAK E A, MOLLEN K P. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 62.

[40] WU Y, TANG L, WANG B, et al. The role of autophagy in maintaining intestinal mucosal barrier [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 19406-19419.

[41] IMPELLIZZERI D, SIRACUSA R, CORDARO M, et al. Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis in mice by targeting IL-1β and IL-18 [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 155: 150-161.

[42] KŁOS P, DABRAVOLSKI S A. The role of mitochondria dysfunction in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(21): 11673.

[43] QI X, QVIT N, SU Y C, et al. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity [J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 3): 789-802.

[44] GUAN S, ZHAO L, PENG R. Mitochondrial respiratory chain super complexes: from structure to function [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13880.

[45] ZHAO R Z, JIANG S, ZHANG L, et al. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(1): 3-15.

[46] SIFRONI K G, DAMIANI C R, STOFFEL C, et al. Mitochondrial respiratory chain in the colonic mucosal of patients with ulcerative colitis [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 342(1/2): 111-115.

[47] SCHNEIDER A M, ÖZSOY M, ZIMMERMANN F A, et al. Expression of oxidative phosphorylation complexes and mitochondrial mass in pediatric and adult inflammatory bowel disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9151169.

[48] MCQUEEN P, BUSMAN-SAHAY K, RIEDER F, et al. Intestinal proteomic analysis of a novel non-human primate model of experimental colitis reveals signatures of mitochondrial and metabolic dysfunction [J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(6): 1327-1335.

[49] HOANG N, BROOKS K, EDWARDS K. Sex-specific colonic mitochondrial dysfunction in the indomethacin-induced inflammatory bowel disease model in rats [J]. Front Physiol, 2024, 15: 1341742.

[50] SOSNOVSKI K E, BRAUN T, AMIR A, et al. GATA6-AS1 regulates intestinal epithelial mitochondrial functions, and its reduced expression is linked to intestinal inflammation and less favourable disease course in ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis, 2023, 17(6): 960-971.

〔收稿日期〕2024-02-04

费添添,梁腾云,曹盼夏,等. 基于氧化应激探讨斑马鱼在心血管疾病的应用及研究进展［J］. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 172-178.
Fei TT, Liang TY, Cao PX, et al. Research progress on the role of oxidative stress in cardiovascular disease in zebrafish［J］. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 172-178.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.020

基于氧化应激探讨斑马鱼在心血管疾病的应用及研究进展

费添添,梁腾云,曹盼夏,孟　雪,吴　鸿*

(河南中医药大学第二临床医学院,郑州　450002)

【摘要】 心血管疾病已严重威胁人类的生命安全,而氧化应激反应是心血管疾病发生和发展的重要因素。构建可靠的氧化应激动物模型有助于深入研究心血管疾病发病机制和治疗性药物的开发。斑马鱼具有易于繁殖、发育周期短、胚胎透明便于观察、心血管基因背景与人类高度同源等优点,近年来常被用于心血管疾病领域相关研究。本文聚焦于斑马鱼氧化应激模型在心血管疾病领域的应用与相关研究进展,为其在心血管疾病相关研究中的进一步应用提供参考。

【关键词】 氧化应激;斑马鱼;心血管疾病
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856 (2024) 09-0172-07

Research progress on the role of oxidative stress in cardiovascular disease in zebrafish

FEI Tiantian, LIANG Tengyun, CAO Panxia, MENG Xue, WU Hong*
(the Second Clinical School of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Cardiovascular disease presents a serious threat to human life, and oxidative stress has been identified as an important factor affecting the occurrence and development of cardiovascular disease. The construction of reliable animal models of oxidative stress is important for the in-depth study of the pathogenesis of cardiovascular diseases and the development of therapeutic drugs. Zebrafish have often been for research into cardiovascular diseases, due to their advantages of easy reproduction, a short developmental cycle, transparent embryos for easy observation, and a highly homologous cardiovascular genetic background with humans. In this paper, we review the application of the zebrafish oxidative stress model in cardiovascular disease and related research progress, to provide a reference for its further application in cardiovascular disease-related research.

【Keywords】 oxidative stress; zebrafish; cardiovascular disease
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国心肌缺血人群的发病率和死亡率逐年攀升,对人们的生命健康构成了极大威胁。但患病早期往往被人们所忽视,经常发生由心肌缺血继发心肌梗死、心力衰竭和心源性猝死等多种恶性心血管

[基金项目]河南省特色学科中医学学科建设项目(STG-ZYX05-202142);河南中医药科学研究专项(2021JDZX2025);河南中医药大学2023 年度研究生科研创新能力提升计划(2023KYCX045)。
[作者简介]费添添(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病。E-mail:f2652849320@163.com
[通信作者]吴鸿(1974—),男,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病。E-mail:kevin5me@126.com

事件。研究表明,氧化应激是引起心血管病发生的重要因素之一,调控氧化应激反应平衡细胞内过量的活性氧能对心肌缺血起到较好的保护作用。斑马鱼作为一种重要的模式动物,与人类的器官组织在结构和生理等方面非常接近,尤其是在心血管生物学方面,与人类基因组具有高度同源性。目前,斑马鱼氧化应激模型已被广泛应用于心血管疾病的研究中。本文从氧化应激对心血管的危害、斑马鱼在该领域研究的应用与优势以及最新研究进展进行介绍。

1　氧化应激对心血管病的影响

氧化应激是机体发生氧化或抗氧化系统失衡的现象[1],已被视为心血管疾病潜在的常见病因之一,该类疾病的发生发展与生物体内活性氧(reactive oxygen species,ROS)的过量产生有关[2-5]。当氧化应激发生时,细胞内原有的氧化还原动态平衡被打破,导致大量氧化中间产物 ROS 的产生,高水平的 ROS 会引起细胞结构改变和基因损坏[6]。同时,清除氧化产物的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性也会受到明显抑制[7]。进一步发展,过多的 ROS 堆积会引起细胞膜损伤,进而发生脂质过氧化,生成膜脂过氧化产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)[8]。因此,SOD 和 MDA 的含量变化能够反映细胞氧化损伤程度。同时,谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)是一种存在于线粒体和细胞质的细胞内酶,是机体抗氧化防御系统的重要组成部分,具有清除脂质氢过氧化物、保护细胞免受 ROS 破坏的作用[9]。过氧化物酶(catalase,CAT)通常被认为是抗氧化系统受到氧化损伤的重要指标,可针对 ROS 形成有效保护屏障,能够缓冲 ROS 的毒性作用,防止细胞氧化损伤[10]。

研究显示,氧化应激与心肌缺血、心肌缺血再灌注损伤、心肌梗死、动脉粥样硬化、心力衰竭等诸多心血管病密切相关(图 1)。心肌缺血会引起 ROS 的过度释放,降低 SOD 的自由基清除功能,随着 ROS 的不断堆积,MDA 水平升高,导致细胞膜脂质过氧化,急性心肌损伤、线粒体功能受损,从而加重心肌梗死面积,影响缺血心肌愈后,导致急性冠脉综合征的出现[11-12]。心肌缺血再灌注时,瞬时间局部血氧浓度升高,线粒体内产生大量 ROS,破坏氧化还原的动态平衡,发生氧化应激反应,导致线粒体膜电位下降,出现心肌缺血再灌注损伤的严重现象[13]。氧化应激还是血管内皮功能障碍的主要原因,氧化低密度脂蛋白是一种促动脉粥样硬化分子,积聚在血管壁上,造成动脉粥样硬化早期的血管功能障碍,大大提高心血管病发生的潜在风险[14]。研究表明,心肌细胞在收缩功能障碍和心力衰竭的早期阶段,细胞内线粒体 ROS 产生增加,发生氧化应激反应,使线粒体膜内外电位紊乱,伴随的呼吸活动减少,进一步加重心肌病和心力衰竭[15]。因此,氧化应激的早期干预策略为进一步研究心脏保护与治疗药物提供了方向。

2　斑马鱼模型在心血管病研究中的应用与优势

2.1　斑马鱼简介

斑马鱼是热带淡水硬骨鱼,身体呈纺锤形,体长约 3~5 cm。雄性体型细长,颜色略深,条纹较为显著;雌鱼身体肥胖,颜色稍淡,性成熟后腹部肥大。斑马鱼属于脊椎动物,与人类基因有高度同源性,在形态学、生理学及信号传导通路等方面和哺乳类动物极为相似。

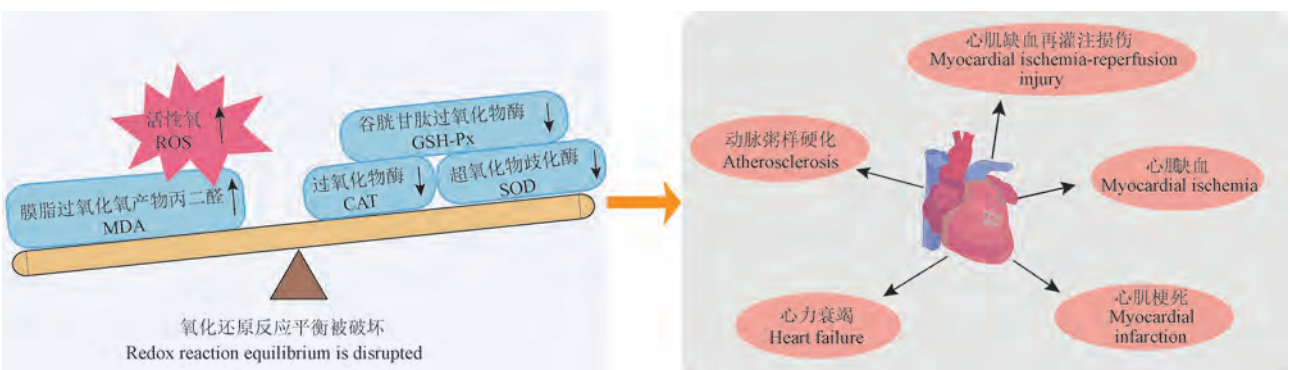


图 1　氧化应激与心血管疾病关系示意图

Figure 1　Schematic illustration of the relationship between oxidative stress and cardiovascular disease

2.2 斑马鱼在心血管病研究中的优势

斑马鱼是一种模式生物,具有易于繁殖、产卵量高、发育周期短、胚胎透明便于观察、遗传学操作难度低等特点[16],便于进行转基因和基因敲除等操作,斑马鱼短时间内各个组织和器官均可快速发育,且受精后 7 d 内鱼体透明,易于观察药物对各个组织器官的影响。

与人类相比,斑马鱼的基因组几乎完全测序[17],特别是在心血管生物学方面,与人类基因具有 87%的高度同源性[18]。同时,斑马鱼基因功能高度保守,其心血管循环系统可在受精后 48 h 完成发育,48 h 后房室瓣和动脉瓣膜形成,心脏发育完成[19]。斑马鱼身体透明,易于观察心脏形态及心功能变化,可以在心脏发育过程中进行无创成像,观察心跳、血管、心室腔等心功能变化。因此,斑马鱼模型非常有利于生物体的心脏相关领域研究。

2.3 斑马鱼心血管病模型的构建

近年来,学者们成功构建了多种心血管病的斑马鱼研究模型,尤其是在心血管及其相关疾病的药物干预领域研究极为活跃。

2.3.1 氧化应激模型

目前,斑马鱼已被作为一种新型实验动物模型来研究氧化应激损伤[20]。斑马鱼发育至第 3 天逐渐开始活跃游动,具备快速逃逸反应的能力,这就为行为学分析氧化损伤斑马鱼行动轨迹变化提供可能。在构建斑马鱼氧化应激模型中,研究者通过物理缺氧法和化学缺氧法,已成功建立斑马鱼氧化应激模型(图 2)。

物理缺氧法——基于氮气灌注法和 Gaspak 厌氧法构建斑马鱼氧化应激模型。研究发现将成年斑马鱼暴露于一个连接着连接器的密封室内,进行氮气灌流制造低氧环境,可构建缺氧性脑损伤斑马鱼模型[21]。通过向水中充入氮气降低水溶氧量的方式,产生急性低氧环境,斑马鱼存活率下降,缺氧诱导因子 HIF-1α 升高,也可成功建立斑马鱼氧化应激模型[22]。此外,还有学者采用了 Gaspak 厌氧产气袋和密封盒来制造缺氧室,构建斑马鱼氧化应激模型,研究发现缺氧处理后斑马鱼脑线粒体脱氢酶活性下降,细胞活性也下降[23]。

化学缺氧法——利用 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(AAPH)、亚硫酸钠、H_2O_2 等化学物质构建斑马鱼氧化应激模型。研究发现,通过 AAPH 诱导构建的斑马鱼氧化应激幼鱼模型,斑马鱼体内多种抗氧化酶活力 CAT、SOD、T-AOC、GSH-Px 明显被抑制,而 MDA 含量增加[24-25]。利用亚硫酸钠(Na_2SO_3)处理斑马鱼构建氧化应激模型,并与氮气灌注斑马鱼的缺氧效果进行了对比,结果发现亚硫酸钠处理斑马鱼具有与氮气灌注相当的缺氧效果,表明两种方法均可构建较为可靠的斑马鱼氧化应激模型[26]。双氧水(H_2O_2)也可作为氧化应激的造模药物[27-29],用于诱导斑马鱼幼鱼,构建氧化应激模型。研究显示,H_2O_2 处理后的斑马鱼幼鱼,其组织匀浆液中 ROS、MDA 含量升高,SOD 活力降低,符合斑马鱼氧化应激模型参考指标[30-31]。

上述几种造模方法,相较物理缺氧法,化学缺氧法的变量更加可控,可较精准计算药物用量及设计浓度梯度,也更有利于后续研究的开展,今后可能会成为主要的研究方向。构建可靠的斑马鱼氧化应激模型,有利于抗氧化机制的研究,同时也可广泛应用于药物毒性试验、抗氧化药物筛选、氧化应激机制研究,为研发心血管疾病防治药物提供有利支撑。

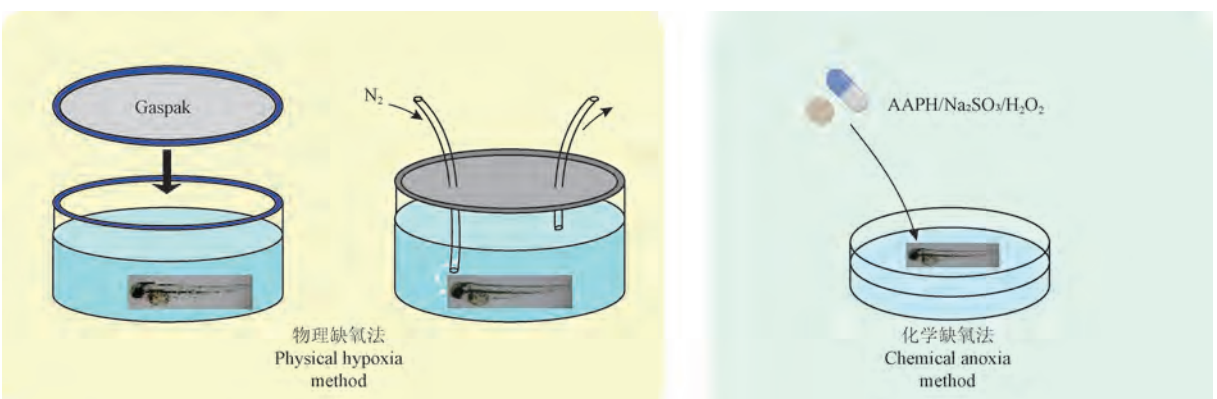


图 2 斑马鱼氧化应激模型构建

Figure 2 Modeling of oxidative stress in zebrafish

2.3.2　其他模型

斑马鱼除用于构建氧化应激模型外，还被广泛用于其他心血管病表型研究。给斑马鱼幼鱼喂食含 5%胆固醇的高脂饲料，通过荧光显微镜能够观察到斑马鱼幼鱼血管壁出现脂质沉积，可成功建立斑马鱼高脂血症模型[32]。对斑马鱼成鱼进行剪尾再生及幼鱼切尾后再生，发现斑马鱼血管内皮生长因子 A 和血管内皮生长因子受体 R2 基因的表达量增加，可观察血管生成的变化[33]。利用绿色荧光蛋白标记巨噬细胞的转基因斑马鱼，通过切割尾部构建巨噬细胞聚集的斑马鱼炎症模型，能观察到转基因斑马鱼炎症模型中巨噬细胞会向损伤尾部聚集，出现明显的炎症反应[34]。

综上，斑马鱼可用于促进或抑制血管生成药物筛选模型、降血脂药物筛选模型、抗炎症药物筛选模型、动脉粥样硬化模型及炎症模型等，为心血管疾病研究提供了可靠的动物模型。

3　斑马鱼氧化应激模型在心血管病中的通路及机制研究

斑马鱼体内发生氧化应激后，会诱发进一步的器官和细胞损害，如斑马鱼的形态学异常、运动行为障碍、脏器功能损伤、甚至死亡[35]。近年来，许多学者通过斑马鱼氧化应激模型进行了抗氧化相关基因表达水平及通路机制调控研究（如图 3），为探究心血管疾病发病机制与防治措施提供了帮助。

3.1　Keap1/Nrf2

Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1（Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1，Keap1）-核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor-erythroid 2-related factor-2，Nrf2）是维持过氧化物和抗氧化平衡的重要信号通路，可介导氧化应激反应[36-37]。当斑马鱼体内发生氧化应激时，会出现肌肉氧化应激损伤、胚胎存活率下降等。此时，Keap1 结构发生改变，导致其无法有效识别和泛素化降解 Nrf2，致使 Nrf2 得以积累，并转移到细胞核中，从而激活抗氧化应激反应[38-39]。Keap1 表达水平下调，能够促使 Nrf2 表达水平上调，可增强斑马鱼抗氧化功能，引起机体内 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性上升，MDA 含量下降，降低斑马鱼氧化应激损伤[40]。

3.2　AMPK/PGC-1α

5’-磷酸腺苷激活的蛋白激酶（5’-amp activated protein kinase，AMPK）和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α（peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α，PGC-1α）是细胞内两个关键的能量代谢调节因子。PGC-1α 是线粒体中一种重要的抗氧化分子，能维持细胞内 ROS 含量和线粒体膜电位水平，调控线粒体代谢和机体氧化应激反应[41-42]。AMPK/PGC-1α 信号通路是调控氧化应激的关键途径，当 AMPK 激活后，可以直接促进 PGC-1α 磷酸化，增强其活性并

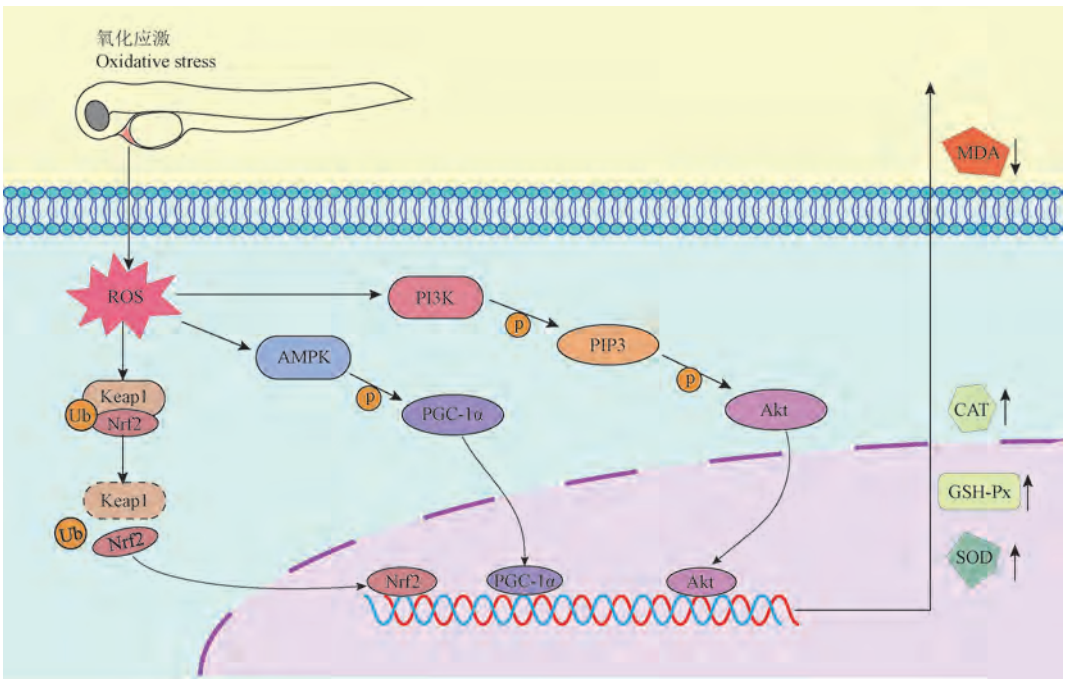


图 3　斑马鱼氧化应激反应通路及机制

Figure 3　Oxidative stress pathways and mechanisms in zebrafish

上调其表达,再通过增加线粒体 ROS 清除酶 CAT 活性来抑制 ROS 堆积,减轻氧化应激反应[43-44]。敲除斑马鱼体内 PGC-1α 基因后,ROS 含量升高,线粒体膜电位加剧下降,氧化应激加重[45]。

3.3 PI3K/Akt

磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,Akt)信号通路在调节氧化应激反应中也发挥重要作用。PI3K 是一种能够激活细胞膜脂类酶,磷酸化的 PI3K 可催化产生三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),细胞膜上的 PIP3 能激活 AKT,从而活化其下游的靶分子,增强斑马鱼体内 SOD 活力,降低胞内 ROS 与 MDA 含量,有效改善斑马鱼氧化应激反应[46-48]。当给予 PI3K/Akt 信号通路抑制剂后,机体 SOD 和 GSH-Px 水平明显降低,而 MDA 水平显著增高,表明氧化应激反应进一步加剧,给机体造成更大损伤[49]。

4 结论与展望

氧化应激可导致心肌缺血、心肌缺血再灌注损伤、心肌梗死、动脉粥样硬化、心力衰竭等多种心血管疾病,针对氧化应激相关的信号通路和分子靶点研究,可能会揭示心血管疾病新的病理发生机制,为心血管疾病的预防和治疗提供新的方向。

斑马鱼作为一种新的模式生物,身体透明,很容易非侵入性地观察胚胎的发育过程,其基因背景与人类疾病相关基因具有高度相似性,在心肌缺血、动脉粥样硬化、血管炎症、血管新生等心血管病研究领域得到深入的应用,已成为研究人类心血管疾病的可靠动物模型,也为人类探究心血管疾病机制提供了有力的工具。

综上所述,斑马鱼氧化应激模型的构建及在科学研究中不断应用,极大促进了在心血管相关疾病领域发病机制、药物开发与干预、药物毒性评价等研究,未来以斑马鱼为模式生物在相关领域还具有更深入研究、开发应用的潜力,因此,斑马鱼模型在心血管疾病研究领域中的应用和作用还有待于进一步拓展和探索。

参考文献:

[1] ANILA P A, SUTHA J, NATARAJ D, et al. *In vivo* evaluation of Nano-palladium toxicity on larval stages and adult of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Sci Total Environ, 2021, 765: 144268.

[2] SAMMAN TAHHAN A, SANDESARA P B, HAYEK S S, et al. Association between oxidative stress and atrial fibrillation [J]. Heart Rhythm, 2017, 14(12): 1849-1855.

[3] SHAITO A, ARAMOUNI K, ASSAF R, et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases [J]. Front Biosci, 2022, 27(3): 105.

[4] KATTOOR A J, POTHINENI N V K, PALAGIRI D, et al. Oxidative stress in atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2017, 19(11): 42.

[5] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1039241.

[6] SIES H, BELOUSOV V V, CHANDEL N S, et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(7): 499-515.

[7] DE FARIAS A C S, DE PIERI PICKLER K, BERNARDO H T, et al. Melatonin pretreatment protects against status epilepticus, glutamate transport, and oxidative stress induced by kainic acid in zebrafish [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(1): 266-275.

[8] ARAUJO G F, SOARES L O S, JUNIOR S F S, et al. Oxidative stress and metal homeostasis alterations in *Danio rerio* (zebrafish) under single and combined carbamazepine, acetamiprid and cadmium exposures [J]. Aquat Toxicol, 2022, 245: 106122.

[9] MATUZ-MARES D, RIVEROS-ROSAS H, VILCHIS-LANDEROS M M, et al. Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases [J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1220.

[10] REN F, JI C, HUANG Y, et al. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of $PM_{2.5}$ in zebrafish embryos [J]. Sci Total Environ, 2020, 719: 135097.

[11] AMRITA J, MAHAJAN M, BHANWER A J, et al. Oxidative stress: an effective prognostic tool for an early detection of cardiovascular disease in menopausal women [J]. Biochem Res Int, 2016, 2016: 6157605.

[12] AMIN M M, EL GAZAYERLY O N, ABD EL-GAWAD N A, et al. Effect of formulation variables on design, *in vitro* evaluation of valsartan SNEDDS and estimation of its antioxidant effect in adrenaline-induced acute myocardial infarction in rats [J]. Pharm Dev Technol, 2016, 21(8): 909-920.

[13] YAO H, XIE Q, HE Q, et al. Pretreatment with panaxatriol saponin attenuates mitochondrial apoptosis and oxidative stress to facilitate treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury via the regulation of Keap1/Nrf2 activity [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9626703.

[14] XU X, SONG Z, MAO B, et al. Apolipoprotein A1-related proteins and reverse cholesterol transport in antiatherosclerosis therapy: recent progress and future perspectives [J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022: 4610834.

[15] WU J, SUBBAIAH K C V, HEDAYA O, et al. FAM210A regulates

mitochondrial translation and maintains cardiac mitochondrial homeostasis [J]. Cardiovasc Res, 2023, 119(14): 2441-2457.

[16] JIA M, TENG M, TIAN S, et al. Developmental toxicity and neurotoxicity of penconazole enantiomers exposure on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environ Pollut, 2020, 267: 115450.

[17] BARANASIC D, HÖRTENHUBER M, BALWIERZ P J, et al. Multiomic atlas with functional stratification and developmental dynamics of zebrafish cis-regulatory elements [J]. Nat Genet, 2022, 54(7): 1037-1050.

[18] KITHCART A, MACRAE C A. Using zebrafish for high-throughput screening of novel cardiovascular drugs [J]. JACC Basic Transl Sci, 2017, 2(1): 1-12.

[19] BAKKERS J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease [J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(2): 279-288.

[20] DONG S, ZHANG B, MA Y, et al. Pumpkin skin polysaccharide-Zn(Ⅱ) complex: preparation, characterization, and suppression of inflammation in zebrafish [J]. Foods, 2022, 11(17): 2610.

[21] LEE Y, LEE S, PARK J W, et al. Hypoxia-induced neuroinflammation and learning-memory impairments in adult zebrafish are suppressed by glucosamine [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(11): 8738-8753.

[22] MA Y, WU Y, XIA Z, et al. Anti-hypoxic molecular mechanisms of *Rhodiola crenulata* extract in zebrafish as revealed by metabonomics [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1356.

[23] KIM Y S, WON Y J, LIM B G, et al. Neuroprotective effects of magnesium L-threonate in a hypoxic zebrafish model [J]. BMC Neurosci, 2020, 21(1): 29.

[24] 李琳, 陈丹, 范晓禹, 等. 英国红芸豆抗氧化肽对氧化应激斑马鱼的保护作用研究 [J]. 中国粮油学报, 2024, 39(2): 70-79.
LI L, CHEN D, FAN X Y, et al. The protective effect of British red kidney bean antioxidant peptides on oxidatively stressed zebrafish [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2024, 39(2): 70-79.

[25] DING Y, KO S C, MOON S H, et al. Protective effects of novel antioxidant peptide purified from alcalase hydrolysate of velvet antler against oxidative stress in Chang liver cells *in vitro* and in a zebrafish model *in vivo* [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5187.

[26] MARINO K M, SILVA E R, WINDELBORN J A. A comparison between chemical and gas hypoxia as models of global ischemia in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Animal Model Exp Med, 2020, 3(3): 256-263.

[27] 万鹏, 陈贵杰, 彭宇佳, 等. 冬青苦丁茶二咖啡酰奎宁酸对 H_2O_2 诱导的小鼠巨噬细胞和斑马鱼氧化应激反应的抑制作用[A]. 中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集[C], 2018.
WAN P, CHEN G J, PENG Y J, et al. Inhibitory effects of dicaffeoylquinic acid from wintergreen bitter tea on H_2O_2-induced oxidative stress in mouse macrophages and zebrafish [A]. Abstracts Collection of the 15th Annual Conference of the Chinese Society for Food Science and Technology[C], 2018.

[28] 张梦斯. 琼玉膏通过 sirt1/p53 信号通路延缓 H_2O_2 诱导斑马鱼衰老的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
ZHANG M S. Qiongyu paste inhibits the aging of *Zea* fish induced by H_2O_2 through Sirt1/p53 signaling pathway [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2018.

[29] 曲蕙名, 王莹, 赵博, 等. β-胡萝卜素对 H_2O_2 诱导的斑马鱼肝损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2019, 40(5): 162-166.
QU H M, WANG Y, ZHAO B, et al. Protective effect of β-carotene on liver oxidative damage induced by hydrogen peroxide in zebrafish [J]. Food Sci, 2019, 40(5): 162-166.

[30] NING W, LI S, TSERING J, et al. Protective effect of triphala against oxidative stress-induced neurotoxicity [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 6674988.

[31] LIN Y C, WU C Y, HU C H, et al. Integrated hypoxia signaling and oxidative stress in developmental neurotoxicity of benzo[a] *Pyrene* in zebrafish embryos [J]. Antioxidants, 2020, 9(8): 731.

[32] 武琳. 斑马鱼高脂血症模型建立及双酚 S 暴露对其影响的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
WU L. Study on the establishment of hyperlipidemia model in zebrafish and exposure effect of bisphenol S [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.

[33] 田丽莉, 盛东来, 朱国福. 白藜芦醇对斑马鱼尾鳍再生的促进作用及机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(5): 1098-1101.
TIAN L L, SHENG D L, ZHU G F. Study on the promoting effect and mechanism of resveratrol on the regeneration of tail fin of zebrafish [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(5): 1098-1101.

[34] 但成丽, 张艳焱, 张永萍, 等. 基于转基因斑马鱼炎症模型的血人参提取物抗炎活性筛选研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 2617-2620.
DAN C L, ZHANG Y Y, ZHANG Y P, et al. Study on anti-inflammatory activity of *Radix Indigofera* extract based on transgenic zebrafish mode-screening [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(11): 2617-2620.

[35] CHAVES R S, GUERREIRO C S, CARDOSO V V, et al. Toxicological assessment of seven unregulated drinking water Disinfection By-products (DBPs) using the zebrafish embryo bioassay [J]. Sci Total Environ, 2020, 742: 140522.

[36] HIROSE W, OSHIKIRI H, TAGUCHI K, et al. The KEAP1-NRF2 system and esophageal cancer [J]. Cancers, 2022, 14(19): 4702.

[37] YU C, XIAO J H. The Keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021,

2021: 6635460.

[38] JIAO Y, TAO Y, YANG Y, et al. Monobutyl phthalate (MBP) can dysregulate the antioxidant system and induce apoptosis of zebrafish liver [J]. Environ Pollut, 2020, 257: 113517.

[39] 贺舒雯, 朱豪杰, 韩鹏薇, 等. 虾壳活性肽对斑马鱼氧化应激损伤的保护作用 [J]. 食品与机械, 2023, 39(9): 140-147.
HE S W, ZHU H J, HAN P W, et al. Protective effects of *Procambarus clarkii* shell bioactive peptides on oxidative stress injury of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Food Mach, 2023, 39(9): 140-147.

[40] 张宇. 基于 Keap1-Nrf2-PPARγ 通路虾壳活性肽 LPLWPY 调节斑马鱼抗氧化和脂代谢反应的研究 [D]. 盐城: 盐城工学院, 2023.
ZHANG Y. Modulation of antioxidant and lipid metabolic responses in zebrafish by LPLWPY, an active peptide of shrimp shells based on Keap1-Nrf2-PPARγ pathway B [D]. Yancheng: Yancheng Institute Of Technology, 2023.

[41] ZHANG K, CHENG H, SONG L, et al. Inhibition of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α)/sirtuin 3 (SIRT3) pathway aggravates oxidative stress after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e923688.

[42] NAAZ S, MISHRA S, PAL P K, et al. Activation of SIRT1/PGC 1α/SIRT3 pathway by melatonin provides protection against mitochondrial dysfunction in isoproterenol induced myocardial injury [J]. Heliyon, 2020, 6(10): e05159.

[43] WANG D, CAO L, ZHOU X, et al. Mitigation of honokiol on fluoride-induced mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cognitive deficits through activating AMPK/PGC-1α/Sirt3 [J]. J Hazard Mater, 2022, 437: 129381.

[44] MARINO A, HAUSENLOY D J, ANDREADOU I, et al. AMP-activated protein kinase: a remarkable contributor to preserve a healthy heart against ROS injury [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 166: 238-254.

[45] 胡成枫, 王晓煜, 陈良标. PGC-1α 敲降对斑马鱼细胞冷应激过程的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(10): 4422-4429.
HU C F, WANG X Y, CHEN L B. Effect of PGC-1α knockdown on zebrafish cells under cold stress [J]. Genom Appl Biol, 2019, 38(10): 4422-4429.

[46] PARK J, AN G, PARK H, et al. Developmental defects induced by thiabendazole are mediated via apoptosis, oxidative stress and alteration in PI3K/Akt and MAPK pathways in zebrafish [J]. Environ Int, 2023, 176: 107973.

[47] REN B C, ZHANG Y F, LIU S S, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12355-12367.

[48] TANG J Y, CHENG Y B, CHUANG Y T, et al. Oxidative stress and AKT-associated angiogenesis in a zebrafish model and its potential application for withanolides [J]. Cells, 2022, 11(6): 961.

[49] WU Y, HUANG J, DENG M, et al. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of Chinese PFOS alternative F-53B induces oxidative stress in early developing zebrafish [J]. Chemosphere, 2019, 235: 945-951.

〔收稿日期〕2024-03-10