

王志刚, 刘晓蕾, 闫磊, 等. 低氧预适应对 HT22 细胞和小鼠海马突触和突触旁中 NR2B 及其酪氨酸 1336 的磷酸化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 1-10.  
Wang ZG, Liu XL, Yan L, et al. Effects of hypoxia preconditioning on the phosphorylation of NR2B and its tyrosine 1336 in the synaptic site and extrasynaptic site of HT22 cells and mouse hippocampus [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 1-10.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.001

## 低氧预适应对 HT22 细胞和小鼠海马突触和突触旁中 NR2B 及其酪氨酸 1336 的磷酸化的影响

王志刚<sup>1#</sup>, 刘晓蕾<sup>2#</sup>, 闫磊<sup>3</sup>, 王志广<sup>3</sup>, 张志勇<sup>3</sup>, 姜树原<sup>2</sup>, 杨静<sup>3\*</sup>, 邵国<sup>2,3,4\*</sup>

(1.龙岗区第三人民医院 ICU, 广东 深圳 518112; 2.格勒大学公共卫生学院, 泰国 曼谷 10220;  
3.内蒙古低氧适应转化医学重点实验室, 内蒙古 包头 014010; 4.龙岗区第三人民医院转化医学中心, 广东 深圳 518112)

**【摘要】** 目的 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚基 2B(NR2B)及其磷酸化参与大脑缺血/低氧神经损伤。低氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC)作为一种内源性保护干预措施,可以保护大脑免受缺血/低氧损伤。本研究拟通过体内和体外实验研究 HPC 对海马细胞中 NR2B 及其两个酪氨酸位点(1252 和 1336)磷酸化的影响,探讨其在 HPC 神经保护中的作用。**方法** 6~8 周龄雄性 SPF 级 ICR 小鼠和小鼠海马神经元细胞系 HT22 重复暴露于低氧环境复制 HPC 动物模型和细胞模型。免疫蛋白印迹和免疫荧光检测 HPC 小鼠海马和 HT22 细胞中 NR2B 的水平及其酪氨酸 1336(pY1336NR2B)和 1252(pY1252NR2B)的磷酸化水平。通过免疫蛋白印迹分析 NR2B、pY1336NR2B 和 pY1252NR2B 在突触部位(TxP)和突触旁部位(TxS)中的分布,同时检测指示细胞凋亡的 cleaved caspase-3 和  $\alpha$ -spectrin 的水平。**结果** HPC 下调小鼠海马和 HT22 细胞中 NR2B 和 pY1336NR2B 的水平。小鼠海马突触旁部位(TxS)中 NR2B 和 pY1336NR2B 水平的变化与海马和 HT22 细胞中的变化相似,而突触部位(TxP)中的变化则表现出相反的趋势。**结论** NR2B 和 pY1336NR2B 的下调可能参与了 HPC 诱导的神经保护作用,它们在突触和突触旁的定位可能在神经保护中发挥不同的作用。

**【关键词】** 低氧预适应;NR2B;突触;细胞凋亡

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0001-10

### Effects of hypoxia preconditioning on the phosphorylation of NR2B and its tyrosine 1336 in the synaptic site and extrasynaptic site of HT22 cells and mouse hippocampus

WANG Zhigang<sup>1#</sup>, LIU Xiaolei<sup>2#</sup>, YAN Lei<sup>3</sup>, WANG Zhiguang<sup>3</sup>, ZHANG Zhiyong<sup>3</sup>, JIANG Shuyuan<sup>2</sup>,  
YANG Jing<sup>3\*</sup>, SHAO Guo<sup>2,3,4\*</sup>

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82060337);深圳市科技计划项目基础研究面上项目(JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012);  
深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目(LGKCYLWS2021000033, LGKCYLWS2023025, LGWJ2023-121)。

**【作者简介】** 王志刚(1982—),男,硕士,主治医师,研究方向:重症医学。E-mail:2978028574@qq.com

刘晓蕾(1988—),女,博士,研究方向:低氧神经保护研究。E-mail:lory1988@163.com <sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 邵国(1972—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:神经保护。E-mail:shao\_guo\_china@163.com

杨静(1981—),女,博士,副教授,研究方向:低氧/缺血神经保护。E-mail:yangjing2569@126.com <sup>\*</sup>共同通信作者

- (1. Department of ICU, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112, China.  
2. Department of Public Health, Krirk University, Bangkok 10220, Thailand. 3. Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine of Inner Mongolia, Baotou 014040. 4. Translational Medicine Center, the Third People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518112)

**【Abstract】 Objective** N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2B (NR2B) and its phosphorylation are involved in cerebral ischemia/hypoxic neural injury. Hypoxic preconditioning (HPC) can serve as an endogenous protective intervention to protect the brain from ischemic/hypoxic injury. This study intended to explore the effect of HPC on NR2B and the phosphorylation of its two tyrosine sites (1252 and 1336) in hippocampal cells through *in vivo* and *in vitro* experiments and thus determine the role of NR2B in HPC neuroprotection. **Methods** 6~8 weeks-old male SPF-grade ICR mice and the mouse hippocampal neuron cell line HT22 were repeatedly exposed to hypoxia to replicate HPC animal and cell models. Western blot and immunofluorescence were applied to detect the levels of NR2B and the phosphorylation levels of its tyrosine 1336 (pY1336NR2B) and 1252 (pY1252NR2B) residues in the hippocampus of mice and HT22 cells. The distributions of NR2B, pY1336NR2B, and pY1252NR2B in the synaptic site (TxP) and extrasynaptic site (TxS) were analyzed by Western blot. The levels of cleaved caspase-3 and  $\alpha$ -spectrin, which indicate cell apoptosis, were also detected. **Results** HPC downregulated the levels of NR2B and pY1336NR2B in the mouse hippocampus and HT22 cells. Changes in NR2B and pY1336NR2B levels in the TxS of the mouse hippocampus were similar to those in hippocampus and HT22 cells, whereas changes in the TxP showed the opposite trend. **Conclusions** Downregulation of NR2B and pY1336NR2B may be involved in HPC-induced neuroprotection, and their localization at synapses and extrasynapses may play different roles in neuroprotection.

**【Keywords】** hypoxic preconditioning; NR2B; synapse; apoptosis

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

低氧是临床多种脑部疾病的发生和发展过程中最常见的神经损伤的原因。低氧会诱发机体大脑组织供能不足,从而发展多种病理性过程,进一步诱发不可逆性脑损伤,在脑损伤领域中作为一个重要的研究方向。N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)是一种离子型谷氨酸受体, NR2B 是 NMDA 受体的 2B 亚基,可以介导低氧/缺血条件下神经元兴奋性毒性而导致神经损伤。针对 NR2B 的干预可以有效降低脑缺血亚急性期的神经元损伤<sup>[1]</sup>。NR2B 的干预可能减轻脑低氧/缺血亚急性阶段神经元损伤。

低氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC)被认为是可有效进行脑低氧/缺血神经保护的一种内源性组织细胞机制,是指细胞和组织经过亚致死低氧刺激,可以对随后出现更严重的低氧/缺血产生耐受<sup>[2]</sup>。HPC 和 NR2B 的表达密切相关,研究表明 HPC 可以增加引起小鼠海马中 MALAT1 和 NEAT1 的表达,降低了 NR2B mRNA 的表达,从而发挥神经保护作用<sup>[3]</sup>。NR2B 的表达和磷酸化水平均与脑低氧/缺血损伤具有相关性,新生小鼠海马缺血低氧损伤后 NR2B mRNA 上调<sup>[4]</sup>。NR2B 亚型特异性拮抗剂可减轻缺血引起的细胞死亡并可增加预处理

诱导的神经保护效果<sup>[5]</sup>。同时 NR2B 的酪氨酸磷酸化在调节 NMDAR 功能方面起着至关重要的作用。NR2B 的 1252、1336 和 1472 三个酪氨酸可被激酶 Fyn 磷酸化。新生儿低氧缺血(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)后 NR2B 的 1472 磷酸化上调会导致脑损伤加重<sup>[6]</sup>,同时相关研究表明缺血还可能导致 NR2B 和 pY1472NR2B 在突触后重新分布从而影响其功能<sup>[7]</sup>,海马突触作为神经系统中影响学习记忆功能的主要区域,受到多种影响, HPC 对海马突触中一些关键性因子具有明显的调控作用,本研究探讨了 HPC 对 NR2B 和 Y1336、Y1252 磷酸化的影响,研究在突触后和突触旁的分布以及可能的机制,探讨在神经保护中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

6~8 周龄雄性 SPF 级 ICR 小鼠共 30 只,体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2024-0001],在斯贝福(北京)生物技术有限公司动物房内进行饲养[SYXK(京)2021-0038],实验条件适宜,动物可自由采食饮水。实验

中涉及动物的操作程序得到深圳市龙岗区人民医院实验动物伦理委员会批准(2021035DW),本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》,实验设计及饲养使用过程遵循 3R 原则。

### 1.1.2 细胞系

小鼠海马细胞系 HT22 购于中国医学科学院北京协和医学院细胞库(4201MOU-CCTCC00673)。

## 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(Gibco 公司,批号:MA0215);胎牛血清(四季青公司,批号:19080504);青霉素/链霉素(BBI 公司,批号:J922FA0004);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,批号:391303);RevertAid First Strand cDNA 试剂盒(TaKaRa 公司,批号:ALF0602A);Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody(Invitrogen 公司,批号:A-11045);RIPA 蛋白裂解液(碧云天生物技术公司,批号:P0013B);BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(博格林生物科技有限公司,批号:MA0082-2-Mar-061);PVDF 膜(Roche 公司,批号:51457600);NR2B 一抗、pY1336NR2B 一抗、cleaved caspase-3 一抗、 $\beta$ -actin 一抗(Cell Signaling Technology 公司,批号:4212S 3、4208S 2、#9664 3、#4967 2);pY1252NR2B 一抗(Phosphosolutions 公司,批号:ks416o); $\alpha$ -spectirn 一抗(abcam 公司,批号:ab154811)。

实时定量 PCR 系统(Applied Biosystems,型号:ABI 7900HT);化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-IVDT-1);穿梭箱测试(成都仪器有限公司,型号:STT-100M);立体定位仪(瑞沃得,型号:68025);激光扫描共聚焦显微镜(尼康 A1,型号:HD25/A1R HD25);NIS-Element 图像分析系统(尼康,型号:AR/BR/D/F)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 HPC 大鼠模型建立及分组 HPC 动物模型

实验模型按本课题组先前报道复制进行<sup>[8]</sup>,将小鼠放入装有新鲜空气的 125 mL 广口瓶中,用橡皮塞密封。一旦出现喘式呼吸将橡皮塞打开,并将小鼠从广口瓶转移到第二个装有新鲜空气的瓶中,并立即再次密封。小鼠每次放入广口瓶密封到打开橡皮塞作为 1 次低氧暴露。小鼠随机分为 3 组:含氧量正常(normal oxygen content, N)组;缺氧(hypoxia, H)组;缺氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)组。HPC 组低氧暴露 4 次;H 组低氧暴露 1 次;N 组不进行低氧暴露。

### 1.3.2 HPC 细胞模型

HT22 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中进行培养,培养基中含 100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素,常氧(21% O<sub>2</sub>/74% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) 37 °C 条件培养。HPC 组细胞在低氧(1% O<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) 条件下培养 30 min,然后常氧培养 30 min,循环交替进行 4 次。然后,将细胞与 H 组细胞一起在低氧条件下培养 13 h,然后复氧 6 h。N 组细胞为正常培养细胞<sup>[9]</sup>。

### 1.3.3 RNA 提取及实时定量 PCR

使用 TRIzol 试剂从小鼠海马和 HT22 细胞中分离总 RNA,并使用 RevertAid First Strand cDNA 试剂盒合成 cDNA。在 ABI7900HT 实时定量 PCR 系统上进行 3 次定量实时 PCR,使用 20  $\mu$ L 体系进行实时定量 PCR 反应程序:95 °C, 10 min;95 °C, 30 s, 58 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 40 个循环;72 °C, 2 min,并使用 2<sup>- $\Delta$ ACT</sup> 方法分析 mRNA 的相对丰度。使用的引物在表 1 中提供。

### 1.3.4 免疫蛋白印迹(Western blot)

使用 RIPA 蛋白裂解液提取小鼠海马和 HT22 细胞全细胞蛋白。使用 BCA 法检测蛋白质浓度,利用 SDS/PAGE 进行电泳分离蛋白,然后转印到 PVDF 膜上。通过与 NR2B、pY1336NR2B、pY1252NR2B、 $\alpha$ -spectrin、cleaved caspase-3 和  $\beta$ -actin 一抗孵育(1:1000 稀释),然后与二抗孵育,ECL 孵育后然后通过 Tanon 4600 分析 PVDF 膜上的条带。

### 1.3.5 免疫荧光

N 组、H 组和 HPC 组共 3 组小鼠安乐死后固定脑组织并脱水,制作 12  $\mu$ m 厚的小鼠大脑冰冻切片。用 0.01 mol/L PBS 清洗切片,按照说明书分别与 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 一抗(1:300 稀释)4 °C 孵育过夜;二抗鼠抗(1:500 稀释)室温孵育 2 h。在激光扫描共聚焦显微镜下检查免疫荧光图像。通过 NIS-Element 图像分析系统分析荧光强度。

### 1.3.6 突触和突触旁膜成分分离

从 N 组、H 组和 HPC 组共 3 组小鼠分离海马组

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

名称 Name	引物序列 Primer sequence
NR2B	Forward 5'-CTGTCATGCTCAACATCATGGA-3' Reverse 5'-GCCGATCCTTGTTCACGAAGTC-3'
$\beta$ -actin	Forward 5'-AGTGGAAGGTCGGAGTCA-3' Reverse 5'-GGTCATTGATGGCAACAA-3'

织。按照 Goebel-Goody 等<sup>[10]</sup>的方法纯化突触和突触旁膜成分,该方法主要使用差速离心方法和含有 Triton X-100 的提取缓冲液实现亚细胞成分分级分离。即将组织匀浆在 1000 r/min 转速下离心 10 min,去除细胞核和未完全匀浆的物质,得到的上清液在 10 000 r/min 转速下离心 15 min,所得沉淀在 0.5% Triton X-100 中悬浮 20 min 后 32 000 r/min 转速下离心 20 min,所得沉淀(TxP)含有 Triton X 不溶性突触后密度(PSD)蛋白是突触成分,而上清液(TxS)含有可溶于 Triton X-100 且未与 PSD 紧密结合的蛋白被定义为突触旁成分。通过 BCA 方法测定突触(TxP)和突触旁膜蛋白(TxS)的浓度,然后保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 以供进一步分析。

#### 1.4 统计学方法

所有数据均使用 GraphPad Prism 8.2 和 SPSS 25.0 进行分析。数据以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。对于正态分布和齐次方差的数据,采用事后 Bonferroni 检验进行单因素方差分析。当数据呈正态分布但方差不齐时,进行 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HPC 下调海马低氧诱导的 NR2B 和 pY1336NR2B 水平

为了明确 NR2B 及其磷酸化在 HPC 诱导的内源性神经保护中的作用,对 HPC 处理后 0~4 d 内小鼠海马的表达情况进行了检测。选择这个时间范围是为了明确 HPC 诱导的神经保护作用早期和晚期 NR2B 及其磷酸化状态的动态变化<sup>[11]</sup>。与 N 组相比,H 组 NR2B mRNA 表达量在第 1、3、4 天下降,而 HPC 组在第 0、1、4 天下降。与 H 组相比,HPC 组第 0、1 天 NR2B mRNA 表达下降(图 1A)。与 N 组相比,H 组和 HPC 组的 NR2B 蛋白水平从第 0~2 天均有所增加。此外,第 0~2 天,HPC 组的 NR2B 蛋白水平低于 H 组(图 1B、1C,  $P < 0.05$ )。pY1252NR2B 3 组间水平无显著性差异(图 1D,  $P > 0.05$ )。第 0~4 天,pY1336NR2B 水平与 NR2B 蛋白变化相似(图 1B、1E,  $P < 0.05$ ),但 N 组和 HPC 组 pY1336NR2B 水平无差异。

免疫荧光显示第 0 天海马区域的 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 蛋白呈阳性信号(图 1F~1H)。于蛋白质印迹分析中观察到的 NR2B 和 pY1336NR2B 形式的变化一致,与 N 组相比,H 组和 HPC 组小鼠海马中 NR2B 蛋白免疫荧光显著增加。

与 N 组相比,H 组小鼠海马中 pY1336NR2B 蛋白免疫荧光显著增加。但 HPC 组的免疫荧光强度低于 H 组(图 1F、1H,  $P < 0.05$ )。研究表明,HPC 可以降低小鼠海马低氧诱导的 NR2B 和 pY1336NR2B 水平。与 Western blot 分析结果类似,第 0 天 3 组间 pY1252NR2B 蛋白免疫荧光信号密度没有变化(图 1G,  $P > 0.05$ )。

### 2.2 HPC 上调突触 NR2B 和 pY1336NR2B,下调突触旁 NR2B 和 pY1336NR2B 的水平

采用亚细胞成分分离技术提取突触部位(TxP)和突触旁部位(TxS),采用 Western blot 检测两种不同亚细胞成分中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的表达情况(图 2)。与 N 组相比,H 组小鼠海马突触部位(TxP)中 NR2B、pY1336NR2B 的水平显著降低,突触旁部位(TxS)中 NR2B、pY1336NR2B 的水平在第 0~2 天显著升高(图 2B、2D、2F、2H,  $P < 0.05$ )。在 HPC 组中,低氧引起的 NR2B 和 pY1336NR2B 的变化在低氧预适应后第 0~2 天逆转,表现出突触部位中 NR2B 和 pY1336NR2B 水平显著升高,突触旁 NR2B 水平显著降低(图 2B、2D、2F、2H,  $P < 0.05$ )。本研究结果表明,小鼠海马低氧和 HPC 处理后, NR2B 和 pY1336NR2B 在突触和突触旁部位的分布呈现相反的变化。HPC 处理后突触和突触旁位点的 NR2B 和 pY1336NR2B 水平几乎与 N 组相同,表明 HPC 可能恢复其正常的生物学功能。另一方面,突触部位(TxP)和突触旁部位(TxS)中的 pY1252NR2B 水平在 3 组中无显著性差异(图 2C、2G,  $P > 0.05$ )。

### 2.3 HPC 抑制低氧诱导的小鼠海马细胞凋亡

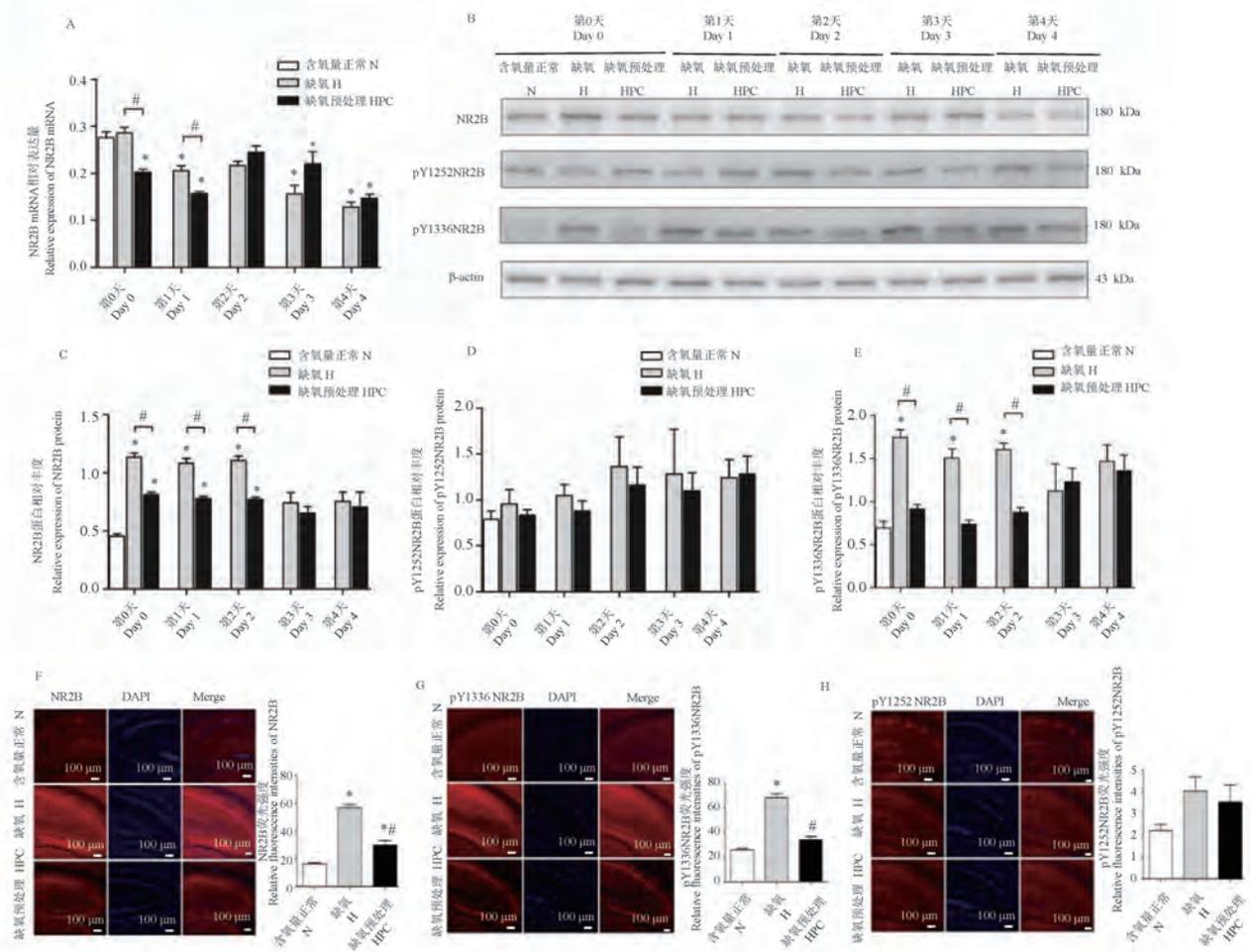
本研究中 120 kDa 的  $\alpha$ -spectrin 分解产物和 cleaved caspase-3 被用作细胞凋亡的标记物<sup>[12]</sup>。通过 Western blot 测量小鼠海马中  $\alpha$ -spectrin 和 cleaved caspase-3 蛋白的水平(图 3A)。与 N 组相比,H 组小鼠海马中 cleaved caspase-3 和 120 kDa  $\alpha$ -spectrin 在 0~2 d 时显著升高,而 HPC 组在 0~2 d 时下降(图 3B、3C,  $P < 0.05$ )。与 H 组相比,HPC 组小鼠海马 0~2 d 时 cleaved caspase-3 和 120 kDa  $\alpha$ -spectrin 显著减少(图 3B、3C,  $P < 0.05$ )。该结果提示 HPC 可能抑制低氧诱导的小鼠海马细胞凋亡,这可能与 NR2B 和 pY1336NR2B 的水平降低有关。

### 2.4 HPC 通过下调 NR2B 和 pY1336NR2B 水平对 HT22 细胞发挥保护作用

为了进一步验证体内实验并观察 NR2B、

pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 在低氧预适应的神经保护中的作用,采用 Western blot 和免疫荧光技术观察低氧和低氧预适应后 HT22 细胞中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的水平。与 N 组相比,H 组 NR2B 和 pY1336NR2B 水平显著升高(图 4A、4B、4C,  $P < 0.05$ );在 HPC 组中,H 组低氧引起的 pY1336NR2B 水平升高受到逆转,使得 pY1336NR2B 的水平与 N 组相似(图 4A、4C,  $P < 0.05$ )。pY1252NR2B 在 3 组 HT22 细胞中的水平无显著差异(图 4A、4D,  $P > 0.05$ )。免疫荧光显示在

HT22 细胞中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的相对荧光强度与蛋白质印迹分析中观察到的 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的变化一致,与 N 组相比,H 组和 HPC 组 HT22 细胞中 NR2B 相对荧光强度显著增加(图 4E,  $P < 0.05$ )。与 N 组相比,H 组小鼠海马中 pY1336NR2B 蛋白免疫荧光显著增加,与 H 组相比,HPC 组的免疫荧光强度显著降低(图 4F,  $P < 0.05$ )。pY1252NR2B 相对荧光强度无显著性差异(图 4G,  $P > 0.05$ )。根据上述结果,低氧和 HPC 均影响 HT22 细胞中 pY1336NR2B 的



注:A:NR2B mRNA 表达水平( $n=6$ );B:NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的 Western blot 典型图( $n=6$ );C~E:半定量分析表明 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 中的蛋白质变化;F~H:第 0 天小鼠海马 NR2B、pY1336NR2B、pY1252NR2B 的免疫荧光及其相对荧光强度( $n=5$ )。与 N 组相比,  $*P < 0.05$ ;与 H 组相比,  $#P < 0.05$ 。

**图 1** 缺氧预处理对小鼠海马 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的影响

Note. A, NR2B mRNA expression levels ( $n=6$ ). B, Western blot typical plots of NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B ( $n=6$ ). C~E, Semi-quantitative analysis showing protein changes in NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B. F~H, Immunofluorescence of mouse hippocampal NR2B, pY1336NR2B, and pY1252NR2B and their relative fluorescence intensities on day 0 ( $n=5$ ). Compared with N group,  $*P < 0.05$ . Compared with H group,  $#P < 0.05$ .

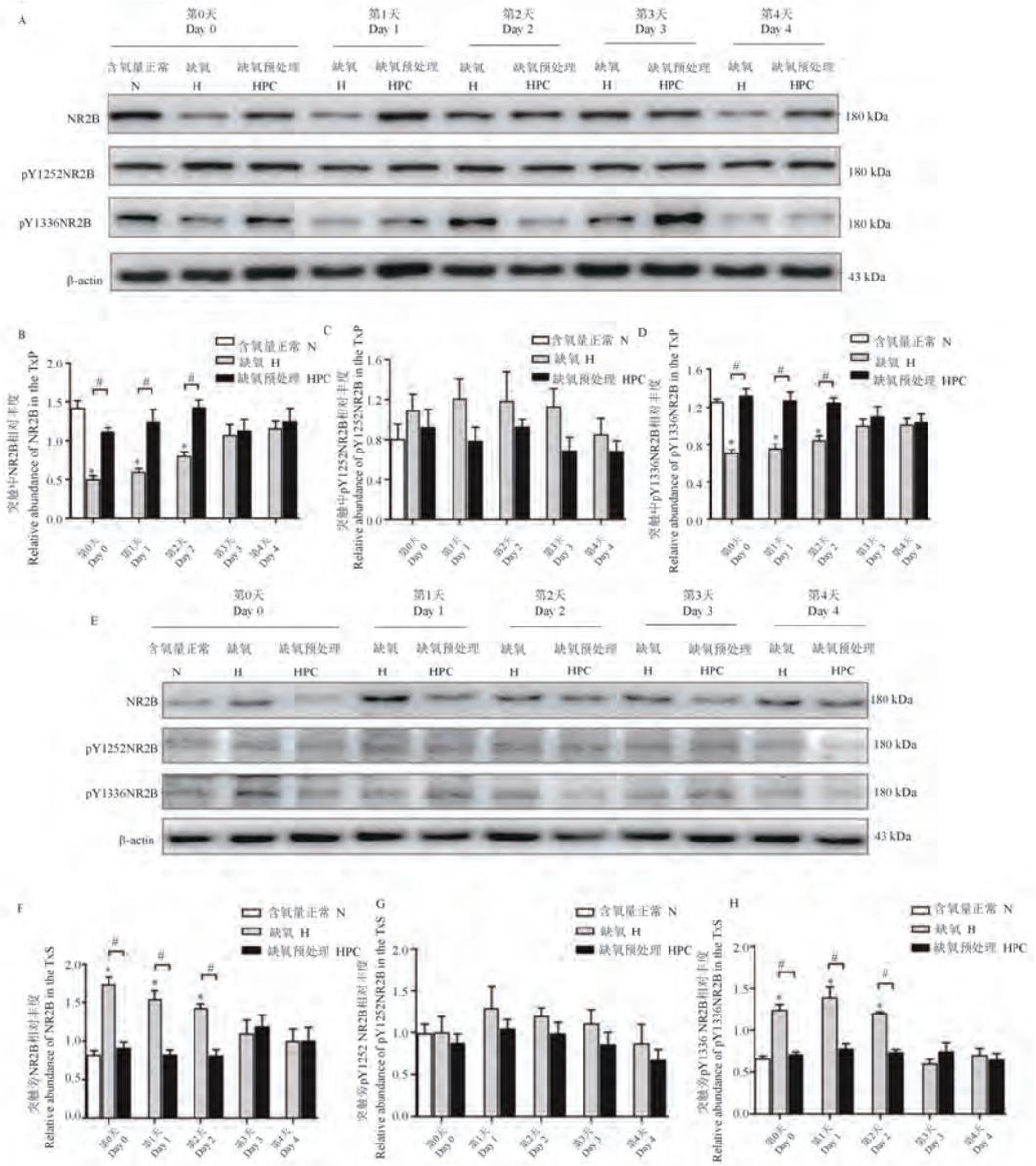
**Figure 1** Effects of hypoxic preconditioning on mouse hippocampal NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B

水平,但不影响 pY1252NR2B 的水平。

## 2.5 HPC 抑制缺氧诱导的 HT22 细胞凋亡

HT22 细胞中使用 Western blot 分析 120 kDa 的  $\alpha$ -spctrin 分解产物和 cleaved caspase-3 水平的变化

来检测细胞凋亡(图 5A)。如图 5B 和 5C 所示,与 N 组相比,H 组 HT22 细胞中 120 kDa  $\alpha$ -spctrin 分解产物和 cleaved caspase-3 水平显著增加( $P<0.05$ )。120 kDa  $\alpha$ -spctrin 分解产物和 cleaved caspase-3 水

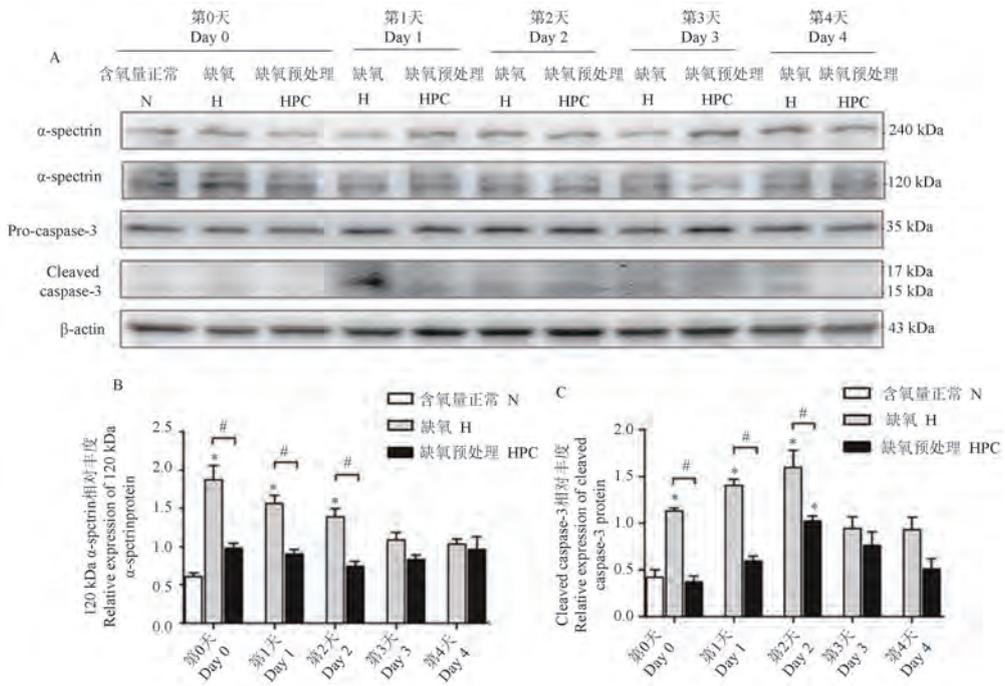


注:A:突触(TxP)中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的 Western blot 蛋白条带;B~D:半定量分析突触(TxP)中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的蛋白质变化( $n=6$ );E:突触旁(TxS)中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的 Western blot 蛋白条带;F~H:半定量分析突触旁(TxS)中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 的蛋白质变化( $n=6$ )。与 N 组相比,\* $P<0.05$ ;与 H 组相比,# $P<0.05$ 。

**图 2** HPC 对小鼠海马突触成分和突触外成分中 pY1252NR2B、pY1336NR2B 和 NR2B 分布的影响

Note. A, NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B in synaptic (TxP) Western blot typical plots. B~D, Semi-quantitative analysis of protein changes of NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B in synapses (TxP) ( $n=6$ ). E, Typical plot of Western blot of NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B in the parasympathetic (TxS) synapse. F~H, Semi-quantitative analysis of protein changes of NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B in the parasympathetic (TxS) ( $n=6$ ). Compared with N group, \* $P<0.05$ . Compared with H group, # $P<0.05$ .

**Figure 2** Effects of HPC on the distribution of pY1252NR2B, pY1336NR2B and NR2B in synaptic and extrasynaptic components of mouse hippocampus

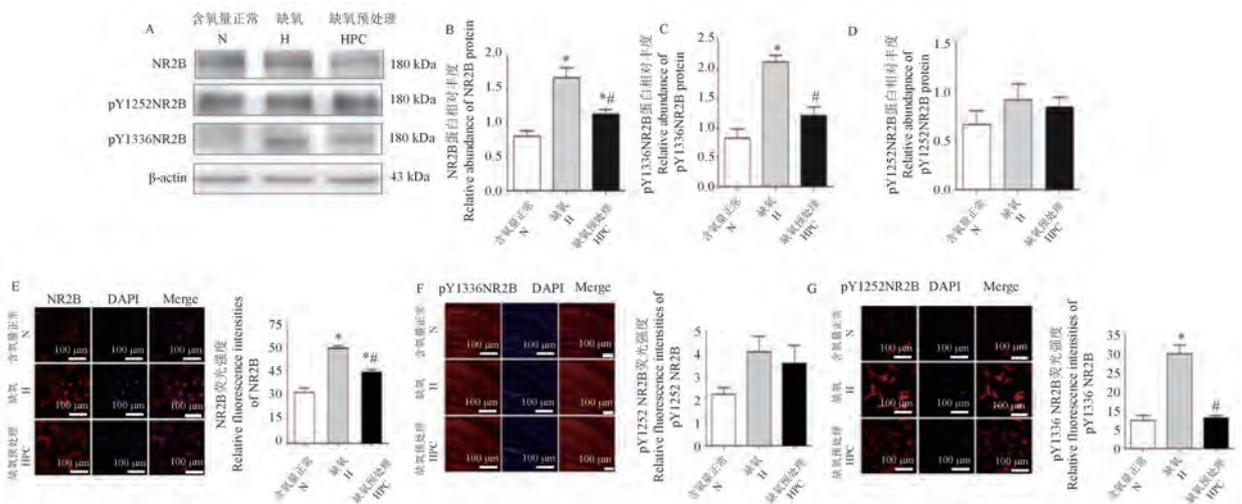


注:A: Cleaved caspase-3 和  $\alpha$ -spectrin 的 Western blot 典型条带; B: 半定量分析 120 kDa  $\alpha$ -spectrin 蛋白质变化; C: 半定量分析 cleaved caspase-3 水平的蛋白质变化。与 N 组相比,  $*P < 0.05$ ; 与 H 组相比,  $\#P < 0.05$ 。

图 3 HPC 对小鼠海马 cleaved caspase-3 蛋白和  $\alpha$ -spectrin 的影响

Note. A, Typical plot of Western blot for cleaved caspase-3 and  $\alpha$ -spectrin. B, Semi-quantitative analysis of 120 kDa  $\alpha$ -spectrin protein changes. C, Semi-quantitative analysis of protein changes in cleaved caspase-3 levels. Compared with N group,  $*P < 0.05$ . Compared with H group,  $\#P < 0.05$ .

Figure 3 Effect of HPC on cleaved caspase-3 protein and  $\alpha$ -spectrin in mouse hippocampus

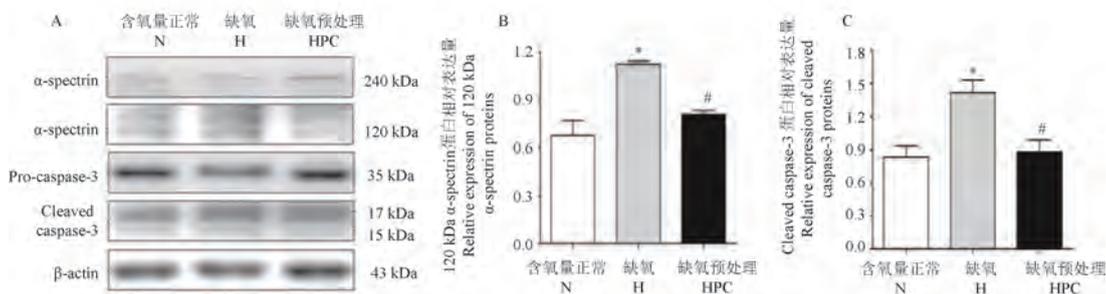


注:A: NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 蛋白 Western blot 典型条带; B~D: 半定量分析表明 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 中的蛋白质变化 ( $n = 3$ ); E~G: HT22 细胞中 NR2B、pY1252NR2B、pY1336NR2B 的免疫荧光及其相对荧光强度 ( $n = 5$ )。与 N 组相比,  $*P < 0.05$ ; 与 H 组相比,  $\#P < 0.05$ 。

图 4 HPC 对 HT22 细胞中 NR2B、pY1252NR2B 和 pY1336NR2B 蛋白的影响

Note. A, Typical plot of Western blot for NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B proteins. B~D, Semi-quantitative analysis showing protein changes in NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B ( $n = 3$ ). E~G, Immunofluorescence of NR2B, pY1252NR2B, pY1336NR2B and their relative fluorescence intensity in HT22 cells ( $n = 5$ ). Compared with N group,  $*P < 0.05$ . Compared with H group,  $\#P < 0.05$ .

Figure 4 Effect of HPC on NR2B, pY1252NR2B and pY1336NR2B proteins in HT22 cells



注:A:cleaved caspase-3和 $\alpha$ -spectrin蛋白Western blot的典型图;B:半定量分析120 kDa $\alpha$ -spectrin蛋白水平变化;C:半定量分析cleaved caspase-3蛋白水平变化。与N组相比,\* $P<0.05$ ;与H组相比,# $P<0.05$ 。

图5 HPC对HT22细胞中cleaved caspase-3和 $\alpha$ -spectrin蛋白的影响

Note. A, Typical plot of Western blot for cleaved caspase-3 and  $\alpha$ -spectrin proteins. B, Semi-quantitative analysis of 120 kDa  $\alpha$ -spectrin protein level changes. C, Semi-quantitative analysis of cleaved caspase-3 protein level changes. Compared with N group, \* $P<0.05$ . Compared with H group, # $P<0.05$ .

Figure 5 Effect of HPC on cleaved caspase-3 and  $\alpha$ -spectrin proteins in HT22 cells

平在HPC组中恢复正常。这些结果表明HPC可能抑制由低氧引起的细胞凋亡。

### 3 讨论

低氧/缺血后NR2B水平变化决定了神经细胞的生死,NR2B水平的下调可能有助于低氧/缺血条件下的神经保护。全脑和局灶脑缺血模型的损伤过程中,在缺血的早期阶段NR2B表达发生上调<sup>[13]</sup>。大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)会增加大鼠海马中的NR2B水平,而降低NR2B水平会抑制神经细胞突触损伤<sup>[14]</sup>。本研究发现HPC降低了小鼠海马早期(第0天)和晚期第0~2天的NR2B水平,体外细胞实验也显示HPC可以降低NR2B的水平。同时,通过体内体外检测pro-caspase3和cleaved caspase-3水平显示在HPC处理后可以降低低氧引起的细胞损伤。Zhu等<sup>[15]</sup>观察到模拟高海拔低氧可降低海马CA1区NR2B的蛋白表达并减轻了神经元的低氧损伤。本研究结果提示HPC诱导NR2B的降低在神经保护中可能起到了关键作用。

蛋白质磷酸化与低氧/缺血大脑中调节多种的细胞反应有关。NR2B磷酸化可以通过脑中Src家族激酶Fyn来调节。抑制Src可减轻低氧缺血性损伤引起的神经损伤和神经病理变化<sup>[16]</sup>。NR2B亚基的细胞内C端共含有25个酪氨酸残基,其中1252、1336和1472个酪氨酸残基在人胚胎肾成纤维细胞中与Fyn共表达时可被磷酸化。pY1472 NR2B的上调参与超氧化物介导的氧化应激并导致低氧-缺血脑损伤<sup>[17]</sup>。我们研究了NR2B在Y1252

和Y1336位点的磷酸化,发现低氧增加小鼠海马组织和体外HT22细胞中pY1336的水平显著增加,而HPC处理后其水平降低至对照组水平。低氧及HPC处理均不影响pY1252NR2B的水平。文献报道NMDA受体激活可能与Fyn介导的Y1336 NR2B磷酸化有关<sup>[18]</sup>。因此,HPC诱导的pY1336NR2B下调可能有助于减轻脑损伤。

突触或突触旁NR2B水平可能会影响神经元细胞在低氧/缺血条件下的存亡。NR2B位于突触或突触旁是否决定细胞命运方面仍有争议。Zhou等<sup>[19-20]</sup>表明NR2B突触和突触旁NMDAR的功能类似,证明它们在NMDAR介导的促生存信号和神经元死亡的双向调节中发挥相似而不是相反的作用。Tu等<sup>[21]</sup>发现突触旁NR2B亚基充当中风神经损伤的调节枢纽。Buonarati等<sup>[22]</sup>研究发现突触旁位点NR2B结合区域的突变可以防止神经元细胞死亡。本研究发现低氧条件下突触旁部位的NR2B和pY1336NR2B水平增加,但在HPC后恢复到基线;在突触部位观察到相反的趋势,低氧期间水平下降,HPC后水平上升。本研究结果表明,突触旁位点的NR2B和pY1336NR2B可能有助于HPC诱导的神经保护。

HPC可以在缺血/低氧条件下抑制细胞死亡并促进细胞存活。激活的cleaved caspase-3和 $\alpha$ -spectrin会导致细胞凋亡增加,这是缺血/低氧脑损伤中细胞死亡的重要指标<sup>[9]</sup>。而Deridder等<sup>[23]</sup>的研究表明在损伤条件下阻断含有NR2B的NMDAR、Caspase-3和钙蛋白酶的活化都会减弱。由此可以推测HPC可以在缺血/低氧条件下通过调

控 NR2B/Caspase-3 这一途径抑制细胞死亡并促进细胞存活。在本研究第 0~2 天激活的 cleaved caspase-3 和  $\alpha$ -spectrin 水平的变化趋势与突触旁部位的 NR2B 和 pY1336NR2B 类似。HPC 可能会延迟过度激活 NR2B 触发的神经元死亡信号通路<sup>[24]</sup>。我们先前证明 HPC 可诱导小鼠海马的脑源性神经营养因子(BDNF)增加<sup>[25]</sup>。BDNF 能够增强脑缺血后的神经发生,同时保持细胞存活和细胞凋亡之间的微妙平衡。BDNF 控制神经元的存活和生长,在不同大脑区域的突触传递和可塑性中发挥作用,并触发抗凋亡途径以保护神经元<sup>[26]</sup>。因此,HPC 诱导的突触旁位点 NR2B 和 pY1336NR2B 的下调可能有助于通过抑制激活的 cleaved caspase-3 和  $\alpha$ -spectrin 来达到神经保护作用。

总之,本研究显示 HPC 在体内和体外均可降低小鼠海马中 NR2B 和 pY1336NR2B 的水平。在突触旁位点观察到的变化与全细胞水平的变化相似,而在突触部位观察到的变化与全细胞水平相反。突触旁位点 NR2B 和 pY1336NR2B 的减少可能参与 HPC 诱导内源性神经保护作用的分子机制。然而,突触部位 NR2B 和 pY1336NR2B 增加在神经保护中的作用需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] GUO B, SONG H, FAN J, et al. The NR2B-targeted intervention alleviates the neuronal injuries at the sub-acute stage of cerebral ischemia; an exploration of stage-dependent strategy against ischemic insults [J]. *Exp Brain Res*, 2023, 241(11/12): 2735-2750.

[ 2 ] CHANG Z, LIU Q, FAN P, et al. Hypoxia preconditioning increases Notch1 activity by regulating DNA methylation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Biol Rep*, 2024, 51(1): 507.

[ 3 ] WANG L, FU G, HAN R, et al. MALAT1 and NEAT1 are neuroprotective during hypoxic preconditioning in the mouse hippocampus possibly by regulation of NR2B [EB/OL]. [2024-05-29]. [https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ham.2023.0135?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ham.2023.0135?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed).

[ 4 ] MONTORI S, DOS-ANJOS S, MARTÍNEZ-VILLAYANDRE B, et al. Age and meloxicam attenuate the ischemia/reperfusion-induced down-regulation in the NMDA receptor genes [J]. *Neurochem Int*, 2010, 56(8): 878-885.

[ 5 ] CHEN M, LU T J, CHEN X J, et al. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance [J]. *Stroke*, 2008, 39(11): 3042-3048.

[ 6 ] KNOX R, BRENNAN-MINNELLA A M, LU F, et al. NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 contributes to brain injury in a

rodent model of neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Stroke*, 2014, 45(10): 3040-3047.

[ 7 ] BESSHOH S, BAWA D, TEVES L, et al. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain [J]. *J Neurochem*, 2005, 93(1): 186-194.

[ 8 ] SHAO G, GAO C Y, LU G W. Alterations of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the hippocampus of mice acutely and repeatedly exposed to hypoxia [J]. *Neurosignals*, 2005, 14(5): 255-261.

[ 9 ] LIU N, ZHANG X L, JIANG S Y, et al. Neuroprotective mechanisms of DNA methyltransferase in a mouse hippocampal neuronal cell line after hypoxic preconditioning [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(12): 2362-2368.

[ 10 ] GOEBEL-GOODY S M, DAVIES K D, ALVESTAD LINGER R M, et al. Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors in adult hippocampal slices [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(4): 1446-1459.

[ 11 ] LIU N, ZHANG Y, ZHANG P, et al. Vascular endothelial growth factor and erythropoietin show different expression patterns in the early and late hypoxia preconditioning phases and may correlate with DNA methylation status in the mouse hippocampus [J]. *High Alt Med Biol*, 2022, 23(4): 361-368.

[ 12 ] SUN D, LU F, SHELDON A, et al. Neuronal deficiency of hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  increases hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice [J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(11): 2964-2975.

[ 13 ] GAPPOEVA M U, IZYKENOVA G A, GRANSTREM O K, et al. Expression of NMDA neuroreceptors in experimental ischemia [J]. *Biochemistry*, 2003, 68(6): 696-702.

[ 14 ] LIANG X, SHI L, WANG M, et al. Folic acid ameliorates synaptic impairment following cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting excessive activation of NMDA receptors [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 112: 109209.

[ 15 ] ZHU M, XU M, ZHANG K, et al. Effect of acute exposure to hypobaric hypoxia on learning and memory in adult Sprague-Dawley rats [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 367: 82-90.

[ 16 ] QIU H, QIAN T, WU T, et al. Src family kinases inhibition ameliorates hypoxic-ischemic brain injury in immature rats [J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 746130.

[ 17 ] ZHANG X, PENG K, ZHANG X. The function of the NMDA receptor in hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 567665.

[ 18 ] WU H Y, HSU F C, GLEICHMAN A J, et al. Fyn-mediated phosphorylation of NR2B Tyr-1336 controls calpain-mediated NR2B cleavage in neurons and heterologous systems [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20075-20087.

[ 19 ] ZHOU X, DING Q, CHEN Z, et al. Involvement of the GluN2A and GluN2B subunits in synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function and neuronal excitotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(33): 24151-24159.

- [20] ZHOU X, HOLLERN D, LIAO J, et al. NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(3): e560.
- [21] TU W, XU X, PENG L, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010, 140(2): 222-234.
- [22] BUONARATI O R, COOK S G, GOODELL D J, et al. CaMKII versus DAPK1 binding to GluN2B in ischemic neuronal cell death after resuscitation from cardiac arrest [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(1): 1-8.
- [23] DERIDDER M N, SIMON M J, SIMAN R, et al. Traumatic mechanical injury to the hippocampus *in vitro* causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(1): 165-176.
- [24] ZHANG S, TAGHIBIGLOU C, GIRLING K, et al. Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(18): 7997-8008.
- [25] ZHANG S, FU W, JIA X, et al. Hypoxic preconditioning modulates BDNF and its signaling through DNA methylation to promote learning and memory in mice [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(12): 2320-2332.
- [26] ZHU T, WANG L, XIE W, et al. Notoginsenoside R1 improves cerebral ischemia/reperfusion injury by promoting neurogenesis via the BDNF/Akt/CREB pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 615998.

[收稿日期]2024-05-15



## 过表达 ACE2 通过抑制 NF- $\kappa$ B/VEGF/VEGFR2 通路改善 $A\beta$ -诱导的血脑屏障损伤和血管生成

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经退行性疾病,其发病机制尚不清楚。其主要病理特征之一是  $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ )的细胞外沉积,可对脑血管系统和血脑屏障造成损害。最近的研究表明,脑血管功能障碍、脑血流量减少、血脑屏障通透性障碍发生时间早于认知障碍。因此,改善血管功能对于 AD 的进展和治疗可能具有重要意义。血管紧张素-转换酶 2(ACE2)是肾素-血管紧张素系统中的重要成分。其主要生理功能是降解血管紧张素 II,血管紧张素 II 作用于血管收缩和增压,以维持血压稳定。在大脑中,ACE2 主要表达于内皮细胞和神经元。研究表明,AD 患者海马和扣带皮层中 ACE2 的表达降低。在携带载脂蛋白 E(APOE) $\epsilon$ 4 等位基因的 AD 患者中,ACE2 的活性降低,这与  $A\beta$  水平显著相关。然而,ACE2 在 AD 中的具体作用仍不清楚。

来自中国医学科学院医学实验动物研究所神经退行性疾病课题组的研究人员通过在  $A\beta_{25-35}$  聚合物诱导条件下培养 bEnd. 3 细胞来诱导体外 AD 内皮细胞损伤,并通过慢病毒转染在 bEnd. 3 细胞系中实现 ACE2 过表达;使用 CCK-8 检测检测了  $A\beta_{25-35}$  对细胞活力的影响,并使用血管生成检测了过表达 ACE2 对血管生成的影响;使用 Western blot 和细胞免疫荧光来检测 VEGF/VEGFR2 通路、紧密连接蛋白和 NF- $\kappa$ B 通路表达的变化。

结果显示, $A\beta_{25-35}$  处理显著降低了 ACE2 的表达并降低了细胞活力。ACE2 过表达直接减少小管形成中分支和连接的数量,抑制  $A\beta_{25-35}$  诱导的 VEGF/VEGFR2 通路的激活,增加 TJPs 的表达,包括 ZO-1 和 claudin-5,并恢复了  $A\beta_{25-35}$  诱导的 NF- $\kappa$ B 通路激活。

综上所述,研究表明 ACE2 的过表达可以通过抑制 NF- $\kappa$ B/VEGF/VEGFR2 通路活性来改善体外 AD 内皮细胞模型中的病理性血管生成和血脑屏障损伤。因此,ACE2 有成为 AD 中内皮细胞功能障碍治疗靶点的潜力。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(3): 237-244. <http://doi.org/10.1002/ame2.12324>)。

金爱花,朱洁波,全吉淑. 草苈蓉纳拉昔对 SMMC-7721 肝癌细胞上皮-间质转化的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 11-18.

Jin AH, Zhu JB, Quan JS. *Boschniakia rossica* boschnaloside inhibition of epithelial-mesenchymal transition of hepatoma SMMC-7721 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 11-18.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.002

# 草苈蓉纳拉昔对 SMMC-7721 肝癌细胞上皮-间质转化的抑制作用

金爱花<sup>1</sup>, 朱洁波<sup>2</sup>, 全吉淑<sup>2\*</sup>

(1. 延边大学附属医院(延边医院), 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

**【摘要】** **目的** 探讨草苈蓉纳拉昔(*Boschniakia rossica* boschnaloside, BRBN)对 SMMC-7721 肝癌细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)以及侵袭、迁移的抑制作用。**方法** 用转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 诱导 SMMC-7721 肝癌细胞建立 EMT 模型。将其分为对照组、模型组、BRBN 组, 利用细胞划痕愈合实验检测肝癌细胞迁移能力, Transwell 侵袭实验检测肝癌细胞侵袭能力, Western blot 法检测 E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、Slug、Twist1、ZEB1 及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) 的蛋白表达。**结果** TGF- $\beta_1$  使 SMMC-7721 肝癌细胞发生纤维状间质样改变, E-钙黏蛋白表达下调, N-钙黏蛋白和波形蛋白表达上调, 提示 SMMC-7721 细胞获得间质表型。与模型组比较, BRBN 组 SMMC-7721 细胞侵袭率和迁移率均显著降低 ( $P < 0.05$ ), E-钙黏蛋白表达显著升高 ( $P < 0.05$ ), N-钙黏蛋白和波形蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), Slug、Twist1、ZEB1 蛋白表达均显著下调 ( $P < 0.05$ ), STAT3 磷酸化水平显著降低。**结论** BRBN 可抑制 SMMC-7721 肝癌细胞侵袭、迁移, 其作用机制可能与 STAT3 介导的 EMT 逆转有关。

**【关键词】** 草苈蓉; 草苈蓉纳拉昔; SMMC-7721 细胞; 上皮-间质转化; STAT3

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0011-08

## *Boschniakia rossica* boschnaloside inhibition of epithelial-mesenchymal transition of hepatoma SMMC-7721 cells

JIN Aihua<sup>1</sup>, ZHU Jiebo<sup>2</sup>, QUAN Jishu<sup>2\*</sup>

(1. the Affiliated Hospital of Yanbian University (Yanbian Hospital), Yanji 133000, China.

2. Yanbian University Medical College, Yanji 133002)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the inhibitory effect of *Boschniakia rossica* boschnaloside (BRBN) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT), invasion, and migration of human hepatoma SMMC-7721 cells. **Methods** Transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) was used to induce an EMT model of SMMC-7721 cells. The cells were divided into a control group, model group, and BRBN group. Cell migration was detected with a wound healing test, and cell invasion was observed by Transwell chamber assay. The expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Slug, Twist1, ZEB1, and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) were determined with the Western blot method. **Results** TGF- $\beta_1$  resulted in spindle-shaped SMMC-7721 cells, down-regulated the expression of E-cadherin, and up-

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82060113)。

**【作者简介】** 金爱花(1984—), 女, 博士, 研究方向: 分子肿瘤学。E-mail: aihua1028@sina.com

**【通信作者】** 全吉淑(1968—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 分子肿瘤学。E-mail: quanjs@ybu.edu.cn

regulated the expression of N-cadherin and vimentin, suggesting that SMMC-7721 cells obtained a mesenchymal phenotype. Compared with the model group, the BRBN group SMMC-7721 cells' expression of E-cadherin was significantly increased, their expression of N-cadherin and vimentin were reduced, and their expression of Slug, Twist1, and ZEB1, as well as STAT3 phosphorylation, were down-regulated. **Conclusions** BRBN inhibits the invasion and migration of human hepatoma SMMC-7721 cells, possibly by reversing EMT through the STAT3 pathway.

**[Keywords]** *Boschniakia rossica*; *Boschniakia rossica* boschnalioside; SMMC-7721 cells; EMT; STAT3

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

原发性肝癌是临床常见的消化系统恶性肿瘤,根据 GLOBOCAN 2022 数据库,原发性肝癌是全球癌症死亡的第三大原因,而在我国癌症死亡率排名中位居第二,仅次于肺癌;中青年人(20~59 岁)甚至高居首位<sup>[1-3]</sup>。近年来我国肝癌发病率和死亡率虽逐年降低,但疾病负担仍然很重,这与肝癌生长迅速、恶性程度高、转移早及预后差等有关<sup>[2-4]</sup>。肝癌转移和复发是决定肝癌高死亡率的主要原因,因此控制肝癌转移是提高肝癌患者生存率的关键之一<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞需要经过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,使上皮样细胞失去顶端-基底极性和细胞黏附功能,转化为间质细胞,获得侵入性<sup>[6]</sup>。转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )是介导 EMT 过程的最重要因子之一,在多种肿瘤细胞的 EMT 模型构建中常作为诱导因子使用<sup>[5-7]</sup>。

草苈蓉(*Boschniakia rossica Fedtsch. et Flerov*)属于列当科草苈蓉属草本植物,为国家级重要保护植物,主要分布在我国长白山地区以及俄罗斯、朝鲜和日本的部分山区,生长于山坡及沟边低湿处<sup>[8-9]</sup>。草苈蓉又称“不老草”,全草可入药,在民间常做肉苈蓉的替代品;性味甘、酸,具有补肾壮阳、润肠通便之功效,主治肾虚阳痿、腰膝冷痛、小便遗沥、肠燥便秘、风湿关节炎、膀胱炎、血尿等症<sup>[8-9]</sup>。据文献报道,草苈蓉具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种药理作用,而草苈蓉环烯醚萜是其抗癌的重要有效部位,在多种肿瘤细胞和动物模型中验证了其抗癌作用,包括抗癌前病变、抗移植瘤、抗 EMT 等<sup>[10-12]</sup>。草苈蓉纳拉昔(*Boschniakia rossica boschnalioside*, BRBN)为草苈蓉环烯醚萜的主要成分, Lin 等<sup>[13]</sup>发现 BRBN 可通过调节胰高血糖素样肽-1 的作用在体内发挥抗糖尿病作用;杨雪晶等<sup>[14]</sup>通过网络药理学和分子对接分析发现 BRBN 可通过 PI3K/Akt、MAPK 和 HIF-1 信号通路,作用于 AKT1、IL6 等关键靶点,从而发挥抗衰老的作用。然而其抗癌作用尚不清楚,其对 EMT 逆转以及肝癌转移的影响尚未见

报道。本研究以人肝癌细胞 SMMC-7721 为研究对象,利用 TGF- $\beta_1$  诱导构建肝癌细胞 EMT 模型,观察 BRBN 对 SMMC-7721 细胞 EMT 以及肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响,旨在为草苈蓉在肝癌预防与辅助治疗中的应用提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞

人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国科学院上海生命科学研究院。

### 1.2 主要试剂与仪器

BRBN 由延边大学医学院尹宗柱教授惠赠,经 NMR 及 HPLC 检测纯度为 99%,过滤除菌后备用<sup>[15]</sup>。DMEM 高糖培养基(货号 C11995500BT,美国 Gibco 公司);胎牛血清、胰酶(货号 10270-106、25200-072,美国 Gibco 公司);重组人 TGF- $\beta_1$ (货号 100-21C,美国 Peprotech 公司);AG490(货号 573097,美国 Sigma-Aldrich 公司);小鼠 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-Cad)抗体、小鼠 N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-Cad)抗体、兔波形蛋白(Vimentin, Vim)抗体、兔 Slug 抗体、兔 Twist1 抗体、兔 ZEB1 抗体、小鼠信号传导与转录激活因子 3(STAT3)抗体、兔 p-STAT3 抗体(货号分别为 11472、14215、5741、9585、46702、3396、4904、9145,美国 Cell Signaling Technology 公司);山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(货号 AP-124、AP-132,美国 Merck 公司)。Thermo 371 型二氧化碳培养箱(美国 ThermoFisher 公司);AURA Mini 型无菌超净台(美国 BIOAIR 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);RT-2100 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);Mini-PROTEAN 型垂直板电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Abby 型化学发光凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞 EMT 模型的构建

人肝癌 SMMC-7721 细胞用含 10%胎牛血清的

DMEM 高糖培养基,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养,选取对数生长期细胞进行消化,取 2×10<sup>6</sup> 个 SMMC-7721 细胞接种于 100 mm 培养皿中培养<sup>[12,16]</sup>。待贴壁后,对照组细胞用无血清培养基处理,模型组则用含 10 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 的无血清培养基处理。观察细胞形态,Western blot 法检测 EMT 相关蛋白表达<sup>[12,16]</sup>。

### 1.3.2 BRBN 安全剂量的选定

取人肝癌 SMMC-7721 细胞进行消化并将细胞密度调至 2×10<sup>5</sup>/mL,接种到 96 孔板。待贴壁后加入含 0、100、200、400 mg/L BRBN 的培养液,继续培养 24 h。CCK-8 法检测 SMMC-7721 细胞存活率,细胞存活率大于 90%,认定为无细胞毒性。

### 1.3.3 细胞分组及处理

取人肝癌 SMMC-7721 细胞分为对照组、模型组和 BRBN 组,对照组用无血清培养基继续处理 48 h,模型组用 10 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 处理 48 h,BRBN 组则用 10 μg/L TGF-β<sub>1</sub> 和 200 mg/L BRBN 联合处理 48 h 后,检测 EMT 相关指标以及 STAT3 表达<sup>[12]</sup>。STAT3 通路验证实验中,增设 STAT3 特异抑制剂——AG490 组,其浓度选定为 50 μmol/L<sup>[6]</sup>。

### 1.3.4 细胞形态的观察

取人肝癌 SMMC-7721 细胞进行消化并将细胞铺到 6 孔板,待贴壁后用 PBS 清洗,4% 甲醇固定、苏木素染色后观察其形态学改变<sup>[16]</sup>。

### 1.3.5 细胞侵袭能力的测定

取人肝癌 SMMC-7721 细胞进行消化并收集细胞。Transwell 下室加培养基,上室加基质胶后再加细胞继续培养 48 h。细胞经固定、染色后在倒置显微镜下观察并计数<sup>[12,17]</sup>。

### 1.3.6 细胞迁移能力的测定

取人肝癌 SMMC-7721 细胞进行消化并将细胞

铺到 6 孔板,待贴壁后板内垂直划平行线。随机选 3 个视野,拍摄并记录划痕宽度,分别培养 24 h 和 48 h 后再次拍摄记录划痕宽度,并计算细胞迁移率<sup>[12]</sup>: 细胞迁移率 = (划痕宽度<sub>0h</sub> - 划痕宽度<sub>24 或 48 h</sub>) / 划痕宽度<sub>0h</sub> × 100%。

### 1.3.7 Western blot 检测 EMT 相关蛋白的表达

取人肝癌 SMMC-7721 细胞进行消化并收集细胞。提取总蛋白,上十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转膜 PVDF 膜,封闭 2 h,4 ℃ 一抗孵育过夜,二抗常温孵育 2 h,显影并分析灰度值。

## 1.4 统计学方法

数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用 SPSS 20.0 统计软件分析数据,组间比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

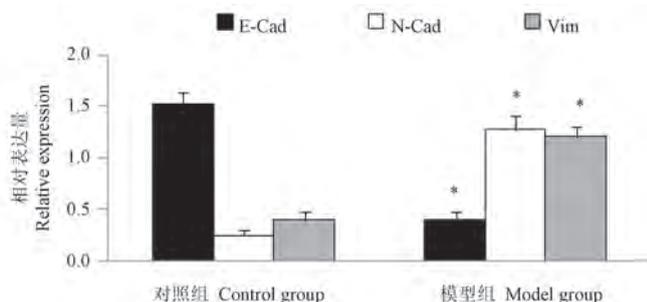
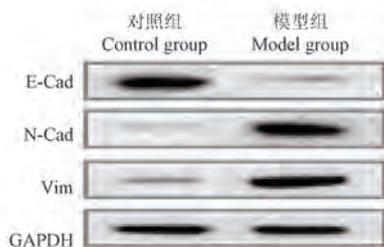
## 2 结果

### 2.1 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 模型的构建

由图 1 可见,对照组 SMMC-7721 细胞 E-Cad 蛋白表达很强,N-Cad、Vim 蛋白表达均弱。与对照组比较,模型组 SMMC-7721 细胞 E-Cad 表达降低(*P* < 0.05),N-Cad、Vim 表达均增加(*P* < 0.05)。提示,TGF-β<sub>1</sub> 诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 模型构建成功。

### 2.2 BRBN 对 SMMC-7721 细胞的毒性检测

如图 2 所示,BRBN 质量浓度为 0~200 mg/L 时,SMMC-7721 细胞存活率均高于 90%,无细胞毒性。BRBN 质量浓度大于 400 mg/L 时,细胞活力显著下降(*P* < 0.01)。因此,本研究以 200 mg/L BRBN 为安全干预剂量进行了后续研究。



注:与对照组相比,\**P* < 0.05。

图 1 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 模型的构建

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

Figure 1 Construction of TGF-β<sub>1</sub>-induced EMT model of SMMC-7721 cells

### 2.3 BRBN 对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 SMMC-7721 细胞形态的影响

对照组 SMMC-7721 细胞形态多数呈卵圆形等上皮样形态,模型组 SMMC-7721 细胞多为梭形等间质样形态;与模型组比较,BRBN 组发生纤维状间质样改变的细胞减少(图 3)。结果提示,BRBN 能抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 SMMC-7721 细胞间质样形态改变。

### 2.4 BRBN 对 TGF- $\beta_1$ 诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 相关标志物表达的影响

由图 4 可见,与对照组比较,模型组 SMMC-7721 细胞 E-Cad 表达降低( $P < 0.05$ ),N-Cad、Vim

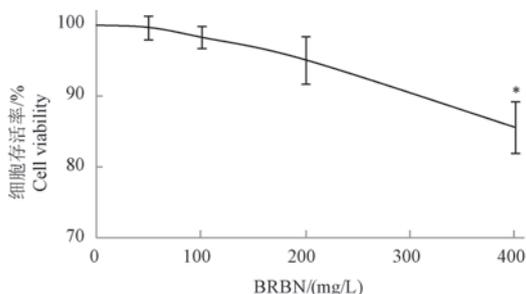
表达均升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRBN 组 E-Cad 表达上调( $P < 0.05$ ),N-Cad、Vim 表达下调( $P < 0.05$ ),表明 BRBN 可抑制人 SMMC-7721 肝癌细胞 EMT 过程。

### 2.5 BRBN 对 TGF- $\beta_1$ 诱导 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响

由图 5 可见,作用 24 h 时,对照组、模型组和 BRBN 组 SMMC-7721 细胞迁移率分别为( $0.58 \pm 0.05$ )、( $1.08 \pm 0.10$ )和( $0.85 \pm 0.07$ )  $\mu\text{m}/\text{h}$ ,作用 48 h 时,3 组细胞迁移率分别为( $0.67 \pm 0.04$ )、( $1.35 \pm 0.11$ )和( $1.02 \pm 0.06$ )  $\mu\text{m}/\text{h}$ 。与对照组比较,24、48 h 时模型组细胞迁移率分别增高 86%和 103%( $P < 0.05$ );与模型组比较,24、48 h 时 BRBN 组细胞迁移率分别下降 22%和 27%( $P < 0.05$ )。结果提示,BRBN 可通过 EMT 的逆转从而抑制人 SMMC-7721 肝癌细胞迁移能力。

### 2.6 BRBN 对 TGF- $\beta_1$ 诱导 SMMC-7721 细胞侵袭能力的影响

由图 6 可见,对照组、模型组和 BRBN 组侵袭细胞数分别为( $110 \pm 9$ )、( $174 \pm 12$ )和( $151 \pm 12$ );模型组侵袭细胞数较对照组升高 58%( $P < 0.05$ );BRBN 组侵袭细胞数较模型组下降 13%( $P < 0.05$ )。结果提示,BRBN 可通过 EMT 的逆转从而抑制人 SMMC-7721 肝癌细胞侵袭能力。



注:与 0 mg/L BRBN 相比, \* $P < 0.01$ 。

图 2 BRBN 对 SMMC-7721 细胞毒性的检测

Note. Compared with 0 mg/L BRBN, \* $P < 0.05$ .

Figure 2 Cytotoxicity detection of BRBN on SMMC-7721 cells

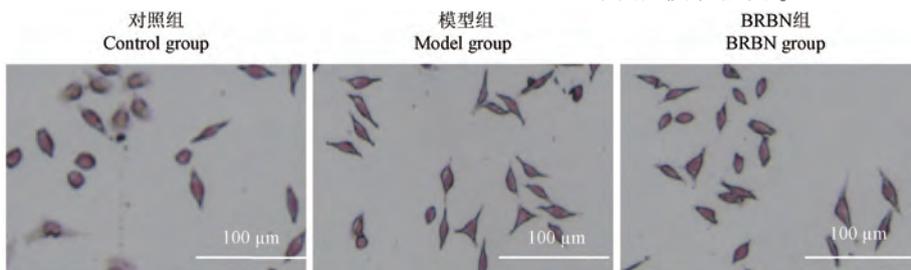
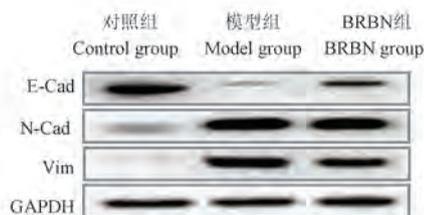


图 3 BRBN 对 SMMC-7721 细胞形态的影响

Figure 3 Effect of BRBN on the morphology of SMMC-7721 cells

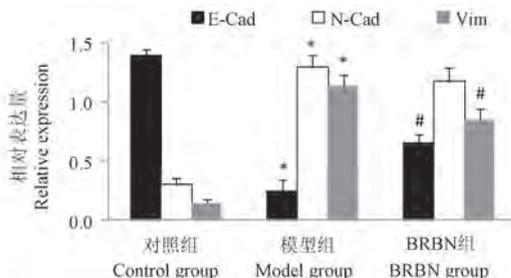


注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 BRBN 对 SMMC-7721 细胞 E-Cad、N-Cad 和 Vim 表达的影响

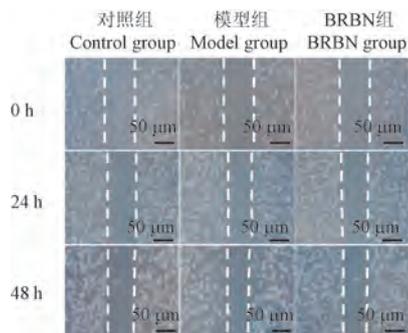
Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 4 Effect of BRBN on the expression of E-Cad, N-Cad and Vim in SMMC-7721 cells



## 2.7 BRBN 对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 相关转录因子表达的影响

由图 7 可见,与对照组比较,模型组 SMMC-7721 细胞 EMT 相关转录因子,如 Slug、Twist1、ZEB1 的蛋白表达均上调( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRBN 组 EMT 相关转录因子的表达均下调( $P < 0.05$ )。该结果与 BRBN 抗 SMMC-7721 细胞 EMT 作用相吻合。

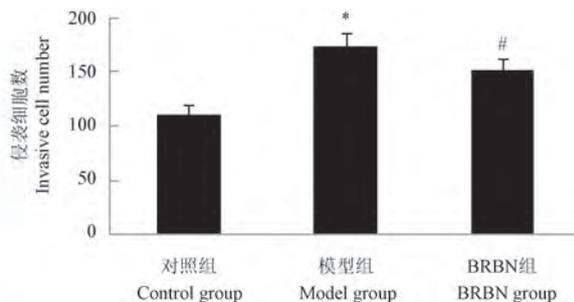
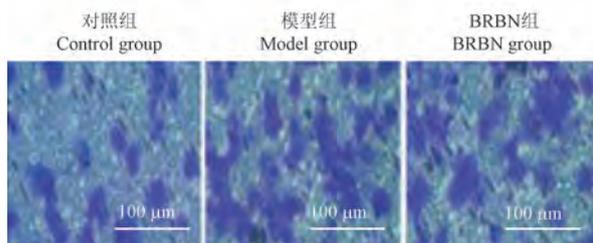
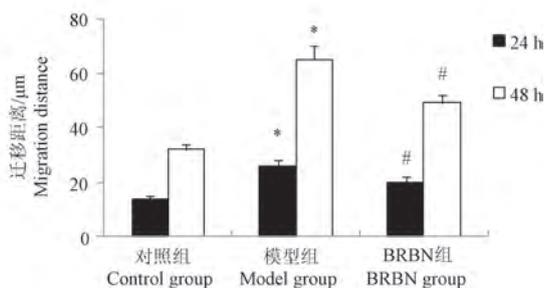


注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 5 BRBN 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响( $\times 40$ )

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 5 Effect of BRBN on the migratory ability of SMMC-7721 cells( $\times 40$ )

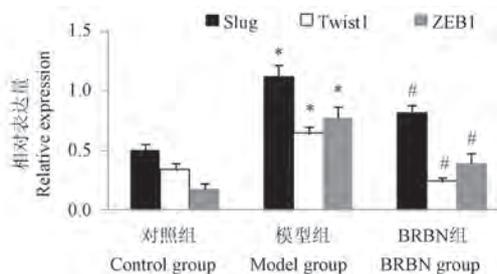
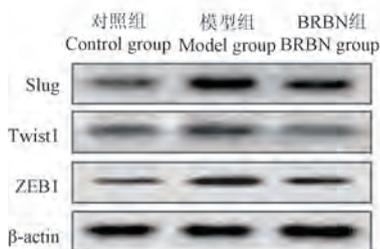


注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 6 BRBN 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 6 Effect of BRBN on the invasive ability of SMMC-7721 cells



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

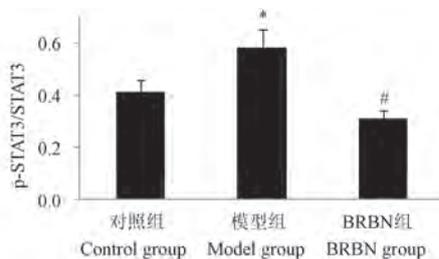
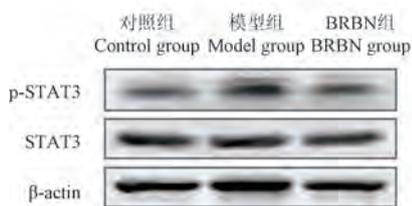
图 7 BRBN 对 SMMC-7721 细胞 EMT 相关转录因子表达的影响

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 7 Effect of BRBN on the expression of EMT-associated transcription factors in SMMC-7721 cells

## 2.8 BRBN 对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 SMMC-7721 细胞 STAT3 蛋白表达的影响

由图 8 可见,与对照组比较,模型组 SMMC-7721 细胞的 STAT3 磷酸化水平增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRBN 组 STAT3 磷酸化水平下降( $P < 0.05$ )。如图 9 可见,为了明确 BRBN 通过调控 STAT3 抑制 SMMC-7721 细胞 EMT 作用,本实验选

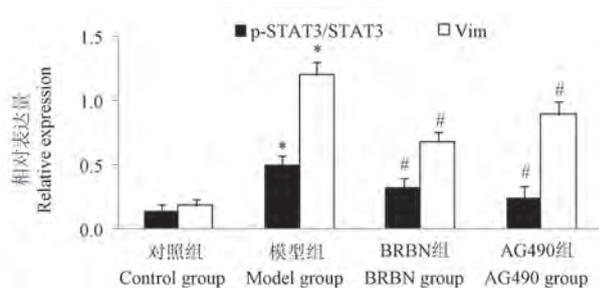


注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

图 8 BRBN 对 SMMC-7721 细胞 STAT3 蛋白表达的影响

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 8 Effect of BRBN on the expression of STAT3 protein in SMMC-7721 cells



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

图 9 BRBN 和 AG490 对 SMMC-7721 细胞 STAT3、Slug 和 Vim 蛋白表达的影响

Note. Compared with the control group, \* $P < 0.05$ . Compared with the model group, # $P < 0.05$ .

Figure 9 Effect of BRBN and AG490 on protein expression of STAT3, Slug and Vim in SMMC-7721 cells

用 STAT3 特异抑制剂 AG490 进行进一步验证。与对照组比较,模型组 SMMC-7721 细胞 p-STAT3、Vim 水平显著增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRBN 组、AG490 组细胞 p-STAT3、Vim 水平降低( $P < 0.05$ )。结果表明 BRBN 抗 SMMC-7721 细胞 EMT 作用是通过调控 STAT3 实现的。

### 3 讨论

肿瘤细胞 EMT 是与肿瘤发生发展和侵袭转移密切相关的生物学过程,能够增强肿瘤细胞远处转移和异位种植能力<sup>[16-19]</sup>。肝癌细胞经 EMT 过程获得侵袭性是肝癌恶性进展的关键驱动因素<sup>[17-19]</sup>。EMT 使肝癌细胞上皮标志物——E-Cad 表达下调,间质上皮标志物——N-Cad 和 Vim 表达上调,从而使上皮细胞获得间质表型,并赋予肝癌细胞脱离原发肿瘤部位向远处转移能力<sup>[16-18]</sup>。肿瘤细胞发生 EMT 是肿瘤早期伴随侵袭转移发生的病理现象,细胞呈纤维样改变,上皮细胞失去细胞极性,黏附连接并获得浸润和迁移能力<sup>[16-18]</sup>。E-Cad 下调或 N-Cad 上调与肿瘤侵袭转移有关;而作为间质细胞的主要细胞骨架成分,Vim 主要功能包括细胞黏附增

加和迁移能力增强<sup>[16-18]</sup>。因此,可通过 E-Cad、N-Cad 和 Vim 水平判断肝癌细胞表型为上皮或间质,有助于了解肿瘤细胞 EMT 程度<sup>[16-18]</sup>。本实验利用 TGF- $\beta_1$  诱导构建 SMMC-7721 细胞 EMT 模型,并发现 TGF- $\beta_1$  干预使 SMMC-7721 肝癌细胞发生明显的形态学变化,肝癌细胞由圆型转变为纺锤样间质形态;E-Cad 下调和 N-Cad、Vim 上调,提示,TGF- $\beta_1$  诱导 SMMC-7721 细胞 EMT 模型构建成功。该结果与前人报道一致<sup>[16-19]</sup>。

据报道中药有效成分对肿瘤转移过程具有调节作用,其对 EMT 的逆转作用可提高肿瘤患者的生存质量,对肿瘤治疗具有重要的现实意义<sup>[20]</sup>。草苈蓉是长白山珍贵保护植物,BRBN 是其抗癌有效部位——环烯醚萜苷的主要成分<sup>[10-12]</sup>。已有研究报道,BRBN 具有抗糖尿病、抗衰老作用,可通过 PI3K、MAPK 等多条信号通路发挥其药理作用<sup>[13-14]</sup>。本研究结果表明,BRBN 减轻 SMMC-7721 肝癌细胞纤维样改变,上调 E-Cad 表达,N-Cad 和 Vim 表达,并减弱 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭能力,提示 BRBN 具有通过 EMT 逆转减轻肿瘤转移的潜力。

肝癌细胞 EMT 相关转录因子有多种,包括 Snail、ZEB 和 Twist,可在 EMT 及肝癌转移过程中发挥重要作用<sup>[19-21]</sup>。EMT 相关转录因子受多条上游信号通路的调控,如 Wnt/ $\beta$ -catenin、Hippo、Notch、Hedgehog 和 STAT3 等均可激活 EMT 并促进肝癌细胞迁移和侵袭<sup>[22-23]</sup>。据文献报道 STAT3 通路可参与细胞内多种生物学过程,包括细胞迁移、侵袭以及肿瘤血管生成<sup>[22-24]</sup>。多种肿瘤细胞,如结直肠癌、乳腺癌和恶性胶质瘤细胞中,STAT3 可通过调控 EMT 过程,影响肿瘤细胞迁移和侵袭能力<sup>[24]</sup>。本实验结果也显示,TGF- $\beta$ 1 处理使 SMMC-7721 细胞 STAT3 磷酸化水平升高,变化趋势与 EMT 相关转录因子——Slug、Twist 一致,提示该 EMT 模型的构建过程中可能有 STAT3 的参与。研究证实,BRBN 可抑制 SMMC-7721 细胞 EMT 过程,此作用与 STAT3 介导的 Slug、Twist1 等 EMT 转录因子的下调有关。

综上所述,BRBN 可抑制 SMMC-7721 肝癌细胞 EMT 过程,减弱 SMMC-7721 细胞迁移、侵袭能力,其作用可能与 STAT3 介导的 EMT 逆转有关。具体调控机制还需进一步研究。该研究为 BRBN 在肿瘤防治中的应用提供科学依据。

#### 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] 胡志强,游伟程,潘凯枫,等.中、美两国癌症流行特征分析——《2023 美国癌症统计报告》解读 [J]. 科技导报, 2023, 41(18): 18-28.  
HU Z Q, YOU W C, PAN K F, et al. Epidemiological characteristics of cancers in China and America: Interpretation of the report of American cancer statistics, 2023 [J]. Sci Technol Rev, 2023, 41(18): 18-28.
- [3] 周昌明,王泽洲,郑莹.2023 年美国癌症数据解读及对中国癌症防治的启示 [J]. 中国癌症杂志, 2023, 33(2): 117-125.  
ZHOU C M, WANG Z Z, ZHENG Y. Interpretation of US cancer statistics 2023 and its implications for cancer prevention and treatment in China [J]. Chin Oncol, 2023, 33(2): 117-125.
- [4] QI J, LI M, WANG L, et al. National and subnational trends in cancer burden in China, 2005-20: an analysis of national mortality surveillance data [J]. Lancet Public Health, 2023, 8(12): e943-e955.
- [5] 陈春苗,张国哲,刘平平,等.小檗碱通过 TGF- $\beta$ /Smad 通路抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肝癌 HepG2 细胞上皮间质转化的

- 研究 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 261-267.  
CHEN C M, ZHANG G Z, LIU P P, et al. Berberine inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer HepG2 cells via TGF- $\beta$ /Smad pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(2): 261-267.
- [6] WANG B, LIU T, WU J C, et al. STAT3 aggravates TGF- $\beta$ 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 214-221.
  - [7] SRIVASTAVA A, SHARMA H, CHOWDHURY S, et al. Transforming growth factor- $\beta$  mediated regulation of epigenome is required for epithelial to mesenchymal transition associated features in liver cancer cells [J]. Heliyon, 2023, 9(4): e14665.
  - [8] 张航,王辉,杨树东.草苳蓉的本草考证及药理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(1): 40-42.  
ZHANG H, WANG H, YANG S D. Herbalogical study and pharmacological effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2016, 32(1): 40-42.
  - [9] 陈庆红,张睿,冯秀春,等.长白山区草苳蓉研究现状与濒危机理 [J]. 现代农业科技, 2015, 44(14): 80-81.  
CHEN Q H, ZHANG R, FENG X C, et al. Research status and endangered mechanism of *Orobanchae coeruleascentis* in Changbai Mountain district [J]. Mod Agric Sci Technol, 2015, 44(14): 80-81.
  - [10] 崔香丹,郑峰,朱洁波,等.草苳蓉环烯醚萜苷对肝癌细胞凋亡及 Bax 和 Bel-2 蛋白表达的影响 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(12): 137-141.  
CUI X D, ZHENG F, ZHU J B, et al. Effect of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* on apoptosis and expression of bax and bel-2 in liver cancer cells [J]. J Food Sci Biotechnol, 2019, 38(12): 137-141.
  - [11] 郑峰.草苳蓉环烯醚萜苷对肝癌细胞株及大鼠肝癌抑制作用的实验研究 [D]. 延吉:延边大学, 2017.  
ZHENG F. Experimental study of the inhibitory effect of iridoids from *Boschniakia rossica* on liver cancer cell lines and rat liver cancer [D]. Yanji: Yanbian University, 2017.
  - [12] 朱洁波,董学花,崔香丹,等.草苳蓉环烯醚萜苷对 SK-Hep1 细胞 EMT 的抑制作用及其机制 [J]. 广东医学, 2019, 40(22): 3103-3107.  
ZHU J B, DONG X H, CUI X D, et al. Inhibitory effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on SK-Hep1 cell EMT and its mechanism [J]. Guangdong Med J, 2019, 40(22): 3103-3107.
  - [13] LIN L C, LEE L C, HUANG C, et al. Effects of boschnalioside from *Boschniakia rossica* on dysglycemia and islet dysfunction in severely diabetic mice through modulating the action of glucagon-like peptide-1 [J]. Phytomedicine, 2019, 62: 152946.
  - [14] 杨雪晶,杨辉萍,张天雷.草苳蓉抗衰老作用的网络药理学研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2024, 40(2): 131-138.  
YANG X J, YANG H P, ZHANG T L. Network pharmacological study on anti-aging effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Harbin

- Univ Commer Nat Sci Ed, 2024, 40(2): 131-138.
- [15] YIN Z Z, KIM H S, KIM Y H, et al. Iridoid compounds from *Boschniakia rossica* [J]. Arch Pharm Res, 1999, 22(1): 78-80.
- [16] 董学花, 延光海, 朱洁波, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷联合 5-氟尿嘧啶对人肝癌 HepG2、SK-Hep1 细胞上皮间质转化的抑制效果研究 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4498-4505.
- DONG X H, YAN G H, ZHU J B, et al. Inhibitory effects of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* combined with 5-fluorouracil on human hepatoma HepG2 and SK-Hep1 cells epithelial-mesenchymal transition [J]. Acupunct Res, 2020, 51(17): 4498-4505.
- [17] 刘茂林, 王晓堂, 宋晓娜, 等. Gli2 调控 Hedgehog 通路活化对 Tca8113 细胞增殖、转移和上皮间质转化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 1-9.
- LIU M L, WANG X T, SONG X N, et al. Gli2 regulates the activation of Hedgehog pathway in proliferation, metastasis, and epithelial mesenchymal transformation of Tca8113 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 1-9.
- [18] 黄青昕. 人参皂苷辛酸酯 Rh2-O 通过调控 c-jun/COX2/PGE2 通路抑制肝癌侵袭转移的机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2023.
- HUANG Q X. Mechanism of ginsenoside octanoate Rh2-O inhibiting liver cancer invasion and metastasis by regulating the c-jun/COX2/PGE2 pathway [D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.
- [19] 贾茗博. 氯化两面针碱对胶质瘤细胞上皮-间质转化的抑制作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- JIA M B. Inhibitory effect and mechanism of nitidine chloride on epithelial-mesenchymal transition of glioma cells [D]. Changchun: Jilin University, 2020.
- [20] 亓丁, 李红梅, 梁铭阁, 等. 中药活性成分对宫颈癌上皮间充质转化干预作用的研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(4): 102-108.
- QI D, LI H M, LIANG M G, et al. Research progress on intervention of active components of traditional Chinese medicine on epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer [J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2023, 37(4): 102-108.
- [21] SRIVASTAVA A, SHARMA H, KHANNA S, et al. Interleukin-6 induced proliferation is attenuated by transforming growth factor- $\beta$ -induced signaling in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Front Oncol, 2021, 11: 811941.
- [22] SENGEZ B, CARR B I, ALOTAIBI H. EMT and inflammation: crossroads in HCC [J]. J Gastrointest Cancer, 2023, 54(1): 204-212.
- [23] LI Y L, ZHANG M M, WU L W, et al. DYRK1A reinforces epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma via cooperatively activating STAT3 and SMAD [J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 34.
- [24] SADRKHANLOO M, ENTEZARI M, OROUEI S, et al. STAT3-EMT axis in tumors: Modulation of cancer metastasis, stemness and therapy response [J]. Pharmacol Res, 2022, 182: 106311.

[收稿日期]2024-05-11

丁世彬, 蒋金金, 李洋. PM2.5 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝炎症细胞因子和淋巴生成的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 19-25.

Ding SB, Jiang JJ, Li Y. Effects of combined exposure to PM2.5 and high-salt diet on liver inflammatory cytokines and lymphangiogenesis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 19-25.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.003

# PM2.5 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝炎症细胞因子和淋巴生成的影响

丁世彬, 蒋金金\*, 李洋

(江苏医药职业学院公共卫生与管理学院, 江苏 盐城 224005)

**【摘要】** 目的 研究大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝炎症和淋巴生成的影响。方法 将 32 只 C57BL/6J 小鼠随机分为: 对照组, PM2.5 组, 高盐(HSD)组和 PM2.5+高盐组。高盐组和 PM2.5+高盐组小鼠连续 8 周给予 8%高盐饲料, 其余两组连续 8 周给予含盐 0.4%的对照饲料; PM2.5 组和 PM2.5+高盐组小鼠采用气管滴注法进行 PM2.5 染毒(每周 2 次); 其余两组小鼠通过气管滴注法滴注等体积生理盐水(每周 2 次)。在 PM2.5 染毒结束 24 h 后, 将全部小鼠处死。测定小鼠肝炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平; 用免疫荧光染色法观察肝 LYVE1 表达水平; 用蛋白免疫印迹法测定肝淋巴生成标志蛋白 PROX1 和 LYVE1 以及淋巴生成调节蛋白 VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白质表达水平。结果 与对照组相比, 高盐组小鼠肝组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平以及肝组织 PROX1、LYVE1、VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。与高盐组相比, PM2.5+高盐组肝组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平以及肝组织 PROX1、LYVE1、VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ); 并且 PM2.5 和高盐饮食对以上指标的影响具有交互作用。结论 大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露显著加重了小鼠肝炎症, 并且可能通过上调肝 VEGFR-3/VEGF-C 蛋白质表达增加淋巴生成。

**【关键词】** PM2.5; 高盐饮食; 肝; 炎症; 淋巴生成

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0019-07

## Effects of combined exposure to PM2.5 and high-salt diet on liver inflammatory cytokines and lymphangiogenesis in mice

DING Shibin, JIANG Jinjin\*, LI Yang

(School of Public Health and Management, Jiangsu Medical College, Yancheng 224005, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of combined exposure to PM2.5 and a high-salt diet on hepatic inflammation and lymphangiogenesis in mice. **Methods** Thirty-two C57BL/6J mice were assigned randomly to control, PM2.5, high-salt (HSD), and PM2.5+HSD groups. Mice in the HSD and PM2.5+HSD groups were fed an 8% high-salt diet for 8 weeks, while mice in the other groups were fed a control diet containing 0.4% salt. Mice in the PM2.5 and PM2.5+HSD groups were treated with PM2.5 by tracheal instillation (twice per week), and mice in the other groups were instilled with equal volumes of saline (twice per week). All mice were sacrificed after the last PM2.5 exposure. Tumor

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82204095); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20210141); 江苏高校“青蓝工程”资助项目(苏教师函[2023]27号, 苏教师函[2024]14号); 江苏省卫生健康委员会医学科研项目(M2022035)。

**【作者简介】** 丁世彬(1982—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 空气污染与代谢性疾病。E-mail: dingshibin@163.com

**【通信作者】** 蒋金金(1985—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 空气污染的毒性效应研究。E-mail: jiang\_jinjin@163.com

necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin (IL)-6 levels in the liver tissues of the mice were determined and lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE1) expression in the liver tissues was visualized by immunofluorescence staining. Protein expression levels of the lymphangiogenesis markers PROX1 and LYVE1, and the lymphangiogenesis regulatory proteins vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor (VEGFR) 3 and VEGF-C in liver tissue were measured by Western blot. **Results** TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and protein expression levels of PROX1, LYVE1, VEGFR-3, and VEGF-C in liver tissues were increased in the HSD group compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and in the PM2.5+HSD group compared with the HSD group ( $P < 0.05$ ). Moreover, there were significant interaction effects between PM2.5 and a high-salt diet on these above indicators. **Conclusions** Combined exposure to PM2.5 and a high-salt diet aggravated hepatic inflammation and may increase hepatic lymphangiogenesis by upregulating VEGFR-3 and VEGF-C in liver of mice.

**[Keywords]** PM2.5; high-salt diet; liver; inflammation; lymphangiogenesis

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

大气细颗粒物(又称 PM2.5)是指空气动力学直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物,是一种严重威胁环境和公共健康的空气污染物。根据 2015 年全球疾病负担的研究结果,持续暴露于 PM2.5 的环境被认定为全球第五大致死风险因素,共造成了 420 万人死亡<sup>[1]</sup>。PM2.5 因其微小的颗粒尺寸,可以随着呼吸进入肺部的肺泡,并进一步进入血液系统,从而对心脏、血管以及肝等远离呼吸系统的器官造成潜在的有害影响<sup>[2-4]</sup>。高盐摄入是导致慢性非传染性疾病,特别是心血管疾病的主要饮食风险因素<sup>[5]</sup>。研究已经证实,高盐饮食和高脂饮食联合暴露能加重小鼠肝炎症损伤和纤维化<sup>[6]</sup>。肝是人体最大的淋巴液生成器官,通过胸导管流动的淋巴液中,有 25%~50%源自肝;在肝发生疾病的过程中,可以观察到正常的肝淋巴管结构和功能遭受破坏<sup>[7]</sup>。然而,大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝炎症和淋巴生成的影响目前尚无报道。因此,本研究将揭示 PM2.5 和高盐联合暴露对小鼠肝炎症和淋巴生成的影响,并分析可能分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

32 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(SPF 级),购自扬州大学比较医学中心[SCXK(苏)2022-0009]。全部小鼠饲养在江苏医药职业学院实验动物房[SYXK(苏)2023-0005],饲养温度为 21~25 $^{\circ}\text{C}$ ,湿度为 60%~70%,以 12 h/12 h 明/暗交替循环。本实验经过江苏医药职业学院伦理委员会批准(SYLL-2022-008),实验过程遵守实验动物伦理规范,符合 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

高盐饲料(含盐 8%)和对照饲料(含盐 0.4%)

(南通特洛菲饲料科技有限公司,中国);白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司,中国);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国,中国);anti-PROX1 抗体、anti-LYVE1 抗体、anti-VEGFR-3 抗体(Abcam 上海公司,中国);anti-VEGF-C 抗体、GAPDH 抗体和 Goat anti-rabbit IgG 抗体(武汉三鹰,中国)。电泳仪(Bio-Rad,美国);双色红外激光成像系统(LI-COR,美国);酶标仪(Thermo 公司,美国);荧光倒置显微镜(Olympus,日本);颗粒采样器(武汉天虹)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 PM2.5 收集

大气 PM2.5 用颗粒采样器连续 24 h 大流量收集。将载有 PM2.5 样本的石英纤维滤膜浸泡在超纯水中超声洗脱 4 h,真空干燥后用无菌生理盐水配制成 PM2.5 混悬液(7.15 mg/mL)待用<sup>[8-9]</sup>。

#### 1.3.2 实验动物分组

将 32 只小鼠随机分为 4 组(每组 8 只):对照组(control)、PM2.5 组(PM2.5)、高盐组(HSD)和 PM2.5+高盐组(PM2.5+HSD)。对照组和 PM2.5 组小鼠给予含盐 0.4%的对照饲料;高盐组 and PM2.5+高盐组小鼠给予含盐 8%的高盐饲料;对照组和高盐组小鼠气管滴注生理盐水;PM2.5 组和 PM2.5+高盐组小鼠每周 2 次气管滴注 5 mg/kg 的 PM2.5 染毒。动物气管内滴注 PM2.5 剂量依据我国《环境空气质量标准》(GB 3095—2012)中关于 PM2.5 浓度的一级浓度限值(24 h 平均浓度为 35  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、小鼠的生理参数和 100 倍不确定因子来确定<sup>[9]</sup>。

### 1.3.3 肝炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 检测

实验结束后,用 20 mg/kg 的戊巴比妥将小鼠麻醉后心脏穿刺取血并处死小鼠,分离肝组织。按 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的 ELISA 试剂盒说明书检测肝组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平。

### 1.3.4 肝组织切片 LYVE1 免疫荧光染色

将肝组织浸泡在 4% 多聚甲醛溶液,用石蜡包埋固定,然后将肝石蜡切片切成 5  $\mu\text{m}$  厚度,然后对肝组织切片进行 LYVE1 荧光染色,用激光共聚焦显微镜观察图像。

### 1.3.5 Western blot 法检测蛋白表达水平

使用全蛋白提取试剂盒从肝组织中提取蛋白质,并利用 BCA 蛋白定量试剂盒来测定样品中的蛋白浓度。Western blot 的具体操作步骤如下:首先,将肝组织样本在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离。接着,将分离后的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上;然后,使用 5% 脱脂奶粉配制的 TBS 溶液对膜进行封闭处理,持续 2 h。封闭后,用 TBS 溶液将膜洗涤 3 次,以去除未结合的物质。最后,将一抗应用于膜上,并在 4  $^{\circ}\text{C}$  下进行过夜孵育,以实现目标蛋白的特异性结合<sup>[9]</sup>。一抗包括:anti-PROX1 抗体、anti-LYVE1 抗体、anti-VEGFR-3 抗体、anti-VEGF-C 抗体和 GAPDH。将硝酸纤维素膜再次用 TBS 洗 3 次后,将膜用二抗室温下孵育 2 h。用双色红外激光成像系统检测样本中蛋白表达水平,用 Image J 软件分析蛋白结果。

## 1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 统计软件分析实验数据,结果中计量资料用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。对多组的均数比较用单因素方差分析,组间均数比较采用 Bonferroni 检验或 Dunnett' T3 检验;使用 2 $\times$ 2 因素

方差分析来确定 PM2.5 和高盐饮食对目的蛋白的影响是否存在交互作用。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露增加了肝 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 浓度

由图 1 可见,对照组和 PM2.5 组小鼠肝 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度的差异无统计学意义( $P>0.05$ );高盐组小鼠肝 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度显著高于对照组( $P<0.05$ );PM2.5+高盐组小鼠肝 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度显著高于对照组、PM2.5 组和高盐组( $P<0.05$ )。

### 2.2 大气 PM2.5 和高盐饮食对肝 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 浓度的交互作用分析

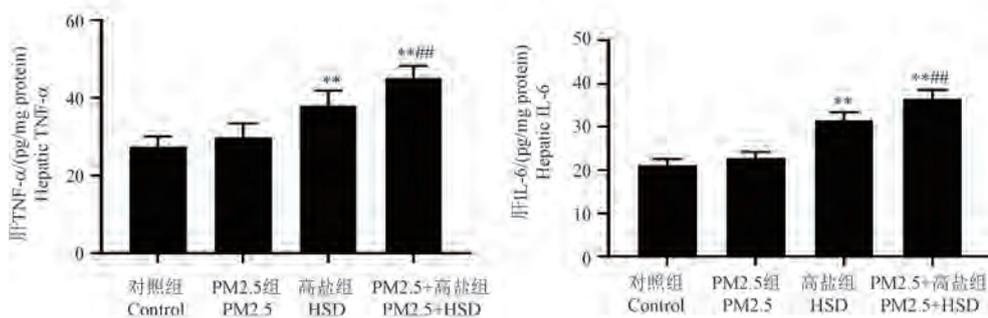
由图 2 可见,把 PM2.5 和高盐饮食作为两个因素进行交互作用分析发现:大气 PM2.5 和高盐饮食对小鼠肝 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度的增加均具有明显交互作用( $P<0.01$ )。

### 2.3 大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露能增加肝淋巴管标志物 LYVE1 表达

由图 3 可见,与对照组相比,高盐组小鼠肝 LYVE1 表达均明显增加;并且 PM2.5+高盐组小鼠肝 LYVE1 表达明显高于其他 3 组。因此,大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露能增加小鼠肝淋巴管生成。

### 2.4 大气 PM2.5 和高盐饮食联合暴露能升高肝 PROX1 和 LYVE1 蛋白表达水平

由图 4 可见,PM2.5 处理的小鼠肝 PROX1 和 LYVE1 蛋白的表达水平相较于对照组有所上升,且这种增加有显著性( $P<0.05$ )。高盐饮食的小鼠肝中这两个蛋白的表达水平明显高于对照组( $P<$

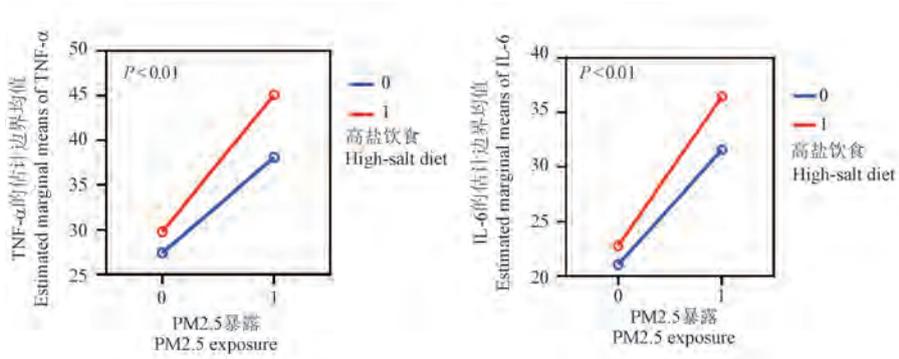


注:与对照组相比,\*\* $P<0.01$ ;与高盐组相比,\*\*\* $P<0.01$ 。

图 1 PM2.5 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的影响

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

Figure 1 Combined exposure of PM2.5 and high-salt diet on hepatic TNF- $\alpha$  and IL-6 in mice



注:横轴中0为非PM<sub>2.5</sub>暴露,1为PM<sub>2.5</sub>暴露;纵轴中蓝色为非高盐饮食,红色为高盐饮食。

图2 PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食对小鼠肝TNF-α和IL-6水平的影响交互作用分析

Note. Horizontal axis, 0 indicates non-PM<sub>2.5</sub> exposure, 1 indicates PM<sub>2.5</sub> exposure. Vertical axis, blue indicates non-high-salt diet, red indicates high-salt diet.

Figure 2 Interaction effect analysis of PM<sub>2.5</sub> and high-salt diet on hepatic TNF-α and IL-6 in mice

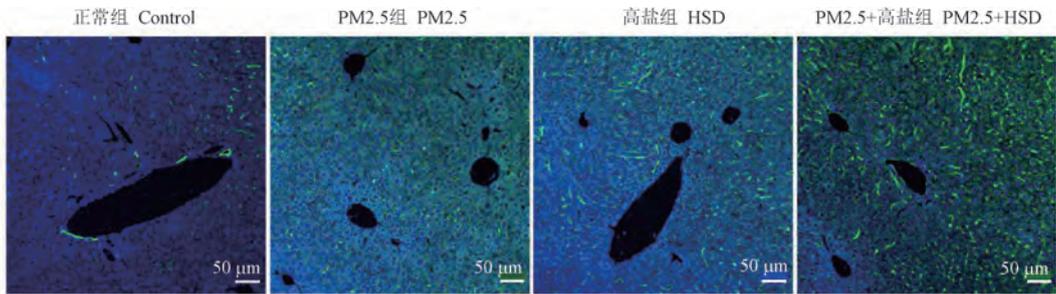
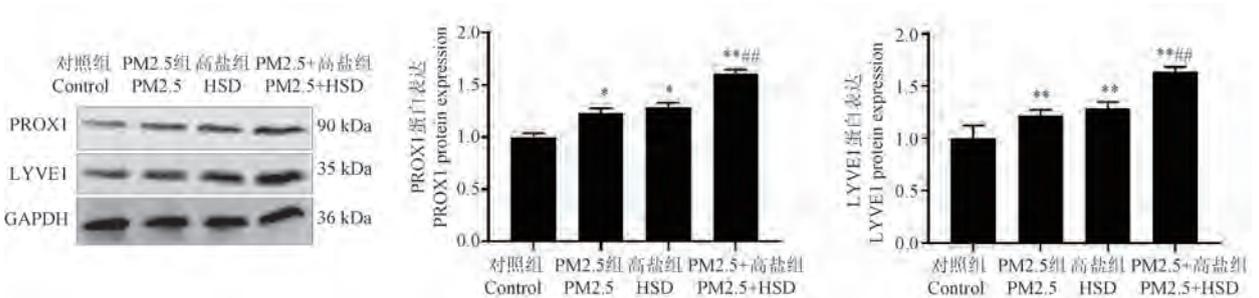


图3 LYVE1免疫荧光染色

Figure 3 Immunofluorescence staining of LYVE1



注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与高盐组相比,## $P < 0.01$ 。

图4 PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食对肝PROX1和LYVE1蛋白表达的影响

Note. Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . Compared with HSD group,## $P < 0.01$ .

Figure 4 Effects of PM<sub>2.5</sub> and high-salt diet on PROX1 and LYVE1 protein expression in liver

0.05)。而对于同时接受PM<sub>2.5</sub>暴露和高盐饮食的小鼠,其肝PROX1和LYVE1的蛋白表达水平不仅显著高于对照组,而且比单独高盐饮食的小鼠更高( $P < 0.05$ )。

## 2.5 大气PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食对肝PROX1和LYVE1蛋白表达的交互作用分析

由图5可见,把大气PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食作为两

个暴露因素进行交互作用分析发现:PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食对肝PROX1和LYVE1蛋白表达的增加具有显著的交互作用( $P < 0.01$ )。

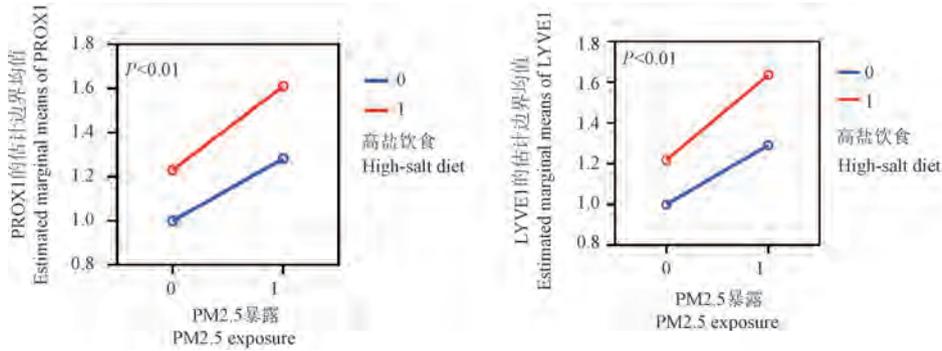
## 2.6 大气PM<sub>2.5</sub>和高盐饮食对肝VEGFR-3和VEGF-C蛋白表达的影响

在对照组和PM<sub>2.5</sub>组之间,小鼠肝VEGF-C蛋白的表达变化没有统计学意义( $P > 0.05$ ,图6)。然

而,高盐组小鼠肝中 VEGFR-3 和 VEGF-C 这两个蛋白的表达水平明显高于对照组( $P<0.05$ )。PM2.5+高盐组小鼠肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白的表达水平显著高于对照组和高盐组( $P<0.05$ )。

## 2.7 大气 PM2.5 和高盐饮食对肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白表达的交互作用分析

由图 7 可见,把大气 PM2.5 和高盐饮食作为两个暴露因素进行交互作用分析发现:PM2.5 和高盐

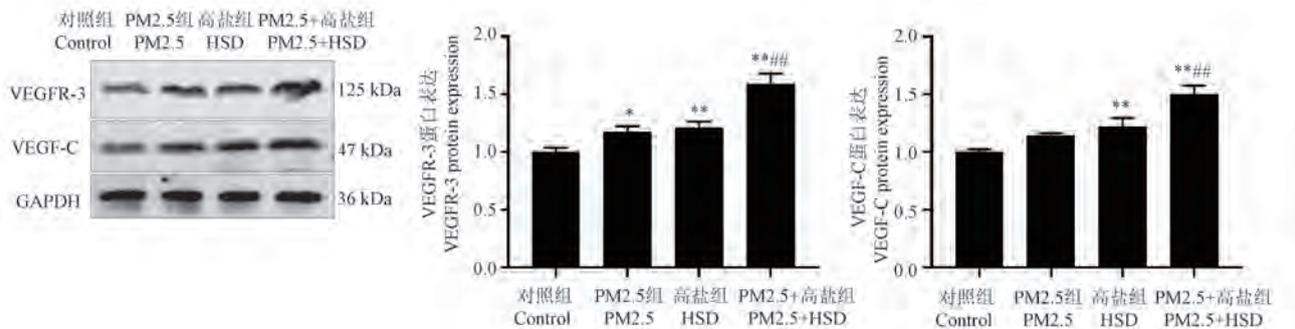


注:横轴中 0 为非 PM2.5 暴露,1 为 PM2.5 暴露;纵轴中蓝色为非高盐饮食,红色为高盐饮食。

图 5 PM2.5 和高盐饮食对小鼠肝 PROX1 和 LYVE1 表达的交互作用分析

Note. Horizontal axis, 0 indicates non-PM2.5 exposure, 1 indicates PM2.5 exposure. Vertical axis, blue indicates non-high-salt diet, red indicates high-salt diet.

Figure 5 Interaction analysis of PM2.5 and high-salt diet on the expression of PROX1 and LYVE1 in the liver of mice

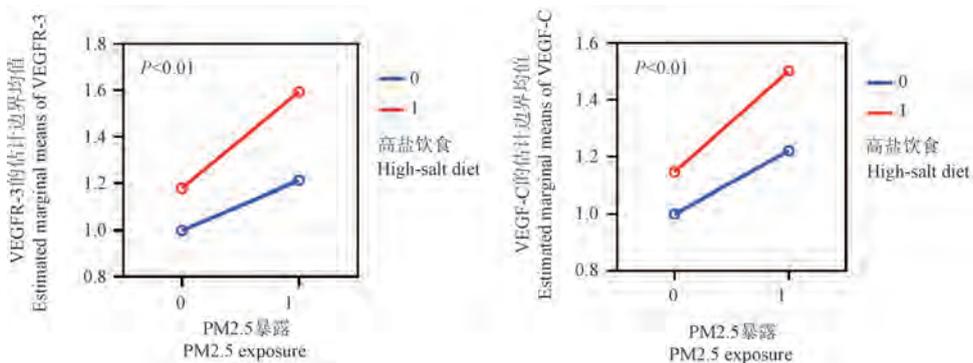


注:与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与高盐组相比, ## $P<0.01$ 。

图 6 PM2.5 和高盐饮食对小鼠肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白表达的影响

Note. Compared with control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ . Compared with HSD group, ## $P<0.01$ .

Figure 6 Effects of PM2.5 and high-salt diet on the protein expression of VEGFR-3 and VEGF-C in liver of mice



注:横轴中 0 为非 PM2.5 暴露,1 为 PM2.5 暴露;纵轴中蓝色为非高盐饮食,红色为高盐饮食。

图 7 PM2.5 和高盐饮食对小鼠肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 表达交互作用分析

Note. Horizontal axis, 0 indicates non-PM2.5 exposure, 1 indicates PM2.5 exposure. Vertical axis, blue indicates non-high-salt diet, red indicates high-salt diet.

Figure 7 Interaction analysis of PM2.5 and high-salt diet on the expression of VEGFR-3 and VEGF-C in liver of mice

饮食对肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 蛋白表达的影响具有显著的交互作用( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 建议人群饮食中盐摄入量应低于 5 g/d, 然而世界上大多数人口盐摄入量仍然超过 10 g/d<sup>[10]</sup>。高盐饮食会增加多种健康风险, 包括心血管疾病、慢性肾疾病和慢性炎症等<sup>[11-13]</sup>。研究报道, 连续 8 周给予高盐饮食后小鼠出现肝脂肪变性和炎症增加, 并伴有高血压和心功能障碍<sup>[14]</sup>。与之前的研究结果一致, 本研究连续 8 周给予 C56BL/6J 小鼠 8% 高盐饮食后发现, 肝组织炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度显著增加。流行病学研究发现, 长期暴露于大气 PM<sub>2.5</sub> 可能会增加代谢相关脂肪性肝病的风险<sup>[15]</sup>。动物实验研究已经证实, 长期大气 PM<sub>2.5</sub> 暴露能导致远端器官肝炎症和纤维化等损伤<sup>[16-17]</sup>, 这表明肝也是 PM<sub>2.5</sub> 毒性效应的靶器官之一。有研究报道, PM<sub>2.5</sub> 能显著增加 ApoE 基因敲除小鼠血清炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平<sup>[18]</sup>, 但本研究中 PM<sub>2.5</sub> 暴露并没有显著增加对照饮食 (含盐 0.4%) 喂养小鼠肝炎症细胞因子水平。目前, 我国很多居民存在高盐摄入和大气 PM<sub>2.5</sub> 暴露共存的现实情况, 但环境污染因素 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食因素共同暴露对健康的影响尚无报道。因此, 进一步研究大气 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食暴露对肝损伤的影响具有重要意义。参考之前应用析因设计的动物实验研究<sup>[19-20]</sup>, 本研究将大气 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食分别作为暴露因素, 研究大气 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露对小鼠肝炎症细胞因子和淋巴生成的影响是否存在交互作用。本研究发现, 短期 PM<sub>2.5</sub> 并没有增加肝炎症, 但 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露能加重小鼠肝炎症损伤。

由于 25%~50% 的淋巴通过胸腔导管起源于肝, 因此认为肝是淋巴液分泌最重要的器官<sup>[21]</sup>。淋巴生成 (即淋巴管的生长) 被认为是组织修复和清除炎症的有益事件, 其能被组织炎症激活<sup>[22]</sup>。淋巴生成可以增加间质液的收集, 干扰炎症细胞的募集和促炎介质的清除, 从而减轻炎症<sup>[23-24]</sup>。因此, 推测大气 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露导致的肝炎症可能导致肝淋巴生成。本研究发现, 短期大气 PM<sub>2.5</sub> 暴露能增加淋巴标志蛋白 PROX1 和 LYVE1 蛋白表达水平, 而与单独 PM<sub>2.5</sub> 暴露相比, PM<sub>2.5</sub>

和高盐饮食联合能显著增加肝 PROX1 和 LYVE1 蛋白表达水平。VEGFR-3 和 VEGF-C 是淋巴管的生成调节的上游信号蛋白, 上调 VEGFR-3/VEGF-C 轴能增加淋巴生成<sup>[25-26]</sup>。本研究首次发现, PM<sub>2.5</sub> 和高盐暴露显著上调了肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 的蛋白质表达, 这表明 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露可能通过调节 VEGFR-3/VEGF-C 轴增加肝淋巴生成。

综上所述, 大气 PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露能增加小鼠肝炎症和淋巴管生成, 并且毒性影响具有交互作用; PM<sub>2.5</sub> 和高盐饮食联合暴露能通过上调肝 VEGFR-3 和 VEGF-C 增加肝淋巴生成, 这提示减少盐摄入量能有效降低 PM<sub>2.5</sub> 空气污染的肝毒性效应。

### 参考文献:

- [1] COHEN A J, BRAUER M, BURNETT R, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015 [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1907-1918.
- [2] XIE W, YOU J, ZHI C, et al. The toxicity of ambient fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) to vascular endothelial cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(5): 713-723.
- [3] LI D, LI Y, LI G, et al. Fluorescent reconstitution on deposition of PM<sub>2.5</sub> in lung and extrapulmonary organs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(7): 2488-2493.
- [4] PAN L, SUI J, XU Y, et al. Effect of fine particulate matter exposure on liver enzymes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(4): 2803.
- [5] GBD DIET COLLABORATORS. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 393(10184): 1958-1972.
- [6] UETAKE Y, IKEDA H, IRIE R, et al. High-salt in addition to high-fat diet may enhance inflammation and fibrosis in liver steatosis induced by oxidative stress and dyslipidemia in mice [J]. *Lipids Health Dis*, 2015, 14: 6.
- [7] JEONG J, TANAKA M, IWAKIRI Y. Hepatic lymphatic vascular system in health and disease [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(1): 206-218.
- [8] 蒋金金, 张国富, 董雅琪, 等. 急性 PM<sub>2.5</sub> 暴露对 C57BL/6J 小鼠和酒精性脂肪肝模型小鼠肺组织炎症的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 520-525.  
JIANG J J, ZHANG G F, DONG Y Q, et al. Effects of acute PM<sub>2.5</sub> exposure on lung inflammation and NLRP3 inflammasome activation in C57BL/6J mice and alcoholic fatty liver disease model mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 520-525.
- [9] 丁世彬, 李洋, 陈玉萍, 等. PM<sub>2.5</sub> 对代谢相关脂肪性肝病

- 模型小鼠淋巴生成的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 985-991.
- DING S B, LI Y, CHEN Y P, et al. Effects of particulate matter 2.5 on hepatic lymphangiogenesis in metabolic-associated fatty liver model mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 985-991.
- [10] STRAZZULLO P, D'ELIA L, KANDALA N B, et al. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies [J]. BMJ, 2009, 339: b4567.
- [11] MA H, WANG X, LI X, et al. Adding salt to foods and risk of cardiovascular disease [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 80(23): 2157-2167.
- [12] HODSON E M, COOPER T E. Altered dietary salt intake for preventing diabetic kidney disease and its progression [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2023, 1(1): CD006763.
- [13] LI K, SONG H, WEI F, et al. High salt intake damages myocardial viability and induces cardiac remodeling *via* chronic inflammation in the elderly [J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 952691.
- [14] GAO P, YOU M, LI L, et al. Salt-induced hepatic inflammatory memory contributes to cardiovascular damage through epigenetic modulation of SIRT3 [J]. Circulation, 2022, 145(5): 375-391.
- [15] GUO B, HUANG S, LI S, et al. Long-term exposure to ambient PM<sub>2.5</sub> and its constituents is associated with MAFLD [J]. JHEP Rep, 2023, 5(12): 100912.
- [16] GE C, TAN J, ZHONG S, et al. Nrf2 mitigates prolonged PM<sub>2.5</sub> exposure-triggered liver inflammation by positively regulating SIKE activity: Protection by Juglanin [J]. Redox Biol, 2020, 36: 101645.
- [17] ZHU L, ZHANG Q, HUA C, et al. Melatonin alleviates particulate matter-induced liver fibrosis by inhibiting ROS-mediated mitophagy and inflammation *via* Nrf2 activation [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 268: 115717.
- [18] 赵培, 谭鹤, 彭克楠, 等. 细颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响及机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4): 33-39.
- ZHAO P, TAN H, PENG K N, et al. Influence and mechanisms of fine particulates (PM<sub>2.5</sub>) on atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 33-39.
- [19] JIANG J, DING S, ZHANG G, et al. Ambient particulate matter exposure plus a high-fat diet exacerbate renal injury by activating the NLRP3 inflammasome and TGF- $\beta$ 1/Smad2 signaling pathway in mice [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 238: 113571.
- [20] DING S, JIANG J, ZHANG G, et al. Ambient particulate matter exposure plus chronic ethanol ingestion exacerbates hepatic fibrosis by triggering the mitochondrial ROS-ferroptosis signaling pathway in mice [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 256: 114897.
- [21] TANAKA M, IWAKIRI Y. The hepatic lymphatic vascular system: structure, function, markers, and lymphangiogenesis [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016, 2(6): 733-749.
- [22] TAMMELA T, ALITALO K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise [J]. Cell, 2010, 140(4): 460-476.
- [23] FENG X, DU M, LI S, et al. Hydroxysafflor yellow A regulates lymphangiogenesis and inflammation *via* the inhibition of PI3K on regulating AKT/mTOR and NF- $\kappa$ B pathway in macrophages to reduce atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. Phytomedicine, 2023, 112: 154684.
- [24] GLINTON K E, MA W, LANTZ C, et al. Macrophage-produced VEGFC is induced by efferocytosis to ameliorate cardiac injury and inflammation [J]. J Clin Invest, 2022, 132(9): e140685.
- [25] LIN Q Y, ZHANG Y L, BAI J, et al. VEGF-C/VEGFR-3 axis protects against pressure-overload induced cardiac dysfunction through regulation of lymphangiogenesis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(3): e374.
- [26] ZHANG L, ZHOU F, HAN W, et al. VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis [J]. Cell Res, 2010, 20(12): 1319-1331.

[收稿日期]2024-05-09

王兆博,潘熠,林谦. 基于 miRNA 测序探究瓜蒌薤白半夏汤对动脉粥样硬化小鼠 Epsin1-FGFR1 通路调节机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 26-33.

Wang ZG, Pan Y, Lin Q. MicroRNA analysis of the regulatory effects of Gualou Xiebai Banxia Decoction on the Epsin1-fibroblast growth factor receptor 1 pathway in atherosclerotic mouse [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 26-33.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.004

# 基于 miRNA 测序探究瓜蒌薤白半夏汤对动脉粥样硬化小鼠 Epsin1-FGFR1 通路调节机制研究

王兆博<sup>#</sup>, 潘熠<sup>#</sup>, 林谦<sup>\*</sup>

(北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**【摘要】** **目的** 本研究旨在评估瓜蒌薤白半夏汤 (Gualou Xiebai Banxia Decoction, GXBD) 对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 模型小鼠的治疗效果, 并探讨其作用机制。**方法** 实验采用 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠, 通过 16 周高脂饮食诱导 AS 模型。小鼠随机分为模型组、对照组、不同剂量的 GXBD 治疗组及降脂药组。通过 HE 染色和油红染色观察动脉壁和斑块的变化, 并通过短链 RNA (microRNA, miRNA) 测序分析 GXBD 的调控作用。应用蛋白免疫印迹实验 (Western blot) 和免疫荧光实验验证关键蛋白的表达变化。**结果** 结果显示, GXBD 能够显著减少动脉斑块的形成。miRNA 测序分析发现, GXBD 对多个与 AS 相关的 miRNA 基因具有调控作用, 尤其是通过调节表皮生长因子底物蛋白 1 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 (EPS15) interacting protein 1, Epsin1) 和成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 等关键蛋白的表达, 对 AS 产生潜在治疗效果。进一步的 Western blot 和免疫荧光实验验证了这些调控作用。**结论** 研究结果表明, GXBD 可通过调控 miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p 下调 AS 小鼠主动脉内皮 Epsin1 表达, 同时上调 FGFR1 蛋白表达, 抑制内皮细胞的间充质转化, 在 AS 的治疗中具有显著疗效。

**【关键词】** 冠心病; 动脉粥样硬化; miRNA; 瓜蒌薤白半夏汤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0026-08

## MicroRNA analysis of the regulatory effects of Gualou Xiebai Banxia Decoction on the Epsin1-fibroblast growth factor receptor 1 pathway in atherosclerotic mouse

WANG Zhaobo<sup>#</sup>, PAN Yi<sup>#</sup>, LIN Qian<sup>\*</sup>

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**【Abstract】** **Objective** This study aims to evaluate the therapeutic effect of Gualou Xiebai Banxia Decoction (GXBD) on an atherosclerosis (AS) mouse model and explore its underlying mechanism. **Methods** Male ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed a high-fat diet for 16 weeks to induce the AS model. Mice were divided into a model group, control group, GXBD treatment groups (at different doses), and a lipid-lowering drug group. Histological assessments (HE and Oil Red staining) were performed to observe arterial changes. MicroRNA (miRNA) sequencing was used to analyze the regulatory

**【基金项目】** 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (zyy201xk-2023253)。

**【作者简介】** 王兆博 (1991—), 男, 博士, 研究方向: 心血管疾病中西医结合诊疗及研究。E-mail: wangzhaobo2024@163.com

潘熠 (1989—), 女, 博士, 研究方向: 心血管疾病临床及研究。E-mail: 287568160@qq.com <sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 林谦 (1962—), 女, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 心血管临床及研究。E-mail: linqian62@126.com

effect of GXBD. Western blot and immunofluorescence were applied to confirm key protein expression. **Results** GXBD significantly reduced plaque formation and regulated several AS-related miRNAs, notably impacting Epsin1 and FGFR1 protein expression. Western blot and immunofluorescence further validated these effects. **Conclusions** GXBD demonstrated a therapeutic effect on AS by regulating miR-3102-5p, miR-3547-5p, and miR-7080-5p, downregulating Epsin1, and upregulating FGFR1, thereby inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition.

**【Keywords】** coronary heart disease; atherosclerosis; miRNA; Gualou Xiebai Banxia Decoction

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

冠心病 (coronary heart disease, CAD) 是全球致死率最高的心血管疾病之一,不仅在男性中占据主导地位,女性中也是主要的死亡原因<sup>[1]</sup>。CAD 的主要病理基础是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS),其始于动脉内皮细胞损伤,进而导致动脉内膜增厚和阻塞性斑块的形成。尽管这一过程通常缓慢且漫长,但一旦斑块侵蚀或破裂,可能迅速引发急性血栓形成,导致冠状动脉狭窄和阻塞,最终诱发急性心肌梗死等严重事件<sup>[2-3]</sup>。目前,CAD 的治疗主要依赖于降脂、稳定斑块及抗血小板药物的联合应用,虽然这些方法在一定程度上能够延缓疾病进展并减少心血管事件,但其总体临床疗效仍不尽如人意,且患者的长期预后不确定性较大<sup>[4]</sup>。因此,探索更有效的治疗策略成为临床和科研的重点。

在这一背景下,中医药为 CAD 提供了新的研究方向。冠心病属于中医“胸痹心痛”范畴,其关键病机为“阳微阴弦”,即阳气虚衰、阴寒内盛,导致气滞血瘀、经络阻滞,从而引发胸痛、心悸等症状。张仲景在《金匮要略》中提出的瓜蒌薤白半夏汤 (Gualou Xiebai Banxia Decoction, GXBD) 正是针对这一病机创立。方中栝楼实可以祛痰热、宽胸理气;薤白可以通理阳气止痛,半夏化血脉之痰浊共同作用达到理气化痰、宽胸通络的效果,从而缓解胸痹心痛。GXBD 的现代药理学研究进一步揭示了其在心血管保护方面的潜在机制。例如,实验研究表明,该方剂能显著改善心肌供血,减少心肌缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>。然而,尽管初步研究结果令人鼓舞,其具体作用机制仍需深入探讨。

短链 RNA (microRNA, miRNA) 作为短链非编码核苷酸,在基因表达调控中发挥关键作用。研究显示,miRNA 在心脏发育、血管功能、内皮损伤修复、炎症反应及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 迁移等病理生理过程中有重要作用<sup>[6-7]</sup>。通过靶向沉默特定基因,miRNA 能够抑制蛋白质合成,从而影响细胞功能。在 AS 的发展过程中,miRNA 可能通过调控平滑肌细胞增殖、

炎症反应及巨噬细胞活性,对斑块的形成和破裂起到重要影响<sup>[6-9]</sup>。

本研究通过 miRNA 测序分析,探究瓜蒌薤白半夏汤对 AS ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的作用机制。ApoE<sup>-/-</sup>小鼠常用于 AS 研究,其缺失载脂蛋白 E (ApoE),在高脂饮食条件下易出现类似人类动脉粥样硬化的病变。本研究通过分析 miRNA 表达谱变化,旨在初步探究 GXBD 在分子水平上的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验动物为 ApoE<sup>-/-</sup>和 C57BL/6J 雄性小鼠 (SPF 级),购自北京斯贝福生物技术有限公司 [SCXK(京)2024-0001]。小鼠年龄为 6 周,体重约 20 g,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所 SPF 级实验动物房 [SYXK(京)2021-0017],室温为 (26±2) °C。实验获得中国中医科学院医学实验中心动物伦理委员会的批准 (ERCCACMS11-22-09-03),实验过程遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

瓜蒌薤白半夏汤 (Gualou Xiebai Banxia Decoction, GXBD) 由北京同仁堂提供 (中草药批号: 10878793),每剂 130 g;阿托伐他汀钙片 (NO. DN9900,每片 10 mg) 购自辉瑞制药有限公司;其他药物包括依折麦布 (默沙东,NO. W021856,每片 10 mg)。TRIzol™ Reagent RNA 提取试剂盒 (Thermo Scientific,NO. 15596026);RIPA 裂解液 (碧云天,P0013B);BCA 定量试剂盒 (碧云天,P0012);PVDF 膜 (Sigma,IPVH00010);一抗 Epsin1 (博奥森,bs-13101R);α-SMA (博奥森,bsm-52396R);FGFR1 (博奥森,bs-0230R);TGF-β (博奥森,bs-0086R);二抗 (ABCAM,ab6721-1 mg)。

高速冷冻离心机 (Thermo Fisher Scientific, Sorvall Legend X1R); 冰冻切片机 (Leica Biosystems, CM3050S); 光学显微镜 (Olympus, BX53); 全景扫描仪 (OLYMPUS, BX61VS); 蛋白

印迹显影仪 (Bio-Rad, NO. 12009077)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验分组

实验开始前,小鼠在上述条件下适应环境 1 周。12 只 C57BL/6J 小鼠作为对照 (C) 组,饲喂标准饲料 16 周。其余 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为模型 (M) 组 (12 只)、低剂量 (LD) 组 (10 只)、中剂量 (MD) 组 (20 只)、高剂量 (HD) 组 (12 只) 和降脂药 (W, 阿托伐他汀+依折麦布) 组 (14 只),所有 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠均给予高脂饮食 16 周。GXBD 低、中、高剂量组分别通过灌胃给予中药 (LD: 8.45 g/(kg·d), MD: 16.9 g/(kg·d), HD: 33.8 g/(kg·d))。W 组 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠口服阿托伐他汀 (1.3 mg/kg)、依折麦布 (1.3 mg/kg)。对照组和模型组小鼠灌胃等量蒸馏水。实验期间,每周记录小鼠体重。

#### 1.3.2 HE 染色

药物干预和高脂饮食喂养 16 周后,麻醉处死小鼠后取出心脏,进行组织包埋,并在主动脉瓣处切片进行 HE 染色,以评估动脉壁及斑块状况。使用 Thermo fisher 冷冻切片将冷冻组织切割为 10 μm 切片。切片经苏木精染色 10 min,固定 10 min 后,使用盐酸分化。随后,切片在 HE 溶液中染色,脱水后封片。

#### 1.3.3 油红染色

切片浸入 60% 异丙醇中 1 min 后,立即放入油红染色工作液 (含 60% 油红染液) 浸染 15 min 后,放入 60% 异丙醇中浸泡 5 min,随后在苏木精中染核 30 s,并在清水中冲洗。

#### 1.3.4 MiRNA 测序

运用 RNA 提取试剂盒从对照组、模型组和中剂量组的小鼠主动脉组织中提取总 RNA。RNA 的纯度通过琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 评估。使用 Agilent 2100 软件检测 RNA 的完整性,构建 cDNA 文库并进行 DNA 验证,同时用 Qubit 2.0 定量测定 RNA 浓度。采用 HiSeq™ 2500 系统对各组样本进行高通量测序。获取清洁数据后,用 TopHat 软件比对小鼠参考基因组。

在 miRNA 表达分析中,确定每组的平均 miRNA 表达水平,并将对照组与模型组,模型组与中剂量组进行比较。当  $P < 0.05$  且基因变化倍数 (FC) 绝对值  $> 1.5$  时,视为差异表达 miRNA。假设 GXBD 对 miRNA 的调控趋势与疾病基因表达趋势相反,则可能对疾病基因有治疗作用。

#### 1.3.5 蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验

称量各样本主动脉组织,按照 1:100 (mg/mL) 比例加入 RIPA 裂解液提取组织蛋白,通过 BCA 试剂盒测定各样本的蛋白浓度。通过电泳分离不同分子量的蛋白后,将其电转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF) 膜。用 5% BSA 溶液室温封闭 2 h,1% BSA 溶液稀释一抗并 4 °C 孵育过夜。次日多次洗膜后,加入二抗摇床上慢速孵育 2 h,最后加入显色液显影。

#### 1.4 统计学方法

本研究的数据分析使用 SPSS 19.0 软件进行,各组数据均以平均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 的形式呈现。采用了 ANOVA 单因素方差分析作为统计的主要方法。在进行组间配对比较时,当方差齐性假设成立时,使用 LSD 检验;当方差不齐时,使用 Tamhane's  $T^2$  检验。统计结果中, $P < 0.05$  被视为具有显著性差异。

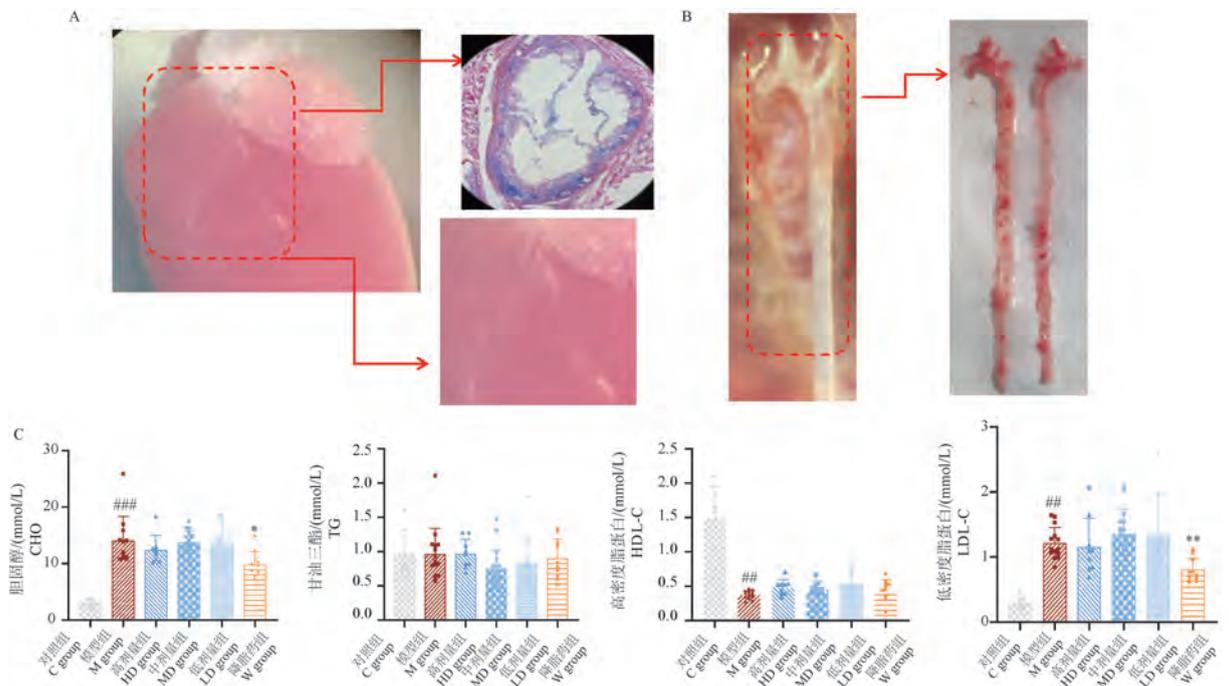
## 2 实验结果

### 2.1 动脉粥样硬化模型及疗效评估

在高脂饮食喂养 16 周后,ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠的主动脉中形成了显著的脂质斑块,尤其是在主动脉弓和肾动脉分支处 (见图 1A、1B)。与对照组相比,模型组小鼠的血清胆固醇 (cholesterol, CHO) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL-C) 水平明显升高,而高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL-C) 水平则有降低的趋势。西药降脂药 (阿托伐他汀及依折麦布) 能够有效降低 CHO 和 LDL-C 的水平,而 GXBD 对各组血脂水平的影响不明显 (图 1C)。进一步分析发现,GXBD 方剂与降脂药物均能减少斑块形成。本课题组随机选取了一些样本进行 HE 和油红染色观察。HE 染色显示,模型组的小鼠主动脉内膜增厚,血管周围伴有大量炎症细胞聚集,且内膜存在大量脂质斑块,而对照组未见斑块形成。相比之下,降脂药组和 GXBD 组的血管病变均有所减轻 (图 2A、2B)。通过对整个主动脉进行油红染色,可以更全面地评估病变程度。结果显示,GXBD 组的斑块面积和百分比均有明显减少的趋势 (图 2C、2D)。

### 2.2 MiRNA 差异基因分析

对对照组、模型组和 GXBD 各剂量组主动脉中的 miRNA 进行了高通量测序,以研究 GXBD 的作用机制。测序结果显示,与对照组相比,模型组有 30

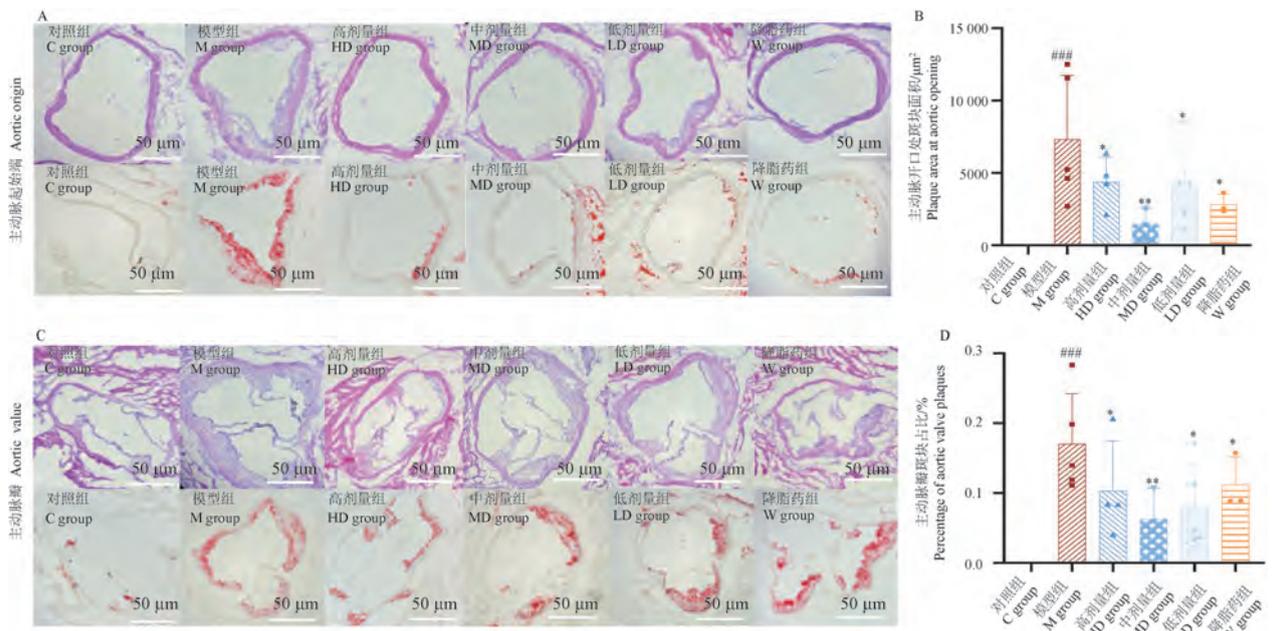


注:A:模型组镜下冠脉 AS 病变;B:模型组镜下主动脉 AS 病变;C:各组的血脂情况。与对照组相比,### $P<0.01$ ,#### $P<0.001$ ;与模型组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 1 血脂及 AS

Note. A, Coronary AS lesions in M group. B, Aortic AS lesions in M group. C, Lipid profile of each group. Compared with the C group,### $P<0.01$ ,#### $P<0.001$ . Compared with the M group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ .

Figure 1 Blood lipids and AS



注:A、B:主动脉开口处 AS 病变(HE 及油红染色);C、D:主动脉瓣处 AS 病变(HE 及油红染色)。与对照组相比,#### $P<0.001$ ;与模型组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

图 2 AS 病理

Note. A/B, AS lesions at the aortic opening (HE and Oil Red staining). C/D, AS lesions at the aortic valve (HE and Oil Red staining). Compared with the C group,#### $P<0.001$ . Compared with the M group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ .

Figure 2 AS Pathology

个 miRNA 基因发生了显著变化。相比之下 GXBD 组有 56 个 miRNA 基因相对于模型组有明显差异(图 3A)。将这两种差异基因相交并进行反相关分析(GXBD 对异常基因的调控趋势与模型组相反), 15 个 miRNA 基因受到 GXBD 的有效调控, 表明 GXBD 可能对 71.4%(15/21)的“疾病 miRNA”具有治疗作用(图 3)。这 15 个有效调控的基因是 miR-674-3p、miR-1946b、miR-30a-3p、miR-30c-5p、miR-100-5p、miR-30b-5p、miR-133a-3p、miR-1906、miR-143-5p、miR-676-3p、miR-5620-5p、miR-99b-5p、miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p。

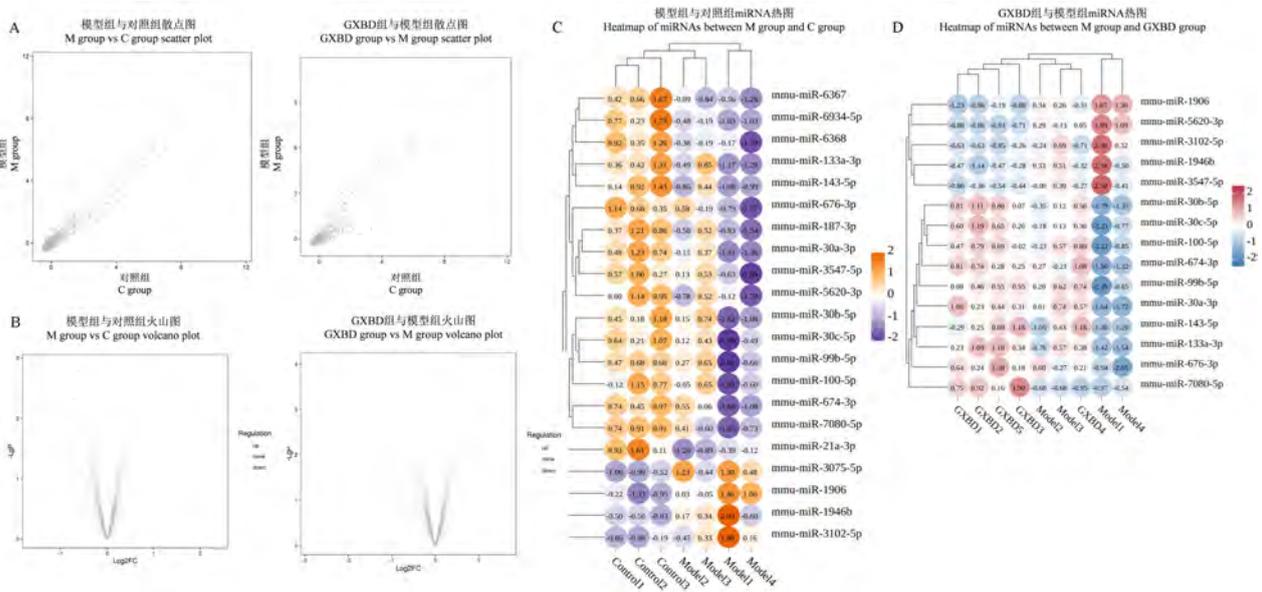
### 2.3 MiRNA 差异基因 GO 和 KEGG 富集分析

将 15 个有效调控的 miRNA 输入 Targetscan 和 Miranda 数据库后, 得到了 6849 个靶基因。将上述两组目标基因交叉后得到 867 个重叠基因, 将这些基因输入 Metascape 网站进行 GO 和 KEGG 富集分

析, 预测出 115 条通路(图 4), 其中 14 条与 AS 最密切相关的通路。其中预测结果显示 GXBD 可以通过调控 miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p 调节表皮生长因子底物蛋白 1 (epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 (EPS15) interacting protein 1, Epsin1), 同时通过 miR-7080-5p 调节 FGFR1 表达。

### 2.4 蛋白实验验证

根据 miRNA 测序结果(图 5)及既往研究, 通过蛋白免疫印迹实验(Western blot)及免疫荧光实验对关键蛋白转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、Epsin1、FGFR1、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)进行了实验验证。结果显示与对照组相比较, 模型组显著升高了 Epsin1、 $\alpha$ -SMA 的表达, 同时 GXBD 进行了相反趋势的调节, 即下调了模型组中 Epsin1 及  $\alpha$ -SMA 的表

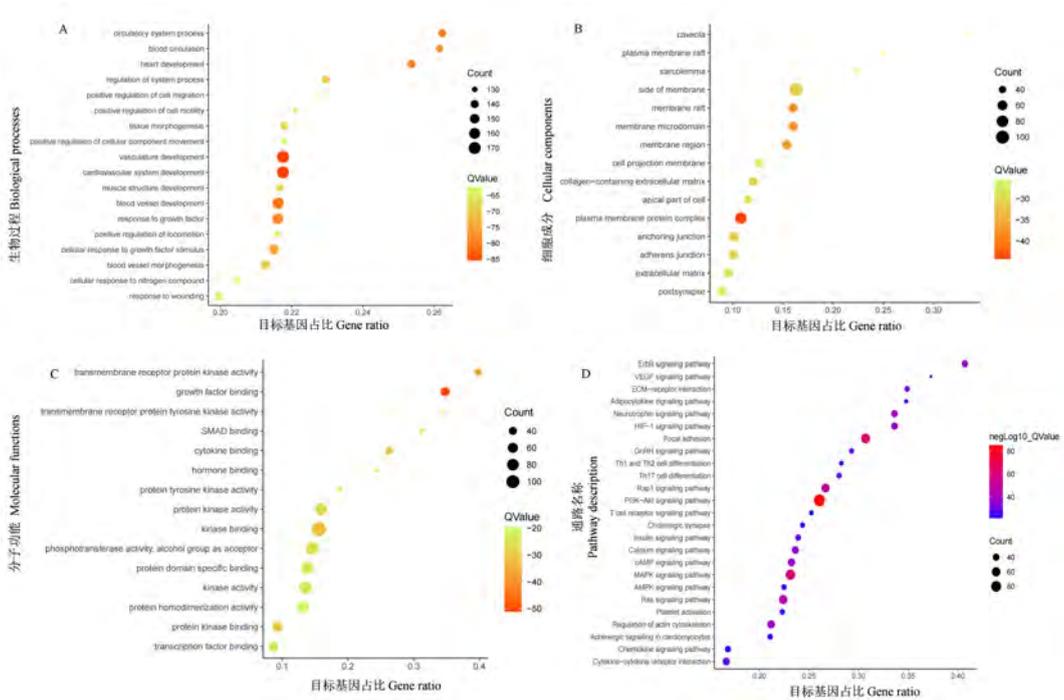


注: A: 图中每一点的 X 值和 Y 值代表 miRNA 的表达量。如果两组 miRNA 表达相似(X 值和 Y 值相似), 则为无差异(灰色), 围绕“Y=X”分布。如果表达量有明显差异(红色或蓝色), 则远离函数“Y=X”; B: X 轴上的 FC 值用于评估表达量差异的大小,  $\text{Log}_2\text{FC}>0$  表示高表达,  $\text{Log}_2\text{FC}<0$  表示低表达。Y 轴用于评估 P 值的大小,  $P<0.05$  通常表示存在统计学意义; C~D: 红色(或者橘色)代表上调基因, 蓝色代表下调基因。两图中不同颜色区域的分布呈中心对称, 模型组和对照组的 miRNA 表达量有显著差异, GXBD 有效调控了大部分“疾病”基因。

图 3 GXBD 对 AS 小鼠主动脉 miRNA 的调控作用

Note. A, X and Y values at each point in the graph represent miRNA expression. If two groups of miRNAs are expressed similarly (similar X and Y values), they are undifferentiated (grey) and distributed around “Y=X”. If there is a significant difference in expression (red or blue), it is away from the function “Y=X”. B, FC value on the X-axis is used to assess the magnitude of the difference in expression, with  $\text{Log}_2\text{FC}>0$  indicating high expression and  $\text{Log}_2\text{FC}<0$  indicating low expression. Y-axis is used to assess the magnitude of the P value, and  $P<0.05$  usually indicates a statistical difference. C ~ D, Red (or orange) represents up-regulated genes, and blue represents down-regulated genes. The distribution of the different coloured regions in the two graphs is centrosymmetric, and there is a significant difference in miRNA expression between the model group and the control group, which indicates that GXBD effectively regulates most of the “disease” genes.

Figure 3 Regulation of aortic miRNAs by GXBD in AS mice

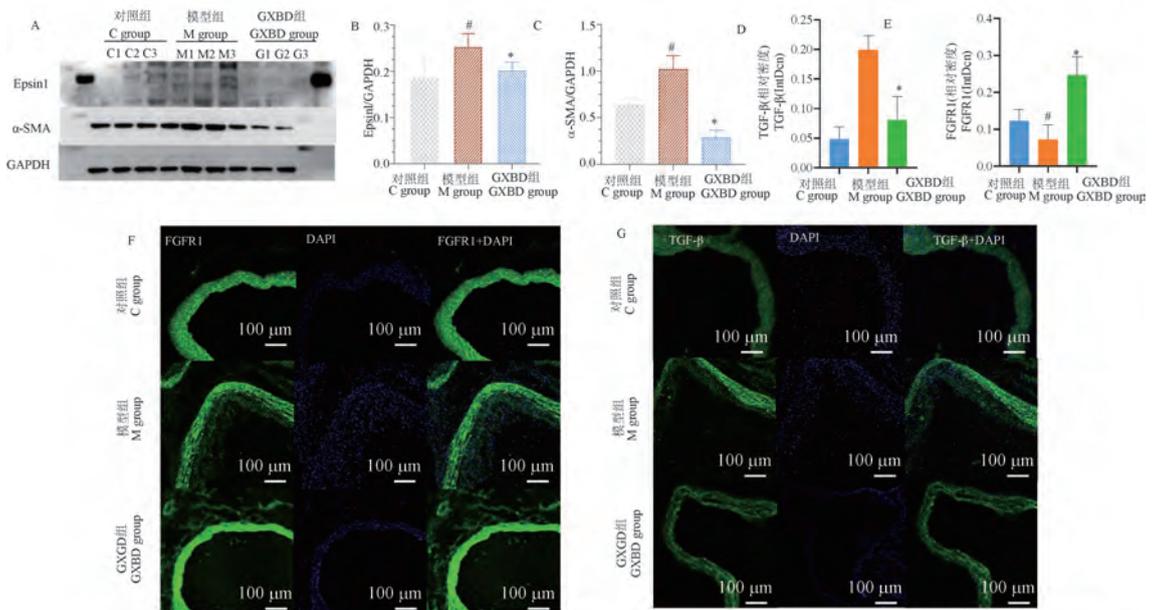


注:A~C:GXBD 的 GO 生物功能、细胞成分及分子功能图;D:GXBD 的 KEGG 富集分析通路气泡图。

图 4 关键 miRNA 及其功能富集分析

Note. A~C, GO biological processes, cellular components and molecular functions plot of GXBD. D, Atherosclerosis-related KEGG enrichment pathways bubble plot of GXBD.

Figure 4 Enrichment analysis of key miRNAs and their functions



注:A:Western blot 条带,其中 Epsin 蛋白有多种亚型,故存在多条带显影的情况;B,C:Western blot 条带相对表达量统计结果;D,E:免疫荧光密度统计结果;F,G:免疫荧光染色。与对照组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ;与模型组相比,  $^*P < 0.05$ 。

图 5 关键蛋白及因子的实验验证

Note. A, Western blot bands. Epsin protein has multiple isoforms, so there are cases of multiple bands showing up. B/C, Relative expression statistics of Western blot bands. D/E, Immunofluorescence density statistics. F/G, Immunofluorescence staining. Compared with the C group,  $^{\#}P < 0.05$ . Compared with the M group,  $^*P < 0.05$ .

Figure 5 Experimental validation of key proteins and factors

达。实验中本课题组发现 FGFR1 及 TGF- $\beta$  在 Western blot 实验中显影不显著,因此本课题组对 FGFR1 及 TGF- $\beta$  进行了免疫荧光实验,结果显示模型组 TGF- $\beta$  对比对照组表达量显著升高,而 FGFR1 则低于对照组,GXBD 均进行了相反趋势的调节。

### 3 讨论

在中医学中,冠心病被归类为“胸痹”“真心痛”“厥心痛”等症候。张仲景在《金匱要略》中,基于这种病机提出了 GXBD,方剂由栝楼实、薤白、半夏及白酒组成。这些药物组合不仅具有理气化痰、宽胸通络的作用,还在临床中被证明对由痰浊阻滞心脉引起的胸痹心痛具有显著疗效,特别是在缓解胸痛彻背、胸闷不适等症状方面效果显著。本研究聚焦于 GXBD 在冠心病治疗中的效果。尽管研究结果表明该方剂在降脂方面没有显著效果,但在减少脂质斑块形成方面却表现出明显的作用。这一发现提示,GXBD 可能通过其他非传统的途径,影响冠心病的进展。

AS 的主要特征为脂质在动脉壁的堆积,伴随局部炎症和纤维化,最终可能导致动脉狭窄和血栓形成<sup>[10-11]</sup>。miRNA 是一类由 20~25 个核苷酸组成的短链非编码 RNA。它可以通过与靶 mRNA 结合,抑制翻译或促进 mRNA 降解,在转录后水平上调控基因的表达。miRNA 在多种生理和病理过程中具有关键作用,涉及细胞的生长、分化以及代谢调控等多方面功能,同时其通过调控炎症反应、VSMCs 和内皮细胞的功能、脂质代谢等多个途径,在动脉粥样硬化的发生和发展中起着关键作用<sup>[12-13]</sup>。本研究表明 GXBD 可显著调节 AS 小鼠主动脉 miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p 的表达。其中 miR-3102-5p 被认为可能通过调节炎症反应,通过 NF- $\kappa$ B 信号通路靶向炎症因子来调控炎症过程。此外,miR-3102-5p 可能通过调控 VSMCs 的功能,影响血管壁的结构变化,从而影响动脉硬化的进程。内皮细胞功能障碍是心血管疾病中的一个重要环节,尤其是在动脉粥样硬化的早期阶段。miR-3102-5p 可能通过调节内皮细胞的功能,进而影响血管的通透性、炎症反应和血栓形成。通过靶向内皮细胞相关的基因,miR-3102-5p 有潜力参与调控内皮细胞的损伤修复和增殖过程,这与心血管疾病的发生密切相关<sup>[14-15]</sup>。此外,miR-3547-5p、miR-7080-5p 是一类较新发现的 miRNA,对其生理功能的研究还在

不断展开中。根据目前的研究,miR-3547-5p、miR-7080-5p 很可能在涉及氧化应激、代谢调控及细胞增殖等关键途径<sup>[16-18]</sup>。

内皮-间充质转化 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndoMT) 作为一种由特定信号通路 (如 TGF- $\beta$  信号通路) 调控的细胞转化过程,其内皮细胞逐渐失去其特性,转化为具备间充质细胞特性的细胞<sup>[19-20]</sup>。这一过程在 AS 早期可能具有一定的保护作用,但在疾病的晚期,随着炎症反应的加剧,这种保护调节作用会减弱甚至消失。在 EndoMT 过程中, $\alpha$ -SMA 是内皮细胞向间充质细胞转化的重要标志物,表明这一过程的发生。EndoMT 被认为是多种心血管疾病 (如 AS 和纤维化) 发展的关键机制之一。TGF- $\beta$  信号通路在推动 EndoMT 的过程中起到了重要作用<sup>[21-22]</sup>,通过调节细胞外基质重塑、炎症反应、细胞增殖和凋亡等过程,TGF- $\beta$  在多种病理生理过程中发挥了关键作用<sup>[23-24]</sup>。

Epsin1 是一种通过其泛素相互作用基序与泛素化的 FGFR1 直接结合的蛋白质。这种结合促使 FGFR1 受体复合物的内吞和降解,从而调控 FGFR1 的信号传导。在正常情况下,Epsin1 通过促进 FGFR1 的降解,减少其在细胞质膜上的积累,进而抑制 TGF- $\beta$  信号通路,从而减少 EndoMT 的发生。然而,当内皮细胞中的 Epsin1 表达减少或丧失时,FGFR1 在质膜上积累,导致信号传导的改变,这种变化可能在特定的炎症环境下抑制 EndoMT 的进展<sup>[25-26]</sup>。研究表明,GXBD 可能通过调控 miRNA (如 miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p) 抑制 Epsin1 的表达,增加 FGFR1 的积累,同时调节 TGF- $\beta$  信号通路,从而抑制 EndoMT 的发生和 AS 的进展。这一发现为本课题组理解中药在冠心病及 AS 治疗中的作用机制提供了新的视角。

本研究具有一定的局限性。首先,不同基因数据库在记录疾病相关基因时存在差异,缺乏统一的靶点筛选标准,这可能对本研究的结果产生影响。例如,在筛选冠心病和 AS 相关基因时,可能会遗漏一些重要的分子靶点,或者引入一些非关键的基因。这些问题需要在后续研究中通过更多的实验验证和数据补充来完善。其次,本研究主要集中于 Epsin1-FGFR1 通路中关键蛋白的表达。然而,这一通路可能还涉及其他未深入研究的分子和信号通路。因此,仅分析这些关键蛋白的表达可能不足以全面揭示 GXBD 在冠心病及 AS 治疗中的作用机

制。最后,未来的研究应更加深入地探讨该通路中的其他可能参与者,并研究这些分子之间的相互作用如何影响 AS 的病理发展。

综上,本研究结果显示,GXBD 可通过调控 miR-3102-5p、miR-3547-5p、miR-7080-5p 下调 AS 小鼠主动脉内皮 Epsin1 表达,同时上调 FGFR1 蛋白表达,抑制内皮细胞的间充质转化,从而改善动脉粥样硬化。

#### 参考文献:

[ 1 ] LINDSTROM M, DECLEENE N, DORSEY H, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risks collaboration 1990-2021 [J]. *J Am Coll of Cardiol*, 2022, 80(25): 2372-2425.

[ 2 ] KOBIYAMA K, LEY K. Atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2018, 123(10): 1118-1120.

[ 3 ] 李浩, 张琪. 动脉粥样硬化小鼠模型应用进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(6): 787-794.  
LI H, ZHANG Q. Progress in the application of arteriosclerosis mouse models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(6): 787-794.

[ 4 ] ZHANG X H, LU Z L, LIU L. Coronary heart disease in China [J]. *Heart*, 2008, 94(9): 1126-1131.

[ 5 ] ZHANG H M, TANG D L, TONG L, et al. Gualou Xiebai Banxia decoction inhibits NF- $\kappa$ B-dependent inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*, 2011, 31(4): 338-343.

[ 6 ] REDDY M A, DAS S, ZHUO C, et al. Regulation of vascular smooth muscle cell dysfunction under diabetic conditions by miR-504 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(5): 864-873.

[ 7 ] ALBINSSON S, SWÅRD K. Targeting smooth muscle microRNAs for therapeutic benefit in vascular disease [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 75: 28-36.

[ 8 ] ROBINSON H C, BAKER A H. How do microRNAs affect vascular smooth muscle cell biology? [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(5): 405-411.

[ 9 ] WANG D, ATANASOV A G. The microRNAs regulating vascular smooth muscle cell proliferation: A minireview [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 324.

[ 10 ] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 56.

[ 11 ] LIBBY P, RIDKER P M, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135-1143.

[ 12 ] LI S, XU R X, GUO Y L, et al. MicroRNAs in the pathogenesis

of atherosclerosis: A focus on inflammation and lipid metabolism [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 617-629.

- [ 13 ] KIM D, SADOWSKI K A, CUDNOCH-JĘDRZEJSKA A. MicroRNA inhibiting atheroprotective proteins in patients with unstable angina [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10621.
- [ 14 ] ZHAO X, WANG Y, XU Y. MicroRNA-3102-5p regulates vascular smooth muscle cell proliferation in atherosclerosis [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(3): 345-357.
- [ 15 ] WANG Z, LI Y. Role of miRNAs in cardiovascular diseases: focus on inflammation and cell proliferation [J]. *Cardiovasc Res Rev*, 2021, 28(2): 128-140.
- [ 16 ] SMALL E M, OLSON E N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 336-342.
- [ 17 ] JIANG X, TSITSIOU E, HERRICK S E, et al. MicroRNAs and the regulation of fibrosis [J]. *FEBS J*, 2010, 277(9): 2015-2021.
- [ 18 ] NOURAEI N, MOWLA S J. miRNA therapeutics in cardiovascular diseases: promises and problems [J]. *Front Genet*, 2015, 6: 232.
- [ 19 ] CHEN P Y, QIN L, BAEYENS N, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12): 4514-4528.
- [ 20 ] SOUILHOL C, HARMSEN M C, EVANS P C, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 565-577.
- [ 21 ] CHEN P Y, QIN L, LI G, et al. Endothelial TGF- $\beta$  signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis [J]. *Nat Metab*, 2019, 1(9): 912-926.
- [ 22 ] HOWE K L, FISH J E. Transforming endothelial cells in atherosclerosis [J]. *Nat Metab*, 2019, 1(9): 856-857.
- [ 23 ] NEWMAN A A C, SERBULEA V, BAYLIS R A, et al. Multiple cell types contribute to the atherosclerotic lesion fibrous cap by PDGFR $\beta$  and bioenergetic mechanisms [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(2): 166-181.
- [ 24 ] ZHANG J, OGBU S C, MUSICH P R, et al. The contribution of endothelial-mesenchymal transition to atherosclerosis [J]. *Int J Trans Med*, 2021, 1(1): 39-54.
- [ 25 ] KLAUBER-DEMORE N. Are epsins a therapeutic target for tumor angiogenesis? [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4341-4343.
- [ 26 ] PASULA S, CAI X, DONG Y, et al. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4424-4438.

夏童童,马芳,刘虹麟,等. DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及其研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 34-42.

Xia TT, Ma F, Liu HL, et al. Role and mechanism of DNMT1 in regulating LSM4 in Hcy-induced hepatocyte apoptosis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 34-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.005

## DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞 凋亡中的作用及其研究

夏童童<sup>1</sup>, 马芳<sup>1,2</sup>, 刘虹麟<sup>1,3</sup>, 张正皓<sup>1,2</sup>, 丁寒霜<sup>1</sup>, 郝银菊<sup>4</sup>, 张慧萍<sup>5</sup>,  
吴凯<sup>2</sup>, 焦运<sup>6</sup>, 姜怡邓<sup>1</sup>, 李桂忠<sup>1,2\*</sup>

(1.国家卫生健康委员会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.宁夏医科大学检验学院,银川 750004;4.宁夏医科大学总医院,银川 750004;  
5.湖南省妇幼保健院医学遗传科,长沙 410008;6.宁夏医科大学总医院感染科,银川 750004)

**【摘要】** 目的 探讨 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 调控 LSM4 蛋白 (Sm-like protein-4, LSM4) 在同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及机制研究。方法 将 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 (12 只) 均分为 2 组, 给予普通饲料喂养设为饮食对照组 (ND 组, n=6), 给予高蛋氨酸饲料喂养设为高蛋氨酸组 (HMD 组, n=6); NCTC1469 小鼠正常肝细胞分为正常对照组 (Control 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预组 (Hcy 组, 100 μmol/L Hcy)、转染干扰片段对照组 (si-NC 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 LSM4 干扰片段组 (si-LSM4 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 DNMT1 干扰片段组 (si-DNMT1 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下对照干扰组 (Hcy+si-NC 组, 100 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下 LSM4 干扰组 (Hcy+si-LSM4 组, 100 μmol/L Hcy) 和 Hcy 干预下 DNMT1 干扰组 (Hcy+si-DNMT1 组, 100 μmol/L Hcy); NCBI 数据库分析 LSM4 在多种组织中表达; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测小鼠组织 (HMD 组和 ND 组) 和肝细胞 (Control 组和 Hcy 组) LSM4 蛋白表达差异; Western blot 检测凋亡指标 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X, Bax) 和 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达变化; 流式细胞术检测 Control 组、Hcy 组、Hcy+si-NC 组和 Hcy+si-LSM4 组细胞凋亡率变化; MethPrimer 在线软件分析 LSM4 启动子区 CpG 岛; qRT-PCR 和 Western blot 检测 Hcy+si-DNMT1 组中 LSM4 蛋白表达。结果 与 ND 组、Control 组相比, HMD 组、Hcy 组 LSM4 蛋白表达显著增高 (P<0.05); 与 Control 组比较, Hcy 组中 Bax 蛋白表达显著上调 (P<0.05), 而 Bcl-2 表达明显降低 (P<0.05); 与 Hcy+si-NC 组比较, Hcy+si-LSM4 组中 Bax 蛋白表达量显著减少 (P<0.05), Bcl-2 蛋白表达量明显增多 (P<0.05); 与 Control 组相比, Hcy 组细胞凋亡率显著升高 (P<0.05); 相较 Hcy+si-NC 组, Hcy+si-LSM4 组细胞凋亡率下降 (P<0.05); MethPrimer 在线软件分析显示 LSM4 启动子区 GC 含量丰富且存在 1 个 CpG 岛; 与 Hcy+si-NC 组相比, Hcy+si-DNMT1 组 LSM4 蛋白表达增高 (P<0.05)。结论 DNMT1 通过调控 LSM4 低甲基化使其表达升高, 从而促进 Hcy 诱导的小鼠肝细胞凋亡。

**【关键词】** 内分泌与代谢病; LSM4; 同型半胱氨酸; 凋亡; DNA 甲基转移酶 1

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0034-09

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (82370293, U21A20343, 82060110); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (2023BEG02074, 2022BFH02013, 2022BEG02054, 2021BEG02028, 2020BEG03005); 宁夏医科大学校级科研项目重点项目 (XZ2022005)。

**【作者简介】** 夏童童 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 代谢性血管病学。E-mail: xiayezi77@163.com

**【通信作者】** 李桂忠 (1965—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 血管钙化机制研究。E-mail: lilylove36@163.com

## Role and mechanism of DNMT1 in regulating LSM4 in Hcy-induced hepatocyte apoptosis in mice

XIA Tongtong<sup>1</sup>, MA Fang<sup>1,2</sup>, LIU Honglin<sup>1,3</sup>, ZHANG Zhenghao<sup>1,2</sup>, DING Hanshuang<sup>1</sup>, HAO Yinju<sup>4</sup>,  
ZHANG Huiping<sup>5</sup>, WU Kai<sup>2</sup>, JIAO Yun<sup>6</sup>, JIANG Yideng<sup>1</sup>, LI Guizhong<sup>1,2\*</sup>

(1. NHC Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research, Yinchuan 750004, China. 2. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 3. School of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 4. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004. 5. Department of Medical Genetics, Hunan Maternal and Child Health Hospital, Changsha 410008. 6. Department of Infection, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004)

**[Abstract] Objective** To study the effect of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) on sm-like protein-4 (LSM4) in hepatocyte apoptosis in mice induced with Hcy. **Methods** 12 ApoE<sup>-/-</sup> mice were divided into two groups: normal diet (ND,  $n=6$ ) and high methionine diet (HMD,  $n=6$ ) groups. Normal hepatocytes of NCTC1469 were divided into a normal group (control, 0  $\mu\text{L/L}$  Hcy), Hcy intervention group (Hcy, 100  $\mu\text{L/L}$  Hcy), NC siRNA-transfected control group (si-NC group, 0  $\mu\text{mol/L}$  Hcy), LSM4 siRNA-transfected group (si-LSM4 group, 0  $\mu\text{mol/L}$  Hcy), DNMT1 siRNA-transfected group (si-DNMT1 group, 0  $\mu\text{mol/L}$  Hcy), NC siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-NC group, 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy), LSM4 siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-LSM4 group, 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy), and DNMT1 siRNA-transfected Hcy intervention group (Hcy+si-DNMT1 group, 100  $\mu\text{mol/L}$  Hcy). Analysis of the expression of LSM4 in various tissues was conducted using the NCBI database. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect differences in LSM4 protein expression in mouse tissues (HMD and ND) and hepatocytes (control and Hcy). Western blot was used to detect the expression of Bcl2-associated X (Bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). The cell apoptosis rate in the Control, Hcy, Hcy+si-NC, and Hcy+si-LSM4 groups were detected by flow cytometry. MethPrimer online software was used to analyze the CpG islands of LSM4 promoter region. The expression of LSM4 in the Hcy+si-DNMT1 group was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The expression of LSM4 in HMD, Hcy group was higher than that in the ND and Control group ( $P<0.05$ ). Bax protein expression was significantly higher, but Bcl-2 was significantly lower in Hcy group compared with those of the Control group ( $P<0.05$ ). The expression of Bax protein was significantly lower, but the level of Bcl-2 was significantly higher in the Hcy+si-LSM4 group compared with those in the Hcy+si-NC group ( $P<0.05$ ). The cell apoptosis rate in the Hcy group was higher than that in the Control group ( $P<0.05$ ), while the apoptosis rate in the Hcy+si-LSM4 group was lower than that in the Hcy+si-NC group ( $P<0.05$ ). MethPrimer database analysis showed that the promoter region of LSM4 was GC-rich, and there was one CpG island. Compared with the Hcy + si-NC group, the Hcy+si-DNMT1 group's expression of LSM4 protein was increased ( $P<0.05$ ). **Conclusions** DNMT1 regulates LSM4 hypomethylation to increase its expression, thereby promoting Hcy-induced apoptosis of mouse hepatocytes.

**[Keywords]** endocrinology and metabolism; LSM4; homocysteine; apoptosis; DNMT1

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

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是蛋氨酸循环、叶酸代谢和硫代谢途径中的代谢物质,是甲硫氨酸去甲基化的中间产物。最新研究显示,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)与心血管、糖尿病、肝脂质沉积等疾病密切相关<sup>[1-2]</sup>。肝是Hcy等多种生物分子的重要代谢脏器,在调控体内Hcy水平中发挥重要作用,已被发现并证明Hcy水平升高与肝损伤相关疾病的进展和肝癌的转移有关<sup>[3-5]</sup>。肝损伤可导致Hcy代谢失调,而Hcy水平

升高又可反过来诱导肝细胞凋亡<sup>[6]</sup>,但Hcy诱导肝细胞凋亡而引起肝损伤中的具体作用机制仍不明确,因此有必要进行深入的探讨。

有研究发现 LSM4 蛋白(Sm-like protein-4, LSM4)参与乳腺癌<sup>[7]</sup>、皮肤黑色素瘤<sup>[8]</sup>、肝损伤等疾病的发生发展进程<sup>[9]</sup>。例如,LSM4 的敲低可抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。另有研究发现,LSM4 是促进 mRNA 前体剪接和 mRNA 脱帽的复合体的组成部分,可增强 mRNA 的稳定性并诱导

caspase 介导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>。然而, LSM4 是否在 Hcy 引起的肝细胞凋亡中发挥作用尚不清楚。DNA 的表观遗传修饰包括乙酰化、甲基化、氢甲基化等, 其中具有可逆性特点的 DNA 甲基化在调节基因表达、细胞分化和机体发育等过程中必不可少, 已成为一个研究热点。因此, 本研究旨在探讨 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及其机制研究, 可能为肝损伤相关疾病的诊断和治疗提供新的靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 12 只(雄), 6 周龄, 体重 25~28 g, 自北京唯尚立德生物科技有限公司购入 [SCXK(京)2021-0010], 相关动物实验内容经宁夏医科大学总医院医科听伦理委员会授权 [KYL-2024-0303], 于宁夏医科大学动物实验中心 SPF 级动物房开展造模实验 [SYXK(宁)2020-0001], 昼夜节律交替照明 (12 h/12 h), 温度 (23±2) °C, 日温差 < 4 °C, 相对湿度 60%。小鼠于 IVC 实验动物笼具中

饲养, 定期更换垫料和正常饮用水, 分别给予普通饲料和高蛋氨酸饲料喂养。所有实验均遵循宁夏医科大学实验动物伦理规范和 3R 原则, 给予人道关怀。

#### 1.1.2 细胞

NCTC1469 小鼠正常肝细胞购于上海联迈生物工程技术有限公司, 连续传 10 代以上。

### 1.2 主要试剂与仪器

总蛋白提取试剂盒和蛋白定量试剂盒 (货号: KGP250/23227, 凯基生物); RNA 提取试剂盒 (货号: DP304, 天根); 逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂 (货号: RR037A/RR820A, TaKaRa); 流式凋亡试剂盒 (货号: BD556547, BD); Bcl-2 抗体 (货号: BS1511, 巴傲得); DNMT1 抗体 (货号: GTX116011, 欣博盛); Bax 抗体 (货号: 50599-2-Ig, Proteintech); HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG (货号: bs-0296 G/bs-0295 G, 博奥森); 小鼠 GAPDH 内参引物、LSM4 和 DNMT1 上下游引物及 NC、LSM4 和 DNMT1 干扰片段 (上海, 吉玛)。实时荧光定量分析仪 (德国, 耶拿); 电泳仪、电转仪及凝胶成像仪 (美国, Bio-Rad); 流式细胞仪 (美国, ACEA Biosciences)。所用干扰片段及引物序列见表 1、表 2。

表 1 干扰片段序列  
Table 1 Sequences of the siRNA

名称 Name	siRNA 序列 siRNA sequence	产物/bp Product
NC	正义链 Sense 5' -UUCUCCGAAAGGUGACACGUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'	
LSM4-Mouse-1	正义链 Sense 5' -CUCGCUGAUUGGUCUAUAGUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -ACUAUGACCAAUCACGGAGTT-3'	
LSM4-Mouse-2	正义链 Sense 5' -GCUGUGACAACUGGAUGAATT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -UUCAUCCAGUUGUCACAGCTT-3'	
LSM4-Mouse-3	正义链 Sense 5' -GCAUCCUGAUGAGAUAU-3'	21
	反义链 Antisense 5' -AUGAUCUCAAGGGGAGCTT-3'	
DNMT1-Mouse-1	正义链 Sense 5' -GGGAGAAUUAACUUACUTT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -AGUAAGUUAAUUUCUCCCTT-3'	
DNMT1-Mouse-2	正义链 Sense 5' -GAGGCCUACAUAUCAAAGATT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -UCUUUGAAUUGUAGGCCUUCTT-3'	
DNMT1-Mouse-3	正义链 Sense 5' -CGCAUCAGCUGCAGUAAAATT-3'	21
	反义链 Antisense 5' -UUAACUGCAGCUGAUGCGTT-3'	

表 2 引物序列  
Table 2 Sequences of the primers

名称 Name	引物序列 Primer sequence	产物/bp Product
GAPDH-Mouse	上游引物 Forward: 5' -AGTCCGCTGTGAACGGATTG-3'	21
	下游引物 Reverse: 5' -GGGTCGTTGATGGCAACA-3'	
LSM4-Mouse	上游引物 Forward: 5' -CAGCGCAGATCACCCAT-3'	21
	下游引物 Reverse: 5' -TTGATGTTTCATCCAGTTGTCACA-3'	
DNMT1-Mouse	上游引物 Forward: 5' -CCGTGCTACCAGGAGAAC-3'	21
	下游引物 Reverse: 5' -TTGGTTTCCGTTTGTAGTGGG-3'	

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物及分组

选取 12 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为饮食对照组 (ND 组,  $n=6$ ) 和高蛋氨酸组 (HMD 组,  $n=6$ ), 室内环境温度 ( $25\pm 2$ ) °C, 相对湿度 60%, 喂养 12 周后进行实验。

#### 1.3.2 细胞培养及分组

NCTC1469 小鼠正常肝细胞培养于 37 °C 环境 (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 培养箱中, 采用 DMEM 培养液 (10% 特级马血清 + 1% 青链霉素) 进行常规培养, 细胞生长至 85% 时传代培养。干扰片段转染 24~48 h 后裂解细胞提 RNA 和蛋白。实验分组为正常对照组 (Control 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预组 (Hcy 组, 100 μmol/L Hcy)、转染干扰片段对照组 (si-NC 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 LSM4 干扰片段组 (si-LSM4 组, 0 μmol/L Hcy)、转染 DNMT1 干扰片段组 (si-DNMT1 组, 0 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下对照干扰组 (Hcy + si-NC 组, 100 μmol/L Hcy)、Hcy 干预下 LSM4 干扰组 (Hcy + si-LSM4 组, 100 μmol/L Hcy) 和 Hcy 干预下 DNMT1 干扰组 (Hcy + si-DNMT1 组, 100 μmol/L Hcy)。

#### 1.3.3 NCBI 数据库分析 LSM4 在多种器官组织中表达

通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) 查看 LSM4 在小鼠肝、肾等多种组织中的表达情况。

#### 1.3.4 qRT-PCR 检测 DNMT1 和 LSM4 mRNA 表达

ND 组和 HMD 组小鼠处死后, 取肝组织, 每只分离 80 mg 进行组织匀浆; NCTC1469 细胞经 100 μmol/L Hcy 干预 24 h 后收集细胞; si-NC/si-LSM4/si-DNMT1 干扰片段分别转染经 100 μmol/L Hcy 干预后的肝细胞和正常肝细胞, 24 h 后分别进行细胞采集。按 RNA 提取试剂盒说明书提炼 RNA; 逆转录合成 cDNA 以逆转录试剂说明为基准; PCR 扩增以 StepOnePlus™ qRT-PCR 系统为操作平台。

#### 1.3.5 Western blot 实验检测 LSM4、DNMT1、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

取 ND 组和 HMD 组小鼠肝组织研磨, NCTC1469 细胞经 100 μmol/L Hcy 干预 24 h 后收集细胞; si-NC/si-LSM4/si-DNMT1 干扰片段分别转染经 100 μmol/L Hcy 干预后的肝细胞和正常肝细胞 48 h 后收集细胞。分别加入细胞裂解液进行取样, 以 BCA 法测得的蛋白含量为依据, 采用 Loading

buffer 稀释法对不同浓度的蛋白进行均匀稀释并分别加至不同的加样孔; 利用电泳和电转实现蛋白质印迹的液相-固相转移; 封闭 1~2 h 后, 分别以一抗 (各自说明书推荐比例) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1 : 5000) 室温孵育 1~2 h; 采用电化学法洗涤并显影后, 采集条带并使用 Image J 软件进行灰度值分析和计算。

#### 1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集 Control 组、Hcy 组、Hcy + si-NC 组和 Hcy + si-LSM4 组的肝细胞, 将细胞密度调整为  $1 \times 10^6$  / mL; 用胰蛋白酶-EDTA 消化液 (不含酚红) 消化收集后, 离心 5 min 去上清; 预冷  $1 \times$  PBS 重悬, 2000 r/min 离心 5~10 min 后去上清;  $1 \times$  Binding Buffer (300 μL) 悬浮细胞, 另加 Annexin V-FITC (5 μL), 轻轻摇晃, 充分混合后, 避光孵育 15 min; 开机 5 min 前, 加入 5 μL PI 染料, 轻轻摇动, 使之均匀; 上机前补加  $1 \times$  Binding Buffer (200 μL), 随之流式细胞术定量细胞凋亡。

### 1.4 统计学方法

本实验所有结果均为计量资料, 以 Prism 8.3.0 软件为工具进行统计学分析处理, 所有资料均以平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 *t* 检验进行两组间比较; 利用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 检验行多组间比较。经统计学处理, 以  $P < 0.05$  为结果有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 肝组织和肝细胞 LSM4 的表达变化

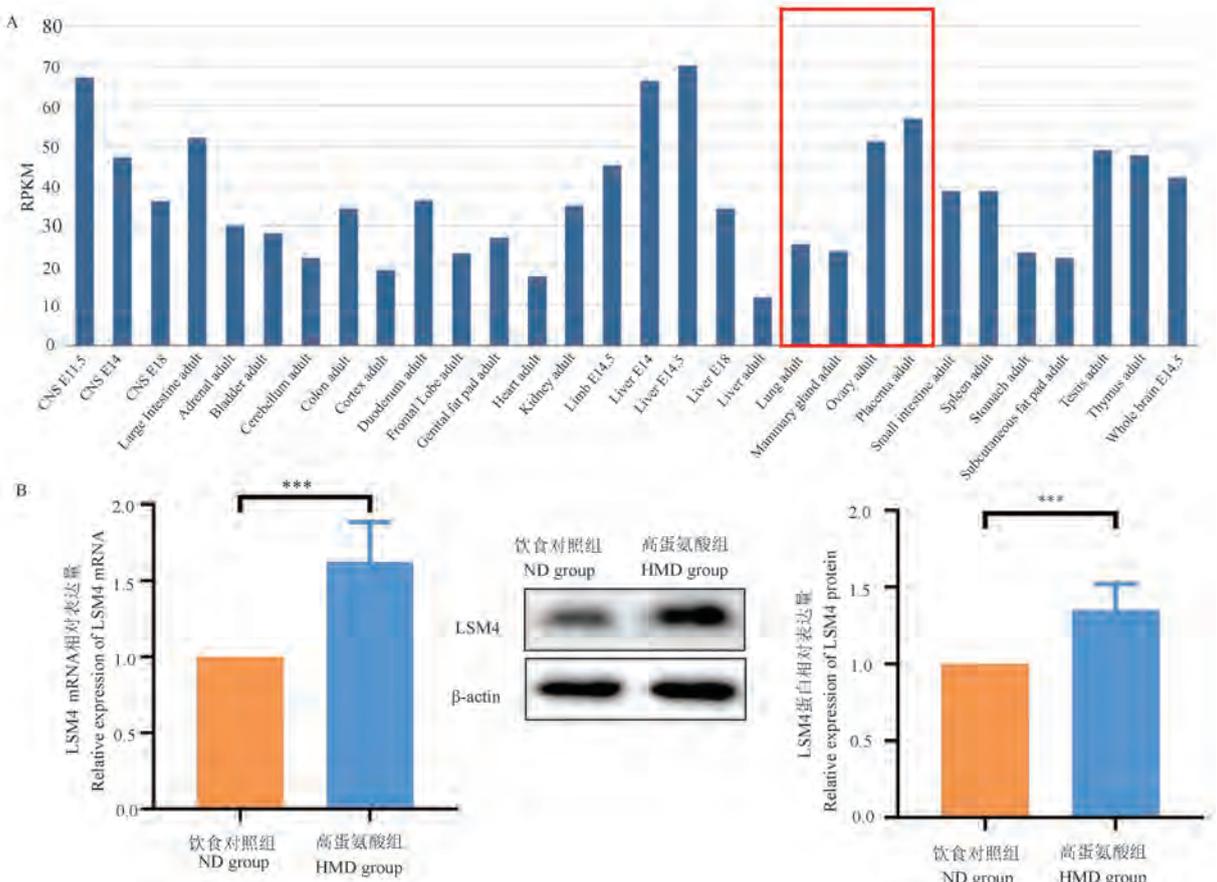
NCBI 数据库 RNA 表达分析图结果显示, 红框所标注区域内, LSM4 在不同时期的肝组织中表达发生改变 (图 1A); qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现, 与 ND 组和 Control 组比较, LSM4 mRNA 和蛋白表达量在 HMD 组和 Hcy 组中显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 1B)。

### 2.2 LSM4 siRNA 干扰自身验证

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现, 与 si-NC 组比较, si-LSM4-1 组、si-LSM4-2 组和 si-LSM4-3 组的 LSM4 mRNA 表达显著减少 ( $P < 0.05$ ), LSM4 siRNA 干扰片段构建成功 (图 2)。综合考虑, 干扰效果最显著的 LSM4 siRNA-3 干扰片段用于后续实验。

### 2.3 Hcy 干预下干扰 LSM4 表达后肝细胞凋亡率变化

Western blot 检测结果发现, Hcy 组内 Bax 蛋白

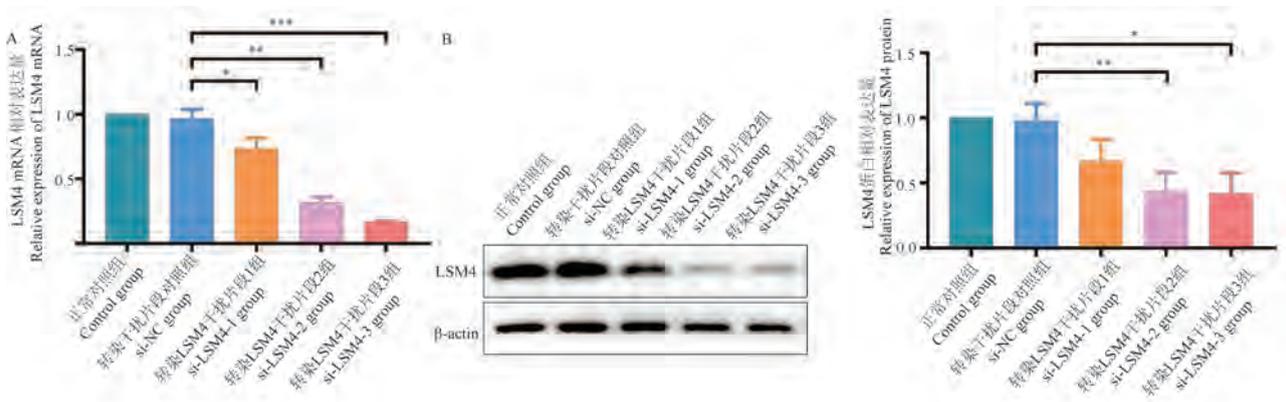


注:A:NCBI 数据库 RNA 表达分析图;B:LSM4 mRNA 和蛋白表达变化。与饮食对照组相比,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 1 Hcy 调控 LSM4 的表达

Note. A, Analysis map of NCBI database RNA sequencing. B, Expression of LSM4 mRNA and protein in liver tissue and hepatocytes. Compared with ND group, \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 1 Hcy regulates LSM4 expression



注:A:LSM4 mRNA 表达;B:LSM4 蛋白表达。与转染干扰片段对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 2 LSM4 siRNA 干扰自身验证

Note. A, LSM4 mRNA expression. B, LSM4 protein expression. Compared with the si-NC group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 2 LSM4 siRNA interference self-validation

含量在与 Control 组对比中呈显著升高趋势( $P<0.05$ ),而 Bcl-2 蛋白水平则显著下降( $P<0.05$ )(图

3A)。相较于 Hcy + si-NC 组,Hcy + si-LSM4-3 组的 Bax 蛋白含量显著下降( $P<0.05$ ),而 Bcl-2 蛋白含

量显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 3B)。流式细胞术结果显示,与 Control 组比较,Hcy 组细胞凋亡率明显升高 ( $P < 0.05$ );与 Hcy+si-NC 组比较,Hcy+si-LSM4-3 组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ ) (图 3C)。

### 2.4 LSM4 DNA 启动子区 CpG 岛预测

MethPrimer 在线软件 (<http://www.urogene.org/methprimer>) 分析 LSM4 的 DNA 启动子区 GC 含量,显示 GC 含量丰富且存在 1 个 CpG 岛,提示 LSM4 表达可能受甲基化调控 (图 4)。

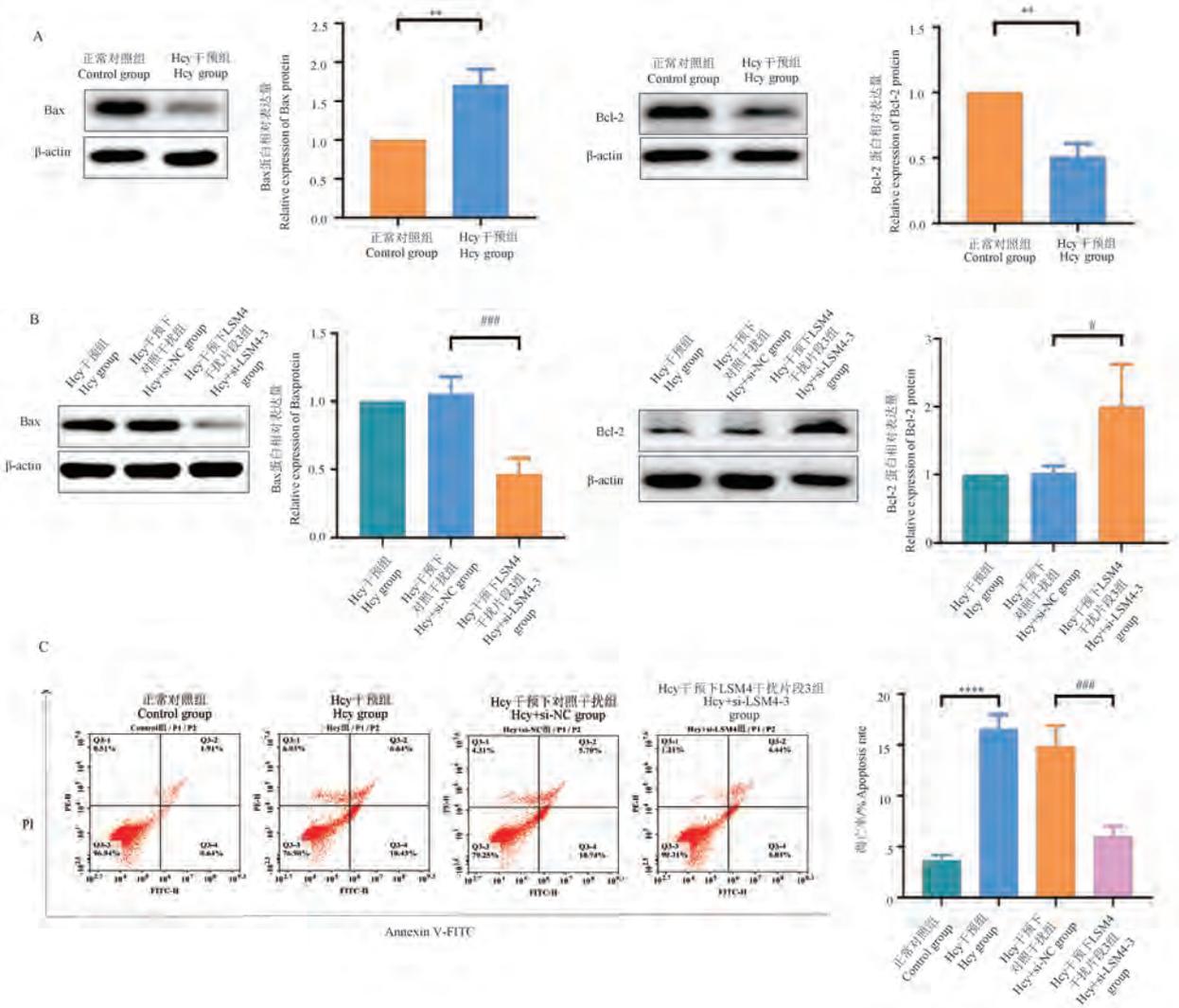
### 2.5 DNMT1 siRNA 干扰自身验证

qRT-PCR 和 Western blot 检测结果发现,与 si-

NC 组比较, DNMT1 mRNA 和蛋白表达水平在 si-DNMT1-1 组、si-DNMT1-2 组和 si-DNMT1-3 组中都有降低 ( $P < 0.05$ ), LSM4 siRNA 干扰片段构建成功 (图 5)。选择干扰效果较为明显的 DNMT1 siRNA-3 干扰片段用于后续实验。

### 2.6 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后肝细胞 LSM4 的表达变化

如图 6 所示, qRT-PCR 和 Western blot 的检测结果显示,与 Hcy+si-NC 组比较, LSM4 mRNA 和蛋白的表达水平在 Hcy+si-DNMT1-3 组中明显升高 ( $P < 0.05$ )。



注:A:凋亡相关蛋白表达变化;B:凋亡相关蛋白表达变化;C:流式细胞凋亡率散点图及统计图。与正常对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ;与 Hcy 干预下对照干扰组相比, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ 。

图 3 干扰 LSM4 抑制 Hcy 诱导的小鼠肝细胞凋亡

Note. A, Expression of apoptosis-related proteins. B, Expression of apoptosis-related proteins. C, Flow cytometry of apoptosis. Compared with the Control group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . Compared with the Hcy+si-NC group, #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$ .

Figure 3 Inhibiting Hcy induced hepatocyte apoptosis in mice by interfering with LSM4

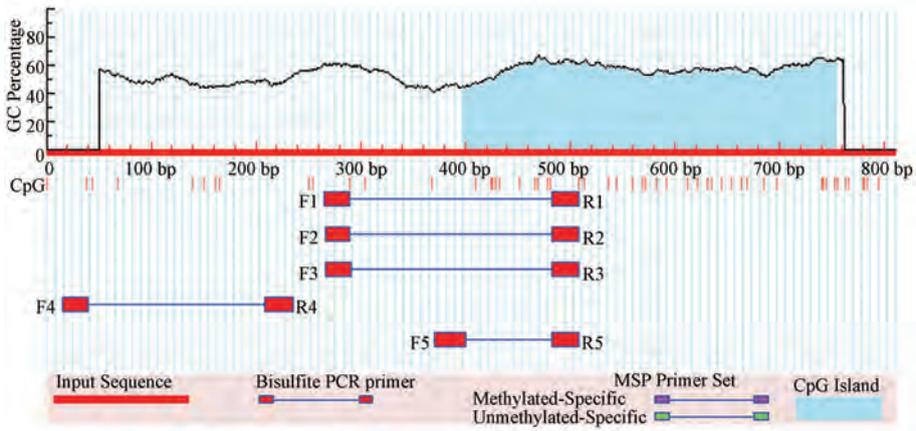
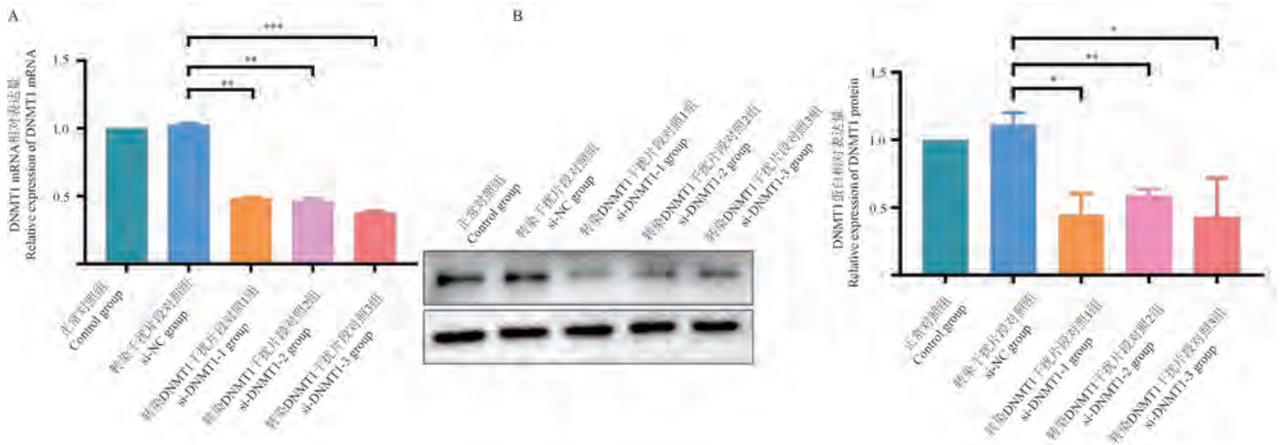


图 4 LSM4 启动子区 CpG 岛预测

Figure 4 CpG island prediction in the LSM4 promoter region

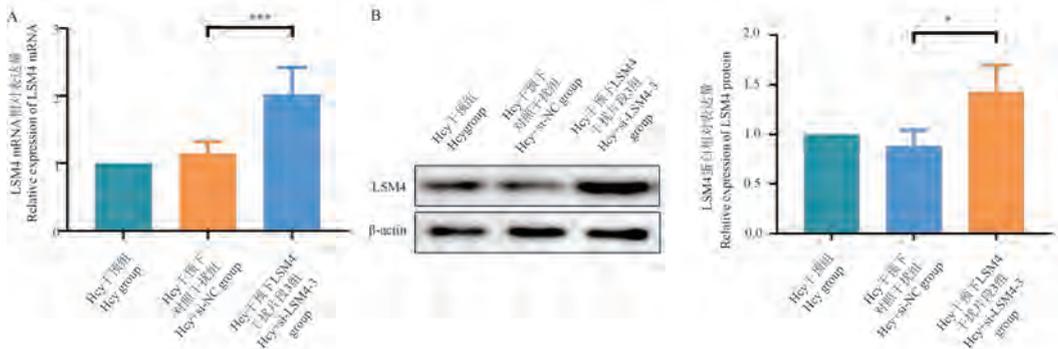


注:A:DNMT1 mRNA 表达;B:DNMT1 蛋白表达。与转染干扰片段对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 5 DNMT1 siRNA 干扰自身验证

Note. A, DNMT1 mRNA expression. B, DNMT1 protein expression. Compared with the si-NC group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 5 DNMT1 siRNA interference self validation



注:A:LSM4 mRNA 表达;B:LSM4 蛋白表达。与 Hcy 干预下对照干扰组相比, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 6 DNMT1 在 Hcy 干预下调控 LSM4 的表达

Note. A, LSM4 mRNA expression. B, LSM4 protein expression. Compared with the Hcy+si-NC group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 6 DNMT1 regulates LSM4 expression in response to Hcy intervention

### 3 讨论

Hcy 是蛋氨酸转化为半胱氨酸过程中所形成的中间产物,属于一种含硫氨基酸。血液中 Hcy 水平升高与基因异常有关,也与营养因素有关,如低叶酸、维生素 B<sub>6</sub>、维生素 B<sub>12</sub> 和蛋氨酸摄入量过多<sup>[12]</sup>。Hcy 通过两条途径代谢,即再甲基化反应和转硫基反应。有研究发现,Hcy 在神经退行性病变、心血管征候、糖尿病和酒精性肝病等疾病发展中均有参与。已有研究发现,Hcy 可促进多种炎症介质释放,如 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8,也可导致细胞内超氧阴离子的产生增加,从而导致细胞内氧化压力升高,NO 含量下降,进而诱发内质网应激,其发生机制均是 Hcy 通过促进细胞凋亡、脂肪堆积和炎症等途径导致细胞损伤过程<sup>[13]</sup>。课题组前期研究已证实 Hcy 能够明显引起肝损伤,HMD 组肝组织与 ND 组相比,肝小叶结构排列紊乱,且 Hcy 可诱导人源肝细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>,但对 Hcy 引起肝细胞凋亡的具体凋亡机制仍不清楚。

LSM 蛋白是 RNA 结合蛋白家族,共有 13 个成员(LSM1~LSM14B)。这些成员与多种类型肿瘤发生和转移密切相关,其中 LSM4 已被证明参与肝损伤<sup>[16]</sup>、肠道疾病和卵巢癌的发生和恶化<sup>[17]</sup>。研究表明,在卵巢癌中,LSM4 的敲低可抑制卵巢细胞的细胞迁移和侵袭,而过表达 LSM4 又逆转敲低 circ\_0、025、033 对上述过程的抑制作用<sup>[18]</sup>;沉默 LSM4 可减少 miR-503 对 CUGBP1 表达的抑制,从而降低肠道上皮细胞对凋亡的敏感性<sup>[19]</sup>。本研究发现 LSM4 在 HMD 组和 Hcy 组中表达上调,这提示 LSM4 可能参与 Hcy 致肝损伤的发展过程。然而,LSM4 是否与 Hcy 致肝细胞凋亡有关仍不明确。故本研究通过 Western blot 检测凋亡相关指标蛋白变化和流式细胞术定量细胞凋亡水平,验证 Hcy 可促进肝细胞凋亡,而干扰 LSM4 的表达可削弱 Hcy 对肝细胞凋亡的促进作用。DNA 甲基化是一种至关重要的表观遗传修饰方式,可引起相关基因的转录促进或抑制,从而调节靶细胞功能。在多种人类疾病的发生机制中均可发现存在 DNA 甲基化的变化<sup>[20]</sup>,例如,CYP2D6 和 CYP2E1 的甲基化水平可影响其自身表达,进而影响药物的半衰期,从而导致肝细胞损伤<sup>[21]</sup>。为此,接下来探讨 Hcy 刺激 LSM4 如何发生改变,通过 MethPrimer 网站分析 LSM4 的 DNA 启动子区 GC 含量,显示 GC 含量丰富

且存在 1 个 CpG 岛,提示 LSM4 表达可能受甲基化调控。

DNMT1 是一个广泛存在于 DNA 甲基化修饰过程的酶,它在 DNA 复制过程中发挥重要维持甲基化作用,还在整个甲基化进程中发挥重要调节作用<sup>[22-23]</sup>。有研究发现 CFP1 缺失可通过降低 DNMT1 合成致 DNA 损伤增加<sup>[24]</sup>,另有研究发现 DNMT1 基因缺失的小鼠在发育后不久死亡,并且肝受损严重<sup>[25]</sup>,这是 DNMT1 功能关键性的证据,同时也提示了 DNMT1 与肝损伤密切相关<sup>[26]</sup>。为验证 LSM4 与 DNMT1 是否在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中存在关联,本研究在 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后,通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 LSM4 表达情况。结果显示,在 Hcy 干预下干扰 DNMT1 表达后,LSM4 表达水平明显上调,提示 DNMT1 通过调控 LSM4 甲基化影响 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡进程。

此前,对于肝损伤中肝细胞凋亡机制的研究仍局限于相关有机化合物<sup>[27]</sup>、lncRNA<sup>[28]</sup>等,本研究首次提出 DNA 甲基化在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的机制作用,将 DNMT1 对 LSM4 的甲基化调控和 Hcy 致肝细胞凋亡的机制串联起来,为肝损伤中 Hcy 致肝细胞凋亡的机制研究提供新思路。

综上所述,本研究探索并验证 DNMT1 调控 LSM4 在 Hcy 诱导小鼠肝细胞凋亡中的作用及机制,LSM4 有望成为治疗 Hcy 致肝细胞凋亡的一个新的干预靶点,对临床上肝损伤相关疾病的诊断和治疗具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] WANG R, JIN Y, YAO X H, et al. A novel mechanism of the M1-M2 methionine adenosyltransferase switch-mediated hepatocellular carcinoma metastasis [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(9): 1201-1212.
- [2] 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.
- [3] VENTURA P, VENTURELLI G, MARCACCI M, et al. Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism in patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis [J]. Thromb Res, 2016, 141: 189-195.
- [4] POGRIBNY I P, DREVAL K, KINDRAT I, et al. Epigenetically mediated inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase and the associated dysregulation of 1-carbon metabolism in nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma [J].

- FASEB J, 2018, 32(3): 1591–1601.
- [ 5 ] LATTERI S, MALAGUARNERA G, CATANIA V E, et al. Homocysteine serum levels as prognostic marker of hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis [J]. *Curr Mol Med*, 2019, 19(7): 532–538.
- [ 6 ] 王青青, 焦运, 吴欣妍, 等. FoxO1 经 ATF6 调控 Hcy 诱导的肝细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(2): 203–209. WANG Q Q, JIAO Y, WU X Y, et al. FoxO1 regulates Hcy-induced hepatocyte apoptosis through ATF6 [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2021, 37(2): 203–209.
- [ 7 ] YIN J, LIN C, JIANG M, et al. CENPL, ISG20L2, LSM4, MRPL3 are four novel hub genes and may serve as diagnostic and prognostic markers in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15610.
- [ 8 ] SUN X, ZHANG J, XIAO C, et al. Expression profile and prognostic values of LSM family in skin cutaneous melanoma [J]. *BMC Med Genomics*, 2022, 15(1): 238.
- [ 9 ] XUE R, HUA L, XU W, et al. Derivation and validation of the potential core genes in pancreatic cancer for tumor-stroma crosstalk [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 4283673.
- [ 10 ] SUN Z P, TAN Z G, PENG C. Long noncoding RNA LINC01419 promotes hepatocellular carcinoma malignancy by mediating miR-485-5p/LSM4 axis [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(9): 826–838.
- [ 11 ] RAJU K K, NATARAJAN S, KUMAR N S, et al. Role of cytoplasmic deadenylation and mRNA decay factors in yeast apoptosis [J]. *FEMS Yeast Res*, 2015, 15(2): fou006.
- [ 12 ] WANG Z, YIP L Y, LEE J H J, et al. Methionine is a metabolic dependency of tumor-initiating cells [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 825–837.
- [ 13 ] JI C, KAPLOWITZ N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(12): 1699–1708.
- [ 14 ] ZHANG Z, YU Y, ZHANG P, et al. Identification of NTRK3 as a potential prognostic biomarker associated with tumor mutation burden and immune infiltration in bladder cancer [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 458.
- [ 15 ] 马芳, 张辉, 李桂忠, 等. MiR-148a-5p 参与了高蛋氨酸饮食诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的肝细胞凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(35): 5632–5637. MA F, ZHANG H, LI G Z, et al. Involvement of miR-148a-5p in ApoE<sup>-/-</sup> mouse hepatocyte apoptosis induced by high methionine diet [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(35): 5632–5637.
- [ 16 ] CHEN L, LIN Y H, LIU G Q, et al. Clinical significance and potential role of *LSM4* overexpression in hepatocellular carcinoma: an integrated analysis based on multiple databases [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 804916.
- [ 17 ] TA H D K, WANG W J, PHAN N N, et al. Potential therapeutic and prognostic values of LSM family genes in breast cancer [J]. *Cancers*, 2021, 13(19): 4902.
- [ 18 ] HOU W, ZHANG Y. Circ\_0025033 promotes the progression of ovarian cancer by activating the expression of LSM4 via targeting miR-184 [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 217: 153275.
- [ 19 ] CUI Y H, XIAO L, RAO J N, et al. MiR-503 represses CUG-binding protein 1 translation by recruiting CUGBP1 mRNA to processing bodies [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(1): 151–162.
- [ 20 ] SMITH ZD, MEISSNER A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3): 204–220.
- [ 21 ] WEI Y, HUAI C, ZHOU C, et al. A methylation functional detection hepatic cell system validates correlation between DNA methylation and drug-induced liver injury [J]. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20(5): 717–723.
- [ 22 ] SONG J, TEPLOVA M, ISHIBE-MURAKAMI S, et al. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation [J]. *Science*, 2012, 335(6069): 709–712.
- [ 23 ] JELTSCH A, JURKOWSKA R Z. New concepts in DNA methylation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(7): 310–318.
- [ 24 ] 王东升, 穆思宇, 王健岗, 等. CXXC 锌指蛋白 1 在恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(3): 144–148. WANG D S, MU S Y, WANG J G, et al. Research progress on the role of CXXC zinc finger protein 1 in malignant tumors [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(3): 144–148.
- [ 25 ] TAKEBAYASHI S, TAMURA T, MATSUOKA C, et al. Major and essential role for the DNA methylation mark in mouse embryogenesis and stable association of DNMT1 with newly replicated regions [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23): 8243–8258.
- [ 26 ] MA J, ZHANG L, HUANG Y, et al. Epigenomic profiling indicates a role for DNA methylation in the postnatal liver and pancreas development of giant pandas [J]. *Genomics*, 2022, 114(3): 110342.
- [ 27 ] 黄向华, 张祥宏, 左连富, 等. 杂色曲霉素对小鼠肝脏细胞凋亡和增殖影响的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2002, 12(2): 109–112. HUANG X H, ZHANG X H, ZUO L F, et al. Effects of sterigmatocystin on apoptosis and proliferation of hepatocytes in KM mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2002, 12(2): 109–112.
- [ 28 ] 刘远光, 刘怀海. LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(10): 44–55. LIU Y G, LIU H H. LncRNA HULC regulates proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via the miR-372/CXCR4 axis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(10): 44–55.

曹愿,杨远松,谷文达,等. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 43-49.

Cao Y, Yang YS, Gu WD, et al. Construction of *Lep* gene knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 43-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.006

# 基于 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型

曹 愿, 杨远松, 谷文达, 赵皓阳, 翟世杰, 孙晓炜, 范昌发\*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 国家啮齿类实验动物资源库, 北京 102629)

**【摘要】** 目的 本研究旨在利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *Lep* 基因敲除小鼠 (C57BL/6N-*Lep*<sup>em1</sup>/Nifdc, 简称 ob 小鼠), 作为肥胖症、糖尿病等临床疾病体内药物评价的动物模型。方法 根据 CRISPR/Cas9 靶点设计原则, 设计能够靶向小鼠 *Lep* 基因的 sgRNA, 经体外转录, 与 Cas9 mRNA 一并注射入小鼠受精卵。随后提取出生小鼠的鼠尾 DNA, 采用 PCR 检测及测序技术, 得到阳性小鼠。将其与野生型小鼠进行交配传代, 最终获得纯合 ob 小鼠, 并对纯合 ob 小鼠进行血清生化指标检测及肝病理检测。结果 经鉴定, 共得到 8 只阳性小鼠, 经筛选传代, 得到能够稳定遗传的阳性小鼠。纯合 ob 小鼠的血清生化指标甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 含量均显著高于野生型小鼠。肝病理检测结果表明, 纯合 ob 小鼠的肝中存在明显的炎症浸润及脂肪空泡样病变。结论 成功建立 *Lep* 基因敲除小鼠, 丰富了国家啮齿类实验动物资源库, 为药物临床前评价提供了动物模型支持。

**【关键词】** 基因敲除; ob 小鼠; CRISPR/Cas9 技术; *Lep* 基因

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0043-07

## Construction of *Lep* gene knockout mouse model based on CRISPR/Cas9 system

CAO Yuan, YANG Yuansong, GU Wenda, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie, SUN Xiaowei, FAN Changfa\*

(Division of Animal Model Research, National Rodent Laboratory Animal Resources Center, Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**【Abstract】 Objective** We generated ob mice (C57BL/6N-*Lep*<sup>em1</sup>/Nifdc) with *Lep* gene knockout (ob/ob) using the CRISPR/Cas9 system, to establish a suitable animal model for preclinical drug evaluation for clinical diseases such as diabetes. **Methods** According to the principle of CRISPR/Cas9 target design, single guide RNA targeting the mouse *Lep* gene was designed for transcription *in vitro*, and microinjected with Cas9 mRNA into mouse zygotes. Mouse tail DNA was extracted and detected by polymerase chain reaction and sequencing, followed by mating of positive and wild-type mice. Blood biochemistry and liver pathology were assessed in homozygous ob mice. **Results** Eight positive mice were identified and a stable mouse strain was selected for further breeding. Serum triglycerides, total cholesterol, and alanine aminotransferase levels were significantly higher in homozygous ob mice than in wild-type mice, and liver pathology showed inflammatory infiltration and lipid vacuolar transformations. **Conclusions** We successfully established a *Lep* gene knockout mouse model, which will provide an important addition to the national rodent experimental animal database and an animal model for preclinical drug evaluation.

**【Keywords】** knockout; ob mouse; CRISPR/Cas9 technology; *Lep* gene

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

【基金项目】药品监管科学全国重点实验室课题(2023SKLDRS0124)。

【作者简介】曹愿(1990—),女,硕士,助理研究员,研究方向:模型动物构建。E-mail:18810961171@163.com

【通信作者】范昌发(1970—),男,博士,研究员,研究方向:疾病动物模型研究。E-mail:fanfc@nifdc.org.cn

基因编辑能够精确操控细胞 DNA 序列,并改变生物体特征,成为研究人类疾病的重要手段<sup>[1]</sup>。其中,遗传修饰动物模型是研究人类疾病的重要工具。到目前为止,关于遗传修饰动物模型构建的方法多种多样,包括 ES 细胞打靶、转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)、CRISPR/Cas (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/Cas) 等内切酶系统,其中,利用 CRSIPR/Cas9 技术构建的基因编辑动物模型具有高效且快速的特点,已经成为模型构建的常用策略<sup>[2-4]</sup>。

瘦素 (leptin) 是一种由脂肪组织分泌的激素,能够维持机体能量稳态,与哺乳动物体重调节密切相关<sup>[5]</sup>。瘦素基因 (*Lep*, *ob*) 位于 6 号染色体,在 1994 年由 Friedman 教授团队率先克隆<sup>[6]</sup>,这一重大发现让人们认识到肥胖和基因的密切关系。最新的文献表明肥胖与胰岛素抵抗相关,尤其是与 2 型糖尿病这一全球普遍存在、患病率逐年攀升的慢性代谢性疾病密切相关<sup>[7-8]</sup>。因此,肥胖及能量代谢成为研究 2 型糖尿病机制的热点之一。本文利用 CRSIPR/Cas9 技术构建 *Lep* 基因敲除小鼠模型 (简称 *ob* 小鼠),为进一步开发和评价肥胖症相关代谢性疾病临床前药物提供良好的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 4~6 周龄雌性 C57BL/6N 小鼠,体重 13~18 g,来自中国食品药品检定研究院 [SCXK (京) 2022-0002],饲养于中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所 SPF 级屏障环境中 [SYXK (京) 2021-0019]。饲养期间给予小鼠标准饲料及洁净饮用水 (饲料购自北京科奥公司,饮用水由本单位经高压灭菌制备)。饲养环境:温度控制于 18~26 °C,湿度恒定,自动光控 (昼夜各半交替)。本实验所有操作均符合本单位实验动物伦理学要求 (中检动 (福) 第 2024 (B) 016 号),遵循 3R 原则。

### 1.2 主要试剂与仪器

Cas9 转录试剂盒、MEGA shortscript T7 high yield transcription kit、MEGA clear transcription clean-up kit、mMESSAGE、mMESSAGE T7 transcription kit、Poly (A) tailing kit 均购自美国 Life Technologies 公司;胶回收试剂盒、RNeasy mini kit 购自德国 Qiagen

公司;TRIzol、RT-PCR 试剂盒、TB Green Premix Ex TaqII 荧光定量 PCR 试剂盒、琼脂糖购自日本 TaKaRa 公司;胚胎操作液和透明质酸酶购自美国 Sigma 公司;绒毛膜促性腺激素购自宁波第二激素厂;其他常用化学试剂如苯、乙醇等购自北京化学工业集团有限公司;所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成;血液指标测定相关试剂盒 (TC *in vitro* diagnostic kit、TG *in vitro* diagnostic kit、ALT/GPT *in vitro* diagnostic kit) 均购自中生北控 Biosino 公司。

Roche 480II 荧光定量 PCR 仪 (Roche 公司,瑞士);Nano Drop 超微量分光光度计 (Thermo Fisher 公司,美国);电子天平 (Sartorius, 德国);离心机 (Thermo Fisher 公司,美国);显微注射仪 (Eppendorf 公司,德国);PCR 仪 (ABI 公司,美国);全自动生化分析仪 (OLYMPUS 公司,日本);病理切片扫描仪 (HAMAMATSU 公司,日本)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 sgRNA 的体外合成及转录

根据 Genbank 报道的小鼠 *Lep* 基因序列,确定切割位点位于外显子 3 区域 (图 1A)。根据 <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public> 在线软件进行预测,选择综合评分最高的作为目标 sgRNA 序列,即 sgRNA f 和 sgRNA r (见表 1)。设计好的引物合成之后,进行退火,将其连接至 BbsI 酶切 pT7 质粒上,然后克隆转化,次日挑取 2 个菌落进行质粒提取,并进行测序验证。然后以测序正确的 sgRNA 质粒为模板,引物 T7 f/T7 r (见表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 15 s,共 30 个循环。然后,加入 2 倍体积无水乙醇,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 500 μL 70% 乙醇清洗 2 次,然后将沉淀溶解于 30 μL RNase free 水中。使用 MEGA shortscript T7 high yield transcription kit 进行体外转录,37 °C 孵育 4 h,然后加入 TURBO DNase 消化 20 min,最后使用 MEGA clear transcription clean-up kit 对产物进行纯化,纯化后对产物进行浓度测定并分装,于 -80 °C 保存<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.2 Cas9 mRNA 的体外转录

以 px330 质粒为模板,采用 HindIII 酶进行酶切,跑胶回收后,最终加入 30 μL RNase free 水溶解。以回收产物为模板,利用 mMESSAGE、mMESSAGE T7 transcription kit 进行体外转录,37 °C

孵育 2 h, 然后加入 TURBO DNase 消化 20 min, 再使用 Poly(A) tailing kit 加尾 50 min, 最后使用 RNeasy mini kit 对产物进行纯化, 纯化后对产物进行浓度测定并分装, 于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3.3 显微注射及胚胎移植

6 周龄 C57BL/6N 雌性小鼠超数排卵后与雄鼠合笼, 挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将构建好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 置于冰上解冻, 混合浓度为 sgRNA 50 ng/ $\mu\text{L}$ , Cas9 mRNA 100 ng/ $\mu\text{L}$ , 13 000 r/min 离心 40 min, 吸取上清。用口吸管吸取液体从注射针后端注入尖端, 进行显微注射。将操作成功的囊胚放入胚胎培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 30~60 min, 随后尽快移植到假孕母鼠的子宫内, 缝合后将移植鼠饲养于 IVC 环境中。

### 1.3.4 $F_0$ 代新生小鼠和 $F_1$ 代小鼠的基因型鉴定

对所有出生小鼠进行剪尾, 提取 DNA 后, 取 100 ng DNA 进行 PCR, 扩增引物 F/R 见表 1, 扩增条件:  $95^{\circ}\text{C}$  5 min;  $95^{\circ}\text{C}$  20 s,  $62^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  60 s/kb, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 测序引物为 F/R (见表 1)。得到阳性鼠后, 将其与野生型 C57BL/6N 小鼠进行交配, 得到的  $F_1$  采用同样的方法进行鉴定。

### 1.3.5 荧光定量 PCR 法检测基因表达水平

取 50 mg 左右小鼠组织, TRIzol 法提取纯合 ob 小鼠和野生型 C57BL/6N 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、脑、白色脂肪组织的总 RNA, 反转录 PCR 获得 cDNA, 以 cDNA 为模版进行检测。扩增引物: 上游序列 5'-AGCAGTCCGGTATCCGCCAAGC-3', 下游序列 5'-GATAGACTGCCAGAGT-3', 小鼠 GAPDH 基因作为内参, 内参引物序列信息为: 上游序列 5'-CAGCAACTCCCACTCTTCCAC-3', 下游序列 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTC-3'。扩增条件:  $95^{\circ}\text{C}$  30 s;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $61^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环;  $4^{\circ}\text{C}$   $\infty$ 。每组 3 个样本, 每个样本设置 3 个复孔。数据分析以

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
sgRNA f	TAGGTTCCAAGATGGACCAGACTC
sgRNA r	AAACGAGTCTGGTCCATCTTGGAC
T7 f	TGACGGGACGGCGGCTTTGT
T7 r	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT
F	TCTGATAAGGGCAGGAGGCT
R	ATGGATGTGTGCACATGCTCTCTT

$Lep$ /GAPDH 比值计算: 先将内参基因均一化, 即目的基因平均 Ct 值-内参基因平均 Ct 值 =  $\Delta\text{Ct}$ ; 然后将模型样本和对照样本比较:  $\Delta\text{Ct}$  模型样本 -  $\Delta\text{Ct}$  对照样本 =  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , 最后倍数变化  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  即为  $Lep$ /GAPDH 比值。

### 1.3.6 血液指标检测

小鼠麻醉后, 腹主动脉取血于 1.5 mL 抗凝管中, 用全自动生化分析仪检测血浆中的甘油三酯 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)。

### 1.3.7 肝组织病理学检测

小鼠麻醉后, 取肝组织, 甲醛溶液固定, 进行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 及油红 O 染色。HE 染色: 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 切片, 行 HE 染色。油红 O 染色: 加 60% 异丙醇浸洗后, 加入改良油红 O 染色液, 密闭染色 10~15 min, 60% 乙醇分化水洗, 使用 Harris 淡染, 再次水洗后贴敷于载玻片, 甘油明胶封固。最后使用病理切片扫描仪进行图像扫描分析。

## 1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 7.0 进行统计, 数据表示为平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), One-Way ANOVA 方法分析数据, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

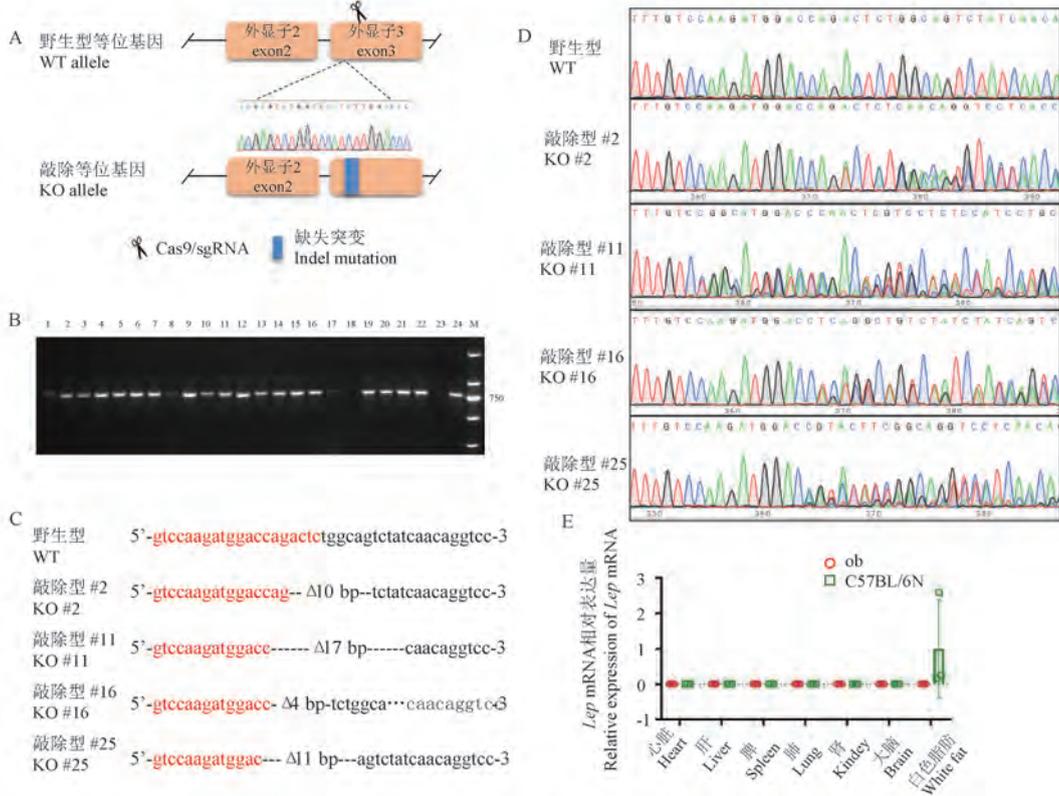
### 2.1 阳性小鼠的获得

$Lep$  基因位于小鼠 6 号染色体, 共 2 个转录本 (Ensembl: ENSMUSG00000059201)。首先在  $Lep$  基因 3 号外显子处选取长度为 250 bp 的序列, 然后利用在线预测软件针对这 250 bp 序列进行 sgRNA 设计。根据评估, 选择综合评分最高的 sgRNA 作为靶序列。 $Lep$  基因敲除小鼠构建策略及 sgRNA 的切割位点如图 1A。

本研究共进行了两批次显微注射, 注射胚胎 205 枚, 出生 83 只小鼠 (表 2)。对出生仔鼠鼠尾进行基因型鉴定, 野生型小鼠的目标片段为 736 bp, 经测序验证, 共获得 8 只  $F_0$  小鼠, 部分结果如图所示 (图 1B~1D)。在后续繁殖过程中, 排除小鼠发育出现异常情况导致无法正常传代外, 只保留  $F_0$ #2 小鼠传代繁殖, 命名为 C57BL/6N- $Lep^{em1}$ /Nifdc (简称 ob 小鼠)。采用 RT-PCR 技术检测纯合 ob 小鼠和野生型 C57BL/6N 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾、大脑、白色脂肪组织中  $Lep$  基因的表达, 结果显示  $Lep$  基因仅

表 2 显微注射情况  
Table 2 Microinjection results

批次 Batch	品系 Strain	移植胚胎/n Transferred zygotes	出生小鼠/n Pups born	首建鼠/n Founder
1	C57BL/6N	80	43	4
2	C57BL/6N	125	40	4



注: A: *Lep* 基因敲除小鼠策略及 sgRNA 的切割位点示意图; B: 基因型鉴定结果; C、D: 部分测序结果, 红色表示 sgRNA 序列; E: *Lep* mRNA 表达水平。WT: 野生型; KO: 敲除型。

图 1 ob 小鼠的构建策略及鉴定结果

Note. A, Schematic diagram of *Lep* gene knockout mouse of cleavage site of sgRNA. B, Genotype results. C/D, Partial sequencing results, Red indicates sgRNA sequence. E, Relative expression of *Lep* RNA. WT, Wild-type; KO, Knock out.

Figure 1 Construction strategy and identification results of ob mice

在野生型 C57BL/6N 小鼠的白色脂肪组织中存在表达,而在 ob 小鼠中无表达(图 1E),说明 *Lep* 基因敲除成功。

## 2.2 ob 小鼠体重的变化

如图 2 所示,在正常饲料饲养条件下,与野生型 C57BL/6N 小鼠相比,纯合 ob 小鼠形态肥胖,屁股肥大,腿短。4~8 周龄的 ob 小鼠体重远高于同周龄的野生型小鼠,且体重随时间呈现稳步上升趋势,8 周龄 ob 小鼠与同周龄野生型小鼠相比,体重增加 2~3 倍。

## 2.3 ob 小鼠血生化测定结果

TG 和 TC 是动脉粥样硬化疾病检测的基本指

标。TG 主要存在于脂肪组织中,原发性或继发性高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、糖尿病及肾病综合征等都可使血液中 TG 含量增高。TC 主要与动脉粥样硬化的形成有关。丙氨酸转氨酶(ALT)主要存在于肝细胞中,当肝细胞受损时,ALT 释放入血,使血液中含量升高。对 8 周龄 ob 小鼠血生化检测结果显示,纯合 ob 小鼠血浆中 TG ( $P < 0.01$ )、TC ( $P < 0.001$ ) 显著高于野生型小鼠,说明 ob 小鼠出现了高脂血症;纯合 ob 小鼠血浆中 ALT ( $P < 0.001$ ) 显著高于野生型小鼠,表明 ob 小鼠出现了肝功能异常;而杂合 ob 小鼠与野生型小鼠相比,TG、TC、ALT 含量等均无明显差异,如图 3。

## 2.4 肝组织切片结果

如图 4 所示,对小鼠肝组织进行 HE 染色和油红 O 染色。HE 染色结果显示,野生型 C57BL/6N 小鼠肝细胞结构完整、排列紧密,肝小叶轮廓清晰;

ob 小鼠肝细胞排列疏松,体积大,炎性细胞增多,肝组织出现大面积的空泡样变,甚至存在许多的大泡样变,说明肝组织出现异常。油红 O 染色结果显示,野生型 C57BL/6N 小鼠肝组织未发生脂质沉积;

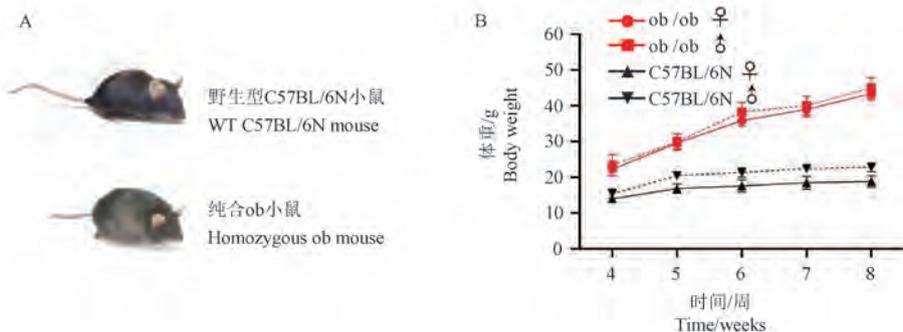
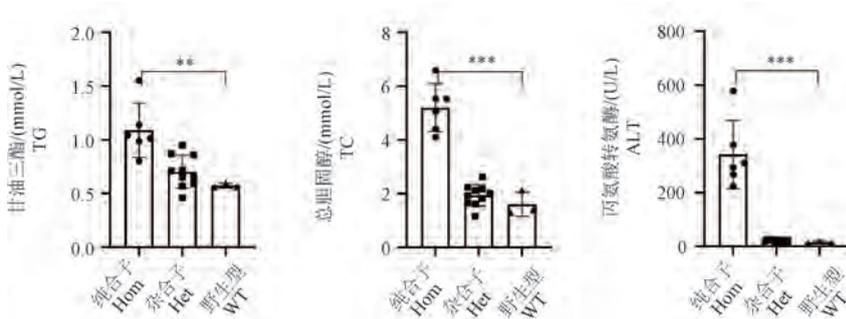


图 2 纯合 ob 小鼠形态(8 周)及体重变化曲线( $n=5$ )

Figure 2 Appearance of 8 weeks homozygous ob mouse and the change curve of ob mice average weight



注:与 WT 相比, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ 。

图 3 8 周 ob 小鼠的血生化检测结果( $n=3\sim 10$ )

Note. Compared with WT group, \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ .

Figure 3 Biochemical results of 8 weeks ob mice

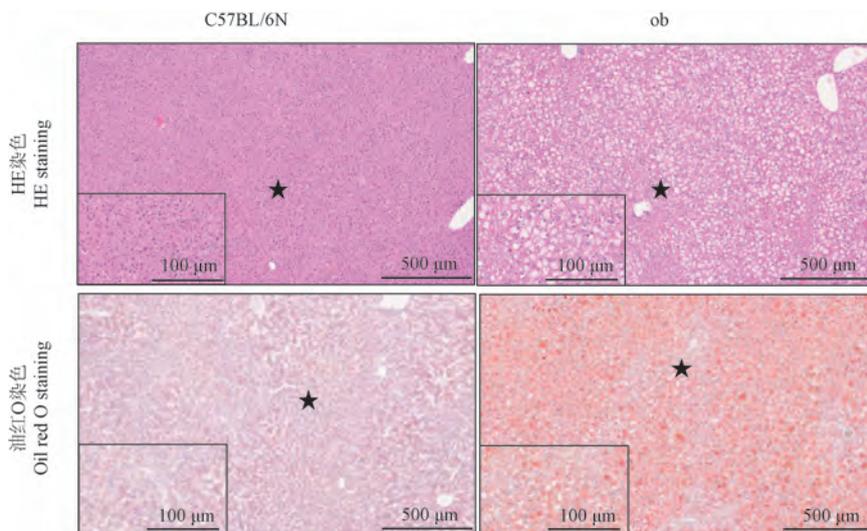


图 4 ob 小鼠的肝病理结果

Figure 4 Representative histopathological result in the liver of ob mice

ob 小鼠肝组织存在大面积脂质沉积,肝细胞中充斥着被染成红色的大颗粒脂滴,肝脂肪变严重,同时表现出弥漫性脂肪泡分布,与 HE 染色结果一致,说明 ob 小鼠肝发生脂质化及脂肪变性。

### 3 讨论

CRISPR 相关基因编辑技术是目前最为热门的基因编辑工具之一,广泛应用于模型动物制作。自 2013 年以来,CRISPR 技术的研究呈爆发式增长,受到越来越多的关注。该技术的发展实现了哺乳动物基因组的改变或修饰<sup>[9-10]</sup>。其主要原理如下:在 sgRNA 的引导下,Cas9 被定位至邻近宿主间隔序列 (protospacer adjacent motif, PAM) 序列的特定位点,导致双链断裂。当存在外源性 DNA 模板时,通过同源定向修复 (homology-directed repair, HDR) 产生新的基因重组;而在没有外源模板的情况下,通过非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 在靶位点产生片段的缺失、插入或移码突变<sup>[11]</sup>。使用 CRISPR/Cas9 技术在临床中的应用潜力巨大,特别是在基因治疗方面,即对患者特异性突变进行基因编辑,或者传统疗法无法治疗的人类疾病方面<sup>[12]</sup>。在过去几年里,基因编辑作为一种治疗多种疾病的通用技术已经取得了相当大的进步,并且大大增加了在真核细胞基因组中修复和操纵的能力<sup>[13-14]</sup>。本研究采用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *Lep* 基因敲除小鼠模型 (简称 ob 小鼠),经过验证,确定该基因成功敲除,建立了能够稳定遗传的 ob 小鼠种群。

瘦素基因 (*Lep*) 突变会导致瘦素缺失,瘦素受体不能接收信号,导致该小鼠长期处于“零脂肪低能量状态”,表现出极强的食欲;同时由于自身能量代谢和脂肪分解被抑制,结果导致小鼠体内蓄积数倍于正常小鼠的脂肪,最终导致小鼠异常肥胖<sup>[15]</sup>。第一只 ob 小鼠是 1949 年 Jackson 实验室发现的,属于隐性突变,且纯合子不育。这种突变小鼠在生长过程中体重迅速增加,甚至达到未突变小鼠的 4 倍<sup>[16]</sup>。本研究构建的 ob 小鼠模型也具有相同的表现,8 周龄 ob 小鼠与同周龄野生型小鼠相比,体重增加 2~3 倍。据报道,瘦素主要在白色脂肪组织中高表达,在其他组织中不表达或表达极低<sup>[17]</sup>,敲除该基因后,白色脂肪组织不表达瘦素,引发 ob 小鼠的高血脂和肝功能异常,并且在繁育过程中,雌性纯合子小鼠由于下丘脑-垂体水平的激素不足导

致生育异常,与文献报道一致<sup>[16,18-21]</sup>。此外,除了肥胖,ob 小鼠的主要特征还包括高摄食量、高脂、高胰岛素血症、高血糖、胰岛素抵抗和性腺功能不全<sup>[22]</sup>,这些特征使得 ob 小鼠被广泛用于肥胖症、糖尿病等的研究。另有文献报道,ob 小鼠可作为非酒精性脂肪肝动物模型,为药品研发及疾病发病机制提供背景资料和参考<sup>[23]</sup>。

目前,国际上仅有一篇关于 *Lep* 基因敲除小鼠模型的报道<sup>[24]</sup>,而国内虽然有公司研发了此模型,但未见相应的文章报道。本研究是中国食品药品检定研究院自主建立的基于 CRISPR/Cas9 技术的基因敲除小鼠模型,为研究肥胖症、糖尿病及相关并发症的研究提供了动物模型,并且进一步丰富国家啮齿类实验动物资源库,具有广泛的应用前景。

### 参考文献:

- [1] DOUDNA J A. The promise and challenge of therapeutic genome editing [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 229-236.
- [2] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [3] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 *FcγR* 基因大片段敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.  
WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment *FcγR* gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 583-591.
- [4] 吴曦, 周舒雅, 刘甦苏, 等. 高效切割 *Hipp11* 敲入位点的 sgRNA 设计及活性验证 [J]. *实验动物科学*, 2015, 32(5): 26-30.  
WU X, ZHOU S Y, LIU S S, et al. Designation and activity verification of high efficiency sgRNAs for *Hipp11* locus [J]. *Lab Anim Sci*, 2015, 32(5): 26-30.
- [5] FRIEDMAN J M, HALAAS J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals [J]. *Nature*, 1998, 395(6704): 763-770.
- [6] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [7] KAHN S E, HULL R L, UTZSCHNEIDER K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 840-846.
- [8] FATUMO S. Including diverse populations enhances the discovery of type 2 diabetes loci [J]. *Nat Rev Genet*, 2024, 25(2): 82.
- [9] KOMOR A C, BADRAN A H, LIU D R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 559.

- [10] LI T, YANG Y, QI H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 36.
- [11] MALI P, ESVELT K M, CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [12] GARVÍ E S, ÖKTEM M, MASEREEUW R, et al. Gene surgery: a potential CRISPR/cas-based treatment option for nephropathic cystinosis *in vitro* [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2022, 33(11S): 37.
- [13] COX D B, PLATT R J, ZHANG F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges [J]. *Nat Med*, 2015, 21(2): 121-131.
- [14] SYDING L A, NICKL P, KASPAREK P, et al. CRISPR/Cas9 epigenome editing potential for rare imprinting diseases: a review [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 993.
- [15] PELLEYMOUNTER M A, CULLEN M J, BAKER M B, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice [J]. *Science*, 1995, 269(5223): 540-543.
- [16] INGALLS A M, DICKIE M M, SNELL G D. Obese, a new mutation in the house mouse [J]. *J Hered*, 1950, 41(12): 317-318.
- [17] BRAY G A, YORK D A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis [J]. *Physiol Rev*, 1979, 59(3): 719-809.
- [18] SWERDLOFF R S, BATT R A, BRAY G A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (*ob/ob*) mouse [J]. *Endocrinology*, 1976, 98(6): 1359-1364.
- [19] LANE P W. The pituitary-gonad response of genetically obese mice in parabiosis with thin and obese siblings [J]. *Endocrinology*, 1959, 65: 863-868.
- [20] RUNNER M N, ROSCOE B. Inherited hypofunction of the female pituitary in the sterile-obese syndrome in the mouse [J]. *Genetics*, 1954, 39: 990-991.
- [21] DRASHER M L, DICKE M W, LANE P W. Physiological differences in uteri of obese stock mice [J]. *J Hered*, 1955, 46(5): 209-212.
- [22] CHEHAB F F, LIM M E, LU R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 318-320.
- [23] 薛欣, 李玉梅, 陈冰, 等. 瘦素缺陷型 *ob/ob* 小鼠和 C57BL/6J 小鼠生物学特性的对比研究 [J]. *中国医科大学学报*, 2015, 44(11): 983-986.
- XUE X, LI Y M, CHEN B, et al. Comparative study of biological characteristics between leptin defect *ob/ob* mice and C57BL/6J wild-type mice [J]. *J Chin Med Univ*, 2015, 44(11): 983-986.
- [24] ROH J I, LEE J, PARK S U, et al. CRISPR-Cas9-mediated generation of obese and diabetic mouse models [J]. *Exp Anim*, 2018, 67(2): 229-237.

〔收稿日期〕2024-06-03

韩雪, 蒋莉, 张远, 等. CdCl<sub>2</sub>与尼古丁对精原细胞联合作用方式的初步研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 50-58.  
Han X, Jiang L, Zhang Y, et al. Preliminary studies on the mode of activity of CdCl<sub>2</sub> in combination with nicotine in spermatogonial cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 50-58.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.007

# CdCl<sub>2</sub>与尼古丁对精原细胞联合作用方式的初步研究

韩雪<sup>1,2</sup>, 蒋莉<sup>1,2</sup>, 张远<sup>1,2</sup>, 吴德生<sup>1,2\*</sup>, 黄海燕<sup>2</sup>, 刘建军<sup>2</sup>

(1.山西医科大学公共卫生学院, 太原 030000; 2.深圳市疾病预防控制中心深圳市现代毒理学重点实验室, 深圳市卫生毒理学医学重点学科(2020-2024), 广东 深圳 518055)

**【摘要】** **目的** 探讨 CdCl<sub>2</sub> 与尼古丁联合作用对小鼠精原 GC-1 细胞周期和凋亡的影响及其联合作用方式。**方法** 设置 CdCl<sub>2</sub> 组、尼古丁组以及联合作用组 24 h (简称联用组) 3 组, 采用 CCK-8 法检测对 GC-1 细胞增殖的抑制, 流式细胞术检测对 GC-1 细胞周期和凋亡的影响。**结果** 随着浓度的升高, CdCl<sub>2</sub>、尼古丁对 GC-1 细胞增殖的抑制作用增强, CdCl<sub>2</sub> 尼古丁对 GC-1 细胞的 24 h IC<sub>50</sub> 分别为 5.409 和 2814 μmol/L。CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联用, 在尼古丁浓度为 0.175、0.350、0.700 和 1.400 mmol/L 时, 其对 GC-1 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 4.422、4.532、3.309 和 2.532 μmol/L, 呈明显的递减过程, 均低于 CdCl<sub>2</sub> 单独作用组, CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时具有协同作用。细胞周期结果显示, CdCl<sub>2</sub> 浓度为 2.5 μmol/L 时联用组 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比上升 (P<0.01), 与 CdCl<sub>2</sub> 组、尼古丁组比较, 联用组增强将细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期的效应, 对细胞周期的影响具有协同作用, 且 CdCl<sub>2</sub> 对于协同作用的影响更强。细胞凋亡结果显示, 与 CdCl<sub>2</sub> 组、尼古丁组比较, 联用组细胞凋亡比例显著增加 (P<0.01), 对细胞凋亡的影响具有协同作用, 且 CdCl<sub>2</sub> 对于协同作用的影响更强。**结论** CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合时具有协同作用, 对小鼠精原细胞毒性作用增强, 细胞周期发生阻滞, 促进凋亡, 且 CdCl<sub>2</sub> 对协同作用的影响更强。

**【关键词】** 尼古丁; CdCl<sub>2</sub>; 联合作用; 雄性; 精原细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0050-09

## Preliminary studies on the mode of activity of CdCl<sub>2</sub> in combination with nicotine in spermatogonial cells

HAN Xue<sup>1,2</sup>, JIANG Li<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuan<sup>1,2</sup>, WU Desheng<sup>1,2\*</sup>, HUANG Haiyan<sup>2</sup>, LIU Jianjun<sup>2</sup>

(1. College of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030000, China.

2. Shenzhen Key Laboratory of Modern Toxicology, Shenzhen Medical Key Discipline of Health Toxicology (2020-2024), Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the combined effect of CdCl<sub>2</sub> and nicotine on the cell cycle and apoptosis of mouse spermatogonium (GC-1). **Methods** A CCK-8 assay was used to detect the inhibition of GC-1 cell proliferation in the CdCl<sub>2</sub> groups, nicotine groups, and combined groups at 24 hours. Flow cytometry was used to detect the effects of

**【基金项目】** 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZSM202211010); 深圳市医学重点学科建设经费资助项目 (SZXK069)。

**【作者简介】** 韩雪 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 卫生毒理学。E-mail: hanxue202122@163.com

**【通信作者】** 吴德生 (1976—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 遗传毒理学和生态毒理学。E-mail: dswucn@126.com

CdCl<sub>2</sub>, nicotine, and the combined treatment on the cell cycle and apoptosis of GC-1 cells at 24 hours. **Results** The inhibitory effect on the proliferation of GC-1 cells increased with the rise in CdCl<sub>2</sub> and nicotine concentrations. The IC<sub>50</sub> values of CdCl<sub>2</sub> and nicotine alone were 5.409 μmol/L and 2814 μmol/L, respectively. The IC<sub>50</sub> values of CdCl<sub>2</sub> and nicotine combined for GC-1 cells were 4.422, 4.532, 3.309, and 2.532 μmol/L at nicotine concentrations of 0.175, 0.350, 0.700, and 1.400 mmol/L, respectively, thus there was an obvious decrease with nicotine concentration. The IC<sub>50</sub> values were lower than those of the group administered CdCl<sub>2</sub> alone, and the combined action of CdCl<sub>2</sub> and nicotine had synergistic effects. Cell cycle result showed that CdCl<sub>2</sub> concentration of 2.5 μmol/L increased the percentage of G<sub>2</sub>/M phase cells in the combination groups. Cells were arrested in the G<sub>2</sub>/M phase in the combined groups ( $P < 0.01$ ). When combined, CdCl<sub>2</sub> and nicotine had a synergistic effect on the cell cycle, and the synergistic effect of CdCl<sub>2</sub> was stronger. The result of apoptosis showed the proportion of cells in apoptosis increased in the 2.5 μmol/L CdCl<sub>2</sub> group. Compared with the CdCl<sub>2</sub> and nicotine single-treatment groups, the CdCl<sub>2</sub> and nicotine combined group's percentage of cells in apoptosis increased significantly ( $P < 0.01$ ), and CdCl<sub>2</sub> had a stronger synergistic effect. **Conclusions** Combinations of CdCl<sub>2</sub> and nicotine had a synergistic effect on mouse spermatogonium (GC-1) and led to enhanced cytotoxicity, G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest, and cell apoptosis. CdCl<sub>2</sub> was the main effect factor in the synergistic effect.

**【Keywords】** nicotine; CdCl<sub>2</sub>; combined effect; male; spermatogonium

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

吸烟是人类社会司空见惯同时又充满争议的行为。据统计,2020 年全球吸烟者(包括卷烟吸食者和其他烟草产品使用者)为 13.2 亿人,15 岁及以上人口吸烟率为 22.8%,其中男性为 37.5%、女性为 8.0%<sup>[1]</sup>。香烟燃烧后,烟雾中有害物质会造成呼吸、循环、生殖等系统损害<sup>[2]</sup>。随着不孕不育人群逐渐增多,吸烟对生殖毒性的研究已成为热点问题之一,越来越受到人们的关注。

香烟烟雾含有 7000 多种化学物质<sup>[3]</sup>,包括尼古丁、多环芳烃、重金属、亚硝胺、羰基化合物、酚类化合物、杀虫剂、苯及其化合物以及其他可能释放到环境中并通过废弃烟头或吸烟成为污染源的化合物,这些释放物被认为可能对人类健康和环境造成威胁<sup>[4]</sup>。香烟的燃烧会在主流烟雾(mainstream smoke, MS),即吸烟期间吸入肺部的烟雾中产生潜在的有毒物质。尼古丁(nicotine)在 MS 中的含量为 1191.07 μg/cig,金属化合物镉(Cd)在 MS 中的含量为 0.35 μg/cig<sup>[5]</sup>。尼古丁和 Cd 均是香烟烟雾中的有害成分。关于 Cd 与尼古丁是通过哪种联合作用方式产生对生殖系统的危害,尚无文献报道。本研究以小鼠精原细胞 GC-1 为研究对象,通过 CdCl<sub>2</sub> 与尼古丁联合暴露,观察两者对 GC-1 细胞周期及凋亡的影响,以期提供吸烟对男性生殖系统影响的基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株

小鼠精原细胞 GC-1 细胞株购自中国科学院昆

明细胞库(批号:220825)。

### 1.2 主要试剂与仪器

CdCl<sub>2</sub>(纯度 99.99%, sigma, 202908); DMSO 二甲基亚砜(sigma, 67-68-5); 尼古丁(纯度 ≥ 95%, 麦克林, N964558); DMEM 高糖培养基(GIBCO, 11965092), FBS 胎牛血清(GIBCO, 10091148); 胰蛋白酶(0.25%, GIBCO, 15050065); 胰蛋白酶-EDTA (0.25%, GIBCO, 25200056); 青霉素-链霉素(thermofisher, 15070063); CCK-8 试剂盒(dojindo, CK04); Annexin V 凋亡检测试剂盒(FITC/PI 双染法, BBI, E606336-0100); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碧云天, C1052)。

酶标仪(spark, 瑞士); 流式细胞仪(BD C6 Plus, 美国); CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(Thermo Scientific, 美国); 生物安全柜(Nuaire, 美国); 普通光学显微镜(ZEISS, 德国); 分析天平(METTLER TOLEDO, 瑞士)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞培养及传代

小鼠精原细胞 GC-1 培养用 DMEM 高糖培养液, 含 10% 胎牛血清、1% 双抗(5000 U/mL 青霉素和 5000 μg/mL 链霉素), 在 37 °C、饱和湿度、体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中常规传代培养, 待细胞长至约占瓶底 80%~90% 融合度时按 1:2 进行传代。

#### 1.3.2 细胞增殖

取对数生长期的 GC-1 细胞, 调整细胞浓度为 4.5×10<sup>4</sup>/mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 培养箱中培养 24 h。分为 CdCl<sub>2</sub> 组(4、8、12、16、20 μmol/L)、尼古丁组(250、500、750、

1000、1250、1500、1750、2000  $\mu\text{mol/L}$ ), 每个浓度设置 6 个平行复孔, 并同时设置阴性对照组(不加药)和空白对照组, 继续培养 24 h 后, 每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  继续培养 2 h, 酶标仪下测定各孔 450 nm 处光密度值(OD 值)。按照公式: 细胞活力 =  $[(\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}}) / (\text{OD}_{\text{空白孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}})] \times 100\%$ , 计算不同浓度下的细胞活力, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件计算各组毒物的半数抑制浓度(median inhibition concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 值。

### 1.3.3 染毒浓度及配制

$\text{CdCl}_2$  储备液的配置: 用分析天平精准称量 0.549 96 g  $\text{CdCl}_2$  粉末于离心管中, 加入 3 mL 纯水, 轻轻震荡, 充分溶解, 终浓度为 1 mol/L; 尼古丁储备液的配置: 在加入 1 mL 纯水的离心管中加入 157.20  $\mu\text{L}$  尼古丁原液, 轻轻震荡, 充分溶解, 终浓度为 1 mol/L。实验时用培养基按比例稀释。

### 1.3.4 联合暴露

取对数生长期的 GC-1 细胞, 调整细胞浓度为  $4.5 \times 10^4/\text{mL}$ , 以每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板, 每个组设 6 复孔, 培养箱中培养 24 h。根据“1.3.2”计算出的  $\text{IC}_{50}$  值确定后续实验浓度, 将 GC-1 细胞分为  $\text{CdCl}_2$  组(0.3125、0.625、1.25、2.5  $\mu\text{mol/L}$ )、尼古丁组(175、350、700、1400  $\mu\text{mol/L}$ )、联用组(共 16 个组), 联用组中  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁按照 1:1 的体积混合, 每个浓度设置 6 个平行复孔, 并同时设置阴性对照组(不加药)和空白对照组, 继续培养 24 h, 每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  继续培养 2 h, 酶标仪下测定各孔 450 nm 处光密度值(OD 值)。按照公式: 细胞抑制率 =  $[1 - (\text{OD}_{\text{实验孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}}) / (\text{OD}_{\text{空白孔}} - \text{OD}_{\text{对照孔}})] \times 100\%$ , 计算不同浓度下的细胞抑制率, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件计算各组毒物的  $\text{IC}_{50}$  值并绘图。采用 CompuSyn 1.0 软件计算  $\text{CdCl}_2$  与尼古丁的联合指数(combination index, CI),  $\text{CI} < 1$  提示协同效应,  $\text{CI} = 1$  提示加性效应,  $\text{CI} > 1$  提示拮抗作用。

### 1.3.5 细胞周期

取 GC-1 细胞  $4.5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 6 孔板中, 设置空白对照组、 $\text{CdCl}_2$  组、尼古丁组、联用组, 4 组细胞毒物作用浓度同“1.3.4”, 每组设置 3 个平行对照, 经过 24 h 处理后, 收集全部细胞, 根据细胞周期检测试剂盒说明书, 配制碘化丙啶染色液, 每管细胞样品中加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 用流式细胞仪进行检测和分析。

### 1.3.6 细胞凋亡

取 GC-1 细胞  $4.5 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 6 孔板中, 设置空白对照组、 $\text{CdCl}_2$  组、尼古丁组、联用组, 4 组细胞药物作用浓度同“1.3.4”, 每组设置 3 个平行对照, 经过 24 h 处理后, 收集全部细胞, 根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒说明书, 配制试剂, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图, 计量资料以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用多因素方差分析。统计检验为双侧,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。所有实验均进行 3 次有效重复。

## 2 结果

### 2.1 细胞活力

$\text{CdCl}_2$  和尼古丁单独暴露时, 对精原细胞 GC-1 增殖的抑制作用均随浓度增加而增强。将 0~20  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ , 0~200  $\mu\text{mol/L}$  尼古丁作用于 GC-1 细胞 24 h 后,  $\text{CdCl}_2$  对 GC-1 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 5.409  $\mu\text{mol/L}$ , 尼古丁对 GC-1 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 2814  $\mu\text{mol/L}$  (见图 1A、1B)。根据上述计算出的  $\text{IC}_{50}$  值, 将剂量组设置为空白对照组, 0.3125、0.625、1.25、2.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  组, 175、350、700、1400  $\mu\text{mol/L}$  尼古丁组、联用组, 将 GC-1 细胞处理 24 h 后, 联合作用的结果如表 1 和图 1C 所示, 联用组  $\text{IC}_{50}$  浓度均显著低于  $\text{CdCl}_2$  单独作用浓度,  $\text{CdCl}_2$  浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  时联用组  $\text{IC}_{50}$  浓度低于尼古丁单独作用浓度, 可见  $\text{CdCl}_2$  在联合作用中的协同作用更为明显。 $\text{CdCl}_2$ 、尼古丁、 $\text{CdCl}_2$  和尼古丁联合作用时  $\text{IC}_{50}$  曲线如图 1 所示。根据 GC-1 细胞在不同浓度的  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁单独及联合作用下的细胞活力, 用 CompuSyn 8.0 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。随着  $\text{CdCl}_2$  浓度上升,  $\text{CI} < 1$ , 出现协同作用,  $\text{CdCl}_2$  浓度为 0.625、1.25、2.5  $\mu\text{mol/L}$  时数据点均在等效线下方, 且  $\text{CI} < 1$ , 提示协同作用, 如图 1D 所示。光学显微镜下 GC-1 细胞的形态见图 1E。

### 2.2 细胞周期

加药处理 24 h 后, 流式细胞术检测空白对照组、 $\text{CdCl}_2$  组、尼古丁组、联合组。细胞周期结果显示, 与空白对照组相比,  $\text{CdCl}_2$  浓度为 2.5  $\mu\text{mol/L}$  和尼古丁浓度为 1.4 mmol/L 时  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期细胞占比下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 0.3125、

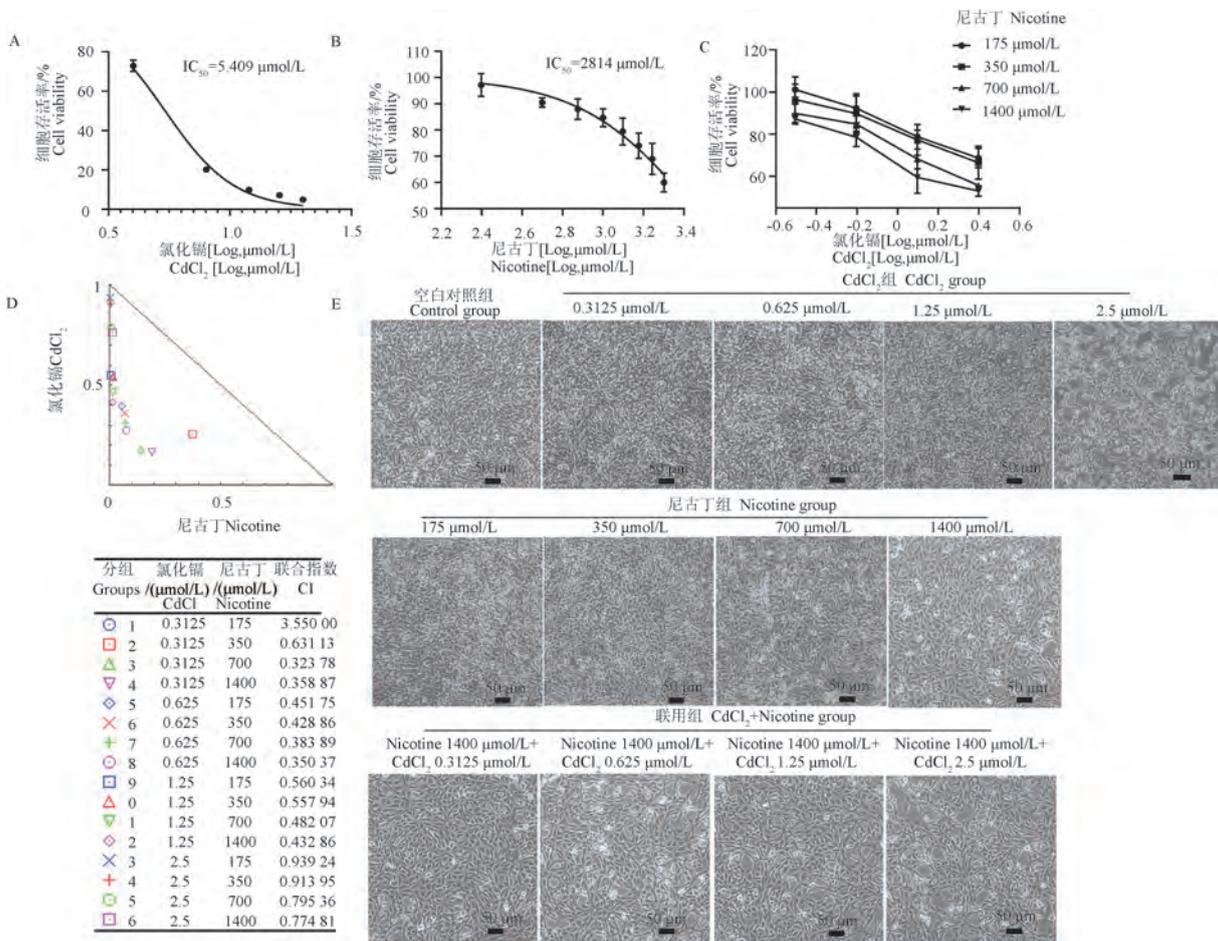
0.625、1.25  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  单独作用时相比,联用组  $G_0/G_1$  期细胞占比显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与 2.5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  单独作用时相比,联用组的尼古丁浓

度为 0.175、0.7、1.4  $\text{mmol/L}$  时  $G_0/G_1$  期细胞占比显著下降 ( $P < 0.05$ )。与 0.175、0.35、0.7、1.4  $\text{mmol/L}$  尼古丁单独作用时相比,联用组  $G_0/G_1$  期

表 1  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁联合作用于 GC-1 细胞 24 h 后的  $\text{IC}_{50}$

Table 1  $\text{IC}_{50}$  values of GC-1 cells 24 hours after exposure to  $\text{CdCl}_2$  and nicotine

氯化镉/( $\mu\text{mol/L}$ ) $\text{CdCl}_2$	尼古丁/( $\mu\text{mol/L}$ ) Nicotine	半数抑制浓度 $\text{IC}_{50}$
0.3125, 0.625, 1.25, 2.5	175	4.422
0.3125, 0.625, 1.25, 2.5	350	4.532
0.3125, 0.625, 1.25, 2.5	700	3.309
0.3125, 0.625, 1.25, 2.5	1400	2.532
0.3125	175, 350, 700, 1400	8457
0.625	175, 350, 700, 1400	12460
1.25	175, 350, 700, 1400	3260
2.5	175, 350, 700, 1400	1782



注:A:不同浓度  $\text{CdCl}_2$  作用于 GC-1 细胞 24 h 后的细胞存活率;B:不同浓度尼古丁作用于 GC-1 细胞 24 h 后的细胞存活率;C:不同浓度  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁联合作用于 GC-1 细胞 24 h 后的细胞存活率;D:CompuSyn 软件计算  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁联合作用时的 CI 值并绘图;E:在光学显微镜下观察 GC-1 细胞的形态。

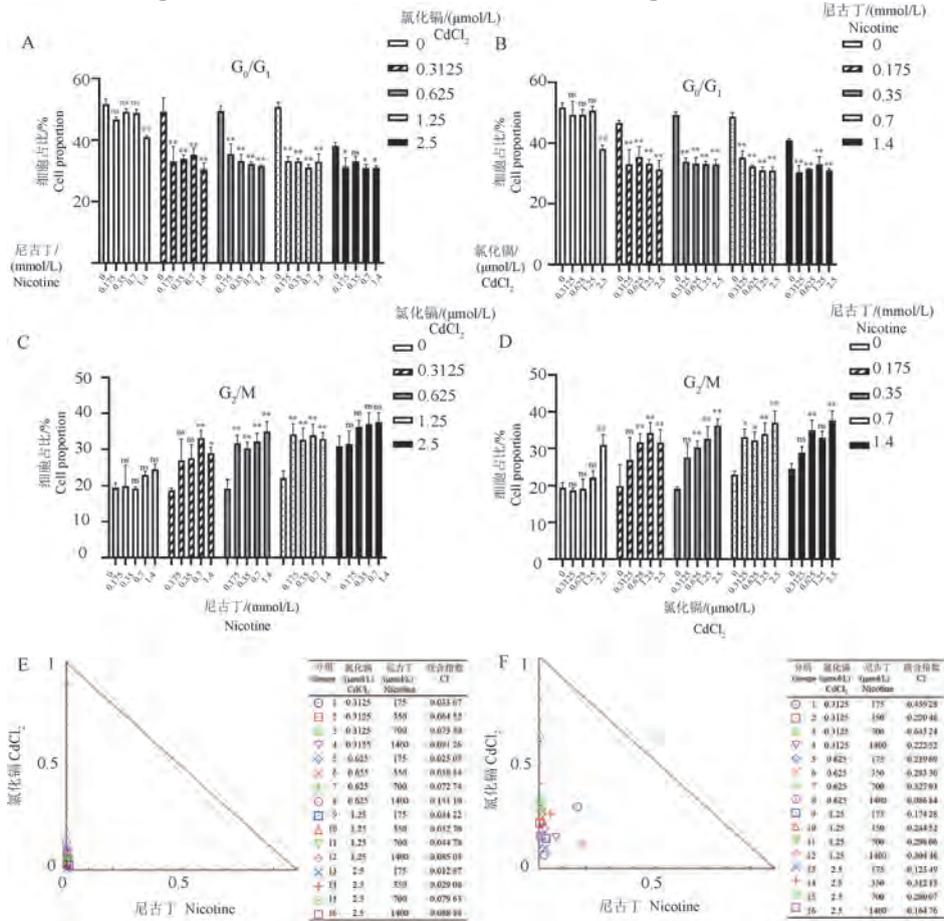
图 1  $\text{CdCl}_2$  和尼古丁对 GC-1 细胞增殖的抑制作用

Note. A, Cell viability after 24 hours of different concentrations of  $\text{CdCl}_2$  in GC-1 cells. B, Cell viability after 24 hours of different concentrations of nicotine in GC-1 cells. C, Cell viability after 24 hours of different concentrations of  $\text{CdCl}_2$  and nicotine combined in GC-1 cells. D, CompuSyn software calculates and plots the CI values for the combination of  $\text{CdCl}_2$  and nicotine. E, Morphology of GC-1 cells under a light microscope.

Figure 1 Inhibitory effect of  $\text{CdCl}_2$  and nicotine on the proliferation of GC-1 cells

细胞占比均下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图 2)。可见, CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁协同作用中, CdCl<sub>2</sub> 对 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞占比的影响更为显著。与空白对照组相比, CdCl<sub>2</sub> 浓度为 2.5 μmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升( $P < 0.01$ )。与 0.3125 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 单独作用时相比, 联用组尼古丁浓度为 0.7 mmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升( $P < 0.01$ ), 联用组尼古丁浓度为 1.4 mmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上

升( $P < 0.05$ ); 与 0.625、1.25 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 单独作用时相比, 联用组 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升( $P < 0.01$ ); 与 2.5 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 单独作用时相比, 联用组 CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.625、1.25、2.5 μmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升( $P < 0.01$ ); 与 0.7 mmol/L 尼古丁单独作用时相比, 联用组 CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.3125、0.625 μmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升( $P < 0.05$ ), CdCl<sub>2</sub> 浓度为 1.25、2.5 μmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期



注:A: CdCl<sub>2</sub> 剂量固定为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5 μmol/L 时, 不同尼古丁联合作用时 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占比统计; B: 尼古丁剂量固定为 0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L 时, 不同 CdCl<sub>2</sub> 联合作用时 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占比统计; C: CdCl<sub>2</sub> 剂量固定为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5 μmol/L 时, 不同尼古丁联合作用时 G<sub>2</sub>/M 期占比统计; D: 尼古丁浓度固定为 0、0.175、0.35、0.7、1.4 mmol/L 时, 不同 CdCl<sub>2</sub> 联合作用时 G<sub>2</sub>/M 期占比统计; E: 根据 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占比数据采用 Compusyn 软件计算 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时的 CI 值并绘图; F: 根据 G<sub>2</sub>/M 期占比数据采用 Compusyn 软件计算 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时的 CI 值并绘图。与空白对照组相比, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与 CdCl<sub>2</sub> 组和尼古丁组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 流式细胞仪检测细胞周期统计

Note. A. Percentage of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells after exposure to different dose of nicotine combined with 0, 0.3125, 0.625, 1.25 and 2.5 μmol/L CdCl<sub>2</sub>. B. Percentage of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells after exposure to different dose of CdCl<sub>2</sub> combined with 0, 0.175, 0.35, 0.7, 1.4 mmol/L nicotine. C. Percentage of G<sub>2</sub>/M phase cells after exposure to different dose of nicotine combined with 0, 0.3125, 0.625, 1.25 and 2.5 μmol/L CdCl<sub>2</sub>. D. Percentage of G<sub>2</sub>/M phase cells after exposure to different dose of CdCl<sub>2</sub> combined with 0, 0.175, 0.35, 0.7, 1.4 mmol/L nicotine. E. Compusyn software was used to calculate and plot the CI values for the combination of CdCl<sub>2</sub> and nicotine based on the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase data. F. Compusyn software was used to calculate and plot the CI values for the combination of CdCl<sub>2</sub> and nicotine based on the G<sub>2</sub>/M phase data. Compared with control group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ . Compared with CdCl<sub>2</sub> group and nicotine group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

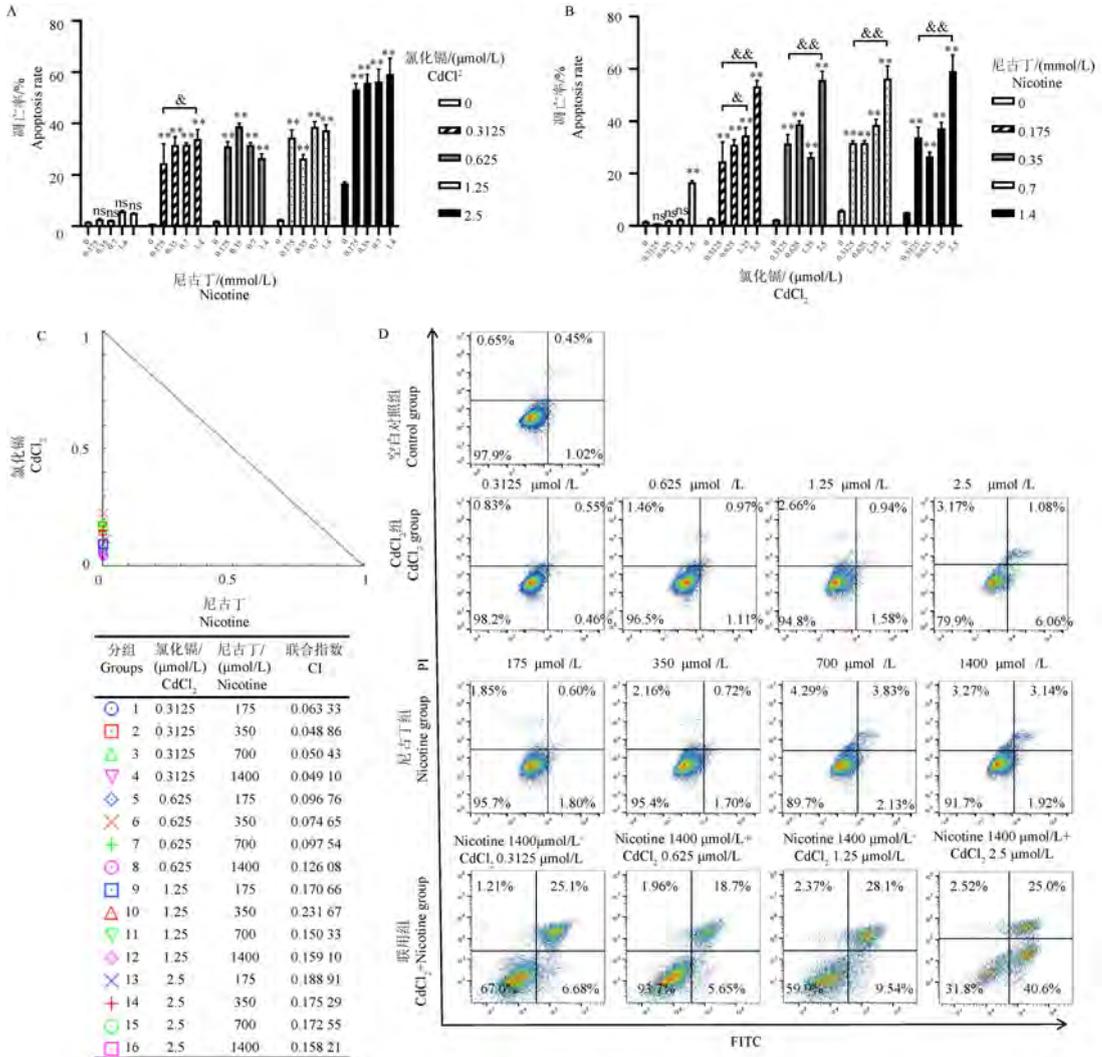
Figure 2 Cell cycle analysis by flow cytometry

细胞占比显著上升 ( $P < 0.01$ ); 与 1.4 mmol/L 尼古丁单独作用时相比, 联用组 CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.625、2.5 μmol/L 时 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比显著上升 ( $P < 0.01$ )。可见, CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁协同作用中, CdCl<sub>2</sub> 对 G<sub>2</sub>/M 期细胞占比的影响更为显著, 表现为 G<sub>2</sub>/M 期阻滞。根据 GC-1 细胞在不同浓度的 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁单独及联合作用下的细胞周期占比, 用 CompuSyn 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。两

毒物联合效应在 CI = 1.0 时为相加, CI < 1.0 时为协同, CI > 1.0 时为拮抗。联合作用数据点均在等效线下方, 且 CI 值均 < 1.0, 提示两药具有协同作用。

### 2.3 细胞凋亡

如图 3 所示, 加药处理 24 h 后, 流式细胞术检测空白对照组、CdCl<sub>2</sub> 组、尼古丁组、联用组细胞凋亡结果显示, CdCl<sub>2</sub> 浓度为 2.5 μmol/L 时, 细胞凋亡比例显著增加, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与



注: A: CdCl<sub>2</sub> 剂量固定为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5 μmol/L 时, 不同 nicotine 联合作用时细胞凋亡统计; B: 尼古丁剂量固定为 0、175、350、700、1400 μmol/L 时, 不同 CdCl<sub>2</sub> 联合作用时细胞凋亡统计; C: 采用 CompuSyn 软件计算 CdCl<sub>2</sub> 和 nicotine 联合作用时的 CI 值并绘图; D: 采用 FlowJo 10.8.1 软件绘制细胞凋亡图。与空白对照组相比, <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与 CdCl<sub>2</sub> 组和尼古丁组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与联用组相比, <sup>&</sup> $P < 0.05$ , <sup>&&</sup> $P < 0.01$ 。

图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡统计图

Note. A, Apoptosis rate after exposure to different dose of nicotine combined with 0, 0.3125, 0.625, 1.25 and 2.5 μmol/L CdCl<sub>2</sub>. B, Apoptosis rate after exposure to different dose of CdCl<sub>2</sub> combined with 0, 175, 350, 700, 1400 μmol/L nicotine. C, CompuSyn software was used to calculate and plot the CI values for the combined effect of CdCl<sub>2</sub> and nicotine. D, Using FlowJo Software to generate cell apoptosis graphs. Compared with control group, <sup>###</sup> $P < 0.01$ . Compared with CdCl<sub>2</sub> group and nicotine group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ . Compared with combined group, <sup>&</sup> $P < 0.05$ , <sup>&&</sup> $P < 0.01$ .

Figure 3 Statistical graph of apoptosis detected by flow cytometry

CdCl<sub>2</sub> 单独作用时相比,联用组细胞凋亡比例均显著增加( $P<0.01$ );CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.3125 μmol/L 时,尼古丁浓度为 0.175、1.4 mmol/L 时细胞凋亡比例显著增加( $P<0.05$ )。与尼古丁单独作用时相比,联用组细胞凋亡比例均显著增加( $P<0.01$ );CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时,CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.625、2.5 μmol/L 时,尼古丁浓度为 0.175 mmol/L 时,细胞凋亡比例显著增加( $P<0.05$ );CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时,CdCl<sub>2</sub> 浓度为 0.3125、2.5 μmol/L 时,尼古丁浓度改变,细胞凋亡比例均显著增加( $P<0.01$ )。可见,CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁协同作用中,CdCl<sub>2</sub> 对细胞凋亡比例增加的影响更为显著。根据 GC-1 细胞在不同浓度的 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁单独及联合作用下的细胞凋亡的变化,用 Compusyn 软件分析得到等效线图及联合方案的联合指数 CI。两毒物联合效应在 CI = 1.0 时为相加,CI<1.0 时为协同,CI>1.0 时为拮抗。联合作用数据点均在等效线下方,且 CI 值均<1.0,提示两药具有协同作用。

### 3 讨论

近年来,由于吸烟人群的占比庞大,不孕不育人群逐渐增多,吸烟对雄性生殖系统的毒性作用也日益受到关注。睾丸作为雄性生殖系统的主要器官,具有分泌雄激素以及产生精子的功能。精子的发生,是处于睾丸曲细精管(生精小管的)中的精原细胞增殖分化形成成熟精子的过程。长期大量吸烟可产生睾丸毒性,使睾丸正常的精子发生过程受到干扰,造成精液质量和精子受精能力下降,而影响男性生育能力<sup>[6]</sup>;先前的研究表明,随暴露时间的延长,暴露剂量的增加,大鼠血浆尼古丁含量随之增加<sup>[7]</sup>;Nazar-Zadeh 等<sup>[8]</sup>的实验表明,尼古丁可诱导生精上皮细胞变性,还可影响睾丸间质组织,使其密度和细胞数量减少,生精谱系细胞的聚集减少,各种细胞间隙增大;大鼠经香烟烟雾处理后睾丸组织出血、充血、生殖细胞核固缩,引起睾丸组织中相关激素的表达异常,造成睾丸组织结构病变,影响精子生成<sup>[9]</sup>;香烟烟雾冷凝物(cigarette smoke condensate, CSC)对精母细胞的生长抑制作用,涉及 AHR 和 MAPK 通路的调控<sup>[10]</sup>。本研究中,用尼古丁处理 GC-1 细胞时,表现为细胞毒性增强,对于细胞增殖的抑制作用随剂量升高而增强,与先前研究结果相同。金属镉(cadmium, Cd)在人体内代谢缓慢,Uwagie-Ero 等<sup>[11]</sup>的研究发现,CdCl<sub>2</sub> 通过下调破骨细胞生成诱导的雄性 Wistar 大鼠骨质疏松症;有

人群实验表明,Cd 在精浆中的高浓度与不育症患者的精子质量下降之间存在关联<sup>[12]</sup>;动物实验研究表明短时低剂量的 Cd 暴露可能会引起小鼠永久性的睾丸间质细胞损伤<sup>[13]</sup>;小鼠模型也证实了,Cd 以剂量和时间依赖方式引发了睾丸组织显著病变<sup>[14]</sup>;高剂量尼古丁对软骨细胞活力具有显著抑制作用<sup>[15]</sup>;Cd 作用于中国仓鼠卵巢巢细胞时,随着 Cd 浓度的增加,细胞生长呈剂量依赖性下降<sup>[16]</sup>。在本次研究中,CdCl<sub>2</sub> 作用于对精原细胞 GC-1 时,对于细胞增殖的抑制作用随浓度增加而增加,与前人的研究结果一致。当用 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合处理 GC-1 细胞时,会产生协同作用,且 CdCl<sub>2</sub> 对于联合的协同增强作用较尼古丁强。

有研究表明,香烟烟雾会导致精母细胞<sup>[17]</sup>和其他细胞类型<sup>[18]</sup>生长周期停滞,其中对于精母细胞来说,主要阻断 S、G<sub>2</sub>/M 期<sup>[17]</sup>,随后细胞死亡。有研究表明,Cd 诱导的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞是不可逆的<sup>[19]</sup>,一旦阻滞形成,无论从培养基中去除 Cd 还是连续供应 Cd,细胞都将保持停滞<sup>[16]</sup>。本研究复现了先前的结论,CdCl<sub>2</sub> 组、尼古丁组、联用组均使细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期占比下降,将细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期;同时本研究进一步发现,对于细胞周期的阻滞作用中,CdCl<sub>2</sub> 的协同效应更强。

凋亡是一种细胞程序化死亡,主要分为内源性及外源性两种途径<sup>[20]</sup>,吸烟产生的大量有害物中,有研究表明尼古丁可损害生殖系统,引起睾丸组织结构破坏、生精上皮萎缩、生殖细胞凋亡,导致精子发生和成熟受到抑制,同时也能对精子的形态和运动能力造成不良影响<sup>[21]</sup>;尼古丁可以促进男性生殖细胞的凋亡,睾丸中 TNF 凋亡途径被激活,过表达的 TRIM27 可以上调去泛素化的 RIP1,导致 TNF 凋亡途径激活,并导致过度凋亡<sup>[22]</sup>。急性和慢性镉暴露会导致男性生殖系统的结构和功能缺陷,包括生殖细胞死亡、睾丸类固醇生成抑制、睾丸坏死、前列腺癌、支持细胞损伤以及精子质量和血清睾酮水平下降,这些影响出现的可能性原因之一是精原细胞凋亡<sup>[23]</sup>。精原细胞凋亡是镉诱导男性生殖毒性的重要分子机制之一<sup>[24]</sup>;有研究表明,CdCl<sub>2</sub> 处理可以增加细胞内活性氧,降低线粒体膜电位,并提高精原细胞的凋亡率<sup>[25]</sup>。本研究发现,高浓度 CdCl<sub>2</sub> 作用时会促进 GC-1 细胞凋亡,与前人的研究结果一致,CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用时会显著促进 GC-1 细胞凋亡,且 CdCl<sub>2</sub> 在协同中的作用更强。

综上所述,香烟的主要成分尼古丁和重金属镉均会抑制雄性精原细胞增殖,引起细胞周期阻滞,导致细胞凋亡,造成精原细胞损伤。尼古丁和重金属镉同时存在时具有协同作用,使细胞毒性作用增强,其中重金属镉的含量对协同作用的影响更强。本研究为 CdCl<sub>2</sub> 和尼古丁联合作用对生殖系统产生的危害提供了科学的依据,以为倡导戒烟、禁烟等措施,为社会创造一个良好的生活环境提供数据支持。

#### 参考文献:

[ 1 ] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025 3rd ed. [ M ]. Geneva: World Health Organization, 2019.

[ 2 ] SOARES S R, MELO M A. Cigarette smoking and reproductive function [ J ]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2008, 20(3): 281-291.

[ 3 ] COOKE M. The chemical components of tobacco and tobacco smoke [ J ]. *Chromatographia*, 2010, 71(9/10): 977-977.

[ 4 ] NOVOTNY T E, SLAUGHTER E. Tobacco product waste: an environmental approach to reduce tobacco consumption [ J ]. *Curr Environ Health Rep*, 2014, 1(3): 208-216.

[ 5 ] SOLEIMANI F, DOBARADARAN S, DE-LA-TORRE G E, et al. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: a comprehensive systematic review [ J ]. *Sci Total Environ*, 2022, 813: 152667.

[ 6 ] ABOULMAOUAHIB S, MADKOUR A, KAAROUCH I, et al. Impact of alcohol and cigarette smoking consumption in male fertility potential: Looks at lipid peroxidation, enzymatic antioxidant activities and sperm DNA damage [ J ]. *Andrologia*, 2018, 50(3): e12926.

[ 7 ] 何丽娟, 仲春雪, 张静, 等. 香烟烟雾暴露对雄性大鼠血浆尼古丁、可替宁的影响 [ J ]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(6): 594-599.

HE L J, ZHONG C X, ZHANG J, et al. Effect of cigarette smoking-induced plasma nicotine and cotinine on male rats [ J ]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(6): 594-599.

[ 8 ] NAZAR-ZADEH M, JALILI C, NIKGOFTAR FATHI A, et al. Royal-jelly-based apitherapy can attenuate damages to male reproductive parameter following nicotine administration [ J ]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(2): 133-140.

[ 9 ] 王倩, 苏德奇, 黄云飞. 香烟烟雾与慢性应激联合作用对大鼠生殖功能的影响 [ J ]. *毒理学杂志*, 2021, 7(6): 491-495.

WANG Q, SU D Q, HUANG Y F. The combined effect of cigarette smoke and chronic stress on the reproductive function of rats [ J ]. *J Toxicol*, 2021, 7(6): 491-495.

[ 10 ] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Cigarette smoke-induced cell cycle arrest in spermatocytes[ GC-2spd(ts) ] is mediated through crosstalk between Ahr-Nrf2 pathway and

MAPK signaling [ J ]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(1): 73-87.

[ 11 ] UWAGIE-ERO E A, ABIAEZUTE C N, NWAEHUJOR C O, et al. Osteocyte viability and bone density in cadmium chloride-induced osteoporosis ameliorated with *Pilotigma thonningii* stem bark-extracted D-3-O-methy-chiroinositol [ J ]. *Anim Model Exp Med*, 2019, 2(1): 25-33.

[ 12 ] ZAFAR A, EQANI S A, BOSTAN N, et al. Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility [ J ]. *Environ Geochem Health*, 2015, 37(3): 515-527.

[ 13 ] WU X, GUO X, WANG H, et al. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis [ J ]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6337.

[ 14 ] SILVA J D, GONÇALVES R V, DE MELO F C S A, et al. Cadmium exposure and testis susceptibility: a systematic review in murine models [ J ]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199(7): 2663-2676.

[ 15 ] 韩贵宾, 张寿, 孙薇薇, 等. 尼古丁抑制 MIA 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡 [ J ]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(3): 40-45.

HAN G B, ZHANG S, SUN W W, et al. Inhibition of nicotine on apoptosis of chondrocytes induced by monosodium iodoacetate [ J ]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(3): 40-45.

[ 16 ] YANG P M, CHIU S J, LIN K A, et al. Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells [ J ]. *Chem Biol Interact*, 2004, 149(2/3): 125-136.

[ 17 ] ESAKKY P, HANSEN D A, DRURY A M, et al. Modulation of cell cycle progression in the spermatocyte cell line[ GC-2spd(ts) Cell-Line ] by cigarette smoke condensate ( CSC ) via arylhydrocarbon receptor-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ( Ahr-Nrf2 ) pathway [ J ]. *Biol Reprod*, 2014, 90(1): 9.

[ 18 ] FIELDS W R, LEONARD R M, ODOM P S, et al. Gene expression in normal human bronchial epithelial ( NHBE ) cells following *in vitro* exposure to cigarette smoke condensate [ J ]. *Toxicol Sci*, 2005, 86(1): 84-91.

[ 19 ] CHAO J I, YANG J L. Opposite roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in cadmium-induced genotoxicity and mitotic arrest [ J ]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(9): 1193-1202.

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

WANG X, WANG L T, ZHANG B. Effect of alantolactone on migration, invasion and apoptosis in glioma C6 cells [ J ]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(3): 317-322.

[ 21 ] 曾颖斐, 杨望, 邹鹏, 等. 尼古丁抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮生成中的线粒体损伤作用 [ J ]. *现代预防医学*, 2019, 46(8): 1376-1381.

ZENG Y F, YANG W, ZOU P, et al. Mitochondrial damage in nicotine-induced inhibition of testosterone production in TM3 mouse leydig cells [ J ]. *Mod Prev Med*, 2019, 46(8): 1376-1381.

- [22] WU J, XU W, ZHANG D, et al. Nicotine inhibits murine Leydig cell differentiation and maturation via regulating Hedgehog signal pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(1): 1-7.
- [23] HABIB R, WAHDAN S A, GAD A M, et al. Infliximab abrogates cadmium-induced testicular damage and spermiotoxicity via enhancement of steroidogenesis and suppression of inflammation and apoptosis mediators [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 182: 109398.
- [24] JI Y L, WANG H, LIU P, et al. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 29(2): 176-183.
- [25] LIU H, WANG R, OUYANG H, et al. Cadmium induced mouse spermatogonia apoptosis via mitochondrial calcium overload mediated by  $IP_3R$ -MCU signal pathway [J]. *Toxicology*, 2023, 486: 153448.

[收稿日期]2024-05-09

编者·读者·作者

## 《中国比较医学杂志》2025 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。

伞雨晴,史佳宁,张振贤. 光照、咖啡因及联合法诱导建立斑马鱼失眠模型的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 59-67.

San YQ, Shi JN, Zhang ZX. Comparative study of light, caffeine, and combined methods for inducing a zebrafish model of insomnia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 59-67.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.008

# 光照、咖啡因及联合法诱导建立斑马鱼失眠模型的比较研究

伞雨晴,史佳宁,张振贤\*

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院传统医学科,上海 200437)

**【摘要】** **目的** 利用斑马鱼建立不同睡眠剥夺模型,为失眠的基础研究提供更多可重复性的实用建模参考方案。**方法** 用持续光照(150 Lux)和光照加咖啡因两种干预手段诱导斑马鱼失眠模型,随机将斑马鱼分为空白组、光照组、咖啡因组(100  $\mu\text{mol/L}$ )和联合组。利用旷场实验和昼夜节律行为学实验观察各组斑马鱼运动能力的区别;利用qPCR技术与ELISA技术检测相关睡眠基因与5-HT神经递质的表达与分泌情况。**结果** 与空白组相比,光照组斑马鱼睡眠时间、静息时间(白天)、睡眠回合明显减少( $P<0.01$ 或 $P=0.01$ ),移动距离较空白组明显增加( $P<0.01$ )。联合组与咖啡因组斑马鱼静息时间(白天)、睡眠回合较空白组增加( $P<0.01$ )。联合组与咖啡因组斑马鱼活动距离无统计学意义( $P>0.05$ );与空白组相比,光照组中心区域游动距离百分比与中心区域游动时间百分比均降低( $P<0.05$ );与光照组相比,咖啡因组中心区域游动距离百分比与中心区域游动时间百分比均降低( $P<0.01$ );与空白组相比,6:00与12:00光照组斑马鱼 *HTR1aa* mRNA 表达呈上调趋势( $P<0.05$ ),光照组与联合组斑马鱼体内 *HTR1ab* mRNA 水平表达均无明显统计学意义( $P>0.05$ );与空白组相比,6:00时光照组的5-HT分泌量均减少( $P<0.01$ );12:00光照组与联合组5-HT量均减少( $P<0.01$ );18:00时光照组与联合组分泌量依然低于空白组( $P<0.01$ )。**结论** 单纯光照法最适用于斑马鱼幼鱼长效失眠模型的建立,其相关机制可能与 *HTR1aa* 基因以及5-HT等生物因子有关。

**【关键词】** 斑马鱼;失眠模型;光照;咖啡因;行为学

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0059-09

## Comparative study of light, caffeine, and combined methods for inducing a zebrafish model of insomnia

SAN Yuqing, SHI Jianing, ZHANG Zhenxian\*

(Department of Traditional Medicine, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish different sleep deprivation models in zebrafish to provide reproducible and practical modeling reference solutions for basic research on insomnia. **Methods** Zebrafish insomnia models were induced by two interventions: continuous light (150 Lux) and light plus caffeine. The zebrafish were divided randomly into control, light, caffeine(100  $\mu\text{mol/L}$ ), and combined light and caffeine groups. The locomotor ability of zebrafish in each group was

**【基金项目】** 上海市中医药事业发展三年行动计划(2018-2020年)上海市中医诊疗模式创新试点建设项目(ZY(2018-2020)-FWTX-6011);上海市中医药事业发展三年行动计划(2018-2020年)医疗机构治未病服务能力提升项目(ZY(2018-2020)-ZWB-1001);国家自然科学基金(81373624)。

**【作者简介】** 伞雨晴(1998—),女,硕士研究生,研究方向:失眠,斑马鱼模型研究。E-mail:1124732193@qq.com

**【通信作者】** 张振贤(1963—),女,博士,主任医师,研究方向:失眠、慢性疲劳综合征。E-mail:yysanyq1998@163.com

observed using open field and circadian rhythm behavioral experiments. The expression and secretion of related sleep genes and the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine (serotonin; 5-HT) were detected using quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. **Results** Sleep time, resting time (during the day), and sleep rounds were significantly reduced ( $P < 0.01$  or  $P = 0.01$ ) and the distance traveled was significantly increased in the light group compared with the control group ( $P < 0.01$ ). The resting time (daytime) and sleep rounds were increased in the combined and caffeine groups ( $P < 0.01$ ) compared with the control group. There was no significant difference in the activity distance between the combined and caffeine groups ( $P > 0.05$ ). The percentages of swimming distance and swimming time in the central area were decreased in the light group compared with the control group ( $P < 0.05$ ), and were both decreased in the caffeine group compared with the light group ( $P < 0.01$ ). HT receptor 1Aa (*HTR1aa*) mRNA expression at 6:00 and 12:00 was up-regulated in the light group compared with the control group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference in *HTR1ab* mRNA levels between the light group and the combined group ( $P > 0.05$ ). 5-HT secretion was decreased in the light group at 6:00 ( $P < 0.01$ ) and at 12:00 compared with the control group. 5-HT levels were reduced in both the light and combined groups ( $P < 0.01$ ), and secretion levels in the light and combined groups were still lower than in the control group at 18:00. ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Light alone is the best intervention for modeling long-lasting insomnia in zebrafish larvae. The responsible mechanisms may be related to the *HTR1aa* gene as well as biological factors such as 5-HT.

**[Keywords]** zebrafish; insomnia model; light; caffeine; behavior

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

近年来,失眠作为一种常见的睡眠障碍,以入睡困难、易醒、多梦、早醒、次日头昏、精神不振为主要临床表现<sup>[1]</sup>。失眠的发病机制极其复杂,与睡眠基因的异常表达和神经递质异常分泌等多种因素有关<sup>[2]</sup>。然而,失眠的确切机制仍不完全清楚,因此需要进一步的研究来揭示其深层次的机理。斑马鱼作为一种经典的实验动物模型,具有生命周期短、易于饲养等优势,在睡眠研究中得到了广泛应用<sup>[3]</sup>。光照法剥夺睡眠作为常用的物理因素之一,能够直接调节斑马鱼外周组织产生生物节律,持续的光照可以模拟日常生活中夜晚光照不足对睡眠的影响<sup>[4-5]</sup>;咖啡因作为国内常用的化学因素之一来诱导斑马鱼的失眠模型,其促觉醒和使睡眠中断的作用已经得到证实<sup>[6]</sup>。据此,我们猜测光照和咖啡因两种因素同时施加于斑马鱼对诱导斑马鱼的失眠模型起到协同作用,从而更加真实自然地模拟失眠环境,成为睡眠剥夺模型的更优选择。本研究旨在以斑马鱼为主要研究对象,探究光照剥夺睡眠法和光照加咖啡因剥夺睡眠法对睡眠的影响,并通过昼夜节律行为学、*HTR1aa* 与 *HTR1ab* 基因表达以及 5-HT 分泌变化等指标来评价两种失眠模型的可靠性。这将有助于更深入地了解失眠的机制以及可能的治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验动物采用野生型 AB 系斑马鱼,斑马鱼年

龄为受精后 7 d,体重不详(鱼龄过小无法衡量体重),性别不详(此时的鱼无法区分性别),共 160 尾,由杭州环特生物科技有限公司提供[SCXK(浙)2022-0003],饲养、繁殖均在杭州环特生物科技有限公司完成[SYXK(浙)2022-0004],实验采用 7 dpf 的幼鱼进行。饲养条件如下:鱼房温度为  $(28.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光暗条件为 14 h/10 h 循环交替,养鱼水 pH = 7.0~8.0,在此期间斑马鱼可从自身卵黄囊中获取营养,无需喂食。本实验依照 3R 原则,优化分组,减少了斑马鱼的实验数量,本实验获得上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院实验动物伦理委员会批准(YYLAC-2023-ZN)。

### 1.2 主要试剂与仪器

咖啡因,美国 Sigma 公司 CAS. NO. 58-08-2(批号 BCCC8969);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,上海司鼎生物科技有限公司(批号 SD6012500T);5-羟色胺(5-HT)ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司(批号 m1064304V);反转录试剂盒,日本 TaKaRa 公司(批号 RR047A);荧光定量试剂盒,日本 TaKaRa 公司(批号 RR420A)。

斑马鱼行为轨迹跟踪系统,荷兰 Noldus 公司(型号 DanioVision);荧光定量 PCR 仪,力康生物医疗科技有限公司(型号 CG-05);离心机,Eppendorf(型号 5810R);酶标检测仪,Tecan(型号 F50);高通量组织研磨器,上海净信科技有限公司(型号 TissueLyser-48)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组和干预

将 160 尾幼鱼 7 dpf 斑马鱼幼鱼随机分为 4 组, 每组 40 尾, 即空白组、咖啡因组、光照组、联合组(光照加咖啡因)。各组的开灯以及给药模式如下: 空白组斑马鱼正常饲养 36 h, 咖啡因组斑马鱼在空白组基础上持续暴露在咖啡因浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的养鱼水中 36 h(造模的第 1 天 22:00~第 3 天 12:00), 光照组斑马鱼在空白组基础上予 150 Lux 的光照条件刺激 6 h(干预的第 2 天 2:00 开始给予光照), 直至第 2 天 8:00 释放到正常的光暗循环中, 联合组在光照组基础上持续暴露在咖啡因浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  的养鱼水中 36 h(咖啡因与光照暴露时间同上), 重复 3 次实验。各组幼鱼均饲养于 96 孔板中, 采用全自动视频追踪系统进行斑马鱼幼鱼的睡眠/觉醒行为学监测。实验前设置室温为恒温 28.5  $^{\circ}\text{C}$ 。将给药处理后的 96 孔板转移至斑马鱼行为检测仪专用鱼箱内, 并固定浸泡在鱼箱内的恒温水浴板槽中。关闭箱门, 设立视频观测范围, 覆盖 96 孔。采用视频追踪定量模式记录每个孔内幼鱼的运动情况。设置最大探测阈值(40)、最小探测阈值(4)、运动活力爆发值(25), 每隔 1 min 和 1 h 自动生成 1 次数据。鱼箱内光照参数设置为: 光照时间 2:00~22:00 和第 2 天 8:00~12:00, 光照强度: 4% (150 Lux)。行为学监测从受精后第 5 天 22:00 开始(受精后约 168 h), 由视频追踪系统自动记录并生成相关数据, 连续监测 38 h 后, 输出数据。每个处理组进行 3 次独立重复实验。光照模式以及药物干预情况见图 1。

#### 1.3.2 昼夜节律行为学及焦虑样行为测定

将 7 dpf 斑马鱼放入 96 孔板中, 每孔 1 条, 斑马鱼可以在孔中自由活动, 行为学分析系统会自动追踪斑马鱼的运动并给出运动轨迹和数据分析, 追踪时间为 36 h(追踪时间同干预时间一致)。利用斑马鱼行为分析系统追踪斑马鱼的运动, 设置追踪参

数 movement threshold, small/large: 25, In-act/Small: 5。从第 1 天 22:00 开始观察并记录, 每组随机选取 24 尾斑马鱼进行运动及焦虑状态的检测。利用旷场实验测试光照组、咖啡因组、联合组与空白组斑马鱼的焦虑样状态, 将直径为 24 mm 的孔板划分成中心区域和总区域, 中心区域直径为 12 mm, 其总区域面积的 1/2, 分布如图 2。每孔放入 1 条测试鱼并让其在中自由活动, 测试时间为 15 min, 观察并记录鱼在总区域和中心区域的潜伏时间, 重复测试 6 次。

#### 1.3.3 qRT-PCR 检测 *HTR1aa*、*HTR1ab* 基因的表达

空白组、光照组及联合组各取 15 尾斑马鱼, 每组随机平均分为 3 份样本, 用柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取组织总 RNA, 扩增生成 cDNA。HTR1aa 上游引物序列: 5'-CTACTCAACTTTCGGGGCGT-3', 下游: 5'-CACCGCCAAGCATTATCCG-3', 长度为 145 bp; HTR1ab 上游引物序列: 5'-ACACCC AATAGGATGCTTCG-3', 下游: 5'-AGCTGCGC TTCCACTTGTAT-3', 长度为 184 bp; 设置 Real-time PCR 仪反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共进行 40 个循环, 于 65~95  $^{\circ}\text{C}$  绘制熔解曲线, 测定 HTR1aa、HTR1ab 以及  $\beta$ -actin 的吸光度值。计算  $\Delta\text{Ct}$  值及  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  进行数据分析:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$  目的基因 -  $\text{Ct}$  内参基因;  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$  实验组 -  $\Delta\text{Ct}$  对照组。

#### 1.3.4 ELISA 检测 5-HT 分泌情况

空白组、光照组及联合组各取 20 尾斑马鱼, 每组随机平均分为 3 份样本, 检测 5-HT 的浓度, 加入 1:9 斑马鱼身体组织和缓冲溶液, 充分匀浆, 离心取上清。按照鱼源 5-HT 试剂盒说明书进行检测。

### 1.4 统计学方法

运用统计软件 SPSS 21.0 以及绘图软件 Graphpad prism 8.0 对实验数据进行处理。对正态分布多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 方差齐时, 组间比较采用 LSD-*t* 法, 方差不齐时, 组间比较采用 Tamhane's *T2* 法。对于非正

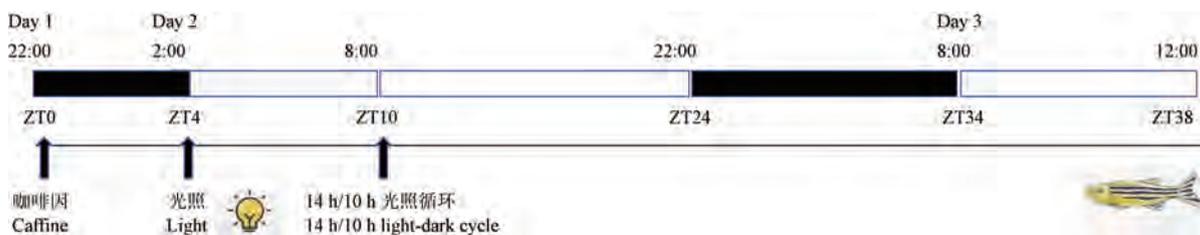


图 1 光照模式以及药物干预示意图

Figure 1 Light pattern and a schematic diagram of the drug intervention

态分布的数据,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组睡眠剥夺斑马鱼模型的昼夜节律行为学评价

将各组斑马鱼平均移动距离实施均一化处理,可见光照组 4~22 h 移动距离振幅较空白组增高,咖啡因与联合组移动距离振幅低于空白组,见图 3。光照组斑马鱼睡眠时间较空白组明显减少( $P = 0.01$ ),联合组与咖啡因组斑马鱼睡眠无统计学意义,见表 1。光照组斑马鱼睡眠回合较空白组明显减少( $P < 0.01$ ),联合组与咖啡因组斑马鱼睡眠回合较空白组明显增加( $P < 0.01$ ),见表 2。光照组斑马鱼白天静息时间较空白组明显减少( $P < 0.01$ ),联合组与咖啡因组斑马鱼白天静息时间增加( $P < 0.01$ ),见表 3。光照组斑马鱼黑夜静息时间较空白组明显减少( $P < 0.01$ ),见表 3。光照组斑马鱼黑夜 10 h 活动距离较空白组明显增加( $P < 0.01$ ),与空白组相比,联合组与咖啡因组斑马鱼黑夜活动距离无统计学意义,见表 4。

### 2.2 各组睡眠剥夺斑马鱼模型焦虑样状态测定

如图 4 旷场实验结果表明,光照组中心区域游动距离百分比较空白组降低( $P < 0.05$ ),而咖啡因组中心区域游动距离百分比较光照组明显降低,这一观察结果在统计学上呈现显著性差异( $P < 0.01$ );光照组中心区域游动时间百分比较空白组降低( $P < 0.05$ ),而咖啡因组中心区域游动时间百分比较光照组明显降低( $P < 0.01$ )。相对而言,咖啡因组的斑马鱼更偏向于在实验场地的边缘活动,而联合组的

斑马鱼活动轨迹则显示介于咖啡因组和光照组之间,同样呈现显著性差异( $P < 0.01$ )。

### 2.3 光照组与联合组斑马鱼 *HTR1aa*、*HTR1ab* 基因表达变化情况

各组斑马鱼组织 qRT-PCR 检测结果显示,6:00

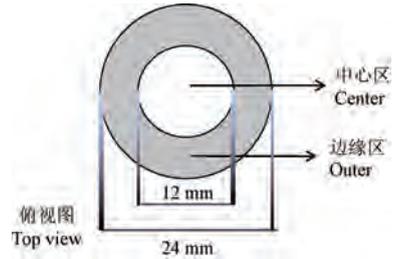


图 2 旷场实验内外区域分布图

Figure 2 Distribution diagram of the areas inside and outside the open field test

表 1 总睡眠时间( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Total sleep duration

组别 Groups	总睡眠时间/min Total sleep time
光照组 Light group	403.29 ± 87.95**
联合组 Light+caffeine group	503.86 ± 72.39**##
咖啡因组 Caffeine group	537.13 ± 81.67**##
空白组 Control group	438.25 ± 57.42

注:与空白组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与光照组相比,## $P < 0.01$ 。

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

表 2 睡眠回合( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Sleep round

组别 Groups	睡眠回合/次 Sleep rounds/times
光照组 Light group	16.20 ± 5.23*
联合组 Light+caffeine group	31.31 ± 7.67*##
咖啡因组 Caffeine group	34.66 ± 4.11**##
空白组 Control group	26.30 ± 6.92

注:与空白组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与光照组相比,## $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ 。

Note. Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . Compared with light group,## $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$ .

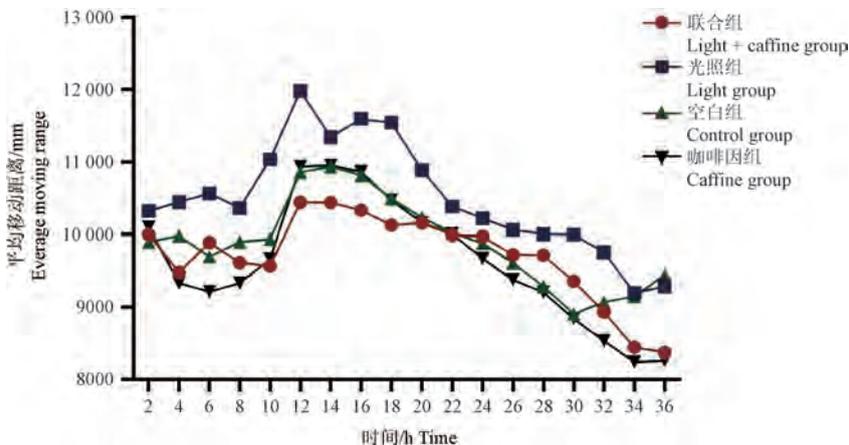


图 3 各组平均移动距离

Figure 3 Average moving distance of each group

表 3 静息时间( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Resting time

组别 Groups	客观白天静息时间/s Objective daytime resting time	客观黑夜静息时间/s Objective dark night resting time
光照组 Light group	20 091.22±6068.46 <sup>*</sup>	20 693.94±5907.97 <sup>**</sup>
联合组 Light+caffeine group	32 560.67±7046.79 <sup>##</sup>	26 236.21±7168.43 <sup>##</sup>
咖啡因组 Caffeine group	33 094.70±8096.89 <sup>##</sup>	26 996.72±6543.71 <sup>##</sup>
空白组 Control group	28 489.31±8245.43	27 224.38±7327.74

注:与空白组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与光照组相比,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with control group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ . Compared with light group, <sup>##</sup> $P<0.01$ .

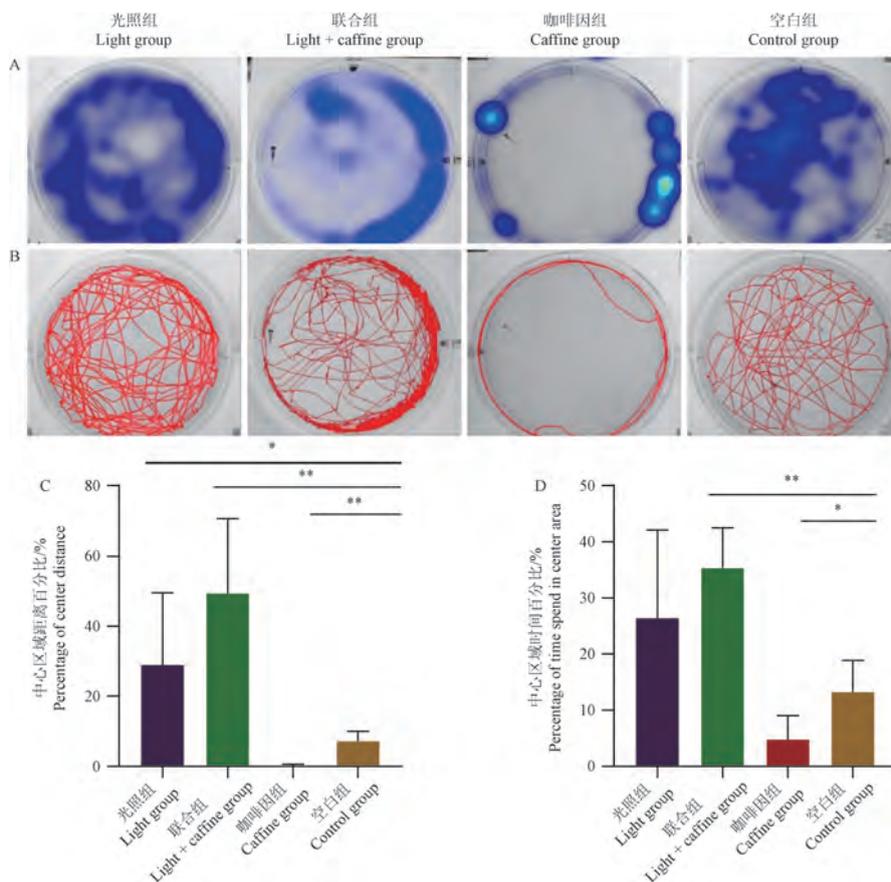
表 4 移动距离( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Movement distance

组别 Groups	客观白天移动距离/mm Objective daytime movement distance	客观黑夜移动距离/mm Objective dark night movement distance
光照组 Light group	77 960.71±7874.28 <sup>#</sup>	62 283.37±9027.68 <sup>**</sup>
联合组 Light+caffeine group	71 460.74±7006.36	46 159.43±8625.24 <sup>##</sup>
咖啡因组 Caffeine group	73 226.53±9202.53	46 017.70±8156.53 <sup>##</sup>
空白组 Control group	74 059.56±14 180.77	44 187.36±11 088.19

注:与空白组相比,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与光照组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

Note. Compared with control group, <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ . Compared with light group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ .



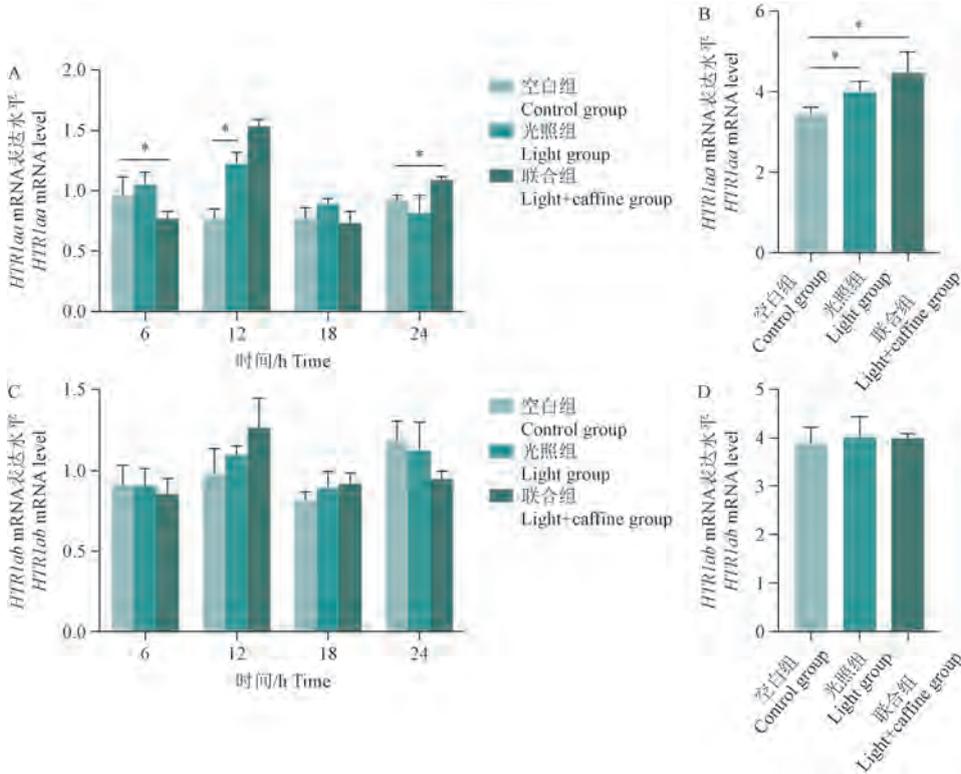
注:A:斑马鱼运动轨迹图;B:斑马鱼运动轨迹热图;C:中心区域游动距离百分比;D:中心区域游动时间百分比。与空白组相比,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

图 4 睡眠剥夺斑马鱼模型焦虑样状态

Note. A, Zebrafish movement trajectory diagram. B, Heatmap of the zebrafish movement trajectory. C, Swimming distance in the central region. D, Percent swimming time in the central area. Compared with control group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ .

Figure 4 Anxiety-like state of a sleep deprived zebrafish model

光照组斑马鱼 *HTR1aa* mRNA 水平表达高于空白组 ( $P < 0.05$ ), 12:00 光照组与联合组斑马鱼 *HTR1aa* mRNA 水平表达均高于空白组 ( $P < 0.05$ )。光照组与联合组斑马鱼体内 *HTR1ab* mRNA 水平表达均无明显统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 5。

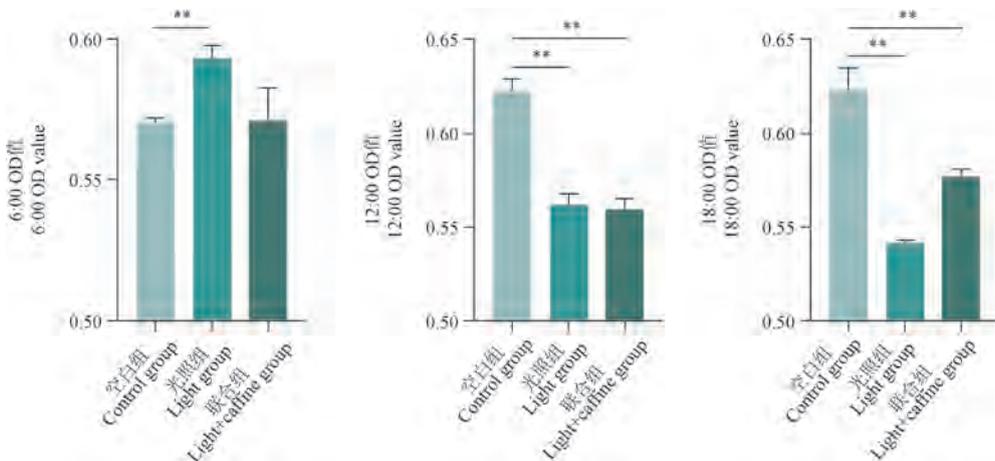


注: A: *HTR1aa* 基因表达各时间段情况; B: *HTR1aa* 基因表达总情况; C: *HTR1ab* 基因表达各时间段情况; D: *HTR1ab* 基因表达总情况。与空白组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 5 *HTR1aa*、*HTR1ab* 基因表达变化情况

Note. A, *HTR1aa* gene expression at each time period. B, Total *HTR1aa* gene expression. C, *HTR1ab* gene expression at each time period. D, Total *HTR1ab* gene expression. Compared with control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 5 Changes in the expression of *HTR1aa* and *HTR1ab* genes



注: 与空白组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

图 6 5-HT 分泌变化情况

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

Figure 6 Changes in 5-HT secretion

### 3 讨论

有研究表明,在夜间暴露于突然性光照可以有效抑制人类睡眠,灯光强度大幅度减少了其睡眠时间<sup>[7]</sup>。咖啡因可通过调节神经递质系统,诱发斑马鱼的神经系统异常兴奋,并引发一定程度的失眠或焦虑样状态<sup>[8]</sup>。该研究证明,光照组与联合组诱导失眠模型后,其行为学表型有较大差异。光照组幼鱼出现了移动速度加快、移动距离增多和静息时间减少的过度行为,此行为与人类失眠后易激惹、活动过度行为相吻合。相比光照联合咖啡因,单纯光照剥夺更适合作为斑马鱼失眠的长效造模手段,同时我们观察到光照不会引起斑马鱼明显的睡眠补偿,这与之前的研究结果相吻合<sup>[9]</sup>。

咖啡因作为一种腺苷受体拮抗剂,其引起失眠的主要机制是通过结合腺苷 A2A 受体抑制睡眠,增强觉醒<sup>[10-11]</sup>。腺苷是脑内重要的抑制性神经递质,睡眠压力的形成与腺苷在清醒时期内不断积累有关<sup>[12]</sup>。咖啡因会引起斑马鱼的焦虑样状态是被广泛认可的事实,也有文章报道了低剂量的咖啡因会引起斑马鱼的过度活跃行为<sup>[13]</sup>,但是迄今为止并没有确切的研究证明咖啡因对斑马鱼昼夜节律有显著的影响。同时,有研究证明咖啡因的作用通常在短时间内显现,可以迅速引发小鼠清醒状态,适用于需要迅速剥夺睡眠的实验<sup>[14]</sup>。因此在后续的生化实验中,我们没有选择单独的咖啡因模型进行 *HTR1aa*、*HTR1ab* 基因表达量与 5-HT 分泌的节律性检测。睡眠受生理时钟(设定睡眠时间)和睡眠内稳态机制(睡眠剥夺后睡眠强度和持续时间的代偿性增加)两方面的调节<sup>[15]</sup>。光作为重置生物钟的一个关键因素,维持一定时间的光照可以改变生物钟,但没有出现睡眠补偿,本实验的行为学结果也证实了这一观点。而光照加咖啡因后出现了睡眠增多与活动减少,证明斑马鱼可能由于体内腺苷的积累而触发到内稳态机制从而形成了睡眠补偿现象,与咖啡因导致人类神经兴奋期过后随之而来的白天嗜睡现象相似<sup>[16]</sup>。

光照对斑马鱼昼夜节律活动具有明显的调节作用,被认为是主要的昼夜节律调节信号<sup>[5]</sup>。本研究发现,与咖啡因和联合造模方法相比,光照剥夺睡眠可以增加斑马鱼的活动移动距离并减少睡眠回合数,明显抑制斑马鱼的睡眠,从而干扰生物钟的正常运行,证明该方法可以用来模拟人类失眠的症状。光照联合咖啡因干预使斑马鱼的移动距离

减少、睡眠回合增多,暗示着两种信号可能存在部分抵消作用,因此在进行光照的同时加入适量的咖啡因并不能起到协同作用。旷场实验结果表明咖啡因组具有更明显的致焦虑作用,所以咖啡因更适用于作为焦虑模型诱导因素<sup>[17]</sup>。由此我们认为单纯光照法更适用于通过改变斑马鱼的昼夜节律来完成失眠模型的建立。

旷场实验中咖啡因组的焦虑作用最明显。光照剥夺睡眠和咖啡因均可通过影响斑马鱼的焦虑状态,改变其旷场活动行为。光照剥夺睡眠可能扰乱生物钟相关基因的表达与 5-HT 代谢<sup>[18]</sup>,导致较为轻微的焦虑状态出现,从而使斑马鱼趋向于避免去中心区域。咖啡因可能通过 5-HT 等神经递质系统,诱发斑马鱼边缘活动,并引发程度较为严重的焦虑<sup>[13]</sup>。但由于本实验的目的是建立非复杂因素性的失眠模型,而咖啡因建立的失眠模型则无法排除其“是否由于焦虑状态的出现而引起失眠”,所以我们认为光照法建立失眠模型并不会引起明显的焦虑状态,故更适合作为非复杂因素性的失眠造模手段。

5-HT<sub>1A</sub> 受体可能与增加清醒有关<sup>[19]</sup>。12 h 睡眠剥夺增强了大鼠海马中 5-HT<sub>1A</sub> 受体的表达<sup>[20]</sup>。在本研究中,光照剥夺睡眠干扰生物钟的昼夜节律,导致 *HTR1aa* 基因表达的增加,这可能与 *HTR1aa* 相关受体神经递质的异常释放有关,从而导致 5-HT 分泌的增加,这也与前人的研究结论相一致<sup>[21]</sup>。在哺乳动物中,与正常睡眠的大鼠相比,睡眠剥夺后大鼠海马中 5-HT<sub>1A</sub> 受体表达水平升高<sup>[19]</sup>,证明斑马鱼睡眠剥夺后 5-HT<sub>1A</sub> 受体表达与哺乳动物存在一致性。但睡眠不足并没有明显影响 *HTR1ab* 基因的表达。于特定时间(2:00)给予斑马鱼幼鱼恒定光照法(150 Lux)并持续 6 h 以上,结果发现光照组幼鱼 *HTR1aa* 以及 5-HT 等生物因子昼夜节律相位的提前改变,联合组幼鱼 *HTR1aa* 基因以及 5-HT 等生物因子昼夜节律相位的改变不如光照组迅速,提示单纯光照法最适用于斑马鱼幼鱼失眠模型的建立。

血清素(5-HT)的功能是促进清醒和抑制快速眼动睡眠(REMS)<sup>[22]</sup>。在斑马鱼中,5-HT 可能在没有刺激的情况下起到促进睡眠的作用,同时在对强烈刺激或突然刺激变化的反应中增加唤醒<sup>[22]</sup>。研究中推测,咖啡因作为神经兴奋剂,通过 5-HT 等神经递质系统调节 *HTR1aa* 基因的表达。加入咖啡因

的光照组在 12:00 时 *HTR1aa* 基因表达的迅速增高,可能与咖啡因的刺激作用和斑马鱼的焦虑状态有关。咖啡因作为神经兴奋剂,通过影响 5-HT 合成、释放和再摄取等途径,促进 5-HT 分泌<sup>[22]</sup>。这一发现为深入探究昼夜节律的分子机制以及环境因素对其的影响提供了基础,对于理解生物体内部节律调控网络具有重要意义。

综上所述,本研究揭示了光照和咖啡因对斑马鱼昼夜节律活动和睡眠行为的交互效应及斑马鱼 5-HT 分泌与 *HTR1aa*、*HTR1ab* 基因表达的昼夜节律调节效应。本研究认为光照联合咖啡因干预使斑马鱼的移动距离减少、睡眠回合增多,暗示着两种信号的部分抵消作用,因此在进行光照的同时加入适量的咖啡因并不能起到协同作用。光照组幼鱼 *HTR1aa* 以及 5-HT 等生物因子昼夜节律相位的提前改变。相比光照联合咖啡因,光照剥夺更适合作为斑马鱼失眠的长效造模手段。该研究暗示其可能的调控机制与 *HTR1aa* 基因和 5-HT 的信号通路有关,这也与前人研究结果相吻合<sup>[2,17]</sup>。这些结果为深入理解生物钟系统和神经递质调控提供了新的视角,同时也为探索睡眠障碍等相关疾病的机制奠定了基础。未来的研究可以进一步探究相关分子机制和信号通路,以更全面地解析光照和咖啡因对生物体活动和睡眠的影响。

#### 参考文献:

[ 1 ] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会睡眠障碍学组. 中国成人失眠诊断与治疗指南(2017 版) [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(5): 324-335.  
SLEEP DISORDERS GROUP OF THE NEUROLOGY SECTION OF THE CHINESE MEDICAL ASSOCIATION (CMA). China adult insomnia diagnosis and treatment guidelines (2017 edition) [J]. Chin J Neurol, 2018, 51(5): 324-335.

[ 2 ] ALTENHOFEN S, BONAN C D. Zebrafish as a tool in the study of sleep and memory-related disorders [J]. Curr Neuropharmacol, 2022, 20(3): 540-549.

[ 3 ] ZHANG Z, PENG Q, HUO D, et al. Melatonin regulates the neurotransmitter secretion disorder induced by caffeine through the microbiota-gut-brain axis in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 678190.

[ 4 ] GIACOMINI A C V V, TEIXEIRA K H, MARCON L, et al. Melatonin treatment reverses cognitive and endocrine deficits evoked by a 24-h light exposure in adult zebrafish [J]. Neurosci Lett, 2020, 733: 135073.

[ 5 ] 宗尤佳, 李雨浓, 郭家彬, 等. 斑马鱼模型在昼夜节律研究中的应用进展 [J]. 军事医学, 2024, 48(1): 75-80.  
ZONG Y J, LI Y N, GUO J B, et al. Application progress of

zebrafish (*Danio rerio*) model in circadian rhythm research [J]. Mil Med Sci, 2024, 48(1): 75-80.

[ 6 ] GARDINER C, WEAKLEY J, BURKE L M, et al. The effect of caffeine on subsequent sleep: a systematic review and meta-analysis [J]. Sleep Med Rev, 2023, 69: 101764.

[ 7 ] TOUITOU Y, REINBERG A, TOUITOU D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption [J]. Life Sci, 2017, 173: 94-106.

[ 8 ] 张瑞, 张振贤, 史佳宁, 等. 益神宁心方对斑马鱼睡眠剥夺模型行为学及神经递质的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(1): 89-95.  
ZHANG R, ZHANG Z X, SHI J N, et al. Effects of Yishen Ningxin Formula on behavior and neurotransmitter in sleep deprivation induced zebrafish [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2024, 58(1): 89-95.

[ 9 ] OIKONOMOU G, ALTERMATT M, ZHANG R W, et al. The serotonergic raphe promote sleep in zebrafish and mice [J]. Neuron, 2019, 103(4): 686-701.

[ 10 ] TRAN T T, PARK J, KIM D Y, et al. Caffeine-induced protein kinase A activation restores cognitive deficits induced by sleep deprivation by regulating *O*-GlcNAc cycling in adult zebrafish [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2024, 326(3): C978-C989.

[ 11 ] NOLLET M, WISDEN W, FRANKS N P. Sleep deprivation and stress: a reciprocal relationship [J]. Interface Focus, 2020, 10(3): 20190092.

[ 12 ] PEREIRA-FIGUEIREDO D, NASCIMENTO A A, CUNHA-RODRIGUES M C, et al. Caffeine and its neuroprotective role in ischemic events: a mechanism dependent on adenosine receptors [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(6): 1693-1725.

[ 13 ] WU J C, CHEN C H, WU L S. Caffeine-induced behavioral changes in zebrafish [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(2): 312-317.

[ 14 ] KORKUTATA M, LAZARUS M. Adenosine a2a receptors and sleep [J]. Int Rev Neurobiol, 2023, 170: 155-178.

[ 15 ] DOS SANTOS M M, FERREIRA S A, DE MACEDO G T, et al. JM-20 potently prevents the onset of caffeine-induced anxiogenic phenotypes in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2024, 277: 109843.

[ 16 ] OTA M, MAKI Y, XU L Y, et al. Prolonging effects of *Valeriana fauriei* root extract on pentobarbital-induced sleep in caffeine-induced insomnia model mice and the pharmacokinetics of its active ingredients under conditions of glycerol fatty acid ester as emulsifiers [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 298: 115625.

[ 17 ] CLAYMAN C L, CONNAUGHTON V P. Neurochemical and behavioral consequences of ethanol and/or caffeine exposure: effects in zebrafish and rodents [J]. Curr Neuropharmacol, 2022, 20(3): 560-578.

[ 18 ] MORIYA R, KANAMARU M, OKUMA N, et al. Optogenetic activation of DRN 5-HT neurons induced active wakefulness, not quiet wakefulness [J]. Brain Res Bull, 2021, 177: 129-142.

- [19] AZIZI H, HWANG J, SUEN V, et al. Sleep deprivation induces changes in 5-HT actions and 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in the rat hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 655: 151-155.
- [20] OCHIAI Y, FUJITA M, HAGINO Y, et al. Therapeutic effects of quetiapine and 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism on hyperactivity in dopamine-deficient mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (13): 7436.
- [21] CAO M, XU T, ZHANG H, et al. BDE-47 causes depression-like effects in zebrafish larvae *via* a non-image-forming visual mechanism [J]. *Environ Sci Technol*, 2023, 57 (26): 9592-9602.
- [22] GARWOOD M, VIJAYAKUMAR P, BOHNEN N I, et al. Serotonin transporter density in isolated rapid eye movement sleep behavioral disorder [J]. *Front Sleep*, 2024, 2: 1298854.

[收稿日期]2024-06-17

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://zgswdw.cnjournals.com>

期待您的来稿!

焦昆,张静,孟霞,等.应用三维时间飞跃法磁共振血管成像(3D-TOF-MRA)技术观察长爪沙鼠脑动脉的方法初探[J].中国比较医学杂志,2024,34(11):68-74.

Jiao K, Zhang J, Meng X, et al. Preliminary study of three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography for observing cerebral arteries in Mongolian gerbils [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 68-74.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.009

# 应用三维时间飞跃法磁共振血管成像(3D-TOF-MRA) 技术观察长爪沙鼠脑动脉的方法初探

焦昆<sup>1</sup>,张静<sup>1,2</sup>,孟霞<sup>1</sup>,王战京<sup>3</sup>,雷建锋<sup>3</sup>,陈柏安<sup>1,2\*</sup>,卢静<sup>1,2\*</sup>

(1.首都医科大学实验动物部,北京 100069;2.首都医科大学基础医学院实验动物学系,北京 100069;  
3.首都医科大学中心实验室,北京 100069)

**【摘要】** 目的 探究通过3D-TOF-MRA方法确认长爪沙鼠实验前条件的可行性。方法 使用7.0 T MRI扫描仪对长爪沙鼠脑动脉进行扫描,扫描数据采用RadiAnt DICOM Viewer软件进行后续处理;采用乳胶灌注法对影像学结果进行验证与比较;通过MIMICS软件对长爪沙鼠及大鼠的后交通支及周围脑血管进行三维重建;使用此方法筛选血管发育异常的长爪沙鼠个体验证本方法的应用效果。结果 3D-TOF-MRA技术可以有效地观察到活体长爪沙鼠脑动脉;3D-TOF-MRA技术观察长爪沙鼠脑主要动脉血管的准确性较高,并且能观察组织内部血管,但对于较细血管分支的观察效果不如乳胶灌注法;3D-TOF-MRA技术所得数据可以用于血管的三维重建;3D-TOF-MRA技术应用于长爪沙鼠脑动脉结构异常个体的筛选具有较好效果。结论 3D-TOF-MRA技术可以应用于活体长爪沙鼠脑动脉的结构观察及相关研究。

**【关键词】** 核磁共振;血管成像;长爪沙鼠;脑;动脉

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0068-07

## Preliminary study of three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography for observing cerebral arteries in Mongolian gerbils

JIAO Kun<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, MENG Xia<sup>1</sup>, WANG Zhanjing<sup>3</sup>, LEI Jianfeng<sup>3</sup>, CHEN Baian<sup>1,2\*</sup>, LU Jing<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Laboratory Animal, Capital Medical University, Beijing 100069, China.

2. Department of Experimental Zoology, School of Basic Medicine, Capital Medical

University, Beijing 100069. 3. Core Facility Center, Capital Medical University, Beijing 100069)

**【Abstract】** **Objective** To explore the feasibility of confirming pre experimental conditions in Mongolian gerbils using three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography (3D-TOF-MRA). **Methods** The cerebral arteries in Mongolian gerbils were imaged using a 7.0 T magnetic resonance imaging scanner and the data were processed using

**【基金项目】** 国家重点研发计划(2021YFF0702805)。

**【作者简介】** 焦昆(1986—),男,高级实验师,研究方向:人类疾病动物模型及比较医学研究。E-mail:jiaokun122@126.com

**【通信作者】** 陈柏安(1984—),男,博士,教授,研究方向:阿尔茨海默病动物模型研制、基础及转化医学研究。

E-mail:baianchen@ccmu.edu.cn

卢静(1969—),女,博士,教授,研究方向:神经退行性疾病模型的研制和比较医学研究。E-mail:lujing@ccmu.edu.cn

\* 共同通信作者

RadiAnt DICOM Viewer software. The imaging result were then validated and compared using the latex perfusion method, and 3D reconstruction of the posterior communicating branch and surrounding cerebral blood vessels were performed using analytical software. Finally, we attempted to use this method to screen for abnormal vascular development in Mongolian gerbils, to verify the effectiveness of this method. **Results** 3D-TOF-MRA effectively demonstrated the cerebral arteries in live Mongolian gerbils. The technique showed high accuracy for observing the main cerebral arteries in Mongolian gerbils, but its ability to show finer vascular branches was not as good as the latex perfusion method. The data obtained using 3D-TOF-MRA could be used for 3D reconstruction of blood vessels, and the technology could be applied to screen for abnormal arterial structures in Mongolian gerbils. **Conclusions** 3D-TOF-MRA technology can be applied for the structural observation and related research of the cerebral arteries in live Mongolian gerbils.

**[Keywords]** magnetic resonance imaging; vascular imaging; Mongolian gerbils; cerebral; artery

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

脑缺血是指血液供应无法满足脑组织代谢所需,进而引起一系列症状的综合征。严重的脑缺血会导致大脑功能永久性损伤,甚至是死亡。脑缺血相关疾病包括缺血性卒中、慢性脑供血不足等。其中,卒中是我国成人致死、致残的首位病因。随着社会人口老龄化及城镇化进程的加速,脑卒中的流行趋势明显,疾病负担日益增加<sup>[1]</sup>。因此,对于脑缺血相关疾病的研究非常重要。

长爪沙鼠种群中存在部分个体缺乏颈动脉系与椎-基底动脉系之间的后交通支,阻断颈总动脉很容易造成其脑缺血,被公认为是建立脑缺血模型的理想动物,对于研究脑缺血相关疾病的发病机制及治疗措施具有重要意义<sup>[2-4]</sup>。但正因为其脑部动脉血管发育异常存在不确定性,从而影响了造模成功率及后续研究结果的可靠性。如果能找到在造模前检测长爪沙鼠脑部血管结构的技术手段,将显著提高造模成功率并增强实验结果的可靠性。但是,目前已有的对于长爪沙鼠脑血管的观察方法多采用取材后灌注的方法,缺乏对活体动物脑血管的检测方法,阻碍了长爪沙鼠在脑缺血及相关疾病研究中的应用。三维时间飞跃法磁共振血管成像(three dimensional time-of-flight magnetic resonance angiograms, 3D-TOF-MRA)是一种无创性的血管检查技术,其优点是不注射造影剂即可使血管显影,特别是在临床血管相关疾病的检查中被广泛使用<sup>[5-6]</sup>。本研究尝试采用 3D-TOF-MRA 方法对长爪沙鼠脑动脉血管进行观察,为将来长爪沙鼠脑血管相关疾病动物模型影像学的观察和评价提供新方法思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级的健康长爪沙鼠 10 只,雌雄各半,2~3

月龄,体重(60±10)g,来源于首都医科大学实验动物部[SCXK(京)2022-0013]。SPF 级的健康 SD 大鼠 6 只,雌雄各半,3 周龄,体重(60±10)g,由北京市维通利华实验动物有限公司提供[SCXK(京)2021-0006]。实验动物饲养在首都医科大学实验动物设施内[SYXK(京)2021-0030]。实验动物饲养和实验过程中严格遵守实验动物使用的 3R 原则并给予人道的关怀,实验方案获得首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会批准(AEEI-2021-312)。

### 1.2 主要试剂与仪器

异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,批号:2023110301);天然乳胶液(深圳市吉田化工有限公司,货号:H0103);浓缩广告画颜料(上海马利画材股份有限公司,货号:NO.95);0.9%氯化钠注射液(山东齐都药业有限公司,批号:11B23082308);氨水(北京益利精细化学品有限公司,批号:20221110);组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号:GP230930111101)。输液器(山东威高集团医用高分子制品股份有限公司,批号:20231011A);MRI 扫描仪(德国布鲁克 Bruker 公司,型号:Bruker Pharma Scan 7.0T);大鼠头部表面线圈(德国布鲁克 Bruker 公司,型号:1H Rat Head RF Surface coils(T20010V3));小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:R500IE);注射泵(深圳麦科田生物医疗技术股份有限公司,型号:SYS-50VET)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物磁共振扫描前准备

将实验动物放置于透明诱导麻醉盒中,采用 4%异氟烷诱导麻醉,观察动物状态,当动物保持安静后,立即取出并迅速放置于扫描床上佩戴呼吸面

罩,1.5%异氟烷维持麻醉。动物在成像期间注意保温。

### 1.3.2 磁共振扫描参数设定

序列选择 T2WI 成像,参数:视野 = 3.00 cm × 3.00 cm,矩阵 = 256 × 256,重复时间 = 3000 ms,回波时间 = 45 ms,翻转角度 = 180°,像层厚 = 1.0 mm,层间距 = 1.0 mm,采集时间 = 8 min 24 s,重复次数 = 4。血管造影成像序列选择 FLASH 3D 成像,参数:视野 = 3.50 cm × 3.50 cm × 3.00 cm,矩阵 = 256 × 256 × 128,重复时间 = 15 ms,回波时间 = 2.5 ms,翻转角度 = 20°,采集时间 = 12 min 17 s,重复次数 = 2。

### 1.3.3 图像数据处理

长爪沙鼠脑动脉扫描数据采用 RadiAnt DICOM Viewer 软件进行处理分析,窗位和窗宽设定为 12 200 和 24 400。将影像学 DICOM 数据导入医学影像控制软件(materialise's interactive medical image control system, MIMICS,版本:V20)中,进行血管三维重建显示其构筑。

### 1.3.4 乳胶灌注

动物采用 4%异氟烷诱导麻醉,1.5%异氟烷维持麻醉。待动物麻醉后迅速打开其胸腔暴露心脏。将输液器针头从左心室刺入心脏同时剪开右心耳,快速灌注 0.9%氯化钠注射液进行血管冲洗。待血管冲洗干净后,使用注射泵以 1 mL/min 的速度缓慢

灌注红色乳胶染料约每只 4 mL。将脑组织从颅骨中小心剥离,脑组织放入组织固定液中进行充分固定,约 24 h 后进行观察。

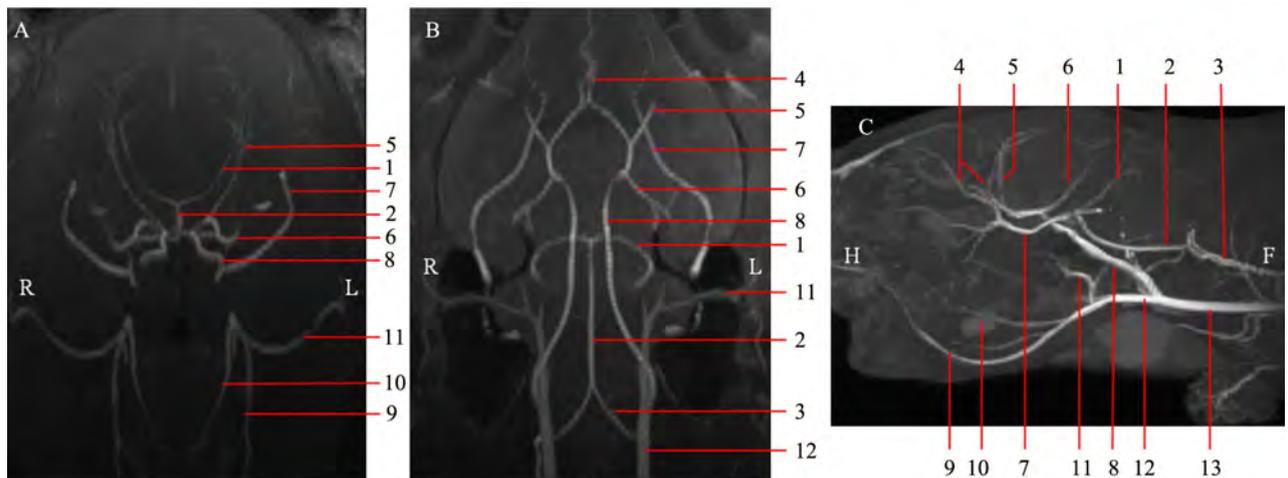
## 1.4 统计学方法

实验数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行处理,采用两独立样本秩和检验对数据进行分析,数据描述采用中位数(四分位间距),统计量报告 *Z* 值和 *P* 值。当 *P* < 0.05 认为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 3D-TOF-MRA 显示脑动脉

为直观地反映长爪沙鼠脑部动脉走行和血管间相对位置,分别截取横断面、冠状面和矢状面 3 个脑动脉图像(如图 1)。通过图像可以看到,长爪沙鼠头部动脉血管主要包括颈动脉系和椎-基底动脉系,而颅脑内血液主要由颈内动脉和基底动脉供应。颈内动脉首先在颅脑外发出翼腭动脉,随后进入颅脑后发出大脑后动脉、大脑中动脉和大脑前动脉。其中,左右两侧大脑前动脉相互交叉,随后向前和后上方分别发出分支。大脑中动脉发出后绕过大脑下缘从大脑中部向后上走行并发出分支。大脑后动脉发出后绕过大脑下缘从侧后向上走行并发出分支。颅脑外左右两侧各有一条椎动脉汇合形成基底动脉,基底动脉在小脑前缘向前上方走



注:A:横断面;B:冠状面;C:矢状面;1:小脑上动脉;2:基底动脉;3:椎动脉;4:大脑前动脉;5:大脑中动脉;6:大脑后动脉;7:翼腭动脉;8:颈内动脉;9:颌外动脉;10:舌动脉;11:枕动脉;12:颈外动脉;13:颈总动脉;R:右侧;L:左侧;H:头侧;F:足侧。

图 1 长爪沙鼠脑动脉 MRA 图像

Note. A, Axial image. B, Coronal image. C, Sagittal image. 1, Superior cerebellar artery. 2, Basilar artery. 3, Vertebral artery. 4, Anterior cerebral artery. 5, Middle cerebral artery. 6, Posterior cerebral artery. 7, Pterygopalatine artery. 8, Internal carotid artery. 9, External maxillary artery. 10, Lingual artery. 11, Occipital artery. 12, External carotid artery. 13, Common carotid artery. R, Right. L, Left. H, Head. F, Feet.

Figure 1 MRA images of cerebral arteries in Mongolian gerbils

行并发出两个小脑上动脉分支。另外,从图中可看到,颈外动脉向前走行,主要发出枕动脉、舌动脉和颌外动脉等分支。

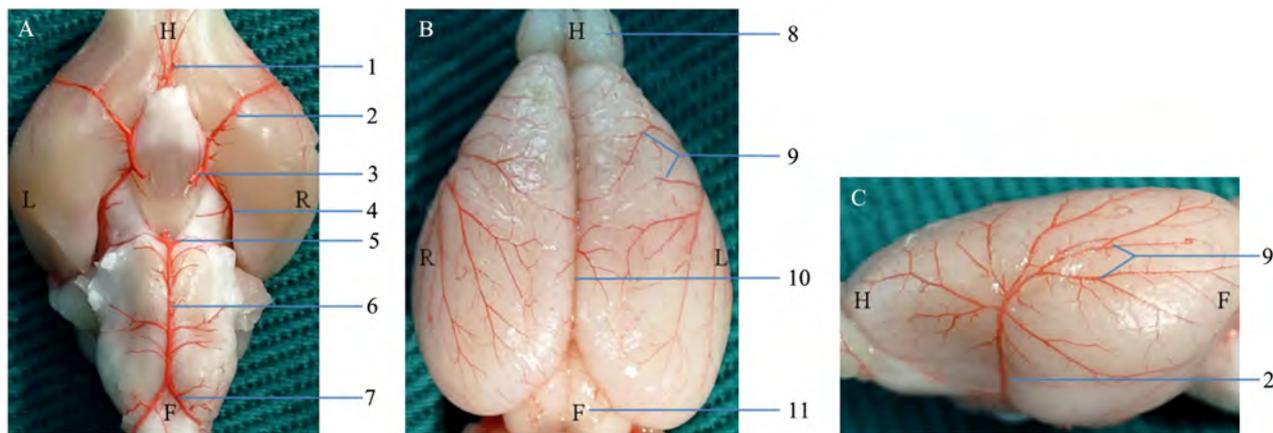
### 2.2 乳胶灌注方法观察脑动脉

为了评价和比较 3D-TOF-MRA 法对长爪沙鼠脑血管的观察效果,我们还采用乳胶灌注法对长爪沙鼠脑动脉进行了观察(如图 2)。从图中可以看到,3D-TOF-MRA 法能够观察到的大脑前动脉向后上方走行的分支,但是在乳胶灌注法中无法看到。另外,我们对两种方法能显示的血管最大分支级数

进行了比较。其中,对于大脑前动脉血管分支的观察,两种方法无差异。对于大脑中动脉的观察乳胶灌注法和 3D-TOF-MRA 法可以观察到最高分支级数分别为 4 级和 2 级,具有显著性差异(如表 1)。对大脑后动脉的观察乳胶灌注法和 3D-TOF-MRA 法可以观察到最高分支级数分别为 3 级和 2 级,同样具有显著性差异。

### 2.3 3D-TOF-MRA 方法比较长爪沙鼠和大鼠后交通支

后交通支作为大脑后动脉和小脑上动脉的连



注:A:腹侧面观;B:背侧面观;C:左侧面观;1:大脑前动脉;2:大脑中动脉主干;3:颈内动脉;4:大脑后动脉;5:小脑上动脉;6:基底动脉;7:椎动脉;8:嗅球;9:大脑中动脉分支;10:大脑纵裂;11:小脑;R:右侧;L:左侧;H:头侧;F:足侧。

图 2 长爪沙鼠脑动脉乳胶灌注结果

Note. A, Ventral view. B, Dorsal view. C, Left side view. 1, Anterior cerebral artery. 2, Middle cerebral artery trunk. 3, Internal carotid artery. 4, Posterior cerebral artery. 5, Superior cerebellar artery. 6, Basilar artery. 7, Vertebral artery. 8, Olfactory bulb. 9, Ranches of the middle cerebral artery. 10, Longitudinal fissure of the brain. 11, Cerebellum. R, Right. L, Left. H, Head. F, Feet.

Figure 2 Latex perfusion results of cerebral arteries in Mongolian gerbils

表 1 两种方法观察不同动脉的效果比较  
Table 1 Comparison of two methods for observing arteries

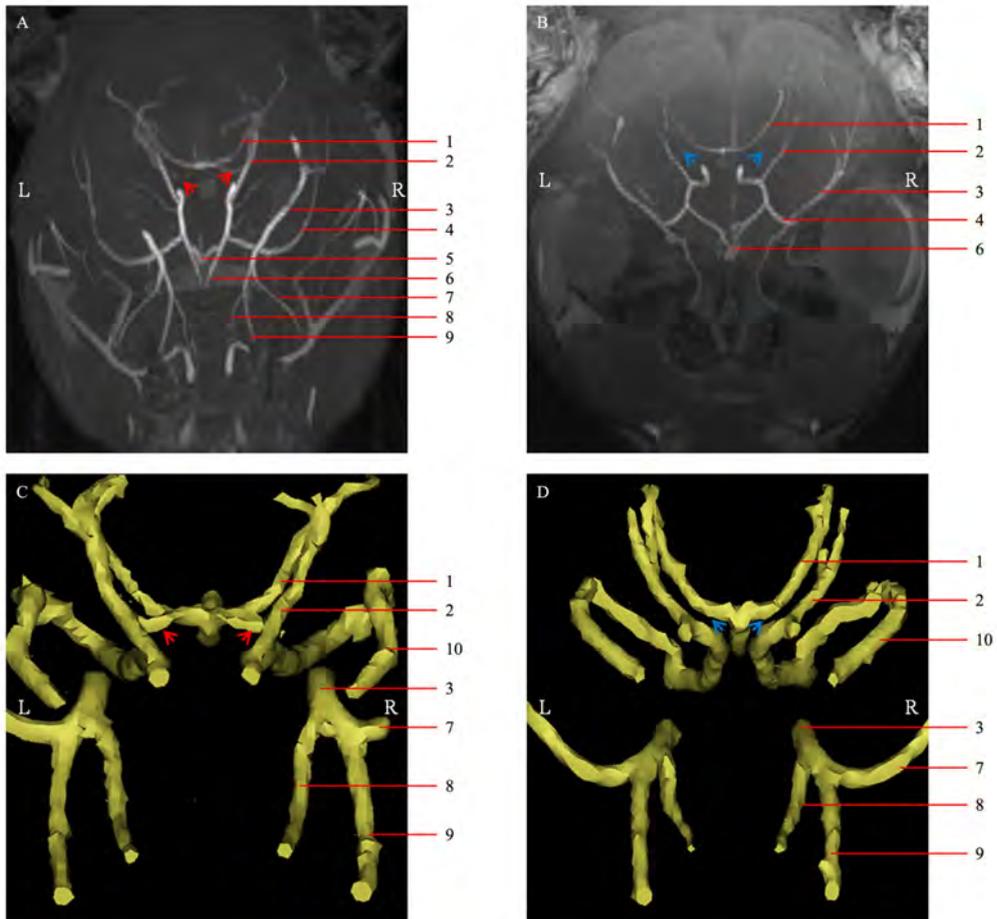
动脉 Arteries	观察方法 Methods	中位数(四分位间距) Median (Interquartile range)	Z	P
大脑前动脉 Anterior cerebral artery	三维时间飞跃法磁共振血管成像 3D-TOF-MRA	1(1, 1.25)	-1.304	0.315
	乳胶灌注法 Latex perfusion	1.5(1, 2)		
大脑中动脉 Middle cerebral artery	三维时间飞跃法磁共振血管成像 3D-TOF-MRA	2(1, 2)	-3.713	0.000
	乳胶灌注法 Latex perfusion	4(3.25, 4)		
大脑后动脉 Posterior cerebral artery	三维时间飞跃法磁共振血管成像 3D-TOF-MRA	2(1, 2)	-3.744	0.000
	乳胶灌注法 Latex perfusion	3(3, 3.75)		

接血管,在脑部缺血代偿机制中起到重要作用,以往研究中认为部分长爪沙鼠存在后交通支缺失的现象<sup>[2-3]</sup>。本实验所用长爪沙鼠通过 3D-TOF-MRA 法均未观察到后交通支,这也与乳胶灌注法结果一致。为了进一步证实 3D-TOF-MRA 法观察后交通支的效果,我们选用与长爪沙鼠体重相似的幼年大鼠进行了验证。结果显示,3D-TOF-MRA 法可以清晰地观察到大鼠后交通支(如图 3A、3B)。为了更直观地反映后交通支在大脑后动脉和小脑上动脉之间的位置关系,我们使用 MIMICS V20 软件进行

了局部动脉的三维重建(如图 3C、3D)。

## 2.4 3D-TOF-MRA 方法对长爪沙鼠脑动脉异常结构的观察

通过 3D-TOF-MRA 方法,我们尝试观察长爪沙鼠脑动脉发育异常的情况。如图 4 所示,我们共采集了 10 只长爪沙鼠的脑动脉影像数据,发现存在单侧大脑前动脉狭窄的动物 1 只,存在单侧大脑后动脉缺失的动物 1 只,存在单侧椎动脉缺失的动物 1 只。以上结果提示,此方法可以有效地筛查出存在大脑主要动脉狭窄或缺失等发育异常的动物。

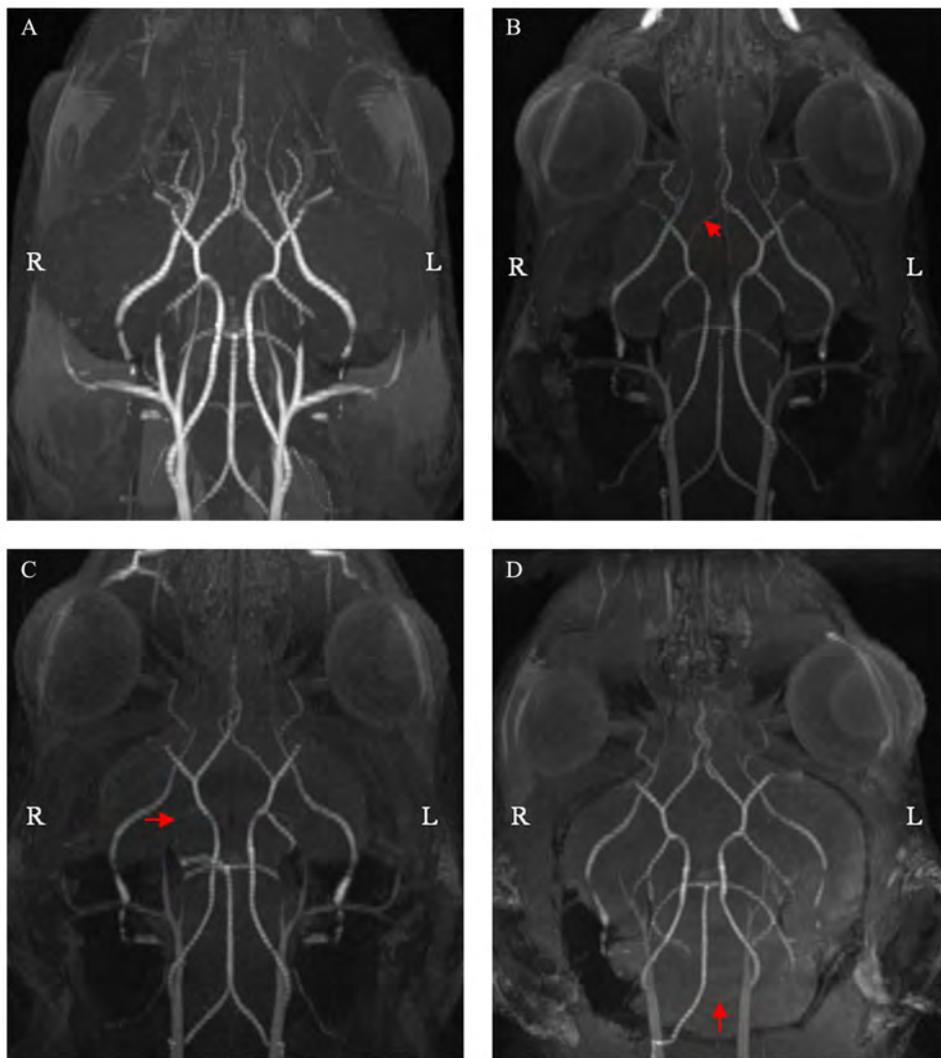


注:A:大鼠脑动脉;B:长爪沙鼠脑动脉;C:大鼠脑动脉三维重建图;D:长爪沙鼠脑动脉三维重建图;1:小脑上动脉;2:大脑后动脉;3:颈外动脉;4:大脑中动脉;5:前交通支;6:大脑前动脉;7:枕动脉;8:舌动脉;9:颌外动脉;10:翼腭动脉;R:右侧;L:左侧;H:头侧;F:足侧;图中红色箭头所示为大鼠后交通动脉位置,蓝色箭头所示为长爪沙鼠后交通支缺失位置。

图3 脑动脉 MRA 图像及三维重建图

Note. A, Rat cerebral artery. B, Mongolian gerbil cerebral artery. C, 3D reconstruction of rat cerebral arteries. D, 3D reconstruction of cerebral arteries in Mongolian gerbils. 1, Superior cerebellar artery. 2, Posterior cerebral artery. 3, External carotid artery. 4, Middle cerebral artery. 5, Anterior communicating artery. 6, Anterior cerebral arteries. 7, Occipital artery. 8, Lingual artery. 9, External maxillary artery. 10, Pterygopalatine artery. R, Right. L, Left. H, Head. F, Feet. The red arrow indicates the location of the posterior communicating artery in rats, while the blue arrow indicates the location of the missing posterior communicating artery in Mongolian gerbils.

Figure 3 MRA images and 3D reconstruction of cerebral arteries



注:A:脑动脉正常结构图;B:大脑前动脉狭窄;C:大脑后动脉缺失;D:椎动脉缺失。图中红色箭头所示为缺失位置;R:右侧;L:左侧。

图4 长爪沙鼠脑动脉结构发育异常 MRA 图像

Note. A, Normal structure of cerebral arteries. B, Stenosis of the anterior cerebral artery. C, Lack of posterior cerebral artery. D, Lack of vertebral artery. The red arrow indicates the missing position. R, Right. L, Left.

Figure 4 MRA images of abnormal development of cerebral artery structure in Mongolian gerbils

### 3 讨论

作为重要的实验动物资源,长爪沙鼠在行为学异常和癫痫等中枢神经系统疾病研究,特别是在脑血管相关疾病研究中被广泛应用<sup>[7]</sup>。已有研究对于长爪沙鼠脑动脉的观察多采用染料灌注后取材观察的方法。该方法虽然能够较好的对组织表面的血管进行观察,但无法在保证动物存活的前提下使用,且无法观察到组织内部的血管,因此该方法在实际研究工作中的应用具有一定局限性<sup>[2,8]</sup>。

3D-TOF-MRA 是一种用于反映血管的解剖形态的扫描技术,因其具备成像简单、无辐射等优点,在临床中被广泛用于脑血管检查及脑血管疾病筛

查<sup>[9-10]</sup>。在基础研究中,3D-TOF-MRA 技术已经被用于大鼠脑血管相关的研究中,并取得了较好的效果<sup>[11-12]</sup>。本研究结果提示,3D-TOF-MRA 技术能够较好地观察长爪沙鼠脑部主要血管的结构与走行,并能及时发现其动脉血管的结构异常。最后,对两种方法的优点与不足进行了比较(见表2)。

总之,认为 3D-TOF-MRA 技术可以用于活体长爪沙鼠脑血管结构的观察,并有助于提升长爪沙鼠在脑缺血相关疾病预防及治疗研究中的应用前景。因此,本方法具有较好的推广价值。但还存在不足之处,受条件所限,本方法对于较细的动脉分支观察效果还存在不足,后续可以通过改进仪器设备或技术参数的方法来提高观察效果。

表 2 两种血管观察方法特点比较

Table 2 Comparison of the characteristics of two vascular observation methods

方法 Methods	优点 Advantages	不足 Defects
乳胶灌注法 Latex perfusion	1. 较细血管显示效果好 2. 操作简单 1. It can show thinner vascular branches 2. Simple operation	1. 无法进行在体检测 2. 无法在不借助繁复的脑透明化技术的前提下观察脑组织内部血管 1. It can't be used <i>in vivo</i> 2. It is impossible to observe the blood vessels inside brain tissue without the complicated transparency Technology
三维时间飞跃法磁共振血管成像 3D-TOF-MRA	1. 可进行在体检测 2. 可观察脑组织内部血管 1. It can be used <i>in vivo</i> 2. It can be used to observe the blood vessels inside brain tissue	1. 对较细血管显示效果较差 2. 需要 MRI 扫描仪 1. Thinner vessel branches cannot be clearly displayed 2. Need an MRI scanner

## 参考文献:

- [ 1 ] 王陇德. 《中国脑卒中防治报告 2020》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2022, 19(2):136-144.  
WANG L D. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020 [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2022, 19(2):136-144.
- [ 2 ] DU X Y, ZHU X D, DONG G, et al. Characteristics of circle of Willis variations in the Mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group [J]. ILAR J, 2011, 52(1): E1-E7.
- [ 3 ] WU Y, HU C, LI Z, et al. Development of a new cerebral ischemia reperfusion model of Mongolian gerbils and standardized evaluation system [J]. Anim Model Exp Med, 2024, 7(1): 48-55.
- [ 4 ] LI Y, ZHANG J. Anim models of stroke [J]. Anim Model Exp Med, 2021, 4(3): 204-219.
- [ 5 ] 刘子航, 李世星, 王月, 等. 通过 3D-TOF-MRA 分析 Willis 环形态改变与颅内动脉瘤的研究进展 [J]. 中国医疗器械信息, 2020, 26(1): 38-39.  
LIU Z H, LI S X, WANG Y, et al. Progress in the study of morphological changes of Willis ring and intracranial aneurysms by 3D-TOF-MRA [J]. Chin Med Device Inf, 2020, 26(1): 38-39.
- [ 6 ] 孙宏, 张秀玲, 王智宝. 3D-TOF-MRA 对椎-基底动脉病变的诊断价值 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2023, 21(4): 22-24.  
SUN H, ZHANG X L, WANG Z B. Value of 3.0T high-field magnetic resonance 3D-TOF-MRA on the identification of intracranial Vertebral Basilar lesions [J]. Chin J CT MRI, 2023, 21(4): 22-24.
- [ 7 ] CURNOW E, WANG Y. New animal models for understanding FMRP functions and FXS pathology [J]. Cells, 2022, 11(10): 1628.
- [ 8 ] KUCHINKA J, NOWAK E, SZCZURKOWSKI A, et al. Arteries supplying the base of the brain in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Pol J Vet Sci, 2008, 11(4): 295-299.
- [ 9 ] 孙沙沙, 徐贤, 崔龙彪, 等. 多模态磁共振成像在认知功能障碍中的研究进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2023, 25(5): 555-557.  
SUN S S, XU X, CUI L B, et al. Research progress of multimodal magnetic resonance imaging in cognitive dysfunction [J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2023, 25(5): 555-557.
- [ 10 ] 张天翼, 董璟. 磁共振血管成像(MRA)在缺血性脑血管病患者诊断中的应用效果 [J]. 贵州医药, 2023, 47(12): 1971-1972.  
ZHANG T Y, DONG J. Application of magnetic resonance angiography (MRA) in the diagnosis of ischemic cerebrovascular disease [J]. Guizhou Med J, 2023, 47(12): 1971-1972.
- [ 11 ] 雷建锋, 赵媛媛, 王战京, 等. 超高磁场下大鼠脑血管成像技术应用 [J]. 现代仪器与医疗, 2020, 26(2): 49-52.  
LEI J F, ZHAO Y Y, WANG Z J, et al. Application of cerebrovascular imaging technology in rats under ultra-high magnetic field [J]. Mod Instrum Med Treat, 2020, 26(2): 49-52.
- [ 12 ] 张建, 雷建锋, 邹海艳, 等. 磁共振成像在脑缺血基础研究中的应用 [J]. 医学综述, 2019, 25(16): 3253-3258.  
ZHANG J, LEI J F, ZOU H Y, et al. Application of magnetic resonance imaging in basic research of cerebral ischemia [J]. Medical Rev, 2019, 25(16): 3253-3258.

[ 收稿日期 ] 2024-06-18

吴翠,李灿委,赵海荣,等. 色氨酸代谢干预阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 75-83.  
Wu C, Li CW, Zhao HR, et al. Research progress in the intervention of tryptophan metabolism in Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 75-83.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.010

## 色氨酸代谢干预阿尔茨海默病的研究进展

吴翠<sup>1,2,3</sup>, 李灿委<sup>1,3,4</sup>, 赵海荣<sup>1,2,3</sup>, 杨自忠<sup>1,2,3</sup>, 高鹏飞<sup>1,2,3</sup>,  
赵昱<sup>1,2,3</sup>, 张成桂<sup>1,2,3\*</sup>

(1.大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室,云南大理 671000;2.大理大学药学院,云南大理 671000;  
3.大理大学药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心,云南大理 671000;4.大理大学公共卫生学院,云南大理 671000)

**【摘要】** 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种退行性神经系统疾病,可导致患者认知功能减退、精神行为异常和日常生活能力下降。色氨酸是人体的必须氨基酸,通过3个主要代谢途径分别生成犬尿氨酸、5-羟色胺(5-HT)和吲哚衍生物;通过影响色氨酸的代谢产物,能有效改善脑部的神经炎症,显著改善认知能力,直接或间接地影响AD的发生和发展,进而干预AD。本文查阅了近3年来中国知网、PubMed等数据库基于色氨酸代谢干预AD的研究文献,总结其作用机制,以期为抗AD药物的进一步研究提供参考。

**【关键词】** 阿尔茨海默病;色氨酸代谢;研究进展

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0075-09

## Research progress in the intervention of tryptophan metabolism in Alzheimer's disease

WU Cui<sup>1,2,3</sup>, LI Canwei<sup>1,3,4</sup>, ZHAO Hairong<sup>1,2,3</sup>, YANG Zizhong<sup>1,2,3</sup>, GAO Pengfei<sup>1,2,3</sup>,  
ZHAO Yu<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Chenggui<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali University, Dali 671000, China.  
2. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000. 3. National Joint Engineering Research Center for the  
Development of Medicinal Special Insects, Dali University, Dali 671000. 4. College of Public Health,  
Dali University, Dali 671000)

**【Abstract】** Alzheimer's disease (AD) is a degenerative neurological disorder that can lead to cognitive decline, mental behavior abnormalities, and a reduced ability to undertake daily life activities. Tryptophan is an essential amino acid for the human body and is produced by three main metabolic pathways, namely kynurenine, 5-hydroxytryptamine, and indole derivatives. Influencing the metabolites of tryptophan can ameliorate neuroinflammation in the brain and significantly improve cognitive ability, while the occurrence and development of AD are reduced. In this paper, we review the research literature on the use of tryptophan metabolism intervention in AD in the last 3 years from CNKI, PubMed, and other

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82160798, 81960712, 81260676); 云南省重大科技专项计划—生物资源数字化开发应用(202002AA100007); 中国国家留学基金(201708535007)。

**【作者简介】** 吴翠(2000—), 女, 硕士, 研究方向: 药剂学。E-mail: 15125227901@163.com

**【通信作者】** 张成桂(1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 昆虫药理学。E-mail: chenggui\_zcg@163.com

databases, and summarize its mechanism of action, with a view to providing a reference for further research on anti-AD drugs.

**[Keywords]** Alzheimer's disease; tryptophan metabolism; research progress

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

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病,通常起病隐匿、缓慢进展,主要表现为逐渐进展的记忆力下降、语言和感官障碍,日常生活能力下降,可伴有精神症状<sup>[1-4]</sup>。AD 发病机制复杂,涉及多个途径和环节,目前仍缺乏有效治疗手段,已成为当今社会人类健康的关注焦点之一。随着经济和社会的快速发展,世界人口在近几十年迅速老龄化,AD 患病率和死亡率持续上升<sup>[3]</sup>。此外,经济调查显示,预计到 2050 年,全球 AD 相关费用所致经济负担将达到 9.12 万亿美元,而中国的经济负担将达到 1.89 万亿美元<sup>[5]</sup>。

近二十年来,全球针对 AD 的研究投入巨大,但其确切的发病机制尚未完全明确,阻碍我们对疾病内在机理的深入了解,同时限制了有效治疗手段的开发。目前市场上针对 AD 的治疗虽能在一定程度上延缓疾病的进展,但效果有限,并且常常伴随着严重的不良反应<sup>[6]</sup>。面对这一严峻局面,迫切需要深入研究以揭示其病理过程,从而推动 AD 研究的突破,为患者带来更有效的治疗手段。

色氨酸 (tryptophan, TRP) 是人体的必需氨基酸,在生物转化、信号转导等方面有着重要作用<sup>[7]</sup>。色氨酸代谢分为 3 个主要途径 (犬尿氨酸途径、5-HT 途径、吲哚途径),通过调节色氨酸代谢的不同途径,可以调控多种生理功能,包括炎症、代谢、免疫反应和神经功能<sup>[8]</sup>。有研究发现,改善生物体内色氨酸代谢的过程,影响其代谢产物,能有效改善脑部的神经炎症,显著改善认知能力,减缓 AD 的进展<sup>[9]</sup>。因此,色氨酸代谢作为主要候选目标和替代的可利用生物分子靶标之一,成为近年来抗 AD 药物的研究热点之一<sup>[10]</sup>。本文对基于色氨酸代谢 3 个主要途径调控 AD 的研究进行初步总结,以期对相关研究提供参考。

## 1 色氨酸代谢与 AD 的关系

AD 的发病机制是一个复杂且尚未完全明确的病理过程。目前,尽管科研人员已经进行了大量的研究,但 AD 的确切病因和发病机制仍不明确。目前解释 AD 的发病机理的假说和理论概述如下:(1) 最为普遍的假说是  $\beta$ -淀粉样蛋白级联假说:大脑中  $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶连续切割淀粉样前体蛋白,引起  $\beta$ -淀

粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 病理性积累,形成具有神经毒性的淀粉样斑块,从而导致神经元损伤和死亡;(2) 另一个重要的发病机制是 tau 蛋白异常磷酸化形成的神经元纤维缠结,与神经元丢失和认知功能损害密切相关<sup>[11-13]</sup>;(3) 全身性炎症也被认为是导致 AD 发病的一个重要因素。

研究表明,人体内的色氨酸水平受多种代谢途径活性的影响,色氨酸代谢途径主要涉及犬尿氨酸、5-HT 和吲哚途径<sup>[14]</sup>。通过调节色氨酸代谢的不同途径,其代谢产物能够显著影响  $A\beta$  的聚集和毒性,并调节炎症反应的强度和特性<sup>[15]</sup>;色氨酸代谢还能够抑制参与  $A\beta$  生物合成的多种酶,其中犬尿氨酸途径 (kynurenine pathway, KP) 的代谢物-3-羟基邻氨基苯甲酸盐能够直接抑制具有神经毒性的  $\beta$ -淀粉样蛋白寡聚化<sup>[16]</sup>。总之,色氨酸代谢在 AD 的发生和发展中发挥着重要作用。

## 2 色氨酸代谢—犬尿氨酸途径

KP 是色氨酸代谢的主要途径 (如图 1),大部分的色氨酸可通过该途径降解为多种生物活性化合物,如犬尿氨酸 (kynurenine, KYN)。吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 和色氨酸 2,3-双加氧酶 (tryptophan, 2,3-dioxygenase, TDO) 是该途径中重要的限速酶,共同催化色氨酸合成 KYN,这两种酶在代谢过程中产生了具有神经活性和抗炎特性的代谢产物,对于维持人体正常的生理功能和疾病状态具有不可忽视的作用。通过调控一种或多种犬尿氨酸途径的酶和代谢物活性,干预犬尿氨酸代谢过程,可对 AD 进行干预和治疗<sup>[17]</sup>。

### 2.1 犬尿酸

N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptors, NMDAR) 是一类受谷氨酸激活的配体门控离子通道受体,通过参与兴奋毒性活动以及认知障碍等病理过程,加快 AD 进展;7-烟碱乙酰胆碱受体 (7-nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha 7nAChR$ ) 涉及神经传递和神经炎症通路,并与 AD 的多个病理途径密切相关<sup>[18]</sup>。NMDAR 和  $\alpha 7nAChR$  表达异常会影响大脑的记忆力,犬尿酸 (kynurenic acid, KYNA) 是 NMDA 和  $\alpha 7nACh$  受体

的拮抗剂,在神经调节过程中发挥着重要作用,由脑内星形胶质细胞合成并释放,参与神经调节,影响认知过程,改善 AD 症状<sup>[18]</sup>。

因此,增加 KYNA 的合成是改善 AD 的重要策略,但是, KYNA 存在通过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的渗透性低、给药效果不显著的局限。Majerova 等<sup>[19]</sup>使用具有相似生物活性但脑渗透性更高的犬尿酸类似物-犬尿酸 N-(2-N,N-二甲基氨基乙基)-4-oxo-1 H-quinoline-2-carboxamid (KYNA-1) 来克服 BBB 限制,发现当长期给药时, KYNA-1 可减少转基因大鼠脑中不溶性 tau 蛋白的过度磷酸化,缓解 AD 进展。而 Pathak 等<sup>[20]</sup>发现生酮饮食 (KD) 会导致腓肠肌 (GTN) 和比目鱼肌中线粒体质量和 KAT 水平特异性增加,血清中犬尿酸 (KYN) 相应减少, KYNA 水平增加,发挥神经保护作用,改善 AD 症状。

Siddiqui 等<sup>[21]</sup>学者通过斑马鱼实验,提出可通过调节 KYNA,帮助干细胞生长和分化,促进新的神经细胞的生成,进而释放神经保护剂或免疫调节因子,恢复 AD 患者认知功能,减少 AD 患者的神经炎症,改善 AD。

## 2.2 喹啉酸

喹啉酸 (quinolinic acid, QUIN) 是一种内源性的兴奋性氨基酸,由巨噬细胞和小胶质细胞通过色氨酸代谢产生, QUIN 既可以增加 tau 蛋白的磷酸化,又可以作为 NMDA 受体激动剂直接产生神经毒性作用<sup>[19]</sup>;还可以作为促炎介质和促氧化分子,造成神经元功能障碍<sup>[22]</sup>,因此, QUIN 通过加剧神经毒性来加快 AD 的进展。

有研究表明,兴奋性氨基酸转运蛋白 (excitatory amino acid transporter, EAAT) 能抑制 QUIN 的摄取<sup>[23]</sup>,将 KP 从神经毒性 QUIN 转向神经保护性 NMDA 受体拮抗剂 KYNA 可能是一种治疗重点,在这一过程中涉及到很多酶及活性物 (如图 1),研究者对此开展了多项实验研究。

### 2.2.1 犬尿酸-3-单加氧酶

犬尿酸-3-单加氧酶 (kynurenine-3 monooxygenase, KMO) 是色氨酸-犬尿酸-喹啉酸代谢通路中的关键酶之一,与犬尿酸氨基转移酶 (kynurenine aminotransferase, KAT) 分支相反, KMO 促进 KYN 羟基化为 3-羟基犬尿酸 (3-hydroxykynurenine, 3-HK), 后者催化 KYN 形成 KYNA。KMO 参与调节犬尿酸及其下游产物的水



注:色氨酸在 IDO 和 TDO 作用下,生成 KYN, KYN 有两条代谢分支,一条是在犬尿酸氨基转移酶 (KAT) 作用下通过转氨基作用催化形成 KYNA,另一条是通过犬尿酸-3-单加氧酶 (KMO) 发生羟化反应形成 3-羟基犬尿酸 (3-HK), 3-HK 在犬尿酸酶 (KYNU) 催化下, C-C 键水解断裂成为 3-羟基-2-氨基苯甲酸 (3-HAA), 3-HAA 最后氧化成神经毒性代谢物 QUIN, QUIN 最终生成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>)。

图 1 犬尿酸途径代谢通路

Note. Tryptophan generates KYN under the action of IDO and TDO, and KYN has two metabolic branches, one of which is catalyzed to form KYNA by transamination under the action of kynurenine aminotransferase (KAT). The other is the hydroxylation of kynurenine-3-monooxygenase (KMO) to form 3-hydroxykynurenine (3-HK), which is catalyzed by kynurenase (KYNU) to hydrolyze and break the C-C bond into 3-hydroxy-2-aminobenzoic acid (3-HAA), and the 3-HAA is finally oxidized into the neurotoxic metabolite QUIN. QUIN eventually produces nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>).

Figure 1 Metabolic pathway of kynurenine pathway

平,包括 QUIN。研究表明,在 AD 患者的脑中, KMO 的活性可能发生改变,导致 QUIN 的积累,加剧 AD 的进展<sup>[24]</sup>。Bonaparte 等<sup>[25]</sup>的研究提示,通过抑制 KMO 可阻断 KYN 下游代谢物的形成,缓解 AD 进程。

因而, KMO 被认为是调节神经活性色氨酸代谢物的可能的理想治疗靶点,但已知的 KMO 抑制剂存在 BBB 渗透性差的问题。Gotina 等<sup>[24]</sup>基于体外荧光测定发现了 6 种新型 KMO 抑制剂,并提出化合物 VS1 和 VS6 可能具有 BBB 渗透性,这一发现有望

克服 KMO 抑制剂的现有局限,促进 AD 药物研发。

### 2.2.2 3-羟基-2-氨基苯甲酸

Sutphin 等<sup>[26]</sup>通过提高 KP 代谢物 3-羟基-2-氨基苯甲酸(3-hydroxy-2-aminobenzoic acid, 3-HAA)的生理水平,将秀丽隐杆线虫的寿命延长约 30%;在食物中长期递送 3-HAA,可延长老年小鼠的寿命;提出 3-HAA 可能通过减少炎症、激活广谱细胞应激反应和增强免疫功能对 AD 的发病过程产生干预作用。

### 2.2.3 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

KP 是色氨酸从头合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>)的唯一代谢途径,喹啉酸磷酸基转移酶是将 QUIN 代谢为 NAD<sup>+</sup>的 KP 的最后一步。NAD<sup>+</sup>的水平会随着年龄的增长而下降,并且与导致神经变性的线粒体功能受损有关,而神经变性是 AD 的一个关键方面。在 NAD<sup>+</sup>补救途径中,主要通过调节 NAD<sup>+</sup>前体烟酰胺、烟酰胺核苷和烟酰胺单核苷酸的下游降解来提高 NAD<sup>+</sup>水平,还可以摄入烟酰胺和调节 KP 来补充 NAD<sup>+</sup>,修复受损的线粒体功能,改善 AD 症状<sup>[27-28]</sup>。

### 2.2.4 其他

Smith 等<sup>[29]</sup>的研究提示,副干酪乳杆菌通过释放血管紧张素(LP-A)改善了果蝇 AD 模型的记忆缺陷。在 Chen 等<sup>[30]</sup>的研究中,敲除 APP/PS1 小鼠半胱氨酰白三烯受体 1(cysteinyl leukotriene receptor 1, CysLT1R)基因后,发现抑制了神经炎症和 KP,说明 CysLT1R 可以介导 AD 发病机制。还有研究指出,富含辣椒素的饮食显著增加了 APP/PS1 小鼠中嗜粘杆菌的相对丰度<sup>[31]</sup>,嗜粘杆菌能增强色氨酸分泌,而上调的色氨酸代谢因子穿过 BBB 并提供神经元保护,改善 AD 症状。

## 3 色氨酸代谢—5-HT 途径

色氨酸通过 5-HT 途径,在色氨酸羟化酶和 5-羟色胺脱羧酶的作用下,导致关键神经递质 5-HT 的产生。5-HT 稳态与 AD 有关,据报道,5-HT 传递信号的中断能增强 A $\beta$  异常积累,A $\beta$  通过 5-HT-5-HT<sub>2C</sub> 受体-PLC-BK 通路破坏小鼠梨状皮质输出的嗅觉信息,加重 AD 症状<sup>[32]</sup>。

5-HT 信号识别受损是小鼠认知受损的途径,有研究指出,激活中缝核 5-HT 神经元可改善小鼠的记忆力<sup>[33]</sup>,5-HT-4R、5-HT 受体和 6-HT 受体的受体激动剂可以降低小鼠模型大脑中 A $\beta$  的脑间质液水

平,通过调节这些受体,可能有助于减轻 AD 症状<sup>[34]</sup>。5-HT 近年来受到越来越多的关注,众多药物研发均聚焦于 5-HT,包括中医药、生物药以及现代药物等。这些药物通过激活 5-HT 途径,调节 5-HT 含量,进而发挥神经保护作用,有效改善 AD 患者的认知缺陷,并提升学习记忆能力。有关这些药物及其作用机制的详细信息,见表 1。

除表 1 中提到的生物药、中医药和现代药物外,还有研究者发现苯并咪唑甲酰胺能有效结合 5-HT<sub>4R</sub> 和 5-HT<sub>7R</sub><sup>[52]</sup>;新型多奈哌齐-查龙-卡巴拉汀杂化物 10c 保护 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 诱导的 PC12 细胞损伤和 HT22 细胞中激活的 UPS 通路,降解 tau 和淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP),显示出显著的神经保护作用<sup>[53]</sup>;低聚半乳糖(galactooligosaccharide, GOS)减少 A $\beta$  负荷和 IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平,调节大脑中神经递质 GABA 和 5-HT 的浓度,这些化合物都可以通过调节 5-HT,改善 AD<sup>[54]</sup>。

## 4 色氨酸代谢—吲哚途径

芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)是脑微血管中色氨酸代谢物的主要靶点,其表达丰富,是一种进化保守的配体激活转录因子,对 APP 具有调节作用,可促进细胞因子的释放,调节肠道稳态。高色氨酸饮食通过上调 AhR 和抑制 NF- $\kappa$ B 通路发挥抗炎作用,改善 AD 症状<sup>[55]</sup>。

色氨酸在肠道微生物群的作用下可以转化为吲哚类物质,吲哚及其衍生物(indol derivatives)有助于维持人体肠道的生物屏障,通过 AhR 介导的多种细胞生理活动参与炎症和抗炎过程,缓解 AD 进展<sup>[56]</sup>。

吲哚类化合物(包括吲哚、吲哚-3-乙酸和吲哚-3-丙酸等)显著增加了 AhR 的表达水平,抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活和 NLRP3 炎症小体的形成,减少了炎症细胞因子的释放,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 IL-18,减轻了 APP/PS1 小鼠的炎症反应,缓解了 AD 的进程(如图 2)<sup>[57]</sup>。

有研究表明,增加脑啡肽酶(enkephalase, NEP)的表达能够改善 AD, Qian 等<sup>[58]</sup>通过建立细胞模型(N2a)和小鼠模型(APP/PS1),发现 AhR 是 NEP 的直接转录因子,激活 AhR 可显著增加 N2a 细胞和 APP/PS1 小鼠中的 NEP 表达和酶活性,促进 A $\beta$  降解,改善 AD。

表 1 生物药、中医药和现代药物调节 5-HT 来调控 AD

Table 1 Biological drugs, traditional Chinese medicine and modern drugs regulate 5-HT to regulate AD

分类 Sort	物质 Matter	作用机制 Action mechanism
生物药 Biological medicine	促红细胞生成素 Erythropoietin	激活 5-HT 途径、抗炎作用和神经源性特征来改善 AD 小鼠的记忆功能 <sup>[35]</sup> Activation of the 5-HT pathway, anti-inflammatory effects, and neurogenic features to improve memory function in AD mice
	突触蛋白 1 Synaptoprotein-1	5-HT、ACh、DA 等神经递质升高,抑制氧化应激和炎症反应 <sup>[36]</sup> 5-HT, ACh, DA and other neurotransmitters increase, inhibiting oxidative stress and inflammatory response
	三碘甲状腺原氨酸 Triiodothyronine	调节参与由 5-HT1A 受体和 5-HT 再摄取介导的 5-HT 相关基因 <sup>[37]</sup> Regulation of 5-HT-related genes involved in 5-HT1A receptor and 5-HT reuptake
	柑橘类黄酮 nobiletin Citrus flavonoid nobiletin	降低在甲基乙二醛 (MG) 作用下升高的 A $\beta$ , 调节 5-HT 再摄取功能 <sup>[38]</sup> Reduce A $\beta$ elevated under methylglyoxal (MG) and regulate 5-HT reuptake function
中药活性成分 Active ingredient of Chinese medicine	大黄素-8-O- $\beta$ -d-吡喃葡萄糖苷 Emodin-8-O- $\beta$ -d-glucopyranoside	选择性地靶向 5-HT1B 并激活 5-HT1B 诱导的信号通路,抑制 TNF- $\alpha$ 水平,保护神经细胞免受 A $\beta$ 诱导的死亡,减轻认知缺陷 <sup>[39]</sup> Selectively targeting 5-HT1B and activating the 5-HT1B-induced signaling pathway inhibits TNF- $\alpha$ levels, protects nerve cells from A $\beta$ -induced death, and alleviates cognitive deficits
	橄榄油多酚 Olive oil polyphenols	促炎细胞因子 (IL-6、IL-8 等) 的释放减少,激活 TREM2 依赖性抗炎途径,增强保护性小胶质细胞活性,对 HT22 细胞毒性产生神经保护作用 <sup>[40]</sup> Release of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, etc.) decreased, activated the TREM2-dependent anti-inflammatory pathway, enhanced the activity of protective microglia, and produced a neuroprotective effect against HT22 cytotoxicity
	洛神花花萼乙醇提取物 Ethanol extract of Roselle calyx	对谷氨酸诱导的 HT22 细胞毒性产生神经保护作用 <sup>[41]</sup> It has neuroprotective effect on HT22 cell toxicity induced by glutamate
	远志皂苷 Senegenin (SEN)	通过 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬保护 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 损伤的 HT22 细胞 <sup>[42]</sup> Mitochondrial autophagy mediated by PINK1/Parkin protects A $\beta$ <sub>1-42</sub> damaged HT22 cells
中药方剂 Traditional Chinese medicine prescription	Miquelianin (槲皮素-3-O- $\beta$ -d-葡萄糖醛酸) Miquelianin (Quercetin-3-O- $\beta$ -d-glucuronide, Q3GA)	促进 HT22 海马细胞的神经突生长,TrkR、PI3K/Akt 增加 <sup>[43]</sup> Promote neurite growth of HT22 hippocampal cells, and increase TrkR and PI3K/Akt
	当归芍药散 Danggui Shaoyao powder	5-HT、ACh、Glu、GABA 和 NE 增加,改善认知缺陷,提高学习和记忆能力 <sup>[44]</sup> Increased concentrations of 5-HT, ACh, Glu, GABA and NE improve cognitive deficits and improve learning and memory
	脑心通胶囊 Naoxintong capsule	炎症细胞因子以及 NF- $\kappa$ B 减少,阻止 HT-22 细胞诱导的细胞毒性 <sup>[45]</sup> Inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B decrease, preventing HT-22 cell-induced cytotoxicity
	蒙药黑苏嘎-25 Mongolian medicine black suka-25	5-HT、ACh、NE 及 DA 增加,改善 AD <sup>[46]</sup> Contents of 5-HT, ACh, NE and DA were increased, and AD was improved
中医其他治疗 Other treatment of Chinese medicine	电针 Electroacupuncture	降低 AD 大鼠结肠 5-HT 水平,增加了海马 5-HT 水平;抑制海马 JNK 通路 5-HT6R、JNK、c-JUN 和 pc-Jun 相关蛋白的表达 <sup>[47]</sup> Level of 5-HT in the colon of AD rats was decreased, and the level of 5-HT in the hippocampus was increased. Expression of 5-HT6R, JNK, c-JUN and PC-Jun-related proteins in hippocampal JNK pathway was inhibited
	艾烟 Mugwort	调节海马组织中神经递质 5-HT、Glu、DA 的含量,从而提高快速衰老小鼠的学习记忆能力 <sup>[48]</sup> Regulate the content of 5-HT, Glu and DA in hippocampus, thereby improving the learning and memory ability of rapidly aging mice
现代药物 Modern medicine	阿立哌唑 Aripiprazole	激活多巴胺 D2 和 5-HT1A,减轻链脲佐菌素诱导的认知缺陷 <sup>[49]</sup> Activation of dopamine D2 and 5-HT1A alleviates streptozotocin induced cognitive deficits
	地氯雷他定 Desloratadine	促进小胶质 A $\beta$ 吞噬作用,减少淀粉样蛋白斑沉积,通过 5-HT2AR/Camp/PKA/CREB/Sirt1 途径刺激自噬过程并抑制神经炎症 <sup>[50]</sup> Promote microglia A $\beta$ phagocytosis, reduce amyloid plaque deposition, stimulate autophagy process and inhibit neuroinflammation through 5-HT2AR/Camp/PKA/CREB/Sirt1 pathway
	恩替司他 Entirestat	恢复 5-HT2A 和 D2R 表达,减轻利培酮引起的运动副作用(锥体外系反应) <sup>[51]</sup> Restore 5-HT2A and D2R expression and reduce risperidone-induced movement side effects (extrapyramidal reactions)

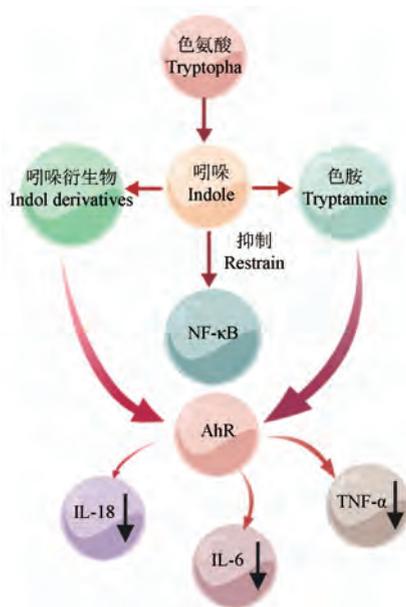


图 2 吲哚途径代谢通路

Figure 2 Indole pathway metabolic pathway diagram

## 5 基于色氨酸代谢探讨 AD 的治疗及研究方法

目前,治疗 AD 的药物主要包括胆碱酯酶抑制剂(如多奈哌齐、卡巴拉汀)和 NMDA 受体拮抗剂(如美金刚)等,这些药物疗效有限且副作用明显,急需研究开发新的药物。中医药具有多成分、多途径、多靶点的作用特点,在长期临床实践中,表现出较好的临床疗效和应用潜力。鉴于 AD 的复杂性和多因素病理机制,中医药在临床应用中,对 AD 患者发挥协同干预作用,展现其独特优势。

研究表明,中医药可通过调节色氨酸代谢途径,改善 AD 症状。例如,人参-五味子药对通过影响色氨酸代谢途径,调节异常能量代谢、减轻炎症、调节肠道菌群和神经递质<sup>[59]</sup>;定植消丸通过影响色氨酸代谢途径介导抗氧化应激、调节能量代谢、改善肠道微生物和保护神经细胞<sup>[60]</sup>;黄连解毒汤干扰色氨酸代谢减轻氧化应激、炎症、神经递质和能量代谢,改善 AD 小鼠模型中的学习和记忆缺陷<sup>[61-62]</sup>;补肾天髓方通过参与色氨酸代谢、亚油酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等相关通路,减轻炎症<sup>[63]</sup>。

此外, Kim 等<sup>[64]</sup>提出 Woohwangchungsimwon (WCW, 东亚国家用于治疗中枢神经系统疾病的传统药物)和多奈哌齐联合治疗,改变了色氨酸合成、代谢的相关途径,改善了认知功能; Bosch 等<sup>[65]</sup>研究

证明源自海洋的寡糖 GV-971 能通过影响色氨酸代谢途径,降低斑块病理学和神经炎症特征。以上都能通过调节色氨酸代谢,缓解 AD 发病进程,改善 AD 症状,研究者从此入手,或许是 AD 的一个转折点。

目前基于色氨酸代谢对 AD 的研究技术,除了常规的方法外,还有:(1)网络药理学技术-分子对接:通过分子对接技术预测药物分子与生物大分子的相互作用,如 Satarker 等<sup>[66]</sup>预测了某些化合物抑制 AD 神经炎症的能力;(2)代谢组学:通过分析生物体代谢产物的变化来了解生理状态, Yu 等<sup>[67]</sup>基于尿液代谢组学,描述 APP 小鼠的代谢变化和潜在的早期生物标志物,发现色氨酸代谢途径受到干扰,提供了 AD 疾病发生的早期指标;(3)高通量测序:用于大规模分析基因组和转录组, Wang 等<sup>[68]</sup>通过高通量测序,发现术后认知功能障碍和 AD 可能共享相同的色氨酸代谢途径。这些研究方法各有优势,网络药理学提供了疾病网络的系统视角,代谢组学可以直接检测反映 AD 疾病状态的生物标志物的动态变化,而高通量筛选技术则促进了药物的研发,缩短了新药研发周期。这三者相互补充,共同推进色氨酸代谢在 AD 的研究,深化了对 AD 发病机制的认识,也为治疗提供了有力的理论支持。

## 6 总结和展望

色氨酸代谢与 AD 的发生发展密切相关。色氨酸主要通过 3 个不同的代谢途径来调控 AD:在犬尿氨酸途径中,通过调节酶转化影响认知功能正常作用;在 5-HT 途径中,通过调节 5-HT 的分泌,调控 AD 的发生发展;在吲哚途径中,调节 AhR,减少炎症细胞因子的释放。

目前该研究领域仍存在一些不足:通过调节色氨酸代谢-犬尿氨酸途径中的 KYNA 和 QUIN 能增强神经保护作用 and 减弱神经毒性作用,但目前仍缺乏明确的认识,多数研究主要聚焦于代谢途径中涉及的酶转化和酶组成的调控,对于代谢调控机制的研究仍不够深入。因此,需要进一步探索色氨酸代谢在 AD 中的调控机制,以更全面地理解其病理过程,并为疾病的治疗提供新的思路。

此外,对基于色氨酸代谢调控 AD 的研究也待深入,通过严谨的科学研究和临床试验,评估色氨酸代谢,3 个途径中提到的各种干预措施在 AD 上的效果,将这些干预策略进一步转化为临床治疗手

段,从而用于治疗 AD。此外,也可以考虑通过结合基于饮食的方法和生活方式干预来预防认知能力下降和延缓 AD 的进展。

最后,经过对文献的检索与分析,基于中医药探讨色氨酸代谢在 AD 调控中的研究,对于 AD 新药的开发以及作用机制的探索具有重要的参考价值,有望为 AD 的治疗提供新的思路与策略。但这一领域的探索研究的深度仍明显不足,亟待进一步深入探索其确定的作用机制。

色氨酸代谢可产生各种生物活性代谢产物,今后的研究中,可以通过基于粪便、血浆、尿液和组织的代谢组学技术鉴定与疾病表型相关的特定代谢物,将代谢组和机制联系起来,进行深入分析,以发现潜在的联系机制,提高 AD 治疗效果并实现精准医疗。

#### 参考文献:

[ 1 ] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.

[ 2 ] 韩英妹, 李一杰, 张衡, 等. 基于 MRI 分析阿尔茨海默病大尺度脑网络研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2024, 40(4): 575-579.

HAN Y M, LI Y J, ZHANG H, et al. Research progress of large-scale brain network of Alzheimer's disease based on MRI analysis [J]. *J Pract Med*, 2024, 40(4): 575-579.

[ 3 ] 李俊彦, 余梦擎, 杨琳琳, 等. 阿尔茨海默病与 microRNA-206 基因多态性的关系 [J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(20): 2545-2548.

LI J Y, YU M Q, YANG L L, et al. Association between microRNA-206 gene polymorphisms and Alzheimer's disease [J]. *J Pract Med*, 2022, 38(20): 2545-2548.

[ 4 ] 罗卓慧, 庞硕, 张连峰. CREB 通过调节突触可塑性调节记忆及与阿尔茨海默病的联系 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 104-109.

LUO Z H, PANG S, ZHANG L F. Advances of CREB in the regulation of memory through synaptic plasticity and its relationship with Alzheimer's disease [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(11): 104-109.

[ 5 ] REN R, QI J, LIN S, et al. The China alzheimer report 2022 [J]. *Gen Psychiatr*, 2022, 35(1): e100751.

[ 6 ] WEI N, LIU H, YE W, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation may be superior to drug therapy in the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and Bayesian network meta-analysis [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(10): 2912-2924.

[ 7 ] SUN P, WANG M, LIU Y X, et al. High-fat diet-disturbed gut microbiota-colonocyte interactions contribute to dysregulating peripheral tryptophan-kynurenine metabolism [J]. *Microbiome*,

2023, 11(1): 154.

[ 8 ] XUE C, LI G, ZHENG Q, et al. Tryptophan metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(8): 1304-1326.

[ 9 ] GUO X, LI C, ZHANG J, et al. Chiral nanoparticle-remodeled gut microbiota alleviates neurodegeneration via the gut-brain axis [J]. *Nat Aging*, 2023, 3(11): 1415-1429.

[ 10 ] FATHI M, VAKILI K, YAGHOOBPOOR S, et al. Dynamic changes in metabolites of the kynurenine pathway in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 997240.

[ 11 ] MEIER-STEPHENSON F S, MEIER-STEPHENSON V C, CARTER M D, et al. Alzheimer's disease as an autoimmune disorder of innate immunity endogenously modulated by tryptophan metabolites [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 8(1): e12283.

[ 12 ] EVERING T H, MARSTON J L, GAN L, et al. Transposable elements and Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Trends Neurosci*, 2023, 46(3): 170-172.

[ 13 ] 郝婧雯, 邓炎尧, 谢君, 等. MicroRNA-9-5p 通过抑制 Tau 磷酸化参与阿尔茨海默病的机制 [J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(18): 2296-2302.

HAO J W, DENG Y Y, XIE J, et al. MicroRNA-9-5p involves in Alzheimer's disease by inhibiting Tau phosphorylation [J]. *J Pract Med*, 2022, 38(18): 2296-2302.

[ 14 ] HADUCH A, BROMEK E, KUBAN W, et al. The engagement of cytochrome P450 enzymes in tryptophan metabolism [J]. *Metabolites*, 2023, 13(5): 629.

[ 15 ] 王丽群, 庞日朝, 胡晓敏, 等. 肠道菌群对色氨酸代谢的影响研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(4): 129-136.

WANG L Q, PANG R C, HU X M, et al. Research progress on the effect of gut microbiota on tryptophan metabolism [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(4): 129-136.

[ 16 ] SAVONIJE K, WEAVER D F. The role of tryptophan metabolism in Alzheimer's disease [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(2): 292.

[ 17 ] BISWAS P, DAI Y, STUEHR D J. Indoleamine dioxygenase and tryptophan dioxygenase activities are regulated through GAPDH- and Hsp90-dependent control of their heme levels [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 180: 179-190.

[ 18 ] MARTOS D, TUKA B, TANAKA M, et al. Memory enhancement with kynurenic acid and its mechanisms in neurotransmission [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(4): 849.

[ 19 ] MAJEROVA P, OLESOVA D, GOLISOVA G, et al. Analog of kynurenic acid decreases tau pathology by modulating astrogliosis in rat model for tauopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113257.

[ 20 ] PATHAK S J, ZHOU Z, STEFFEN D, et al. 2-month ketogenic diet preferentially alters skeletal muscle and augments cognitive function in middle aged female mice [J]. *Aging Cell*, 2022, 21

- (10): e13706.
- [21] SIDDIQUI T, BHATTARAI P, POPOVA S, et al. KYNA/ahr signaling suppresses neural stem cell plasticity and neurogenesis in adult zebrafish model of Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2748.
- [22] HESTAD K, ALEXANDER J, ROOTWELT H, et al. The role of tryptophan dysmetabolism and quinolinic acid in depressive and neurodegenerative diseases [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 998.
- [23] BRAIDY N, ALICAJIC H, POW D, et al. Potential mechanism of cellular uptake of the excitotoxin quinolinic acid in primary human neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(1): 34–54.
- [24] GOTINA L, SEO S H, KIM C W, et al. Pharmacophore-based virtual screening of novel competitive inhibitors of the neurodegenerative disease target kynurenine-3-monooxygenase [J]. *Molecules*, 2021, 26(11): 3314.
- [25] BONAPARTE J, COOK M, DIXON S, et al. Kynurenine metabolites induce microglial cell senescence and stimulate neuroinflammation [J]. *Innov Aging*, 2023, 7: 1073.
- [26] SUTPHIN G, DANG H, ESPEJO L, et al. Targeting kynurenine metabolism to reduce inflammation and enhance stress response during aging [J]. *Innov Aging*, 2021, 5: 682.
- [27] VAN DER VELPEN V, ROSENBERG N, MAILLARD V, et al. Sex-specific alterations in NAD<sup>+</sup> metabolism in 3xTg Alzheimer's disease mouse brain assessed by quantitative targeted LC-MS [J]. *J Neurochem*, 2021, 159(2): 378–388.
- [28] DAVID A J. Probable causes of Alzheimer's disease [J]. *Sci*, 2021, 3(1): 16.
- [29] SMITH C A, SMITH H, ROBERTS L, et al. Probiotic releasing angiotensin (1–7) in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease produces sex-specific effects on cognitive function [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 85(3): 1205–1217.
- [30] CHEN F, FANG S, DU Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated CysLT1R deletion reverses synaptic failure, amyloidosis and cognitive impairment in APP/PS1 mice [J]. *Aging*, 2021, 13(5): 6634–6661.
- [31] LI J, LIAO X, YIN X, et al. Gut microbiome and serum metabolome profiles of capsaicin with cognitive benefits in APP/PS1 mice [J]. *Nutrients*, 2022, 15(1): 118.
- [32] WANG X, HU M, XIE Q, et al. Amyloid  $\beta$  oligomers disrupt piriform cortical output via a serotonergic pathway [J]. *Neurobiol Aging*, 2023, 121: 64–77.
- [33] WANG J, MEI Y, ZHANG X, et al. Aberrant serotonergic signaling contributes to the hyperexcitability of CA1 pyramidal neurons in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(3): 112152.
- [34] WHILEY L, CHAPPELL K E, D'HONDT E, et al. Metabolic phenotyping reveals a reduction in the bioavailability of serotonin and kynurenine pathway metabolites in both the urine and serum of individuals living with Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2021, 13(1): 20.
- [35] SHIM K H, HA S, CHOUNG J S, et al. Therapeutic effect of erythropoietin on Alzheimer's disease by activating the serotonin pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8144.
- [36] MA W, LU K, LIANG H M, et al. Synapsin 1 ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation in rats with Alzheimer's disease: an experimental and bioinformatics study [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2023, 20(9): 648–659.
- [37] MAGLIONE A V, DO NASCIMENTO B P P, RIBEIRO M O, et al. Triiodothyronine treatment reverses depression-like behavior in a triple-transgenic animal model of Alzheimer's disease [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(8): 2735–2750.
- [38] WEI C C, LI S W, WU C T, et al. Dietary methylglyoxal exposure induces Alzheimer's disease by promoting amyloid  $\beta$  accumulation and disrupting autophagy in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(32): 10011–10021.
- [39] YANG Y, ZHANG L, YU J, et al. A novel 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist of herbal compounds and one of the therapeutic uses for Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 735876.
- [40] LERI M, VASARRI M, CARNEMOLLA F, et al. EVOO polyphenols exert anti-inflammatory effects on the microglia cell through TREM2 signaling pathway [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(7): 933.
- [41] SHEEJA M D, IYER P M, MICHAEL B J, et al. *Hibiscus sabdariffa* extract protects HT-22 cells from glutamate-induced neurodegeneration by upregulating glutamate transporters and exerts lifespan extension in *C. elegans* via DAF-16 mediated pathway [J]. *Nutr Healthy Aging*, 2021, 6(3): 229–247.
- [42] TIAN Y, QI Y, CAI H, et al. Senegenin alleviates A $\beta$ <sub>1-42</sub> induced cell damage through triggering mitophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295: 115409.
- [43] LEE Y J, CHEN S R, KO P E, et al. Quercetin-3-O- $\beta$ -d-glucuronide in the nuciferine leaf polyphenol extract promotes neurogenesis involving the upregulation of the tropomyosin receptor kinase (trk) receptor and AKT/Phosphoinositide 3-Kinase signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(42): 15582–15592.
- [44] WANG F G, SUN Y, CAO J, et al. Effects of Danggui-Shaoyao-San on central neuroendocrine and pharmacokinetics in female ovariectomized rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116609.
- [45] WANG X, YIN Z, CAO P, et al. NaoXinTong Capsule ameliorates memory deficit in APP/PS1 mice by regulating inflammatory cytokines [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110964.
- [46] 杨玉秋, 高玉峰, 王澈力莫格. 蒙药黑苏嘎-25 促进神经元骨架蛋白表达提高神经递质含量改善阿尔茨海默病小鼠症状 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2023, 39(2): 153–158.
- YANG Y Q, GAO Y F, WANG C. Mongolian medicine Heisuga-25 promotes the expression of neuroskeletal protein, increases the content of neurotransmitter and improves the symptoms of Alzheimer's disease in mice [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 39(2): 153–158.
- [47] XIAO M, WANG X S, HE C, et al. The gut-brain axis: Effect

- of electroacupuncture pretreatment on learning, memory, and JNK signaling in D-galactose-induced AD-like rats [J]. Iran J Basic Med Sci, 2023, 26(5): 532-539.
- [48] 左滢竹, 林瑶, 哈略, 等. 艾烟经嗅觉途径对快速老化小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国针灸, 2023, 43(7): 800-806.
- ZUO Y Z, LIN Y, HA L, et al. Effects of moxa smoke through olfactory pathway on learning and memory ability in rapid aging mice [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2023, 43(7): 800-806.
- [49] GUPTA T, SINGH V, HEFNAWY M, et al. Ameliorating the role of aripiprazole in memory deficits induced by intracerebroventricular streptozotocin-induced dementia of Alzheimer's type [J]. ACS Omega, 2023, 8(28): 25295-25302.
- [50] LU J, ZHANG C, LV J, et al. Antiallergic drug desloratadine as a selective antagonist of 5HT<sub>2A</sub> receptor ameliorates pathology of Alzheimer's disease model mice by improving microglial dysfunction [J]. Aging Cell, 2021, 20(1): e13286.
- [51] RODRIGUEZ G, FISHER D W, MCCLARTY B, et al. Histone deacetylase inhibitors mitigate antipsychotic risperidone-induced motor side effects in aged mice and in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Front Psychiatry, 2022, 13: 1020831.
- [52] BELINSKAIA D A, VORONINA P A, KRIVOROTOV D V, et al. Anticholinesterase and serotonergic evaluation of benzimidazole-carboxamides as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease [J]. Pharmaceutics, 2023, 15(8): 2159.
- [53] SANG Z, BAI P, BAN Y, et al. Novel donepezil-chalcone-rivastigmine hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's agents: Design, synthesis, *in vitro* biological evaluation, *in vivo* and *in silico* studies [J]. Bioorg Chem, 2022, 127: 106007.
- [54] ZHANG S, LV S, LI Y, et al. Prebiotics modulate the microbiota-gut-brain axis and ameliorate cognitive impairment in APP/PS1 mice [J]. Eur J Nutr, 2023, 62(7): 2991-3007.
- [55] PAN S, ZHANG Y, YE T, et al. A high-tryptophan diet alleviated cognitive impairment and neuroinflammation in APP/PS1 mice through activating aryl hydrocarbon receptor via the regulation of gut microbiota [J]. Mol Nutr Food Res, 2024, 68(2): e2300601.
- [56] KESHAVARZI M, MORADBEGYI F, MOBINI K, et al. The interplay of aryl hydrocarbon receptor/WNT/CTNNB1/Notch signaling pathways regulate amyloid beta precursor mRNA/protein expression and effected the learning and memory of mice [J]. Toxicol Res, 2022, 11(1): 147-161.
- [57] SUN J, ZHANG Y, KONG Y, et al. Microbiota-derived metabolite Indoles induced aryl hydrocarbon receptor activation and inhibited neuroinflammation in APP/PS1 mice [J]. Brain Behav Immun, 2022, 106: 76-88.
- [58] QIAN C, YANG C, LU M, et al. Activating AhR alleviates cognitive deficits of Alzheimer's disease model mice by upregulating endogenous A $\beta$  catabolic enzyme Nephrylsin [J]. Theranostics, 2021, 11(18): 8797-8812.
- [59] WANG A, PI Z, LIU S, et al. Mass spectrometry-based urinary metabolomics for exploring the treatment effects of *Radix ginseng-Schisandra chinensis* herb pair on Alzheimer's disease in rats [J]. J Sep Sci, 2021, 44(16): 3158-3166.
- [60] HE Y, WANG Y, LIU S, et al. A metabolomic study of the urine of rats with Alzheimer's disease and the efficacy of Ding-Zhi-Xiao-Wan on the afflicted rats [J]. J Sep Sci, 2020, 43(8): 1458-1465.
- [61] SUN L M, ZHU B J, CAO H T, et al. Explore the effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on Alzheimer's disease by UPLC-QTOF/MS-based plasma metabolomics study [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 151: 75-83.
- [62] GU X, ZHAO H, ZHOU J, et al. Effects of Huang-Lian-Jie-du Decoction on oxidative stress and AMPK-SIRT1 pathway in Alzheimer's disease rat [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 6212907.
- [63] ZHANG Z, YI P, YANG J, et al. Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of Bushen Tiansui formula on Alzheimer's disease [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112371.
- [64] KIM J S, KIM M G, RYU J E, et al. Effect of woohwangchungsimwon and donepezil co-treatment on cognitive function and serum metabolic profiles in a scopolamine-induced model of Alzheimer's disease [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 3): 117359.
- [65] BOSCH M E, DODIYA H B, MICHALKIEWICZ J, et al. Sodium oligomannate alters gut microbiota, reduces cerebral amyloidosis and reactive microglia in a sex-specific manner [J]. Mol Neurodegener, 2024, 19(1): 18.
- [66] SATARKER S, MAITY S, MUDGAL J, et al. *In silico* screening of neurokinin receptor antagonists as a therapeutic strategy for neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Mol Divers, 2022, 26(1): 443-466.
- [67] YU J, KONG L, ZHANG A, et al. High-throughput metabolomics for discovering potential metabolite biomarkers and metabolic mechanism from the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> transgenic model of Alzheimer's disease [J]. J Proteome Res, 2017, 16(9): 3219-3228.
- [68] WANG Y W, WANG L, YUAN S J, et al. Postoperative cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: a transcriptome-based comparison of animal models [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 900350.

黄依桢,程浩,王浩伟,等. 星形胶质细胞在创伤性脑损伤中的作用及治疗策略 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 84-90.

Huang YZ, Cheng H, Wang HW, et al. Role of astrocytes in traumatic brain injury and therapeutic strategies [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 84-90.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.011

# 星形胶质细胞在创伤性脑损伤中的作用及治疗策略

黄依桢,程浩,王浩伟,张千遥,罗承良\*,曾晓锋\*

(昆明医科大学法医学院,昆明 650500)

**【摘要】** 创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是由外力因素直接或间接作用引起的脑组织结构或功能缺失的损伤。星形胶质细胞(astrocytes, AS)作为中枢神经系统的稳态细胞,在TBI早期阶段迅速增殖、活化,参与损伤后的神经炎症、血脑屏障破坏、胶质瘢痕形成、兴奋性毒性等一系列病理过程,在TBI的继发性神经损伤中扮演至关重要的角色。本文综述了星形胶质细胞在TBI损伤修复过程中的作用,旨在为TBI的预防和治疗提供新策略。

**【关键词】** 星形胶质细胞;创伤性脑损伤;损伤机制;治疗策略

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0084-07

## Role of astrocytes in traumatic brain injury and therapeutic strategies

HUANG Yizhen, CHENG Hao, WANG Haowei, ZHANG Qianyao, LUO Chengliang\*, ZENG Xiaofeng\*

(School of Forensic Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**【Abstract】** Traumatic brain injury (TBI) is caused by the direct or indirect effects of external factors that result in structural or functional loss of brain tissue. Astrocytes are homeostatic cells in the central nervous system that proliferate and activate rapidly in the early stages of TBI. They then participate in a series of pathological processes, such as neuroinflammation, blood-brain barrier disruption, glial scarring, and excitotoxicity after injury, and thus play a crucial role in secondary neurological injury following TBI. This paper reviews the role of astrocytes in the repair of TBI damage, with the aim of providing new strategies for the prevention and treatment of TBI.

**【Keywords】** astrocytes; traumatic brain injury; mechanism of injury; therapeutic strategies

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

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是由外力作用引起的脑组织结构破坏和生理功能障碍性疾病,具有高发病率和高治疗负担的特点。在中国,以人群为基础的TBI死亡率约达到每10万人中有13例<sup>[1]</sup>。TBI根据损伤进程及病理变化可分

为原发性和继发性损伤。原发性损伤由外力作用直接引起脑挫伤、弥漫性轴索损伤等;继发性损伤是原发性损伤后在分子和细胞水平上引起的一系列反应如自由基生成、兴奋性毒性、线粒体功能障碍、神经炎症反应等,进而导致以脑水肿、脑出血等

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82271409);昆明医科大学研究生创新基金项目(2024S188)。

**【作者简介】** 黄依桢(1997—),女,硕士,研究方向:创伤性脑损伤基础机制研究。E-mail: yizhenhuang2022@163.com

**【通信作者】** 曾晓锋(1977—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:毒品神经毒性及成瘾机制的研究。E-mail: zxf2004033@163.com

罗承良(1983—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:颅脑损伤认知行为异常机制与生物标志物筛选研究。

E-mail: luochengliang@kmmu.edu.cn\* 共同通信作者

症状为主的继发性改变<sup>[2-4]</sup>。TBI 幸存者后期会伴有不同程度的运动功能障碍,空间记忆能力下降,认知缺陷,甚至在损伤后期发展为神经退行性疾病,继发性损伤是导致 TBI 后神经功能缺陷和认知功能障碍的关键机制,而星形胶质细胞作为中枢神经系统最大的胶质细胞群,在中枢神经系统防御和稳态平衡中扮演至关重要的角色。

## 1 星形胶质细胞简介

星形胶质细胞(astrocyte, AS)广泛存在于大脑和脊髓中,是中枢神经系统数量最多的神经胶质细胞。生理状态下,AS 感知神经递质并对胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的增加做出反应,通过释放胶质递质参与维持中枢神经系统的稳态;AS 还是中枢神经系统糖原的主要储存细胞,通过糖异生途径生成乳酸为神经元提供能量需求和营养支持;此外,AS 还参与血脑屏障的形成;调节神经元内外离子浓度、pH 及水分的动态平衡;维持细胞间通讯的稳定;其通过终足包绕神经元形成三突触结构、参与调节突触可塑性等多种生理功能<sup>[5-7]</sup>。在脑损伤或外源性刺激下 AS 可活化为反应性星形胶质细胞,表现为细胞胞体肿胀肥大,突起延长、细胞增殖迁移,分泌炎症介质和神经营养因子并高表达 GFAP 和波形蛋白<sup>[8]</sup>。异常的星形胶质细胞信号可引起或促成突触和递质网络的失衡,导致认知和记忆障碍。研究表明,抑制 AS 分泌的 D-丝氨酸会触发海马和前额叶皮质  $\theta$  振荡的严重不同步,从而损害空间记忆和长期记忆<sup>[9]</sup>。因此,了解星形胶质细胞的病理生理特点可能有助于维持大脑的正常功能和预防 TBI 后的神经损伤及神经功能损害。

## 2 星形胶质细胞与 TBI 的关系

### 2.1 星形胶质细胞参与神经炎症

神经炎症是脑损伤的危险因素之一,传统研究认为 TBI 的炎症主要由小胶质细胞调控,最新研究表明反应性 AS 的活化在中枢神经炎症中也发挥重要作用。Landhuis<sup>[10]</sup>发现神经炎症和缺血损伤可诱导两种不同的反应性 AS,分别命名为“A1”和“A2”型星形胶质细胞。A1 型 AS 吞噬能力减弱,失去促突触形成的能力,其激活促进炎症因子和神经毒性介质的分泌,诱发神经炎症,加剧脑组织损伤,具有神经毒性;A2 型 AS 能激活小胶质细胞并促进抗炎因子和神经生长因子分泌,参与神经元再生与修复

功能<sup>[11-12]</sup>。Myer 等<sup>[13]</sup>证实 AS 的消融导致受控皮质挫伤小鼠更为严重的炎症反应。研究表明,反应性 AS 通过分泌细胞因子、趋化因子、补体复合物、MMP-9/危险相关分子模式(HMGB1、热休克蛋白和 S100 蛋白)等多种生物活性成分,直接参与调控 TBI 后的炎症形成<sup>[14-15]</sup>。此外,AS 作为小胶质细胞活化的调节剂,参与神经炎症的调控。研究表明,AS 分泌的趋化因子 CCL7 诱导 TBI 大鼠小胶质细胞激活和促炎介质释放,加剧炎症发展<sup>[16]</sup>。反应性 AS 来源的脂质运载蛋白 2(LCN2)通过诱导促炎小胶质细胞活化,并抑制其神经营养作用,加剧神经炎症<sup>[17]</sup>。然而,关于 AS 在神经炎症中的作用,也有一些研究得到不同结果。AS 来源的外泌体 lncRNA4933431K23Rik 通过上调 Smad7 来减弱 TBI 后小胶质细胞的激活,从而抑制过度的神经炎症<sup>[18]</sup>。研究发现,反应性 AS 通过特异性表达 PD-L1 来调节免疫细胞活动从而对抗 TBI 后的神经炎症<sup>[19]</sup>。综上所述,星形胶质细胞在 TBI 后神经炎症中具有抗炎和促炎的双重角色:一方面分泌的抗炎因子和外泌体可以促进受损神经组织的修复;另一方面通过产生促炎因子、活性氧等多种神经毒性物质加剧神经炎症,此外,星形胶质细胞还可通过与小胶质细胞相互作用,参与炎症反应的进程。

### 2.2 星形胶质细胞维持血脑屏障功能

血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)损伤可引起脑水肿、脑肿胀及脑出血等,是 TBI 预后不良的主要原因之一,其结构功能的破坏被认为是 TBI 损伤严重程度和恢复时间的关键因素。AS 参与构成的神经血管单位(NVU)参与维持 BBB 完整性和稳定性,在维持血脑屏障平衡中发挥重要作用。研究证明,S1PR1 激动剂 FTY720 通过减弱 AS 活化来恢复 TBI 后 NVU 的结构,从而改善 BBB 功能<sup>[20]</sup>。在液击冲击损伤(fluid percussion injury, FPI)模型小鼠中发现,抑制反应性 AS 后血管内皮生长因子(VEGF)表达减轻了 BBB 损伤程度<sup>[21-22]</sup>。在小鼠受控皮质冲击(controlled cortical impact, CCI)模型中发现,抑制 AS 中高表达的磷酸酶肌动蛋白调节因子 1(PHACTR-1)可减少紧密连接蛋白表达和脑水肿<sup>[23]</sup>。另外,水通道蛋白 AQP4 在 TBI 后高表达,而在 AS 中 AQP4 缺失可促进 BBB 结构完整性并改善 TBI 后脑水肿及炎症反应<sup>[24-25]</sup>。过表达 H2 受体则促进星形胶质细胞血管生成素-1(Ang-1)和音猬因子(SHH)的表达水平,减轻 BBB 的损伤程度<sup>[26]</sup>。

综上研究提示,AS 在血脑屏障中发挥着双重作用,它不仅破坏血脑屏障的完整性,其分泌的血管保护因子和表达的受体还可促进血脑屏障的恢复(图 1)。

### 2.3 星形胶质细胞参与胶质瘢痕形成

脑外伤后 AS 活化,增殖肥大的 AS 与去极化的损伤神经元动态缠绕形成胶质瘢痕,包围损伤组织和渗出炎症细胞,限制炎症扩散。然而胶质瘢痕过度形成能够抑制神经元和突触发生,是影响 TBI 后期神经功能恢复的巨大阻碍。有研究报道,*SOX2* 特异性敲除显著抑制反应性 AS 活化,限制胶质界限的形成并改善行为缺陷<sup>[27]</sup>。在小鼠 TBI 模型中,上调的肌动蛋白结合蛋白(Drebrin)可通过控制反应性 AS 的增生形成胶质瘢痕,从而保护易感的中枢神经系统免受脑损伤;而 Drebrin 蛋白缺失导致胶质瘢痕形成和过度的神经退行性病变<sup>[28]</sup>。此外,星形胶质细胞向脑损伤部位的迁移是胶质瘢痕形成的关键步骤,而水通道蛋白 AQP4 在 AS 的迁移中至关重要(图 1)。研究表明,AQP4 敲除小鼠的星形胶质细胞其水渗透性和迁移能力均减弱,AQP4 的缺失减少了反应性星形胶质细胞的数量和胶质瘢痕形成<sup>[29-30]</sup>。

### 2.4 星形胶质细胞调节兴奋性毒性

谷氨酸介导的兴奋性毒性是 TBI 后的继发性损伤之一,过量谷氨酸蓄积将会持续刺激突触后膜上的谷氨酸受体(NMDAR、AMPA、mGluR 等),引起胞内  $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$  增加,进一步导致线粒体功能异常、活性氧生成增加、NO 释放以及细胞毒性水肿等一

系列病理生理过程,最终造成神经元损伤或死亡<sup>[31]</sup>,及时清除突触间隙内过量的谷氨酸是减轻脑损伤后神经元兴奋性损伤的重要策略。在脑损伤 48 h 内检测到人体脑脊液中谷氨酸水平增加,同时 GluCEST 成像扫描结果显示,急性 TBI 期谷氨酸水平与损伤后 1 个月的认知功能密切相关<sup>[32-33]</sup>。另一项针对 165 名重度 TBI 患者的前瞻性研究表明,TBI 后具有较高谷氨酸水平或谷氨酸水平持续升高的患者死亡率更高<sup>[34]</sup>。谷氨酸转运体负责将突触间隙中的谷氨酸转移至 AS,在谷氨酰胺合成酶的作用下谷氨酸被催化为谷氨酰胺,从而减轻兴奋性毒性。AS 内的谷氨酸转运体参与包括皮质、海马在内的几个大脑区域中 95% 的谷氨酸吸收。王琦<sup>[35]</sup>发现,神经元与 AS 共培养后,能耐受更高的谷氨酸浓度且具有更低的细胞死亡率,而高谷氨酸水平组神经元的 GLT-1 表达降低。由此可见,增强 AS 谷氨酸转运体的功能可能是有效减轻兴奋性毒性的关键。研究表明 Arundic acid 增强星形胶质细胞谷氨酸转运体 EAAT1 的功能和表达,从而改善脑损伤<sup>[36]</sup>。此外,研究发现鸟苷(guanosine)治疗可通过激活 PI3K 信号通路恢复 TBI 后谷氨酸摄取的抑制和谷氨酸转运体活性,减少 ROS 生成并维持线粒体活性<sup>[37]</sup>。综上所述,靶向调控星形胶质细胞内的谷氨酸转运体 GLAST 和 GLT-1 的功能及活性是防治 TBI 后兴奋性毒性的关键(图 1)。

### 2.5 星形胶质细胞调控突触功能

星形胶质细胞对损伤后凋亡细胞和突触碎片的吞噬作用在促进脑功能恢复发挥有益功能。有

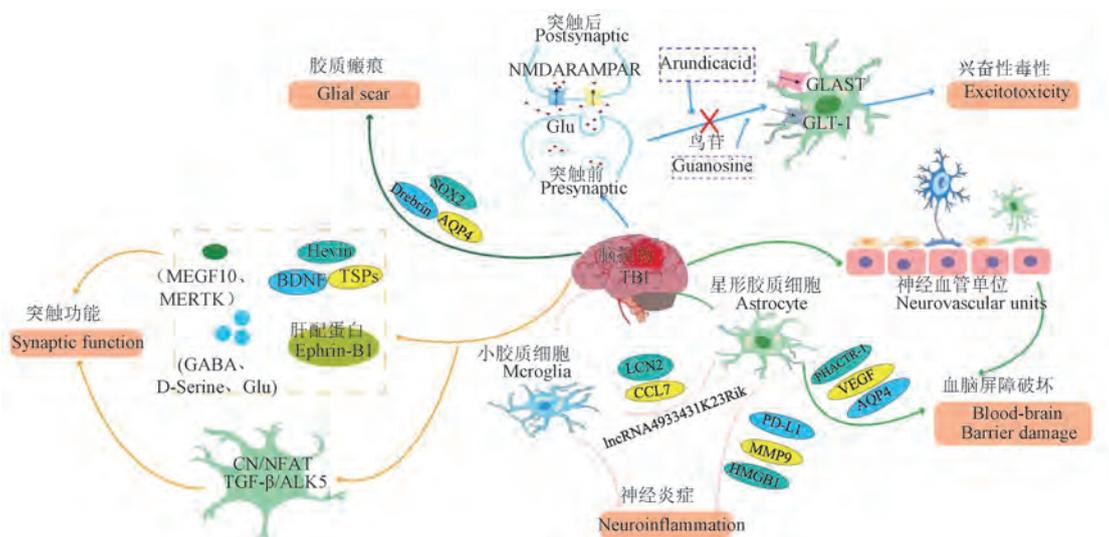


图 1 星形胶质细胞在创伤性脑损伤中的分子作用机制

Figure 1 Molecular mechanism of astrocytes in traumatic brain injury

研究显示,在小鼠 CCI 后 14 d 内检测到星形胶质细胞、小胶质细胞和巨噬细胞的吞噬作用并伴有 MERTK 表达增加,而 MERTK 特异性敲除可减少 TBI 后小鼠的突触吞噬作用并增加神经元树突棘密度,同时减轻 TBI 后小鼠的神经功能缺损<sup>[38]</sup>。与之类似的,Zhuang 等<sup>[39]</sup>初步证明由 Megf10 介导的星形胶质细胞吞噬同侧海马 CA1 区 PSD-95 而加重 TBI 后认知功能障碍。星形胶质细胞还可通过分泌促突触发生因子,如 Hevin、血小板反应蛋白(TSPs)、脑源性神经营养因子等,参与突触的形成和神经系统的发育<sup>[40]</sup>。此外,星形胶质细胞表达的受体或配体蛋白参与调节突触功能。有数据显示,小鼠 CCI 后第 3 天观察到海马星形胶质细胞的肝配蛋白(Ephrin-B1)表达上调与海马 CA1 区神经元的 vGlut1 阳性谷氨酸能数量下降相吻合,而 AS 内 Ephrin-B1 的消融加速了 vGlut1 阳性谷氨酸能输入到 CA1 神经元的恢复,其机制可能与 Ephrin-B1 通过激活 AS 内 STAT3 介导的信号传导有关<sup>[41]</sup>。星形胶质细胞相关信号通路的过表达或抑制也可以影响突触可塑性(图 1)。Furman 等<sup>[42]</sup>研究发现 TBI 后第 7 天海马中钙调磷酸酶(CN)及活化 T 细胞核因子(NFAT)表达上调有关,使用腺相关病毒(AAV-GFA2-VIVIT)通过抑制 AS 中 CN/NFAT 信号通路减少突触相关蛋白 PSD-95、GluR1 的丢失,降低对诱导长期抑制(LDT)的易感性并改善 TBI 大鼠海马区突触可塑性,推测这可能是通过促进前突触生成因子 Hevin 和 Syn1 的表达继而促进受损突触功能恢复。而白蛋白可通过激活 AS 的 TGF- $\beta$ /ALK5 信号通路诱导兴奋性突触的形成,加剧损伤后癫痫的发作<sup>[43]</sup>。此外,AS 还可以分泌多种胶质递质,如  $\gamma$ -氨基丁酸、D-丝氨酸、谷氨酸等,与神经元释放的突触递质、细胞因子等相互作用,进而调控突触的发生、成熟以及信号传递。

### 3 靶向星形胶质细胞的 TBI 疗法

#### 3.1 与 AS 细胞受体相关的药物

金刚烷胺(amantadine, AMA)是一种非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂,能够拮抗兴奋性氨基酸对 NMDA 受体的过度激活,减轻  $Ca^{2+}$ 、 $Na^{+}$  内流引发的细胞毒性反应,同时促进 AS 神经营养因子 GDNF 的表达,因而具有神经保护作用<sup>[44]</sup>。Wang 等<sup>[45]</sup>证明金刚烷胺治疗明显减轻 FPI 大鼠海马区神经元损伤,改善空间学习记忆能力。

此外,美金刚可减少重复性轻度脑外伤(mTBI)模型 SD 大鼠的神经元死亡和星形胶质细胞增生,挽救由 mTBI 诱导的长时程增强丢失和突触损伤<sup>[46]</sup>。一项 I/II 期临床试验(临床试验号:NCT00970944)也显示金刚烷胺治疗促进严重脑损伤患者的功能恢复,提示金刚烷胺对于 TBI 的治疗具有安全性与可行性<sup>[47]</sup>。

#### 3.2 直接靶向调控 AS 活化参与减轻氧化应激和炎症反应的药物

依达拉奉(Edaravone)作为一种新型自由基清除剂,能减少 TBI 模型大鼠的 AS 活化,同时减少促炎因子表达并改善脑水肿<sup>[48]</sup>。Higashi 等<sup>[49]</sup>证明依达拉奉通过减轻脑震荡后的氧化应激改善小鼠的抑郁样行为,这种保护作用与星形胶质细胞细胞 5-脂氧合酶(5-LOX)的易位有关。由此可见,通过靶向调控 AS 的活化,从而减轻 TBI 后氧化应激与神经炎症是治疗 TBI 的可行方法。

#### 3.3 与 AS 相关的非编码 RNA 类分子

非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)是一类由基因组转录而成但不参与蛋白质翻译的 RNA 分子。最新证据表明,AS 来源的非编码 RNA 在 TBI 后的继发性损伤中发挥关键作用。在 TBI 慢性期下调的 microRNA-9-5p 通过促进 AS 增殖活化和增加 AS 衍生的神经营养因子 BDNF 的释放,改善损伤后学习记忆功能;此外, microRNA-9-5p 通过促进 AS 中的血小板反应蛋白 2(Thbs2)的表达激活神经血管单位神经元中的 Notch/CYLD/TAK1 信号通路,从而促进突触重塑和神经功能恢复<sup>[50]</sup>。另外。长链非编码 RNA 也参与 TBI 后脑水肿的调节。有研究表明, lncRNA Malat1 在 FPI 模型的星形胶质细胞中表达下调,而其过表达通过抑制 AS 中的 AQP4 和 NF- $\kappa$ B/IL-6 信号通路减少炎症渗出<sup>[51]</sup>。环状 RNAMETTL9(circMETTL9)作为 TBI 后神经炎症的主要调节因子,它通过与 AS 中的 SND1 受体结合促进趋化因子的表达,增强免疫活动,加剧 TBI 后的神经炎症,是脑损伤后神经功能缺陷的主要贡献者<sup>[52]</sup>。综上所述,与 AS 相关的 ncRNA 表达的变化在 TBI 继发性损伤的调控中发挥重要作用,通过靶向调控非编码 RNA 可为 TBI 今后的治疗和诊断提供新的方向(图 1)。

#### 3.4 与 AS 相关的中药单体

丹参酮 II A 是从中药丹参提取出的具有抗炎抑菌作用的亲脂性菲醌化合物。研究发现。丹参酮

II A 能减轻焚香引起的 ROS 积累和 AS 中炎症相关蛋白的表达并抑制 MAPKs 和 Akt 的磷酸化,具有神经保护作用;此外, Huang 等<sup>[53]</sup>证实 10 mg/kg 丹参酮 II A 减轻 TBI 后的脑水肿和血脑屏障的破坏,这可能与其抑制 AS 的活化和降低 AQP4 水平相关<sup>[54]</sup>。以上研究提示丹参酮 II A 的神经保护特性可能与星形胶质细胞功能的保留相关。另外,白藜芦醇作为一种存在于葡萄和多种药用植物中的天然抗氧化剂,它通过抑制谷氨酸诱导的 ROS 生成和 GSK-3 $\beta$  的激活改善 TBI 后 AS 介导的细胞毒性<sup>[55]</sup>。白藜芦醇还通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路来减轻 TBI 后的神经元自噬和炎症损伤<sup>[56]</sup>。有研究表明,三七能够有效减轻 TBI 后脑出血并改善神经功能<sup>[57]</sup>。此外, Zhou 等<sup>[58]</sup>发现,三七主要有效成分三七总皂苷 (*Panax notoginseng*) 可有效减少星形胶质细胞与 SH-SY5Y 细胞免受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 ROS 生成和乳酸脱氢酶释放,这可能与其激活星形胶质细胞中的 Nrf2 以及上调抗氧化酶 HO-1 和 GSTP1 活性有关。综上所述,传统中药在我国发展源远流长,其在脑损伤治疗中的作用不容小觑,未来可以发掘更多靶向胶质细胞治疗 TBI 的新中药成分。

#### 4 结论和展望

研究人员致力于探索促进脑损伤患者良好转归的新治疗方法,然而至今没有找到一种有效的 TBI 疗法和药物,星形胶质细胞作为治疗 TBI 的一个潜在靶细胞,在脑损伤中的反应受损伤严重程度、分期以及脑区域和细胞内信号机制的调控。由于脑外伤后活化的 AS 间接引起小胶质细胞数量和功能的改变及诱导炎症因子的分泌导致神经炎症,因此通过干预调节 AS 的行为特点,靶向抑制小胶质细胞的活化和过多的免疫活动是减少 TBI 后神经炎症的可行之路;此外,AS 参与形成的胶质瘢痕虽然限制了炎症的扩散,但也影响突触可塑性,通过靶向调控 AS 相关的生物分子、信号通路和谷氨酸受体,或增强 AS 对损伤突触、神经元的吞噬作用是维护突触可塑性和恢复脑功能的可行之举。首先,未来对脑外伤的研究方向可重点聚焦于挖掘星形胶质细胞在中药成分靶向治疗 TBI 的作用,充分利用我国中药资源物产丰富条件,运用单细胞测序和多组学技术寻找新的有效治疗 TBI 的中药成分,为临床上治疗 TBI 提供更多的选择。其次,众多研究表明,星形胶质细胞相关的非编码 RNA 参与 TBI 的

病理生理过程,未来可以通过靶向星形胶质细胞调控的非编码 RNA 来实现对 TBI 的治疗,如使用纳米颗粒或细胞外囊泡等材料作为药物载体,外源调控其组成,为临床上治疗脑损伤提供新思路。最后, TBI 作为一种多因素导致的复杂疾病,未来应重点考虑 AS 与其他细胞的相互作用,使用多组合的方式使 TBI 的损伤修复取得更好的效果。

#### 参考文献:

- [1] JIANG J Y, GAO G Y, FENG J F, et al. Traumatic brain injury in China [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(3): 286–295.
- [2] YAN J, ZHANG Y, WANG L, et al. TREM2 activation alleviates neural damage *via* Akt/CREB/BDNF signalling after traumatic brain injury in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 289.
- [3] BRAMLETT H M, DIETRICH W D. Long-term consequences of traumatic brain injury: current status of potential mechanisms of injury and neurological outcomes [J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(23): 1834–1848.
- [4] 王颖花, 赵亚, 郭文文, 等. 神经干细胞应用于 CCI 创伤性脑损伤模型修复的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 867–872.  
WANG Y H, ZHAO Y, GUO W W, et al. Research progress of neural stem cells in repairing CCI traumatic brain injury model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(6): 867–872.
- [5] BRANDEBURA A N, PAUMIER A, ONUR T S, et al. Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(1): 23–39.
- [6] PATET C, SUYS T, CARTERON L, et al. Cerebral lactate metabolism after traumatic brain injury [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16(4): 31.
- [7] SANTELLO M, TONI N, VOLTERRA A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(2): 154–166.
- [8] PEKNY M, PEKNA M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(4): 1077–1098.
- [9] LAWAL O, ULLOA SEVERINO F P, EROGLU C. The role of astrocyte structural plasticity in regulating neural circuit function and behavior [J]. *Glia*, 2022, 70(8): 1467–1483.
- [10] LANDHUIS E. Tapping into the brain's star power [J]. *Nature*, 2018, 563(7729): 141–143.
- [11] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481–487.
- [12] 韩尊, 罗莉, 虞子宁, 等. 星形胶质细胞在缺血性脑卒中的活化及常见的信号通路 [J]. *赣南医学院学报*, 2022, 42(10): 1089–1093, 1109.  
HAN Z, LUO L, YU Z N, et al. Common signaling pathways

- and activation factors of astrocyte activation in ischemic stroke [J]. *J Gannan Med Univ*, 2022, 42(10): 1089–1093, 1109.
- [13] MYER D J, GURKOFF G G, LEE S M, et al. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury [J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 10): 2761–2772.
- [14] CHENG Y, SONG Y, CHEN H, et al. Ferroptosis mediated by lipid reactive oxygen species: a possible causal link of neuroinflammation to neurological disorders [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5005136.
- [15] XU Y, JIA B, LI J, et al. The interplay between ferroptosis and neuroinflammation in central neurological disorders [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(4): 395.
- [16] XUE J, ZHANG Y, ZHANG J, et al. Astrocyte-derived CCL7 promotes microglia-mediated inflammation following traumatic brain injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107975.
- [17] KIM J H, KANG R J, HYEON S J, et al. Lipocalin-2 is a key regulator of neuroinflammation in secondary traumatic and ischemic brain injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2023, 20(3): 803–821.
- [18] HE X, HUANG Y, LIU Y, et al. Astrocyte-derived exosomal lncRNA 4933431K23Rik modulates microglial phenotype and improves post-traumatic recovery *via* SMAD7 regulation [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(5): 1313–1331.
- [19] GAO X, LI W, SYED F, et al. PD-L1 signaling in reactive astrocytes counteracts neuroinflammation and ameliorates neuronal damage after traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 43.
- [20] CHENG H, DI G, GAO C C, et al. FTY720 reduces endothelial cell apoptosis and remodels neurovascular unit after experimental traumatic brain injury [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(2): 304–313.
- [21] MICHINAGA S, KIMURA A, HATANAKA S, et al. Delayed administration of BQ788, an ET<sub>B</sub> antagonist, after experimental traumatic brain injury promotes recovery of blood-brain barrier function and a reduction of cerebral edema in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2018, 35(13): 1481–1494.
- [22] GAO W, ZHAO Z, YU G, et al. VEGI attenuates the inflammatory injury and disruption of blood-brain barrier partly by suppressing the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1622: 230–239.
- [23] JING Y, ZHANG L, CHEN S W, et al. Inhibiting phosphatase and actin regulator I expression is neuroprotective in the context of traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(7): 1578–1583.
- [24] LIU X, XIE Y, WAN X, et al. Protective effects of aquaporin-4 deficiency on longer-term neurological outcomes in a mouse model [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1380–1389.
- [25] CHEN L H, ZHANG H T, XU R X, et al. Interaction of aquaporin 4 and N-methyl-D-aspartate NMDA receptor 1 in traumatic brain injury of rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(11): 1148–1154.
- [26] MICHINAGA S, SONODA K, INAZUKI N, et al. Selective histamine H<sub>2</sub> receptor agonists alleviate blood-brain barrier disruption by promoting the expression of vascular protective factors following traumatic brain injury in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2022, 150(3): 135–145.
- [27] LIU Y, HONG W, GONG P, et al. Specific knockout of Sox2 in astrocytes reduces reactive astrocyte formation and promotes recovery after early postnatal traumatic brain injury in mouse cortex [J]. *Glia*, 2023, 71(3): 602–615.
- [28] SCHIWECK J, MURK K, LEDDEROSE J, et al. Drebrin controls scar formation and astrocyte reactivity upon traumatic brain injury by regulating membrane trafficking [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1490.
- [29] BANITALEBI S, SKAULI N, GEISELER S, et al. Disassembly and mislocalization of AQP4 in incipient scar formation after experimental stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1117.
- [30] LU D C, ZADOR Z, YAO J, et al. Aquaporin-4 reduces post-traumatic seizure susceptibility by promoting astrocytic glial scar formation in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2021, 38(8): 1193–1201.
- [31] 胡捷先, 陈献华. 脑缺血后谷氨酸通路及其调控的研究进展 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(6): 724–731.
- HU J X, CHEN X H. Research progress of glutamatergic pathway after cerebral ischemia and its regulatory mechanism [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2016, 43(6): 724–731.
- [32] AMORINI A M, LAZZARINO G, DI PIETRO V, et al. Severity of experimental traumatic brain injury modulates changes in concentrations of cerebral free amino acids [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(3): 530–542.
- [33] GAO Y, LIU N, CHEN J, et al. Neuropharmacological insight into preventive intervention in posttraumatic epilepsy based on regulating glutamate homeostasis [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(9): 2430–2444.
- [34] CHAMOUN R, SUKI D, GOPINATH S P, et al. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg*, 2010, 113(3): 564–570.
- [35] 王琦. GLT-1 参与白藜芦醇防止谷氨酸对大鼠大脑皮层神经元兴奋性毒性作用的机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- WANG Q. GLT-1 participates in the mechanism of resveratrol in preventing excitotoxicity of glutamate on cerebral cortex neurons in rats [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.
- [36] KARKI P, HONG P, JR JOHNSON J, et al. Arundic acid increases expression and function of astrocytic glutamate transporter EAAT1 *via* the ERK, Akt, and NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(6): 5031–5046.
- [37] DOBRACHINSKI F, DA ROSA GERBATIN R, SARTORI G, et al. Regulation of mitochondrial function and glutamatergic system are the target of guanosine effect in traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(7): 1318–1328.
- [38] SHEN H, SHI X J, QI L, et al. Microglia and astrocytes mediate synapse engulfment in a MER tyrosine kinase-dependent manner

- after traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(8): 1770–1776.
- [39] ZHUANG Y, XU X, LI H, et al. Megf10-related engulfment of excitatory postsynapses by astrocytes following severe brain injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(10): 2873–2883.
- [40] 何欣然, 孙浩, 秦晓颖, 等. 星形胶质细胞在突触可塑性中的研究进展 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17(4): 215–217, 233.  
HE X R, SUN H, QIN X Y, et al. Research progress of astrocytes in synaptic plasticity [J]. *Neural Inj Funct Reconstr*, 2022, 17(4): 215–217, 233.
- [41] NIKOLAKOPOULOU A M, KOEPPEN J, GARCIA M, et al. Astrocytic ephrin-B1 regulates synapse remodeling following traumatic brain injury [J]. *ASN Neuro*, 2016, 8(1): 1–18.
- [42] FURMAN J L, SOMPOL P, KRANER S D, et al. Blockade of astrocytic calcineurin/NFAT signaling helps to normalize hippocampal synaptic function and plasticity in a rat model of traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(5): 1502–1515.
- [43] WEISSBERG I, WOOD L, KAMINTSKY L, et al. Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- $\beta$ /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 78: 115–125.
- [44] LI T, LUO Z, LIU Y, et al. Excessive activation of NMDA receptors induced neurodevelopmental brain damage and cognitive deficits in rats exposed to intrauterine hypoxia [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(3): 566–580.
- [45] WANG T, HUANG X J, VAN K C, et al. Amantadine improves cognitive outcome and increases neuronal survival after fluid percussion traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(4): 370–377.
- [46] EFFGEN G B, MORRISON B 3rd. Memantine reduced cell death, astrogliosis, and functional deficits in an *in vitro* model of repetitive mild traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(4): 934–942.
- [47] GIACINO J T, WHYTE J, BAGIELLA E, et al. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(9): 819–826.
- [48] WANG G H, JIANG Z L, LI Y C, et al. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(10): 2123–2134.
- [49] HIGASHI Y, HOSHIJIMA M, YAWATA T, et al. Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion [J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(20): 1689–1699.
- [50] WU J, LI H, HE J, et al. Downregulation of microRNA-9-5p promotes synaptic remodeling in the chronic phase after traumatic brain injury [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 9.
- [51] ZHANG Y, WANG J, ZHANG Y, et al. Overexpression of long noncoding RNA Malat1 ameliorates traumatic brain injury induced brain edema by inhibiting AQP4 and the NF- $\kappa$ B/IL-6 pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17584–17592.
- [52] HUANG C, SUN L, XIAO C, et al. Circular RNA METTL9 contributes to neuroinflammation following traumatic brain injury by complexing with astrocytic SND1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 39.
- [53] HUANG Y, LONG X, TANG J, et al. The attenuation of traumatic brain injury *via* inhibition of oxidative stress and apoptosis by tanshinone II A [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4170156.
- [54] CHI M C, LIN Z C, LEE C W, et al. Tanshinone II A suppresses burning incense-induced oxidative stress and inflammatory pathways in astrocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 258: 114987.
- [55] ZOU P, LIU X, LI G, et al. Resveratrol pretreatment attenuates traumatic brain injury in rats by suppressing NLRP3 inflammasome activation *via* SIRT1 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 3212–3217.
- [56] FENG Y, CUI Y, GAO J L, et al. Resveratrol attenuates neuronal autophagy and inflammatory injury by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 921–930.
- [57] PEI X, ZHANG L, LIU D, et al. Notoginsenoside R1 attenuates brain injury in rats with traumatic brain injury: Possible mediation of apoptosis *via* ERK1/2 signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2023, 18(12): e0295903.
- [58] ZHOU N, TANG Y, KEEP R F, et al. Antioxidative effects of Panax notoginseng saponin in brain cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(10): 1189–1195.

[收稿日期]2024-06-03

杨润泽,胡耀华,秦靖,等. LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 91-99.  
Yang RZ, Hu YH, Qin J, et al. Research progress on anti-tumor effects of LRRC8A volume-regulated anion channels [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 91-99.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.012

# LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的研究进展

杨润泽<sup>1</sup>, 胡耀华<sup>2</sup>, 秦靖<sup>3</sup>, 汪永锋<sup>1\*</sup>, 师长宏<sup>3\*</sup>

(1.甘肃中医药大学基础医学院,兰州 730000;2.延安大学医学院,延安 716000;3.空军军医大学实验动物中心,西安 710000)

**【摘要】** 体积调节阴离子通道(volume-regulated anion channels, VRAC)在脊椎动物细胞和各类型的肿瘤细胞中普遍表达。其由富含亮氨酸重复序列 8A(leucine-rich repeat containing 8A, LRRC8A)及其 4 个同源家族成员(LRRC8B-E)组成,其中 LRRC8A 为必需亚基。已证实 LRRC8A/VRAC 通过各种信号途径参与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药,并调控免疫细胞功能。该离子转运蛋白在杀伤肿瘤细胞及预防肿瘤中显示出良好的应用潜力,可作为肿瘤治疗的新靶点。本文综述了 LRRC8A/VRAC 参与肿瘤发生发展的最新研究,包括 LRRC8A/VRAC 的分子结构、功能及其在肿瘤中的调控作用,重点总结了 LRRC8A/VRAC 在肿瘤诊断和免疫治疗中的应用,以期探索 LRRC8A/VRAC 成为肿瘤治疗的新靶点提供借鉴。

**【关键词】** 体积调节阴离子通道;富含亮氨酸重复序列 8A;增殖;迁移;侵袭;多药耐药;肿瘤免疫  
**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0091-09

## Research progress on anti-tumor effects of LRRC8A volume-regulated anion channels

YANG Runze<sup>1</sup>, HU Yaohua<sup>2</sup>, QIN Jing<sup>3</sup>, WANG Yongfeng<sup>1\*</sup>, SHI Changhong<sup>3\*</sup>

(1. Basic Medical College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China.

2. Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000. 3. Experimental Animal Center of Air Force Military Medical University, Xi'an 710000)

**【Abstract】** Volume-regulated anion channels (VRACs) are present in vertebrate cells and a variety of tumor cells. VRACs include leucine-rich-repeat-containing 8A (LRRC8A) and its four homologous family members (LRRC8B-E), of which LRRC8A is an essential subunit. It has been confirmed that the VRAC LRRC8A is involved in the proliferation, migration, invasion, and multi-drug resistance of tumor cells through various signaling pathways. This ion transporter has shown good potential for use in strategies to kill tumor cells and prevent the development of tumors and can be used as a new target for tumor therapy. Therefore, this paper reviews the latest research on the involvement of LRRC8A in tumorigenesis and development. The molecular structure, function, and regulation of LRRC8A in tumor and immune cells, with emphasis on targeting LRRC8A in tumor diagnosis and immunotherapy, are discussed, providing a reference for studies exploring LRRC8A as a new tumor therapy target.

**【Keywords】** volume-regulated anion channels; leucine-rich repeat containing 8A; proliferation; migration; invasion; multidrug resistance; tumor immunity

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82160871);甘肃省自然科学基金资助项目(22JR5RA591);甘肃省中医药管理局项目(GZKZ-2021-10)。

**【作者简介】** 杨润泽(1997—),男,硕士研究生,研究方向:中西医肿瘤防治。E-mail: 1377623986@qq.com

**【通信作者】** 汪永锋(1967—),男,教授,硕士生导师,研究方向:中西医结合治疗胰腺病研究。E-mail: wyf@gszy.edu.cn

师长宏(1973—),男,教授,博士生导师,研究方向:人类疾病的动物模型。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn \* 共同通信作者

肿瘤是全球公共卫生的主要威胁之一,其发病率持续增加,每年新增病例超过 1000 万例<sup>[1]</sup>。到目前为止,包括化疗、放射治疗和手术等方式的综合治疗方案有了一定的发展,但其疗效往往受到肿瘤的扩散和侵袭的限制,肿瘤患者生存预后较差,当前治疗方案的效果远不能让人满意<sup>[2]</sup>。因此,肿瘤的治疗仍然是一个巨大的医学挑战,需要新的潜在靶点。离子通道在人体内参与多项生理病理过程,受到了科研人员广泛关注。在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药中,已被证实存在许多离子通道的异常表达,如电压门控通道和瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道<sup>[3]</sup>。因此有研究者提出离子通道可能成为肿瘤诊断、治疗和预后的潜在靶点。

LRRC8(leucine-rich repeat containing 8)家族被确定为体积调控性阴离子通道(volume-regulated anion channels, VRAC)的重要组成部分,由 LRRC8A-E 5 个亚单位组成,其中 LRRC8A 为必需亚基<sup>[4]</sup>。研究发现,在许多肿瘤中 LRRC8A 均高表达,并促进肿瘤细胞的增殖和迁移。而 LRRC8A 的敲除则显著抑制了肿瘤细胞的增殖和迁移,并诱导了肿瘤细胞凋亡<sup>[5]</sup>。LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的分子机制见图 1。本文从 LRRC8A/VRAC 离子通道对肿瘤细胞的增殖、迁移侵袭和耐药的影响,及对免疫细胞的调控作用展开综述,并对 LRRC8A/VRAC 离子通道调节肿瘤进展的潜在机制及在肿瘤免疫治疗中的应用总结,以期 LRRC8A 作为潜在靶点治疗肿瘤提供参考和借鉴。

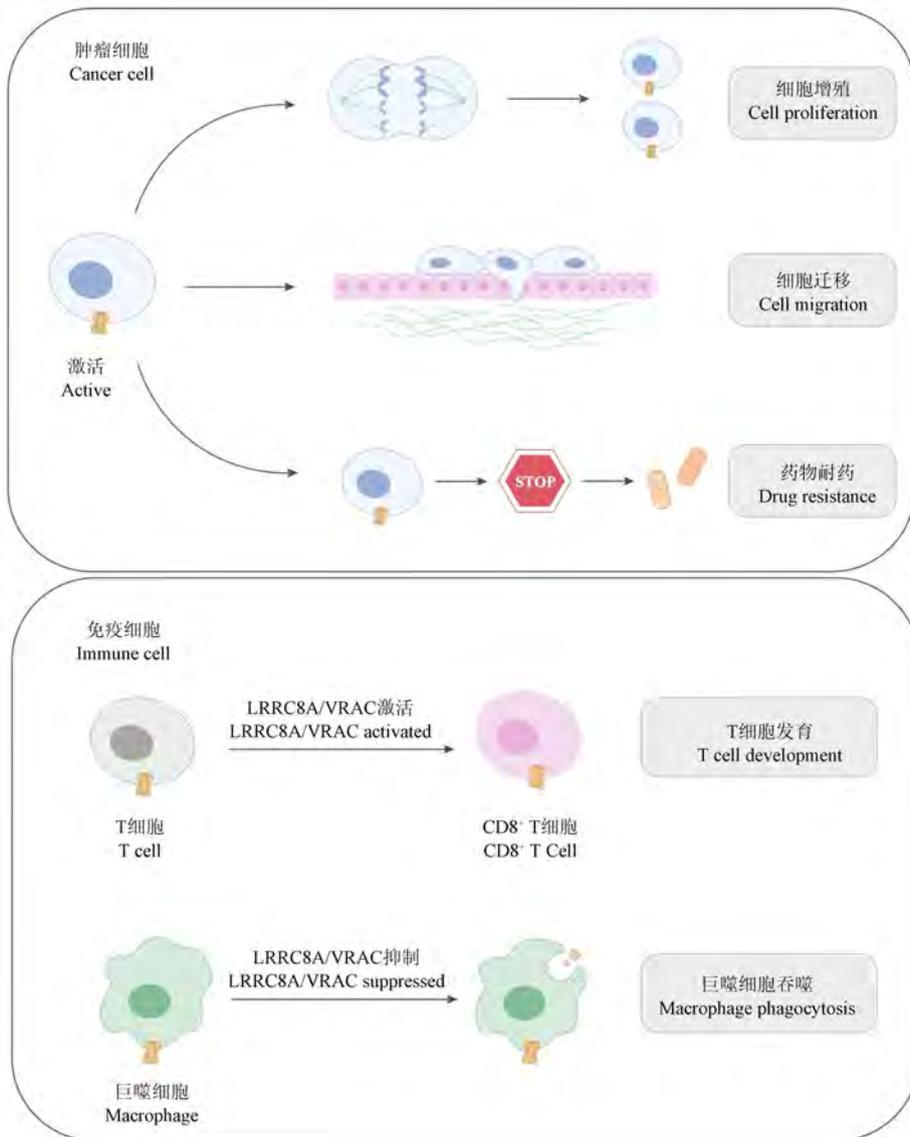


图 1 LRRC8A/VRAC 离子通道抗肿瘤作用的分子机制

Figure 1 Molecular mechanism of anti-tumor effect of LRRC8A/VRAC ion channel

## 1 LRRC8A/VRAC 离子通道的分子表征

### 1.1 阴离子通道 VRAC 通过调节细胞体积维持细胞稳态

细胞体积的动态稳定是细胞正常功能发挥的前提条件。参与细胞肿胀或细胞收缩激活的各种膜通道和转运体与这一过程有关。其中,VRAC 是一种特殊类型的阴离子通道,其在包括肿瘤细胞在内的各种类型的细胞中普遍表达<sup>[6]</sup>。1988 年 Hazama 等<sup>[7]</sup>首次在人淋巴细胞中对 VRAC 进行了功能性的描述,VRAC 活化是由细胞肿胀或其他介导 Cl<sup>-</sup> 外排的刺激引起的离子强度降低所致。其主要特征是激发典型外向整流电流以及广泛阴离子渗透。因此,VRAC 又被称为体积敏感的外向整流阴离子通道 (volume-sensitive outwardly rectifying anion channel, VSOR) 或体积敏感有机渗透压阴离子通道 (volume-sensitive organic osmolyte anion channel, VSOAC)<sup>[8]</sup>。VRAC 可通过介导离子转运导致细胞内液外流,从而使细胞体积恢复正常,这一过程被称为调节性体积减少 (regulatory volume decrease, RVD)<sup>[9]</sup>。此外,VRAC 已被证明可以调节细胞容积动态平衡、细胞电生理、细胞自身内环境稳态,还与细胞的增殖与分化、迁移与凋亡等一系列生理过程密切相关<sup>[10]</sup>。然而,尽管在过去的几十年里进行了广泛的研究,但 VRAC 的分子结构直到近年才被揭示,这主要是因为其复杂的电生理特性。

### 1.2 LRRC8A 是 VRAC 阴离子通道的核心成分

随着对 VRAC 研究的不断深入,其电生理特性被揭示,2014 年两个研究小组通过膜片钳电生理技术和细胞层面的荧光检测技术,发现富含亮氨酸的蛋白 LRRC8A,也称为 SWELL1,是 VRAC 的核心成分<sup>[11]</sup>。LRRC8A 是 LRRC8 蛋白家族的一员,LRRC8A 和其他四个同源家族成员 (LRRC8B-E) 组装成 VRAC 复合物<sup>[12]</sup>。随后的研究表明 LRRC8A 与其同源物的不同组合生成不同的通道特性,包括通道开放概率、门控动力学和底物特异性等。敲除 LRRC8A 将显著抑制细胞中的内源性 VRAC,使 VRAC 功能严重受损甚至完全丧失,揭示 LRRC8A 在 VRAC 中的重要作用<sup>[13]</sup>。

### 1.3 LRRC8A/VRAC 参与细胞体积调节并影响肿瘤细胞

LRRC8A/VRAC 的经典作用为参与细胞体积调

节。细胞在面对细胞外液渗透压不断变动引起的刺激或损伤时,调节细胞体积和保持稳定状态的能力对于维持细胞稳态和许多生理功能至关重要。在此过程中,LRRC8A/VRAC 可调节离子和水跨膜运输,以保护细胞免受过度的细胞肿胀或收缩。这些结果有力地表明,LRRC8A/VRAC 在调节细胞体积和维持相对恒定的细胞体积方面中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。除此之外,最近的研究证实,LRRC8A/VRAC 可通过不同信号通路影响肿瘤细胞的增殖、侵袭迁移和多药耐药,并且可能成为肿瘤诊断、预后和治疗的潜在靶点<sup>[15]</sup>。

## 2 LRRC8A/VRAC 在肿瘤发生、发展中的作用

已证实 LRRC8A 作为 VRAC 的必需蛋白可以通过各种信号途径参与肿瘤细胞的增殖、侵袭迁移及多药耐药。表 1 总结了 LRRC8A/VRAC 在肿瘤发生、发展中的多种作用。

### 2.1 LRRC8A/VRAC 参与调节肿瘤细胞的增殖

肿瘤细胞的肿胀在细胞增殖早期扮演着重要的角色。研究发现在肿瘤细胞中 LRRC8A/VRAC 的表达显著上调,并与不良预后有关<sup>[26]</sup>。已有研究表明,LRRC8A/VRAC 在调节细胞周期转换发挥着重要作用。Lu 等<sup>[22]</sup>通过流式分析对肿瘤细胞进行了检测,结果显示,LRRC8A/VRAC 的高表达使细胞周期中的 S 峰细胞数增加,G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 期细胞数减少。LRRC8A/VRAC 基因表达增强后,细胞周期调控蛋白 Cyclin D1 和 CDK2 在 RNA 和蛋白质水平的表达均显著增加,而 Cyclin E 和 CDK4 的表达不随 LRRC8A/VRAC 的表达而改变。这些结果表明 LRRC8A/VRAC 促进了肝癌细胞的 G<sub>1</sub>/S 转变。Konishi 等<sup>[17]</sup>通过基因敲除实验发现,细胞周期 G<sub>1</sub>/S 检查点调节通路是 LRRC8A/VRAC 基因被敲除后影响最显著的信号通路。进一步分析表明,在肿瘤发生中发挥重要作用的 CDK 抑制因子 p21 和 p27 途径相关基因在 LRRC8A/VRAC 基因敲除后强烈上调,从而抑制 CDK-cyclin 复合物,阻碍细胞周期转换。此外,先前的一项研究发现,PI3K/AKT 是 LRRC8A/VRAC 调控肿瘤细胞增殖和细胞周期转换的下游信号。LRRC8A/VRAC 的缺失降低了肿瘤细胞中 PI3K/AKT 的磷酸化水平,抑制了肿瘤细胞增殖<sup>[27]</sup>。综上可知 LRRC8A/VRAC 在调节肿瘤细胞增殖中发挥重要作用。

表 1 LRRC8A/VRAC 在肿瘤进展中的作用  
Table 1 Role of LRRC8A/VRAC in tumor progression

肿瘤类型 Tumor type	作用 Effect	物种 Species
胶质母细胞瘤 <sup>[16]</sup> Glioblastoma	增殖、迁移、侵袭 Proliferation, migration and invasion	人 Human
鼻咽癌 <sup>[17]</sup> Nasopharyngeal carcinoma	细胞周期进展、迁移、凋亡 Cell cycle progression, migration and apoptosis	人 Human
卵巢癌 <sup>[18]</sup> Ovarian cancer	增殖、细胞周期进展、耐药性 Proliferation, cell cycle progression and drug resistance	人 Human
宫颈癌 <sup>[19]</sup> Cervical cancer	细胞周期进展 Cell cycle progression	人 Human
小细胞肺癌 <sup>[20]</sup> Small cell lung cancer	细胞周期进展 Cell cycle progression	人 Human
神经胶质瘤 <sup>[21]</sup> Glioma	增殖、耐药性 Proliferation and drug resistance	大鼠 Rats
肝细胞癌 <sup>[22]</sup> Hepatocellular carcinoma	增殖、迁移、侵袭 Proliferation, migration and invasion	人、小鼠 Human, mice
骨肉瘤 <sup>[23]</sup> Osteosarcoma	耐药性 Drug resistance	人 Human
肺泡癌 <sup>[24]</sup> Alveolar carcinoma	耐药性 Drug resistance	人 Human
结直肠癌 <sup>[25]</sup> Colorectal cancer	增殖、迁移 Proliferation and migration	人、小鼠 Human, mice

同时, LRRC8A/VRAC 也可影响肿瘤细胞线粒体功能。研究表明, LRRC8A/VRAC 高表达的肿瘤细胞 ROS 产生减少<sup>[28]</sup>。ROS 的产生与线粒体功能密切相关。同时, 过度表达 LRRC8A/VRAC 的细胞有更高的 ATP 水平。因此, 这些结果表明 LRRC8A/VRAC 通过抑制线粒体功能障碍来保护肿瘤细胞免受凋亡的影响, 促进肿瘤细胞增殖。

广泛的研究已经证实, 细胞内稳态在肿瘤进展中起着至关重要的作用<sup>[29]</sup>。LRRC8A 作为一种参与细胞内稳态的容量调节的阴离子通道蛋白, 其可通过改变细胞大小和细胞变形性以调节肿瘤细胞的增殖。Chen 等<sup>[30]</sup>检测了 LRRC8A/VRAC 在低渗条件下是否参与维持肿瘤细胞的细胞内环境平衡。研究表明 LRRC8A/VRAC 基因敲除加速了低渗液处理下肿瘤细胞的肿胀和破裂。用 CCK-8 比色法测定低渗液处理后不同时间点的细胞存活率。结果表明, 与对照组相比, LRRC8A/VRAC 过表达促进了低渗液处理后肿瘤细胞的存活, 而 LRRC8A/VRAC 的缺失显著降低了肿瘤细胞的存活率, 导致肿瘤细胞的凋亡增加, 表明 LRRC8A/VRAC 过表达可能通过抑制凋亡而促进肿瘤细胞的存活与增殖。

此外, LRRC8A/VRAC 基因下调可抑制裸鼠体内肿瘤细胞的成瘤效果。Lu 等<sup>[22]</sup>建立了人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型。结果发现 LRRC8A 敲除组的

小鼠肿瘤体积明显小于对照组, 且敲除组 Ki67 和 CD31 的表达明显下调。说明敲除 LRRC8A/VRAC 有效抑制肿瘤生长, 提示 LRRC8A/VRAC 下调可抑制肿瘤细胞的增殖。Zhang 等<sup>[26]</sup>将 LRRC8A-shRNA (LRRC8A 敲除组) 慢病毒感染的肿瘤细胞及对照慢病毒分别皮下注射于裸鼠腋窝, 2 周后, 腋窝产生肿瘤结节。解剖后发现慢病毒对照组的肿瘤体积与重量均大于 LRRC8A 敲除组, 表明 LRRC8A/VRAC 蛋白的下调使肿瘤生长变慢, 提示 LRRC8A/VRAC 下调可能抑制裸鼠体内肿瘤细胞增殖。

外泌体是肿瘤微环境中细胞间通讯的重要媒介, 已有研究表明, 外泌体通过调节肿瘤微环境的成分并影响肿瘤细胞的增殖和迁移率, 可加速肿瘤的进展。Zhang 等<sup>[31]</sup>对 Vesiclepedia 数据库中的外泌体蛋白质组图谱进行了筛选, 发现 LRRC8A 蛋白存在于不同肿瘤细胞的胞外小泡中, 并且 LRRC8A mRNA 包装在肿瘤细胞的胞外体中。尽管过表达 LRRC8A 蛋白的细胞生长较慢, 但这些细胞增加了外泌体的分泌数量。这些证据支持过表达 LRRC8A/VRAC 可以促进肿瘤细胞外泌体的生物合成和释放。重要的是, LRRC8A/VRAC 是维持外泌体体积稳定的调节器之一, 以响应细胞外渗透压的变化。胞膜和胞外 LRRC8A 蛋白与肿瘤细胞存活和细胞间通讯密切相关, 因此 LRRC8A 可作为一种

有前途的预后生物标志物和潜在的治疗靶点。

## 2.2 LRRC8A/VRAC 参与调节肿瘤细胞的侵袭和迁移

研究发现 LRRC8A/VRAC 可调节细胞骨架重排,是细胞迁移中不可或缺的组成部分,而调节细胞骨架中肌动蛋白的快速聚合和解聚被认为是调节细胞迁移的主要分子机制<sup>[32]</sup>。

Chen 等<sup>[30]</sup>为了探索 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中的作用,在 HeLa 细胞中过表达 LRRC8A/VRAC。Transwell 分析表明,LRRC8A/VRAC 过表达显著增加了肿瘤细胞的迁移和侵袭能力。为了进一步证实 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中的促转移作用,其通过慢病毒感染构建敲低 LRRC8A 的 HeLa 细胞。正如预期的那样,LRRC8A/VRAC 表达的减少抑制了 HeLa 细胞的迁移和侵袭。Xu 等<sup>[14]</sup>发现敲低 LRRC8A 对肿瘤细胞迁移和侵袭具有显著的抑制作用。Lu 等<sup>[22]</sup>的实验也证实,上调 LRRC8A/VRAC 显著增强了细胞的迁移距离,且 LRRC8A/VRAC 过表达时迁移细胞的数量明显更高。LRRC8A/VRAC 在调控肿瘤细胞迁移中发挥重要作用,敲低 LRRC8A 的表达可使肿瘤细胞中整合素表达降低,从而调节生长因子信号传导,如成纤维细胞生长因子等,最终影响肿瘤细胞增殖、迁移和血管生成<sup>[33]</sup>。为了确定 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞体内模型中的作用,研究者通过尾静脉注射建立了裸鼠肿瘤转移模型<sup>[34]</sup>。通过裸鼠的肝及肺部的大体观察和病理检查来评估 LRRC8A/VRAC 在肿瘤转移中的作用。结果表明,注射 shRNA LRRC8A 细胞的小鼠转移瘤显著减少。相关机制研究发现在 LRRC8A/VRAC 过表达的情况下,Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)的表达增加,而抑制 LRRC8A/VRAC 可显著降低 JNK 水平。Transwell 结果表明,LRRC8A/VRAC 对细胞迁移的刺激作用被 JNK 抑制剂 SP600125 显著抑制<sup>[22]</sup>。上述结果提示 LRRC8A/VRAC 可能通过 JNK 途径促进肿瘤细胞的迁移。

此外,细胞黏附在肿瘤转移中有重要地位,细胞黏附能力的丧失被认为是一个显著的致癌特征<sup>[35]</sup>。已有实验表明上调 LRRC8A/VRAC 表达可抑制肿瘤细胞黏附并促进其迁移。进一步实验发现,LRRC8A/VRAC 敲低可导致肿瘤细胞系中上皮-间质转移(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物(如基质金属蛋白酶)表达降低<sup>[36]</sup>。综上所述,

这些结果表明 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞的迁移与侵袭中起着重要作用。

## 2.3 LRRC8A/VRAC 参与肿瘤细胞的多药耐药

化疗依然是目前肿瘤治疗的主要手段之一,但是化疗出现的多药耐药性严重阻碍了肿瘤治疗。铂类药物被广泛应用于肿瘤治疗<sup>[37]</sup>,LRRC8A/VRAC 可抑制铂类药物摄取。研究发现,肿瘤细胞内铂(platinum, Pt)的积累与 LRRC8A/VRAC 蛋白表达和通道活性有关,即当 LRRC8A/VRAC 被质膜去极化或低渗细胞肿胀激活时,细胞 Pt 含量降低,而当通道活性降低或 LRRC8A/VRAC 表达受到抑制时,细胞 Pt 含量较高<sup>[38]</sup>。在人类卵巢癌细胞中敲低 LRRC8A/VRAC 可使顺铂摄取增加,提高了药物的敏感性。已有许多研究表明,细胞凋亡的一个显著特征是细胞体积的减小,这一过程被称为凋亡体积减少(apoptotic volume decrease AVD)。Sørensen 等<sup>[24]</sup>证实,LRRC8A/VRAC 抑制剂可促进顺铂诱导的 AVD 以及 caspase-3 激活,降低肿瘤细胞耐药性,从而提高其对顺铂的敏感度。亦有研究表明,在药物敏感的肿瘤细胞中,顺铂可诱导 LRRC8A/VRAC 的表达下调且肿瘤细胞的凋亡增加,而在存在顺铂耐药性的肿瘤细胞中 LRRC8A/VRAC 表达显著上调。

Zhang 等<sup>[39]</sup>在其他铂类药物抗肿瘤应用中也发现了相似的现象。奥沙利铂是第三代铂类药物,用于肿瘤的一线化疗。然而,肿瘤患者常对奥沙利铂出现耐药性,严重影响了治疗效果,导致化疗失败。其建立了对奥沙利铂具有稳定耐药性的 R-Oxa 细胞,并观察到 LRRC8A/VRAC 在 R-Oxa 细胞中的表达显著高于在天然肿瘤细胞中的表达,提示 LRRC8A/VRAC 上调可能是肿瘤细胞获得奥沙利铂耐药的一个重要因素。该研究证实 LRRC8A/VRAC 可促进奥沙利铂耐药的发生,但 LRRC8A/VRAC 协助肿瘤细胞获得耐药的机制尚不清楚,仍需进一步研究。

此外, Rubino 等<sup>[40]</sup>研究发现,LRRC8A/VRAC 下调可增加胶质母细胞瘤对替莫唑胺(temozolomide, TMZ)的敏感性。其中 LRRC8A/VRAC 下调促进 TMZ 诱导的线粒体依赖性凋亡,包括 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达增加, Bcl-2 相关 x 蛋白(Bcl-2 associated x, Bax)表达减少,细胞色素 c 释放, caspase-9 和 caspase-3 激活。LRRC8A/VRAC 上调则抑制了胶

质瘤细胞线粒体依赖性凋亡通路的激活。同时将 LRRC8A siRNA 与化疗药物相结合时,治疗效果远优于单药,且联合治疗促进了肿瘤细胞的 G2/M 阻滞,并增加凋亡细胞数量。因此,下调 LRRC8A/VRAC 降低了肿瘤细胞的增殖,并增加了肿瘤细胞对临床 TMZ 的敏感性。

综上所述,在抗肿瘤药物治疗中 LRRC8A/VRAC 可能是解决药物耐药,增强疗效的潜在靶点,同时 LRRC8A/VRAC 的靶向抑制与化疗药物的联合使用可相互促进。因此,进一步开展针对 LRRC8A/VRAC 特异性抑制剂的研究是解决药物在肿瘤治疗中出现耐药问题的关键,对于开发临床抗癌疗法和优化应用具有重要意义。

### 3 LRRC8A/VRAC 作为肿瘤潜在治疗靶点的应用进展

越来越多的研究证实,LRRC8A/VRAC 在肿瘤微环境中发挥重要的调控作用。其可通过直接或间接作用于免疫细胞,引发抗肿瘤免疫及促进肿瘤基质纤维化,在肿瘤治疗中发挥重要作用。此外 LRRC8A/VRAC 还可作为一种肿瘤预后生物标志物,以判断肿瘤的预后,反映肿瘤的治疗情况,有望提高肿瘤的诊断效率和患者的生存预后<sup>[41]</sup>。

#### 3.1 LRRC8A/VRAC 作用于免疫细胞

已有研究表明,LRRC8A/VRAC 在免疫调节中发挥作用<sup>[42-43]</sup>,研究者使用肿瘤免疫评估资源(tumor immune estimation resource, TIMER)研究其表达是否与免疫浸润水平相关。结果显示,LRRC8A/VRAC 的表达与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞显著相关。Kumar 等<sup>[44]</sup>发现 LRRC8A/VRAC 在 T 淋巴细胞的发育和功能中发挥着重要作用。LRRC8A/VRAC 全身性敲除小鼠死亡率增加,生长迟缓并且多种组织发育异常。该品系小鼠在胸腺发育早期就表现出严重的细胞内源性障碍,胸腺细胞增殖减少和凋亡增加,外周 T 细胞功能受损。这是由于胸腺上皮细胞表达一种 LRRC8A/VRAC 配体,该配体对胸腺细胞的分化和存活至关重要。这些发现揭示了 LRRC8A/VRAC 在 T 细胞发育、存活和功能中的重要作用。通过使用肿瘤免疫分析数据库(tumor-immune system interactions database management, TISDB)对肿瘤样本中 LRRC8A/VRAC 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞进行的相关性分析也表明两者显著相关。这些发现证实了

LRRC8A/VRAC 通过与免疫浸润,特别是肿瘤中的 CD8<sup>+</sup>T 细胞相互作用,影响患者的临床结果<sup>[45]</sup>。以上结果证明 LRRC8A/VRAC 对 T 细胞发育至关重要,可能在肿瘤免疫治疗中发挥着不可或缺的作用。

此外,LRRC8A/VRAC 的抑制可促进巨噬细胞的吞噬作用,而肿瘤相关巨噬细胞是肿瘤微环境的重要组成部分,在血管生成、细胞外基质重塑、肿瘤细胞增殖、转移中发挥作用。适当激活巨噬细胞可以介导肿瘤细胞的吞噬和细胞毒性肿瘤杀伤,并与先天性和适应性免疫系统的组成部分进行有效的双向相互作用以抑制肿瘤进展。研究结果表明,抑制巨噬细胞中的 LRRC8A/VRAC 可以显著激活巨噬细胞,促进其吞噬作用。从机制上讲,消除或阻断 LRRC8A/VRAC 通道可能促进腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)激活和核因子红细胞 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2)核转位,上调 CD36 表达,增强巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用<sup>[46]</sup>。这些发现不仅揭示了 LRRC8A/VRAC 在巨噬细胞吞噬功能中的作用,还为肿瘤治疗和与巨噬细胞吞噬功能障碍相关的疾病提供了潜在的治疗靶点。

#### 3.2 LRRC8A/VRAC 引发抗肿瘤免疫

环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)负责感知肿瘤细胞的胞浆脱氧核糖核酸,催化形成 20~30 个环鸟苷-磷酸腺苷-磷酸(cGMP-AMP, cGAMP),cGAMP 通过 STING 途径产生干扰素。肿瘤来源的 cGAMP 可以转运到宿主细胞中,并引起干扰素反应,以增强自然杀伤细胞的激活<sup>[47]</sup>。而与肿瘤密切相关的炎症因子可激活 LRRC8A/VRAC,其作为 cGAMP 外流和内流的通道,将 cGAMP 转移至旁细胞中增强 STING 介导的干扰素反应,因此,可以推测 LRRC8A/VRAC 介导的 cGAMP 外流和/或内流在宿主对肿瘤防御中发挥关键作用<sup>[48]</sup>。研究结果表明,LRRC8A/VRAC 介导的 cGAMP 传输促进 cGAS-cGAMP-STING 通路激活。虽然缝隙连接只允许 cGAMP 在物理连接的细胞之间传输,但 LRRC8A/VRAC 可以促进 cGAMP 转移至远处细胞。这一过程有助于抗肿瘤免疫,阻止恶性肿瘤的发生。这一结果表明 LRRC8A/VRAC 高表达的患者可能受益于 cGAS-cGAMP-STING 途径抗肿瘤治疗<sup>[43]</sup>。综上所述,LRRC8A/VRAC 在疫苗接种中的作用值得进一步研究,并应探索将

LRRC8A/VRAC 激动剂用作肿瘤疫苗中 cGAMP 的辅助佐剂的可能性。

LRRC8A/VRAC 在肿瘤样本中的共表达分析显示,肾上腺素 A 受体 (ephrin-A receptor 2, EPHA2) 在大多数肿瘤数据库中与 LRRC8A/VRAC 呈正相关<sup>[49]</sup>。据报道,EPHA2 参与肿瘤的多种免疫调节途径,是肿瘤产生免疫治疗耐药性的内在驱动因子。EPHA2 缺失可逆转肿瘤 T 细胞抵抗性并增强肿瘤免疫治疗敏感性。当 LRRC8A/VRAC 在肿瘤细胞中被敲低时,EPHA2 的 mRNA 表达水平显著降低。因此,通过调节 LRRC8A/VRAC 以降低肿瘤细胞中 EPHA2 的表达可能是一种潜在的肿瘤免疫治疗途径。

LRRC8A/VRAC 还在肿瘤相关纤维化中发挥调节作用。已有研究表明,肿瘤微环境中的纤维化基质会产生细胞外基质蛋白 (extra cellular matrix, ECM),促进肿瘤细胞逃避免疫治疗的攻击,从而使一些实体瘤,例如胰腺导管腺癌,对免疫疗法反应不佳<sup>[50]</sup>。因此抑制 LRRC8A/VRAC 可能是治疗肿瘤的一种有前途的策略。研究显示 LRRC8A/VRAC 在肿瘤纤维化组织中的表达显著升高。其通过激活非受体型蛋白酪氨酸激酶 2 (janus kinase 2, JAK2) - 信号传导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription3, STAT3) 信号通路参与转化生长因子- $\beta$  诱导的肿瘤基质纤维化。此外,LRRC8A/VRAC 通过其 C 末端富含亮氨酸的重复结构域激活 JAK2-STAT3 途径,直接与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2) 相互作用。因此,LRRC8A/VRAC、JAK2 和 Grb2 组成了一个蛋白质复合物,促进 JAK2-STAT3 通路的激活,以促进肿瘤基质纤维化,为 LRRC8A/VRAC 在调节肿瘤相关纤维化中作用提供了新的见解<sup>[51]</sup>。

### 3.3 LRRC8A/VRAC 是一种有前景的肿瘤预后生物标志物

ONCOMINE 数据库检索和基因表达谱交互分析 (gene expression profiling interactive analysis, GEPIA),均发现肿瘤样本中 LRRC8A/VRAC 的表达显著高于正常样本<sup>[30]</sup>。进一步分析显示,LRRC8A/VRAC 的表达与肿瘤患者的病理分期之间存在显著相关性。相较于低表达组,高 LRRC8A/VRAC 的 5 年生存率明显低于低 LRRC8A/VRAC 组。进一步研究 9 个变量 (性别、年龄、肿瘤长度、

组织学分化、淋巴浸润、静脉浸润、pT 类别、pN 类别和 LRRC8A/VRAC 表达)对接受肿瘤根治性切除的患者预后的影响发现,预后与静脉侵犯、pN 类别和 LRRC8A/VRAC 表达显著相关。上述 3 个因素的多变量分析证实静脉浸润和 LRRC8A/VRAC 表达是独立的预后指标。因此,LRRC8A/VRAC 的高表达可能是肿瘤的不良预后因素。这些结果表明,LRRC8A/VRAC 是一种有前景的肿瘤预后生物标志物。

同时体外细胞实验也获得了相似的结论<sup>[14]</sup>。通过肿瘤患者病理切片的免疫组织化学分析发现,LRRC8A/VRAC 的高表达与较高肿瘤级别有关。此外,根据 GEPIA 和 Kaplan-Meier 绘图仪获得的结果,肿瘤患者中 LRRC8A/VRAC 的高表达与较差的临床结果显著相关。尽管如此,LRRC8A/VRAC 在肿瘤中的生物学功能和预后价值尚并未得到全面的表征,其在肿瘤治疗中的关键作用和分子机制仍需要进一步阐明<sup>[52]</sup>。

## 4 总结与展望

LRRC8A 作为 VRAC 的必需组成单位,与肿瘤的发生发展表现出极高的相关性,尤其是在肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及多药耐药中通过介导上下游信号通路发挥重要作用,同时,由于其其在肿瘤免疫中的调控作用,从而使 LRRC8A/VRAC 可能成为肿瘤的潜在治疗靶点。但值得注意的是,现在对 LRRC8A/VRAC 的研究主要是以 VRAC 为主,但有关 LRRC8A 自身的研究相对较少,后续对 LRRC8A 自身的研究可能为肿瘤治疗提供新的思路。此外免疫组化显示 LRRC8A/VRAC 不仅位于细胞膜上,而且位于细胞质中。先前的研究表明,一些膜蛋白细胞内定位的变化会影响肿瘤的进展。这种定位变化的详细机制尚不清楚,仍需进一步研究来阐明 LRRC8A/VRAC 在细胞质中是否具有不同的作用。

### 参考文献:

- [1] DEO S V S, SHARMA J, KUMAR S. GLOBOCAN 2020 report on global cancer burden; challenges and opportunities for surgical oncologists [J]. *Ann Surg Oncol*, 2022, 29(11): 6497-6500.
- [2] PAPIEŻ M A, KRZYŚCIAK W. Biological therapies in the treatment of cancer-update and new directions [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11694.
- [3] ANDERSON K J, CORMIER R T, SCOTT P M. Role of ion channels in gastrointestinal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(38): 5732-5772.

- [ 4 ] LÜCK J C, PUCHKOV D, ULLRICH F, et al. LRRC8/VRAC anion channels are required for late stages of spermatid development in mice [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(30): 11796–11808.
- [ 5 ] KURASHIMA K, SHIOZAKI A, KUDOU M, et al. LRRC8A influences the growth of gastric cancer cells via the p53 signaling pathway [J]. *Gastric Cancer*, 2021, 24(5): 1063–1075.
- [ 6 ] OSEI-OWUSU J, YANG J, VITERY M D C, et al. Molecular biology and physiology of volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Curr Top Membr*, 2018, 81: 177–203.
- [ 7 ] HAZAMA A, OKADA Y.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of volume-regulatory  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channels in cultured human epithelial cells [J]. *J Physiol*, 1988, 402: 687–702.
- [ 8 ] KITTL M, WINKLMAYR M, PREISHUBER-PFLÜGL J, et al. Low pH attenuates apoptosis by suppressing the volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR) chloride current in chondrocytes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 804105.
- [ 9 ] FORMAGGIO F, SARACINO E, MOLA M G, et al. LRRC8A is essential for swelling-activated chloride current and for regulatory volume decrease in astrocytes [J]. *FASEB J*, 2019, 33(1): 101–113.
- [ 10 ] FIGUEROA E E, DENTON J S. A SWELL time to develop the molecular pharmacology of the volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Channels*, 2022, 16(1): 27–36.
- [ 11 ] VOSS F K, ULLRICH F, MÜNCH J, et al. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC [J]. *Science*, 2014, 344(6184): 634–638.
- [ 12 ] FRIARD J, LAURAIN A, RUBERA I, et al. LRRC8/VRAC channels and the redox balance: a complex relationship [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55(S1): 106–118.
- [ 13 ] GHOULI M R, FIACCO T A, BINDER D K. Structure-function relationships of the LRRC8 subunits and subdomains of the volume-regulated anion channel (VRAC) [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 962714.
- [ 14 ] XU R, WANG X, SHI C. Volume-regulated anion channel as a novel cancer therapeutic target [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 159: 570–576.
- [ 15 ] YOSHIMOTO S, MATSUDA M, KATO K, et al. Volume-regulated chloride channel regulates cell proliferation and is involved in the possible interaction between TMEM16A and LRRC8A in human metastatic oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 895: 173881.
- [ 16 ] WONG R, CHEN W, ZHONG X, et al. Swelling-induced chloride current in glioblastoma proliferation, migration, and invasion [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 363–370.
- [ 17 ] KONISHI T, SHIOZAKI A, KOSUGA T, et al. LRRC8A expression influences growth of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(10): 1973–1985.
- [ 18 ] PLANELLS-CASES R, LUTTER D, GUYADER C, et al. Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs [J]. *EMBO J*, 2015, 34(24): 2993–3008.
- [ 19 ] SHEN M R, DROOGMANS G, EGGERMONT J, et al. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells [J]. *J Physiol*, 2000, 529(Pt 2): 385–394.
- [ 20 ] LIU T, STAUBER T. The volume-regulated anion channel LRRC8/VRAC is dispensable for cell proliferation and migration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2663.
- [ 21 ] YANG C, HE L, CHEN G, et al. LRRC8A potentiates temozolomide sensitivity in glioma cells via activating mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. *Hum Cell*, 2019, 32(1): 41–50.
- [ 22 ] LU P, DING Q, LI X, et al. SWELL1 promotes cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *EBioMedicine*, 2019, 48: 100–116.
- [ 23 ] CAI S, ZHANG T, ZHANG D, et al. Volume-sensitive chloride channels are involved in cisplatin treatment of osteosarcoma [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2465–2470.
- [ 24 ] SØRENSEN B H, NIELSEN D, THORSTEINSDOTTIR U A, et al. Downregulation of LRRC8A protects human ovarian and alveolar carcinoma cells against Cisplatin-induced expression of p53, MDM2, p21Waf1/Cip1, and Caspase-9/-3 activation [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(11): C857–C873.
- [ 25 ] FUJII T, SHIMIZU T, YAMAMOTO S, et al. Crosstalk between  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and a volume-regulated anion channel in membrane microdomains of human cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3792–3804.
- [ 26 ] ZHANG H, DENG Z, ZHANG D, et al. High expression of leucine-rich repeat-containing8A is indicative of a worse outcome of colon cancer patients by enhancing cancer cell growth and metastasis [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1275–1286.
- [ 27 ] NOOROLYAI S, SHAJARI N, BAGHBANI E, et al. The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120–128.
- [ 28 ] CHOI H, ETTINGER N, ROHRBOUGH J, et al. LRRC8A channels support TNF $\alpha$ -induced superoxide production by Nox1 which is required for receptor endocytosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 101: 413–423.
- [ 29 ] 刘张驰, 王娟, 陈旭. 人源肿瘤异种移植小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(3): 374–381.
- LIU Z C, WANG J, CHEN X. Establishment and application of human tumor xenograft models in cancer research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(3): 374–381.
- [ 30 ] CHEN Y, ZUO X, WEI Q, et al. Upregulation of LRRC8A by  $\text{m}^5\text{C}$  modification-mediated mRNA stability suppresses apoptosis and facilitates tumorigenesis in cervical cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(2): 691–704.
- [ 31 ] ZHANG H, CUI S, JING Z, et al. LRRC8A is responsible for exosome biogenesis and volume regulation in colon cancer cells [J]. *Biochem J*, 2023, 480(9): 701–713.
- [ 32 ] HOFFMANN E K, SØRENSEN B H, SAUTER D P, et al. Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell

- volume homeostasis, cancer and drug resistance [J]. *Channels*, 2015, 9(6): 380–396.
- [33] SLACK R J, MACDONALD S J F, ROPER J A, et al. Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(1): 60–78.
- [34] PATTEN L W, BLATCHFORD P, STRAND M, et al. Assessing the performance of different outcomes for tumor growth studies with animal models [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(3): 248–257.
- [35] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212–226.
- [36] FRIARD J, CORINUS A, COUGNON M, et al. LRRC8/VRAC channels exhibit a noncanonical permeability to glutathione, which modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 925.
- [37] 李惠, 郭文文, 王荟荟, 等. 抗 PD-1 单抗联合顺铂的新辅助治疗策略对 NSCLC 人源化小鼠模型肿瘤复发与转移的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 751–758.
- LI H, GUO W W, WANG H H, et al. Neoadjuvant treatment strategy by anti-PD-1 immunotherapy combined with cisplatin inhibits recurrence and metastasis of NSCLC in a humanized mouse model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(6): 751–758.
- [38] SØRENSEN B H, DAM C S, STÜRUP S, et al. Dual role of LRRC8A-containing transporters on cisplatin resistance in human ovarian cancer cells [J]. *J Inorg Biochem*, 2016, 160: 287–295.
- [39] ZHANG H, JING Z, LIU R, et al. LRRC8A promotes the initial development of oxaliplatin resistance in colon cancer cells [J]. *Heliyon*, 2023, 9(6): e16872.
- [40] RUBINO S, BACH M D, SCHÖBER A L, et al. Downregulation of leucine-rich repeat-containing 8A limits proliferation and increases sensitivity of glioblastoma to temozolomide and carmustine [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 142.
- [41] XU R, HU Y, XIE Q, et al. LRRC8A is a promising prognostic biomarker and therapeutic target for pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancers*, 2022, 14(22): 5526.
- [42] CONEJO-GARCIA J R. Breaking barriers for T cells by targeting the EPHA2/TGF- $\beta$ /COX-2 axis in pancreatic cancer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3521–3523.
- [43] ZHOU C, CHEN X, PLANELLAS-CASES R, et al. Transfer of cGAMP into bystander cells via LRRC8 volume-regulated anion channels augments STING-Mediated interferon responses and Anti-viral immunity [J]. *Immunity*, 2020, 52(5): 767–781.
- [44] KUMAR L, CHOU J, YEE C S, et al. Leucine-rich repeat containing 8A (LRRC8A) is essential for T lymphocyte development and function [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(5): 929–942.
- [45] CONCEPCION A R, WAGNER L E, ZHU J, et al. The volume-regulated anion channel LRRC8C suppresses T cell function by regulating cyclic dinucleotide transport and STING-p53 signaling [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23(2): 287–302.
- [46] LIU J, SHEN D, WEI C, et al. Inhibition of the LRRC8A channel promotes microglia/macrophage phagocytosis and improves outcomes after intracerebral hemorrhagic stroke [J]. *iScience*, 2022, 25(12): 105527.
- [47] 王赛飞, 荀敬, 武雪亮, 等. NK 细胞及其免疫疗法在肿瘤免疫治疗中的应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(11): 1479–1484.
- WANG S F, XUN J, WU X L, et al. Application of NK cells and their immunotherapy in tumor immunotherapy [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(11): 1479–1484.
- [48] LI T, CHEN Z J. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer [J]. *J Exp Med*, 2018, 215(5): 1287–1299.
- [49] MARKOSYAN N, LI J, SUN Y H, et al. Tumor cell-intrinsic EPHA2 suppresses anti-tumor immunity by regulating PTGS2 (COX-2) [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3594–3609.
- [50] NAIK A, LEASK A. Tumor-associated fibrosis impairs the response to immunotherapy [J]. *Matrix Biol*, 2023, 119: 125–140.
- [51] CHEN X, ZHANG F, HU G, et al. LRRC8A critically regulates myofibroblast phenotypes and fibrotic remodeling following myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2022, 12(13): 5824–5835.
- [52] ZHANG H, LIU R, JING Z, et al. LRRC8A as a central mediator promotes colon cancer metastasis by regulating PIP5K1B/PIP2 pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167066.

[收稿日期]2024-02-01

刘欣,唐红悦,郭畅,等. 血管平滑肌细胞表型转换与细胞焦亡在腹主动脉瘤中的作用及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 100-106.

Liu X, Tang HY, Guo C, et al. Research progress in the role of vascular smooth muscle cell phenotype switching and cell pyroptosis in abdominal aortic aneurysm [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 100-106.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.013

# 血管平滑肌细胞表型转换与细胞焦亡在腹主动脉瘤中的作用及研究进展

刘欣<sup>1,5,6</sup>, 唐红悦<sup>2</sup>, 郭畅<sup>3,5,6</sup>, 马冬<sup>4</sup>, 张明明<sup>5,6\*</sup>

(1.河北医科大学研究生学院,石家庄 050017;2.河北省人民医院输血科,石家庄 050051;  
3.华北理工大学研究生院,河北唐山 063210;4.河北医科大学基础医学院生化研究室,石家庄 050017;  
5.河北省人民医院临床医学研究中心,石家庄 050051;6.河北省代谢病重点实验室,石家庄 050051)

**【摘要】** 腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm,AAA)作为一种隐匿型致死性疾病,其背后的发展机制尚不清楚。研究已经发现血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMCs)表型转换和细胞焦亡(cell pyroptosis)是与AAA产生发展密切相关的两种生物学过程,可能会成为揭示AAA发生机制的重要学说,为AAA的诊断和治疗提供新的方向。本文将通过介绍VSMCs表型转换和细胞焦亡与AAA之间的调控关系展开论述。

**【关键词】** 细胞焦亡;表型转换;动脉粥样硬化性疾病;腹主动脉瘤

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0100-07

## Research progress in the role of vascular smooth muscle cell phenotype switching and cell pyroptosis in abdominal aortic aneurysm

LIU Xin<sup>1,5,6</sup>, TANG Hongyue<sup>2</sup>, GUO Chang<sup>3,5,6</sup>, MA Dong<sup>4</sup>, ZHANG Mingming<sup>5,6\*</sup>

(1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China. 2. Blood Transfusion Department, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051. 3. Graduate School, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210. 4. Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017. 5. Clinical Medicine Research Center, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051. 6. Hebei Key Laboratory of Metabolic Diseases, Shijiazhuang 050051)

**【Abstract】** Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a hidden and fatal disease, but its underlying developmental mechanism remains unclear. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells and pyroptosis have been identified as biological processes closely related to the appearance and progression of AAA, with potentially important roles in the mechanism of AAA and in providing new directions for its diagnosis and treatment. In this review, we discuss phenotypic switching of vascular smooth muscle cells and the regulatory relationship between cell pyroptosis and AAA.

**【Keywords】** cell pyroptosis; phenotypic switch; atherosclerotic disease; abdominal aortic aneurysm

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82270508);河北省自然科学基金面上项目(H2024307005);神经与血管生物学教育部重点实验室主任基金青年基金项目(NV20210006);河北省人社厅重点研发计划项目(A202105015)。

**【作者简介】** 刘欣(1999—),硕士研究生,研究方向:动脉粥样硬化性疾病研究。E-mail:22033100482@stu.hebmu.edu.cn

**【通信作者】** 张明明(1976—),女,博士,硕士生导师,研究方向:动脉粥样硬化性疾病研究。E-mail:zhangmm197612@hebmu.edu.cn

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是全世界范围内的严重医疗保健挑战,当主动脉壁直径超过正常腹主动脉的 50% 或 >30 mm 时可怀疑 AAA 产生,其通常能导致急性血管破裂并伴有极高的发病率和死亡率<sup>[1]</sup>。AAA 常见的危险因素有血脂异常、高血压、吸烟、性别、家族史和动脉粥样硬化等<sup>[2]</sup>。随着开放修复和血管内动脉瘤修复 (EVAR) 疗法的发展,直径 >5.5 cm (女性 >4.5 cm) 的动脉瘤可以得到有效治疗<sup>[3]</sup>。然而,目前只有 10% 的患者符合手术条件,对于不能手术的患者尚无有效的药物治疗方法,因此早期的诊断和治疗极为重要。

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 是动脉壁平滑肌内的主要固有细胞,通过在正常主动脉中合成基质来维持主动脉结构、调节血管张力和血流<sup>[4]</sup>,在病理条件下,VSMCs 将会经历称为表型转换 (phenotypic switch) 的重塑过程,在这个过程中,VSMCs 失去收缩性并转化为合成表型,此时 VSMCs 会过度增殖并从中膜迁移到内膜,从而导致血管闭塞。越来越多的证据表明 VSMCs 可以直接参与 AAA 的发生,健康血管壁中的 VSMCs 表现出收缩表型以维持血管张力,当其收缩功能丧失时血管张力改变,使主动脉壁应力增加,促进 AAA 形成<sup>[5]</sup>。

细胞焦亡 (cell pyroptosis) 是一种由气皮蛋白 (gasdermin, GSDM) 驱动的程序性坏死,与先天免疫和疾病高度相关<sup>[6]</sup>,其特征是炎性小体介导的半胱氨酸天冬酶-1 (caspase-1) 激活,诱导细胞焦亡执行子 (GSDMD) 裂解为 N 端 GSDMD 片段 (GSDMD-N),导致质膜孔形成,细胞裂解并释放促炎细胞因子<sup>[7]</sup>。既往研究表明,细胞焦亡在 AAA 发展中起着至关重要的作用,其通过加速破坏主动脉壁血管壁弹力纤维,从而加速 AAA 的进展<sup>[8]</sup>,可能是 AAA 发生发展中的重要环节。本文综述了细胞焦亡、血管平滑肌细胞表型转化两个重要生物过程与腹主动脉瘤发生发展之间的关系。

## 1 血管平滑肌细胞表型转换与腹主动脉瘤

### 1.1 VSMCs 的正常生理功能

正常主动脉的生理构造大致由三级结构组成,依次是细胞内膜、中膜和外膜,其中内膜层主要由内皮细胞构成,中膜层由动脉血管平滑肌细胞构成,而外膜层则由成纤维细胞和细胞外基质

(extracellular matrix, ECM) 构成<sup>[5]</sup>。生理情况下,动脉的弹性主要来源于 VSMCs 的主动收缩和由胶原及弹性蛋白纤维组成的弹性片的被动收缩,这种收缩特性使 VSMCs 能够调节血管直径、血压和血流分布。在大动脉中,VSMCs 在收缩射血期收缩以维持动脉的正常形状。而在小阻力动脉中 VSMCs 主要负责调节血流分布,缩小小阻力动脉的直径<sup>[9]</sup>。此外自主神经系统、肾上腺激素、血管活性肽和活性氧分泌的活性物质均可调节 VSMCs 的收缩能力。

### 1.2 VSMCs 表型转换

VSMCs 可塑性极强,其完整分解后的结构呈纺锤状,并产生大量收缩蛋白,如调宁蛋白 (calponin)、 $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、钙调蛋白结合蛋白 (caldesmon) 和肌动蛋白相关蛋白 (SM22 $\alpha$ )<sup>[10-12]</sup>。病理条件下,VSMCs 可被转化生长因子 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、血管紧张素 II (angiotensin II, Ang-II) 等诱导转变为去分化的合成表型,去分化的 VSMCs 呈上皮样形状,收缩蛋白表达水平降低,合成蛋白,如骨桥蛋白 (osteopontin)、epiregulin (EGF 家族成员)、弹性蛋白原 (tropoelastin) 等表达水平升高,具有高增殖和迁移能力,并合成大量 ECM<sup>[10,13]</sup>,见表 1。

VSMCs 表型转化主要受基因转录、表观遗传修饰和信号转导的调控。在基因转录水平上,VSMCs 表型调控的关键在于血清反应因子 (serum response factor, SRF),心肌素作为 SRF 的一种转录辅激活因子,负责维持 VSMCs 收缩表型,其机制为在含有靶基因的 CA<sub>T</sub>G 盒上,将心肌素与 SRF 结合,通过转录激活平滑肌特异性收缩表型标记,包括  $\alpha$ -SMA、SM22 和 SMMHC,因此 CA<sub>T</sub>G-SRF-心肌素复合物的形成是维持 VSMCs 分化的关键,一旦复合物被破坏,就会发生 VSMCs 去分化/合成表型的调节<sup>[14]</sup>;在表观遗传修饰水平上,微小 RNA (microRNA, miRNA) 通过结合 3' UTR 抑制靶基因翻译,通过转录后调控影响表型转化。研究发现 miR-134-5p、miR-128-3p 和 miR-145 可以驱动 VSMCs 向分化表型的转变<sup>[15-17]</sup>,而 miR-199a-5p、miR-19a-3p 则可以驱动 VSMCs 向去分化表型的转变<sup>[18-19]</sup>,同时其他类型的非编码 RNA,如 circMAP3K5、circDcbl1 和 circLrp6 也可以调节 VSMCs 的表型转化<sup>[20-22]</sup>;在信号转导通路调控方面,有许多信号通路参与 VSMCs

表 1 血管平滑肌细胞表型转换标志物  
Table 1 Phenotypic switch markers of vascular smooth muscle cells

标志物类型 Types of markers	标志物名称 Name of markers	功能 Function
合成表型 Synthetic phenotype	骨桥蛋白 Osteopontin	增殖、迁入血管内膜及合成细胞外基质蛋白 Proliferation, migration into the vascular intima, and synthesis of extracellular matrix proteins
	EGF 家族成员 Epiregulin	
	弹性蛋白原 Tropoelastin	
	血小板凝血酶敏感蛋白 Thrombospondin	
收缩表型 Phenotype of contraction	基质 Gla 蛋白 MGP	维持血管弹性和收缩血管 Maintain blood vessel elasticity and constrict blood vessels
	$\alpha$ 平滑肌肌动蛋白 $\alpha$ -SMA	
	调宁蛋白 Calponin	
	肌动蛋白相关蛋白 SM22 $\alpha$	
	平滑肌肌球蛋白重链 SMMHC	
	钙调蛋白结合蛋白 Caldesmon	

表型转换,如 TGF- $\beta$ /Smad 和 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以抑制 VSMCs 表型转换<sup>[17]</sup>,而 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路则可以促进 VSMCs 表型转换<sup>[23-24]</sup>。

### 1.3 VSMCs 表型转换在 AAA 发生发展中的作用机制

VSMCs 在动脉瘤形成中起核心作用,促进 VSMCs 分化能够限制实验性 AAA 的形成。健康血管壁中的 VSMCs 表现出收缩表型以维持血管张力,收缩功能的丧失可能改变血管张力,增加主动脉壁应力,促进动脉瘤形成。在 AAA 疾病的初始阶段,可以观察到炎症细胞浸润主动脉壁,促炎介质的产生增加,然后浸润细胞触发炎症反应,促进 VSMCs 的表型转换<sup>[25-27]</sup>。多种信号通路被发现参与 VSMCs 表型转换调控 AAA 的过程,作为经典信号通路,TGF- $\beta$  信号通路已被发现可以通过调节 VSMCs 表型影响 AAA 的产生和发展。Zhou 等<sup>[28]</sup>研究发现,与健康对照组相比,AAA 主动脉样本中的 Runt 相关转录因子 3 (RUNX family transcription factor 3, RUNX3) 表达增加,导致 TGF- $\beta$ 1 沉默,从而抑制 VSMCs 中 SM22、MYH11 和 CNN1 的表达,进而促进了 AAA 的进程;除此之外,NF- $\kappa$ B 信号通路同样参与 VSMCs 表型转换过程,Jiang 等<sup>[29]</sup>发现,海沙瑞林 (Hexarelin) 作为一种合成的生长激素释放肽,被证明对心肌梗死和动脉粥样硬化等心血管疾病有保护作用,其能够恢复平滑肌细胞的收缩表型,还能抑制炎症细胞浸润、NLRP3 炎性体活化和 IL-18 的产生。特别是,Hexarelin 能够抑制作为炎症反应关键发起者的 NF- $\kappa$ B 信号通路,这些结果表明 Hexarelin 通过抑制 VSMCs 表型转换和 NF- $\kappa$ B 信号介导的炎症反应来减轻 AAA 的发生<sup>[29]</sup>;同时,已

有令人信服的证据表明,PI3K/Akt 信号通路在维持各种血管疾病 VSMCs 的收缩表型中起关键作用,PI3K/Akt 通路对 VSMCs 表型调节的作用部分依赖于对 FoxO 转录因子活性的抑制,Lu 等<sup>[30]</sup>研究发现 FoxO3a 通过 P62/LC3BII 自噬信号通路促进 VSMCs 表型转换,加速 AAA 的形成,降低 FoxO3a 表达的治疗方法可能阻止 AAA 的形成。VSMCs 表型转换的另一层控制是 miRNA,Shi 等<sup>[31]</sup>研究发现,含心室区表达的 PH 结构域 1 蛋白作为 miR-126-5p 的靶点,可以促进 VSMCs 的收缩转换,从而减轻 Ang- II 诱导的小鼠 AAA 产生;miR-23b 最近已被证明在维持 VSMCs 收缩表型中起重要作用,Si 等<sup>[32]</sup>对此展开了研究并得到结论,miR-23b 通过抑制 FoxO4 的表达从而抑制 VSMCs 表型转换来防止 AAA 的产生。

## 2 细胞焦亡与腹主动脉瘤

### 2.1 细胞焦亡的经典途径和非经典途径

典型的焦亡是由 caspase-1 介导的,主要发生在巨噬细胞中,其关键步骤是 caspase-1 的募集和激活<sup>[33]</sup>。以 NLRP3 炎性小体为例,当 NLRP3 蛋白受到特异性病原相关分子模型 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 和损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 的刺激时,NLRP3 蛋白募集 ASC 和前 caspase-1,并在 NIMA 相关激酶 7 (NEK7) 的协助下组装成 NLRP3 炎性小体,见图 1。NLRP3 炎性小体组装激活前 caspase-1,激活后的 caspase-1 不仅可以介导 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的成熟和分泌,还可以直接裂解 GSDMD 生成 GSDMD-N。随后,GSDMD-N 通过膜脂相互作用与膜内表面的磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸

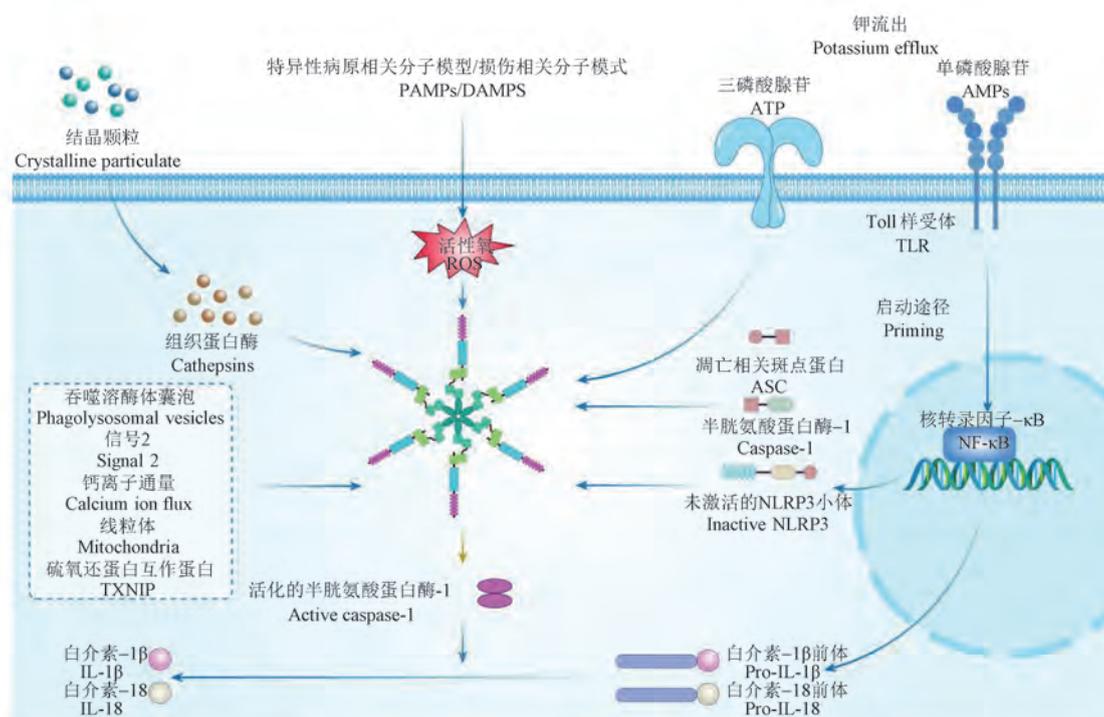


图1 NLRP3小体激活机制

Figure 1 NLRP3 activation mechanism

结合,在脂质双分子层形成内径为 10~20 nm 的低聚孔(GSDMS孔),然后 LDH、IL-1 $\beta$ 、IL-18 以及其他小的细胞质蛋白通过毛孔泄漏出来,最终导致焦亡<sup>[34]</sup>。

研究发现与典型炎性 caspase-1 密切相关的人类效应物 caspase-4 和 caspase-5 以及啮齿动物中的 caspase-11 也作为受体发挥作用<sup>[35]</sup>。caspase-4/5/11 的 CARD 结构域通过与脂多糖(LPS)中的脂质 A 结合,可导致 caspase 寡聚和激活,裂解 GSDMD 的 N 端,引起膜孔形成,分泌炎症介质,引发细胞死亡和炎症<sup>[36]</sup>。

## 2.2 细胞焦亡相关蛋白

### 2.2.1 GSDMD 蛋白

Gasdermin (GSDM) 是近年来发现的一个成孔效应蛋白家族,其家族成员在不同的组织和细胞中表达不同。其中最为重要的 Gasdermin D (GSDMD) 是细胞焦亡的一种孔隙形成效应因子,炎性体复合物 caspase-11 和 caspase-8 可以导致 GSDMD 裂解,GSDMD N 端结构域 N-GSDMD 随后在巨噬细胞的质膜上寡聚并形成孔,形成 GSDMD 孔不仅导致胞质内容物的释放,而且还导致溶解性细胞死亡<sup>[37]</sup>。

### 2.2.2 NLRP3 小体

NLRP3 炎性小体是一种应对细胞压力信号的

胞质免疫因子,一旦 NLRP3 炎性小体形成并被激活,就会激活 caspase-1,将 IL-1 $\beta$  转化为活性形式,由于 IL-1 $\beta$  是一种有效的促炎细胞因子,因此它释放时会导致周围组织的炎症。NLRP3 炎性小体具有活性需要经历两个过程。由于 NLRP3 和 pro-IL-1 $\beta$  的蛋白水平在静息细胞中相对较低,启动信号通过启动 Toll 样受体 (TLRs) 或细胞因子受体介导的核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路来上调这些蛋白水平,翻译后修饰 (post-translational modifications, PTMs),如去泛素化和磷酸化,也被证明可以诱导 NLRP3 蛋白的快速启动<sup>[38]</sup>。随后,激活信号促进 NLRP3 炎性小体复合物的组装,并导致 caspase-1 激活,促进细胞焦亡产生<sup>[39]</sup>。

### 2.2.3 Caspase 蛋白家族

Caspases 主要参与细胞凋亡和炎症反应,已被证明是生物体细胞发育性死亡的必需蛋白酶。在正常细胞中,caspase 通常以无活力的前酶状态 (pro-caspase) 存在,在氨基酸序列水解后,无活力的 caspase 可以变成有活力的 caspase,从而切割作用底物,使作用底物的激活、失活、重新定位或重塑<sup>[40]</sup>。根据结构和功能的不同,caspase 可分为凋亡型和炎症型<sup>[41]</sup>。凋亡型 caspase 与凋亡密切相关,包括 caspase-2/3/6/7/8/9/10,其中 caspase-3 最为重要;

炎症型 caspase 则介导炎症反应和细胞焦亡,包括 caspase-1/4/5/11/12/13/14<sup>[42]</sup>,其中 caspase-1 作用最大,介导焦亡的 caspase-1 依赖途径,而 caspase-4/5/11 则介导焦亡的非 caspase-1 依赖途径。

### 2.3 细胞焦亡在 AAA 发生发展中的作用机制

研究发现细胞焦亡与 AAA 的产生同样密切相关。在动物体实验中,Liao 等<sup>[43]</sup>研究发现,对注射 Ang-Ⅱ 构建 AAA 模型的 C57BL/6J 小鼠进行 RNA 测序和生物信息学分析,结果显示 AAA 中与焦亡和炎症相关的基因显著上调;Fu 等<sup>[8]</sup>同样构建 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AAA 模型,结果发现小鼠体内细胞焦亡效应物 GSDMD 和 NLRP3 炎性小体在腹主动脉中被激活,血清中炎症因子升高。对 AAA 患者进行实验同样可以得到相同的结果,Wortmann 等<sup>[44]</sup>应用自体坏死细胞碎片作为损伤相关的分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 刺激 AAA 患者的人 VSMCs,发现 NLRP3 和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 和蛋白表达水平高于对照细胞,VSMCs 转向炎症表型,证实 NLRP3 介导的炎症参与了 VSMCs 的功能障碍和焦亡,促进了 AAA 的发展。另一项研究发现 NLRP3 炎性小体或许是导致炎症性疾病 AAA 发生的关键介质,可能与以下机制有关:Ang-Ⅱ 刺激外源性巨噬细胞产生活性氧,导致 NLRP3 的激活,从而释放 IL-1 $\beta$  诱导血管炎症的产生,增强炎症反应,促进血管壁弹性层的破坏,导致 AAA 的形成<sup>[45]</sup>。因此,可以认为 AAA 与细胞焦亡间存在相互作用机制,但具体作用仍不明确。

### 3 平滑肌细胞表型转换、细胞焦亡与 AAA 之间的调控关系

目前已经有大量的文献和研究分别叙述了 VSMCs 表型转换和细胞焦亡两个生物学过程调控 AAA 的相关机制,但是这两种过程之间是否同样存在相互作用和调控关系,从而影响 AAA 的产生和发展,临床相关研究还较少。

Gao 等<sup>[46]</sup>研究通过腹腔注射 Ang-Ⅱ 构建 AAA 小鼠模型,其中单细胞转录组分析结果显示在 Ang-Ⅱ 诱导的 AAA 中,主动脉血管平滑肌细胞表达 GSDMD 上调,Western blot 结果显示 VSMCs 的特异性 GSDMD 缺乏会导致收缩表型蛋白  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  和钙-钙蛋白的表达水平升高,这 3 种蛋白在小干扰 RNA (siRNA) 诱导的 GSDMD 敲低的人主动脉平滑肌细胞 (HASMCs) 中也上调。综上所述,这些结果表明,VSMCs 的特异性 GSDMD 缺陷降低

了小鼠 AAA 的发生率,并可以使 VSMCs 维持在收缩表型状态。Burger 等<sup>[47]</sup>通过构建小鼠模型展开了研究,分别进行了流式细胞术、ELISA 和细胞焦亡相关实验,来证明 ox-LDL 激活的单核细胞在 VSMCs 共培养体系中的直接作用,通过免疫荧光定量检测 NLRP3 炎性小体的激活和 VSMCs 表型转换,结果表明 ox-LDL 激活的单核细胞降低了 VSMCs 中  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  的表达,激活了 caspase-1,分泌了 IL-1 $\beta$ ,促进了细胞焦亡,以上结果证明 NLRP3 炎性小体的激活可以促进 VSMCs 表型转换和细胞焦亡,是导致 AAA 产生的危险因素。NLRP3 小体的激活已经被证明与 VSMCs 表型转换相关,Bai 等<sup>[48]</sup>发现来源于平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白基因的 circACTA2 在调节 VSMCs 表型转换和 NLRP3 介导的细胞焦亡中起重要作用,实验结果显示在 circACTA2 过表达时可以抑制 NLRP3 基因转录和炎性小体的活化,同时抑制 NLRP3 小体活化又促进 VSMCs 由合成表型向收缩表型转化,抑制细胞焦亡的产生从而减轻血管炎症,预防 AAA 的发生。Yang 等<sup>[49]</sup>研究结果显示,泛素羧基末端水解酶 L5 (UCHL5) 是一种去泛素化酶,其在功能上被发现与 Smad2/3 和转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 信号通路密切相关,而此通路又被证实可以促进 VSMCs 的增殖、迁移和表型转换,因此怀疑 UCHL5 与 VSMCs 调控相关,实验结果表明 UCHL5 可以通过激活 NLRP3 炎性小体促进 VSMCs 的增殖、迁移和表型转换,是 AAA 发生的危险因素。研究发现,青蒿琥酯具有抗炎活性,在体外可以降低 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 $\beta$  的表达,在 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内则可以降低 NLRP3 和 CD68 的表达,同时随着 NLRP3 表达的减少,抑制发生细胞表型转换,防止 AAA 的发生<sup>[50]</sup>。

### 4 总结与展望

由于 AAA 具有病因不明和破裂后的高死亡率的特点,是目前对公众健康的严重威胁之一,因此明确其发病机制,发现新的高效治疗方法仍是临床研究的首要目标。在 AAA 的诊断、治疗及预防领域均亟需基础研究的深入分析,从而全面改善 AAA 的综合诊治效果;在诊断方面,目前尚缺乏判断 AAA 破裂风险的标志物;在治疗方面,AAA 治疗以手术或介入治疗为主,缺乏有效药物;在预防方面,由于 AAA 的发病及进展机制尚未完全清楚,因此难以有效预防 AAA 发生。故探讨 AAA 的分子机制对其临

床诊治工作具有重要价值。已有研究发现 VSMCs 表型转换和细胞焦亡与 AAA 的发生发展密切相关,同时这两个调控过程均涉及到炎症反应和氧化应激<sup>[46-49]</sup>,因此未来我们会将研究重点放在筛选与炎症反应和氧化应激相关的基因、蛋白和信号通路上,为 AAA 的诊治提供新思路。目前的研究中 PI3K/Akt 信号通路、Smad/TGF- $\beta$  信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路都被证实与这两种调控相关,尽管近年来动物模型和临床研究的越来越多的证据表明这两个过程可以参与调控 AAA 的发生发展,但是对于二者之间的联合调控作用仍知之甚少,因此从分子层面上明确 AAA 的发病机制,为 AAA 提供更加精准的治疗是研究的首要任务。同时由于 AAA 的特殊性,很难在人体中开展试验研究,因此缺乏相关的临床试验数据,未来在符合伦理的前提下,将开展更多针对于临床患者的研究,将新的标志物应用于 AAA 病情的评价,为后续筛选新药治疗提供思路。

#### 参考文献:

- [ 1 ] GOLLEDGE J. Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(4): 225-242.
- [ 2 ] LIU H, TIAN K, XIA C, et al. Kunming mouse strain is less susceptible to elastase-induced abdominal aortic aneurysms [J]. *Anim Model Exp Med*, 2022, 5(1): 72-80.
- [ 3 ] GALLITTO E, SOBOCINSKI J, MASCOLI C, et al. Fenestrated and branched thoraco-abdominal endografting after previous open abdominal aortic repair [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2020, 60(6): 843-852.
- [ 4 ] LAI C H, CHANG C W, LEE F T, et al. Targeting vascular smooth muscle cell dysfunction with xanthine derivative KMUP-3 inhibits abdominal aortic aneurysm in mice [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 297: 16-24.
- [ 5 ] QIAN G, ADEYANJU O, OLAJUYIN A, et al. Abdominal aortic aneurysm formation with a focus on vascular smooth muscle cells [J]. *Life*, 2022, 12(2): 191.
- [ 6 ] NEWTON K, DIXIT V M, KAYAGAKI N. Dying cells fan the flames of inflammation [J]. *Science*, 2021, 374(6571): 1076-1080.
- [ 7 ] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128.
- [ 8 ] FU H, SHEN Q R, ZHAO Y, et al. Activating  $\alpha$ 7nAChR ameliorates abdominal aortic aneurysm through inhibiting pyroptosis mediated by NLRP3 inflammasome [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(10): 2585-2595.
- [ 9 ] CAO G, XUAN X, HU J, et al. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 180.
- [ 10 ] OH S, SON M, PARK C H, et al. Pyrogallol-phloroglucinol-6, 6-bieckolon attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and phenotype switching in hyperlipidemia through modulation of chemokine receptor 5 [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(8): 393.
- [ 11 ] TIERNEY J W, EVANS B C, CHEUNG-FLYNN J, et al. Therapeutic MK2 inhibition blocks pathological vascular smooth muscle cell phenotype switch [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e142339.
- [ 12 ] HE X, LIAN Z, YANG Y, et al. Long non-coding RNA PEBP1P2 suppresses proliferative VSMCs phenotypic switching and proliferation in atherosclerosis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 84-98.
- [ 13 ] HE X, DENG J, YU X J, et al. Activation of M3AChR (type 3 muscarinic acetylcholine receptor) and Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) signaling by choline alleviates vascular smooth muscle cell phenotypic switching and vascular remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020, 40(11): 2649-2664.
- [ 14 ] LIANG M, CAI Z, JIANG Y, et al. SENP2 promotes VSMC phenotypic switching *via* myocardin de-SUMOylation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12637.
- [ 15 ] WANG Y, DONG C Q, PENG G Y, et al. MicroRNA-134-5p regulates media degeneration through inhibiting VSMC phenotypic switch and migration in thoracic aortic dissection [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 16: 284-294.
- [ 16 ] FARINA F M, HALL I F, SERIO S, et al. MiR-128-3p is a novel regulator of vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular diseases [J]. *Circ Res*, 2020, 126(12): e120-e135.
- [ 17 ] ZHANG M, LI F, WANG X, et al. MiR-145 alleviates Hcy-induced VSMC proliferation, migration, and phenotypic switch through repression of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Histochem Cell Biol*, 2020, 153(5): 357-366.
- [ 18 ] CAO Y, CAO Z, WANG W, et al. MicroRNA-199a-5p regulates FOXC2 to control human vascular smooth muscle cell phenotypic switch [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 627.
- [ 19 ] WANG W, WANG Y, PIAO H, et al. Bioinformatics analysis reveals microRNA-193a-3p regulates ACTG2 to control phenotype switch in human vascular smooth muscle cells [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 572707.
- [ 20 ] ZENG Z, XIA L, FAN S, et al. Circular RNA CircMAP3K5 acts as a microRNA-22-3p sponge to promote resolution of intimal hyperplasia *via* TET2-mediated smooth muscle cell differentiation [J]. *Circulation*, 2021, 143(4): 354-371.
- [ 21 ] RONG Z H, CHANG N B, YAO Q P, et al. Suppression of circDcbl1 alleviates intimal hyperplasia in rat carotid artery by targeting miR-145-3p/neuropilin-1 [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 999-1008.
- [ 22 ] HALL I F, CLIMENT M, QUINTAVALLE M, et al. Circ\_Lrp6, a circular RNA enriched in vascular smooth muscle cells, acts as a sponge regulating miRNA-145 function [J]. *Circ Res*, 2019, 124(4): 498-510.
- [ 23 ] WANG Z, LIU B, ZHU J, et al. Nicotine-mediated autophagy of

- vascular smooth muscle cell accelerates atherosclerosis *via* nAChRs/ROS/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2019, 284: 1–10.
- [24] HU C, HUANG W, XIONG N, et al. SP1-mediated transcriptional activation of PTTG1 regulates the migration and phenotypic switching of aortic vascular smooth muscle cells in aortic dissection through MAPK signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 711: 109007.
- [25] BRANGSCH J, REIMANN C, KAUFMANN J O, et al. Concurrent molecular magnetic resonance imaging of inflammatory activity and extracellular matrix degradation for the prediction of aneurysm rupture [J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2019, 12(3): e008707.
- [26] QUINTANA R A, TAYLOR W R. Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation [J]. *Circ Res*, 2019, 124(4): 607–618.
- [27] MALECKI C, HAMBLY B D, JEREMY R W, et al. The role of inflammation and myeloperoxidase-related oxidative stress in the pathogenesis of genetically triggered thoracic aortic aneurysms [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7678.
- [28] ZHOU Z, ZHOU H, ZOU X, et al. RUNX3 is up-regulated in abdominal aortic aneurysm and regulates the function of vascular smooth muscle cells by regulating TGF- $\beta$ 1 [J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(1): 1–11.
- [29] JIANG B, WANG M, LI X, et al. Hexarelin attenuates abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting SMC phenotype switch and inflammasome activation [J]. *Microvasc Res*, 2022, 140: 104280.
- [30] LU W, ZHOU Y, ZENG S, et al. Loss of FoxO3a prevents aortic aneurysm formation through maintenance of VSMC homeostasis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 378.
- [31] SHI X, MA W, PAN Y, et al. MiR-126-5p promotes contractile switching of aortic smooth muscle cells by targeting VEPHI and alleviates Ang II-induced abdominal aortic aneurysm in mice [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(12): 1564–1574.
- [32] SI X, CHEN Q, ZHANG J, et al. MicroRNA-23b prevents aortic aneurysm formation by inhibiting smooth muscle cell phenotypic switching *via* FoxO4 suppression [J]. *Life Sci*, 2022, 288: 119092.
- [33] WANG X, LI H, LI W, et al. The role of Caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis in Taxol-induced cell death and a Taxol-resistant phenotype in nasopharyngeal carcinoma regulated by autophagy [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(5): 437–457.
- [34] FRANK D, VINCE J E. Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 99–114.
- [35] WRIGHT S S, VASUDEVAN S O, RATHINAM V A. Mechanisms and consequences of noncanonical inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(4): 167245.
- [36] WANG M, JIANG S, ZHANG Y, et al. The multifaceted roles of pyroptotic cell death pathways in cancer [J]. *Cancers*, 2019, 11(9): 1313.
- [37] DAI Z, LIU W C, CHEN X Y, et al. Gasdermin D-mediated pyroptosis: mechanisms, diseases, and inhibitors [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1178662.
- [38] WEI S, FENG M, ZHANG S. Molecular characteristics of cell pyroptosis and its inhibitors: a review of activation, regulation, and inhibitors [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 16115.
- [39] LI Z, GUO J, BI L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110542.
- [40] ZENG C, WANG R, TAN H. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases and its therapeutic implications [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1345–1357.
- [41] KESAVARDHANA S, MALIREDDI R K S, KANNEGANTI T D. Caspases in cell death, inflammation, and pyroptosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 567–595.
- [42] ZENG Z, LI G, WU S, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12563.
- [43] LIAO F, WANG L, WU Z, et al. Disulfiram protects against abdominal aortic aneurysm by ameliorating vascular smooth muscle cells pyroptosis [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023, 37(6): 1–14.
- [44] WORTMANN M, SKORUBSKAYA E, PETERS A S, et al. Necrotic cell debris induces a NF- $\kappa$ B-driven inflammasome response in vascular smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms (AAA-SMC) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(2): 343–349.
- [45] USUI F, SHIRASUNA K, KIMURA H, et al. Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 127–136.
- [46] GAO J, CHEN Y, WANG H, et al. Gasdermin D deficiency in vascular smooth muscle cells ameliorates abdominal aortic aneurysm through reducing putrescine synthesis [J]. *Adv Sci*, 2023, 10(5): e2204038.
- [47] BURGER F, BAPTISTA D, ROTH A, et al. NLRP3 inflammasome activation controls vascular smooth muscle cells phenotypic switch in atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 340.
- [48] BAI Y, ZHANG L, ZHENG B, et al. circACTA2 inhibits NLRP3 inflammasome-mediated inflammation *via* interacting with NF- $\kappa$ B in vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(8): 229.
- [49] YANG X, WANG C, ZHU G, et al. METTL14/YTHDF1 axis-modified UCHL5 aggravates atherosclerosis by activating the NLRP3 inflammasome [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 427(2): 113587.
- [50] LIU P, WANG Y, TIAN K, et al. Artesunate inhibits macrophage-like phenotype switching of vascular smooth muscle cells and attenuates vascular inflammatory injury in atherosclerosis *via* NLRP3 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 172: 116255.

郭思序,梅鑫鑫,李晋. 外泌体的生物发生及其在神经退行性疾病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 107-115.  
Guo SX, Mei XX, Li J. Biogenesis of exosomes and their role in neurodegenerative diseases [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 107-115.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.014

# 外泌体的生物发生及其在神经退行性疾病中的作用

郭思序<sup>1</sup>,梅鑫鑫<sup>1</sup>,李晋<sup>1,2\*</sup>

(1.遵义医科大学贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室,贵州 遵义 563006;  
2.遵义医科大学基础医学院,贵州 遵义 563006)

**【摘要】** 神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)的发病率逐年增加,而目前针对 NDs 的药物基本以减轻症状为基础,并不是治疗性的,不能阻止疾病进展。外泌体是细胞外囊泡的一个子集,人体内几乎所有类型的细胞都可以产生外泌体,它被释放到细胞外环境后,通过多种方式发挥生物学效应。多种研究表明了外泌体虽然在中枢神经系统中具有两面性,但因其独特的生物学特性仍可作为 NDs 预防、缓解、治疗、诊断的工具。本文就外泌体的生物发生及其在神经退行性疾病中的作用作一综述,为临床治疗 NDs 提供新思路。

**【关键词】** 外泌体;神经退行性疾病;阿尔茨海默病;帕金森病;亨廷顿病

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0107-09

## Biogenesis of exosomes and their role in neurodegenerative diseases

GUO Sixu<sup>1</sup>, MEI Xinxin<sup>1</sup>, LI Jin<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Infectious Disease & Biosafety, and Provincial Department of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China. 2. School of Preclinical Medicine of Zunyi Medical University, Zunyi 563006)

**【Abstract】** The incidence of neurodegenerative diseases (NDs) has been increasing. Current drugs targeting NDs are mainly based on relieving symptoms rather than effecting a cure, and fail to prevent disease progression. Exosomes are a subset of extracellular vesicles that can be produced by almost all cells in the human body and exert biological effects in a variety of ways after their release into the extracellular environment. Many studies have shown that the unique biological characteristics of exosomes mean that they can be used as a tool for the prevention, remission, treatment and diagnosis of NDs. This article reviews the biogenesis of exosomes and their roles in ND, to provide new ideas for the clinical treatment of these conditions.

**【Keywords】** exosomes; neurodegenerative diseases; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; Huntington's disease

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

据联合国预测,2025年世界上65岁及以上人口比例将从9%升至16%，“银发海啸”席卷全球,随之而来的是神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDs)的流行。据世界卫生组织报告指出,目前全世界有超过5500万人(尤其65岁以上)受NDs折磨,并且人数在逐渐攀升,预估在2030年时

将上升到7800万人,到2050年时人数将达1.39亿<sup>[1-2]</sup>。为了缓解NDs患者的身体、心理负担,减轻整个社会的经济负担,探索预防、缓解、治疗、诊断NDs的方法是非常有必要的。NDs是因神经元或髓鞘丢失引发的,可能会有轻度神经损伤症状,如运动、感觉、视觉、语言、认知受损表现,最后会发展为

**【基金项目】**国家自然科学基金委员会地区项目(82360859);贵州省科技计划一般项目(黔科合基础-ZK[2021]一般547)。

**【作者简介】**郭思序(2000—),女,硕士研究生,研究方向:外泌体保护神经系统的分子机制研究。E-mail:657188860@qq.com

**【通信作者】**李晋(1982—),女,硕士,副教授,研究方向:中药抗病毒的作用及机制研究。E-mail:lijin010502@163.com

昏迷状态甚至脑死亡,常见的 NDs 包括阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 等<sup>[3]</sup>。

NDs 的一个共同点是病理性淀粉样蛋白在脑细胞内外的错误折叠、聚集和积累,这些疾病涉及不同细胞类型间复杂的串扰模式,以维持特定的信号通路,各种类型细胞外囊泡的交换是这种细胞间串扰的一部分<sup>[4]</sup>。外泌体是细胞外囊泡的一个子集,直径 40~160 nm(平均约为 100 nm),内含核酸、蛋白质、脂质、氨基酸和代谢产物等,这些成分可以反映它的细胞来源<sup>[5]</sup>。体内几乎所有类型的细胞都可以产生外泌体,中枢神经系统中包括小胶质细胞、少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元等都可以释放外泌体<sup>[6]</sup>。研究发现外泌体能促进髓磷脂形成、神经突生长和神经元存活,因而在组织修复和再生中发挥重要作用,同时发现中枢神经系统中的外泌体也有致病蛋白,这些蛋白可能促进疾病的进展<sup>[7]</sup>。2019 年末冠状病毒严重急性呼吸综合征 (coronavirus severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 开始流行,年龄是 NDs 与 2019 冠状病毒病 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的共同危险因素,老年患者感染 SARS-CoV-2 病程长,临床表现最为严重,而外泌体已被用于治疗包括 COVID-19 在内的各种疾病<sup>[8-9]</sup>。本文就外泌体的生物发生及其在神经退行性疾病中的作用作一综述,探讨外泌体在 NDs 中诊断、治疗的优势及可行性。

## 1 外泌体概述

外泌体 (exosome) 一词最早于 20 世纪 70 年代引入,然而因为 DNA 片段与脂质双分子层缺乏关联性,这些颗粒被误认为是细胞间转移的 DNA 片段。从 Rose Johnstone 开始使用“外泌体”一词指代多囊泡体与质膜融合后释放的“微囊泡”,后来为使术语更明确,依据生物发生、分泌成分和大小将外泌体与另外两类细胞外囊泡,微囊泡 (100~1000 nm) 和凋亡小体 (50~500 nm) 区分开来。微囊泡和凋亡小体分别通过活细胞或死亡细胞的质膜向外出芽直接释放,并携带蛋白质、脂质、核酸和其他可影响或改变靶细胞行为的活性成分。外泌体是由后期核内体向内出芽产生,并在多囊泡体中形成腔内囊泡,与质膜融合后释放。因死亡细胞产生的凋亡小

体会被巨噬细胞识别和清除,主要具有生物学效应的是外泌体和微囊泡。由于微囊泡的体积更大,它可能比外泌体携带更多种类的蛋白质,但体积较小显然是有利的,例如较小的尺寸意味着较高的口服生物利用度。目前定义的外泌体最早是在 1983 年从绵羊网织红细胞中发现,最初通过电子显微镜被确定为细胞内实体,在电子显微镜下形态是完美的球形,若出现了塌陷的外观,像是“碟装”或是“瘪了的足球”则可能是由样品制备过程引起的<sup>[10-17]</sup>。

### 1.1 外泌体的生成过程和调节方式

外泌体的产生 (图 1) 可以大致分为以下几个阶段:质膜第一次内陷形成一个杯状结构,它含有细胞表面蛋白质、脂质和代谢物等,称为早期分选胞内体 (early sorting endosomes, ESEs)。ESEs 随后发展为晚期分选胞内体 (late sorting endosomes, LSEs) 并完成 DNA、非编码 RNA、蛋白质等的装载,而后第二次内陷形成腔内囊泡 (intraluminal vesicles, ILVs)。LSEs 形成多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs),在 MVBs 成熟过程中 MVBs 从其他细胞器包括反式高尔基网络、内质网及其他细胞质室中引入货物,使 ILVs 的组成进一步改变,成熟的 MVBs 最终被送到溶酶体与其所有组分一起降解,或与细胞的质膜融合,释放 ILVs,这些 ILVs 也被称为外泌体。

多种因素参与调节外泌体的形成和释放过程:①有研究表明外泌体的形成和 MVBs 的运输需要由 4 个独立蛋白组成分选转运复合体 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 协同工作,其机制通过 ESCRT-0 的泛素结合亚基,将泛素化蛋白识别并隔离到胞内体膜的特定区域。在与 ESCRT-I 和 ESCRT-II 招募后形成鞍状蛋白复合物相互作用后,总复合物与 ESCRT-III 结合。最后,ESCRT-III 复合物在液泡蛋白分选因子 4 (vacuolar protein sorting 4, VPS-4) 提供能量的情况下将 ILVs 从 MVBs 膜上分离出来。关于 ESCRT (由 ESCRT-0, -I, -II, -III 亚复合物和 ATP 酶及 VPS-4 组成) 调控机制是否与外泌体释放有关联,目前还存在争议,但已在各种细胞类型分离的外泌体中鉴定出不同的 ESCRT 成分和泛素化蛋白。②虽然 ESCRT 复合体招募去泛素化酶,将泛素从货物蛋白中去除,同时将其结合到 ILVs 中,但是去泛素化并不是所有货物都需要的。由 ESCRT 机制的 Alix 和 HP-PTP 两个辅助组件调节的替代机制,即非 ESCRT 依赖通

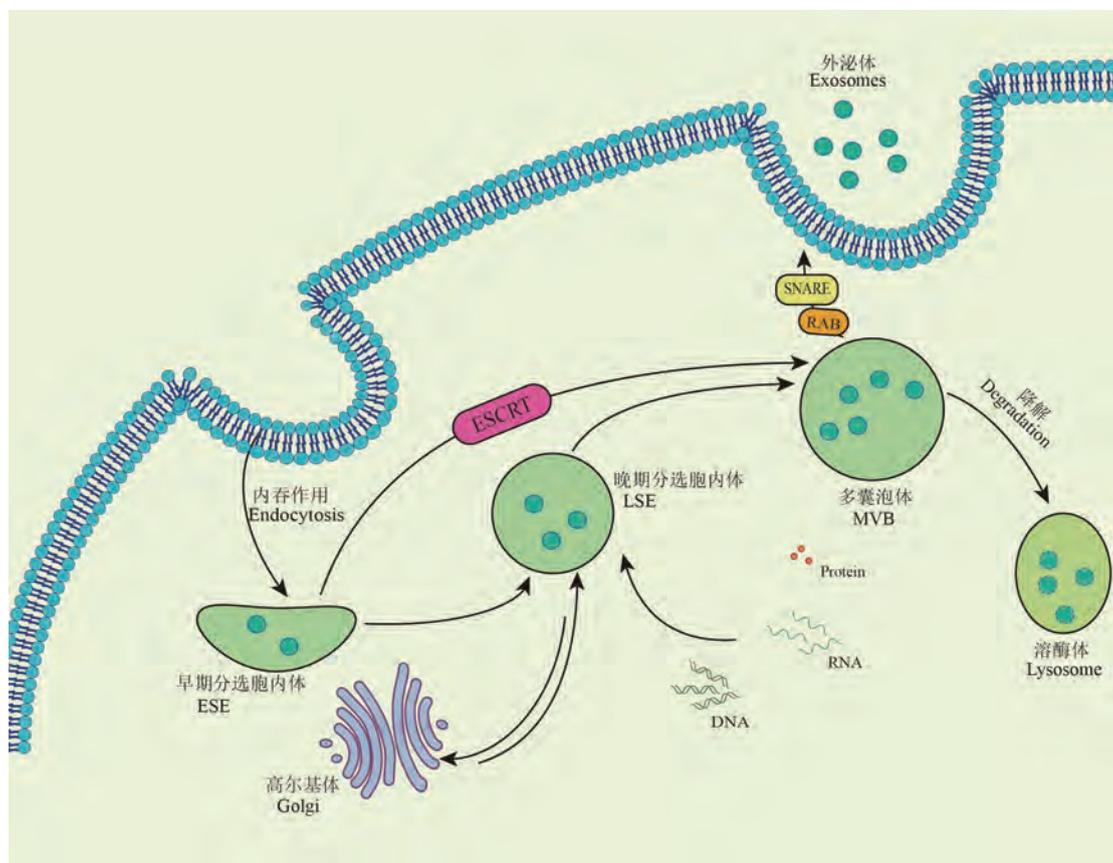


图 1 外泌体的生成过程

Figure 1 Process of exosome formation

路,可招募 ESCRT-III 和 ATPaseVPS4 将货物捕获到 ILVs 中。此过程还需要可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体复合体 (soluble N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptors, SNAREs) 提供 MVBs 融合到质膜所需的能量,从而协助两膜之间的相互作用。③外泌体向细胞外环境释放,是由 Rab-GTPase 家族的蛋白质包括 Rab2B、5A、9A、27A、27B、35 等和 SNARE 家族蛋白中的 VAMP7 和 YKT6 来驱动的,例如 Rab27A 及其效应物 Slp4 介导 MVBs 的质膜对接,Rab27B 及其效应物 Slac2B 介导 MVBs 从核周区向细胞外周的转移,此外 Rab35 还通过调节质膜上的 PIP2 水平来促进外泌体的生物发生,如果发生缺失则会减少大约一半的外泌体释放。④多种外部因素如钙离子载体、缺氧、细胞脱离等都能促进外泌体的生物发生。此外,神经酰胺在外泌体形成中也至关重要,神经酰胺的转化酶鞘磷脂酶的缺陷会使 ILVs 形成受到抑制。

外泌体释放到细胞外环境后,系统地分布在血浆、尿液、精液、唾液、支气管液、脑脊液 (cerebrospinal

fluid, CSF)、母乳、羊水、滑液、泪液、淋巴、胆汁、胃酸等体液中,外泌体包裹的许多货物都将通过这些体液运送到附近或远处的细胞。外泌体发挥生物学效应高度依赖于膜的直接融合、受体-配体相互作用、内化或内吞作用,从而有效传递遗传物质:①膜的直接融合即外泌体与质膜融合并将其内容物释放到胞质,这种情况发生概率较小。②外泌体表面的配体可以与细胞表面受体结合,触发靶细胞的信号级联反应。③内化是一个温度敏感过程,大多数外泌体通过内化吸收或内吞途径,将含有外泌体的胞内体变为 MVBs,最终在靶细胞中降解。④由于内吞作用的主要职责是外泌体的摄取,所以为大多数外泌体所介导的改变受体细胞表型所必需。值得注意的是,一些外泌体货物可通过外泌体膜的被动扩散绕过降解或酸化激活,例如转化生长因子  $\beta$ -1<sup>[7,11,18-25]</sup>。

## 1.2 外泌体的组成

外泌体中含有核酸、蛋白质、脂质、细胞因子、转录因子受体等货物分子。核酸以 RNA、DNA 和 microRNA 的形式反映外泌体的起源、功能、生理变

化和命运等重要遗传信息,外泌体含有不同模式的 RNA, RNA 测序分析显示,在人血浆来源的外泌体 RNA 物种中 microRNA 含量最为丰富,研究表明一旦 microRNAs 被打包到外泌体中可以在细胞间进行单向转移,从而建立细胞间运输网络,进而引发受体细胞短暂或持久的表型变化。与多肽(抗体)相比,核酸具有化学修饰简单、价格便宜、容易制备、长期稳定性好等优势。外泌体蛋白成分主要分为两大类,一类是非特异成分,参与囊泡形成和分泌过程,包括膜运输和融合通讯相关蛋白如 Rab、GTPases,热休克蛋白如 HSP70、HSP90,膜表面高度丰富的蛋白:四跨膜蛋白超家族(CD9、CD26、CD53、CD63、CD81、CD82 等)、ESCRT 复合物相关蛋白(Tsg101、Alix)、整合素等。另一类是特异成分,与祖细胞密切相关,即细胞特异性成分,如来源于抗原提呈细胞的 CD45、MHC-II 等,现在利用抗原和抗体检测免疫应答来识别蛋白质的技术发展迅速,并广泛应用于分析外泌体的多样性。外泌体的膜蛋白组成取决于细胞起源以及亲本细胞在外泌体生物发生过程中的生理状态,外泌体表面也存在许多特定的蛋白质,使其与其他囊泡区分开,并成为有效的诊断标志物<sup>[13,20,26]</sup>。外泌体表现出复杂的脂质-双层表面结构,外泌体脂质双分子层的高度稳定性有助于保护其货物免受免疫系统和循环水解酶的影响。其脂质含量是细胞特异性的或是保守的,其中当某些脂质比例如鞘脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和胆固醇,与其供体细胞中的脂质数量相比有所增加时,有助于增强外泌体膜的刚性,脂质不仅在保护外泌体形状方面具有重要作用,还参与外泌体的生物发生和调节受体细胞内的稳态<sup>[19,24,27-28]</sup>。

### 1.3 外泌体的生物特性

外泌体体积较小,可有效避免单核巨噬细胞吞噬,因而可作为药物载体通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)进入中枢神经系统。BBB 是由紧密堆积的内皮细胞组成并形成具有高度特化的连续细胞层。这些细胞紧密相连,在血液和大脑之间形成一道调节分子进出神经系统的屏障。事实上,98% 以上的小分子药物和几乎 100% 的大分子药物(多肽、重组蛋白、单克隆抗体、基因和短干扰 RNA)都不能穿过 BBB。目前仍有相当多的疾病缺乏有效的治疗方法或良好的给药方式,如神经退行性疾病和癌症等,由于大多数治疗药物不能有效地穿过

BBB 到达病变部位,因而药物的生物利用度相对较低。虽然治疗剂也可以通过导管直接注入脑室,并通过鞘内腰椎注射进入脊髓腰骶蛛网膜下腔,以将治疗药物输送到大脑,但是脑室内和鞘内给药是侵入性,治疗的同时也带来了一些风险,而外泌体可通过非侵入性途径如静脉注射或口服等穿过 BBB 到达中枢神经系统。外泌体在体内的半衰期为几分钟,大多数外泌体已被证明在几小时内排出,需要反复治疗,但可能因外泌体内容物介导了级联反应的激活,其作用随着时间的推移而保持,因而外泌体仍具有巨大的治疗前景。以下原因使许多研究人员考虑使用外泌体作为多种疾病治疗的递送载体:①从供体细胞释放的外泌体进入受体细胞,通过将其内容物(如功能蛋白、mRNA 转录物和 miRNA)递送给受体细胞,参与细胞间通讯且不论细胞之间是否直接接触均影响许多生物过程,如细胞增殖、凋亡、分化和免疫反应。②外泌体 RNA 的稳定性高于细胞 RNA,与传统细胞疗法相比,外泌体提供了更好的稳定性、免疫耐受性并通过全身递送,而且与病毒载体不同,通过外泌体给药不会增加基因表达。③外泌体经修饰后可靶向特定位置或个性化治疗,由于清除率低,还可以在靶组织中停留较长时间,同时也不会引起血管栓塞。最重要的是,外泌体能穿过 BBB,多次静脉注射(intravenous injection, IV)没有任何副作用,并能增强神经和运动功能<sup>[13,29-34]</sup>。

总之,这些独特的生物特性赋予了外泌体天然给药的优势,并使其成为治疗药物中跨 BBB 运输的最有希望的载体,有望治疗 AD、PD、HD 等。越来越多的证据表明,口服外泌体也是一种有前景的治疗途径,因外泌体能抵抗胃部的恶劣条件,口服外泌体可能会影响消化道的免疫细胞,进而通过血液和或淋巴传播影响局部和外周组织。人脑和视网膜、中枢神经系统、CSF、神经血管系统以及体循环是外泌体的丰富来源,由于脑细胞可以释放外泌体,其可从大脑和中枢神经系统进入血液,因此从体循环中分离出的脑源性外泌体可以用于监测中枢神经系统疾病,从而改善临床诊断和预后<sup>[35-36]</sup>。

## 2 外泌体在神经退行性疾病中的作用

### 2.1 外泌体在阿尔茨海默病中的作用

AD 是最常见的神经退行性疾病,其主要病理特征是由  $\beta$  淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )的

不溶性聚集和异常积累形成的淀粉样斑块和过度磷酸化的 tau 蛋白引起的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)。此外,神经炎症、氧化应激、胆碱能神经元损伤等因素也可引起神经退行性变。AD 的特征是随着时间推移逐渐增加多种认知缺陷,包括在获取新信息和恢复信息时的记忆退化,以及与以下一种或多种功能障碍(失语、失用症、失认症或执行障碍综合症)相关,因而 AD 也可以认为是一种海马型遗忘综合症。目前针对 AD 的药物治疗是以减轻症状为基础的,并不是治疗性的,目的是提高生活质量和延长寿命,但并不能阻止疾病进展。美国食品药品监督管理局批准用于 AD 患者的药物有四种,包括 3 种胆碱酯酶抑制剂和一种非竞争性 NMDA 受体 2 调节剂。众所周知,AD 在出现临床症状之前的几十年就会出现特有的病理变化,导致临床前阶段相当长,然后进展为轻度认知障碍,那么在 AD 的临床前阶段,即在认知症状和病理改变变得不可逆转之前,找到证据诊断并治疗显得非常重要<sup>[37-41]</sup>。

在临床实践和研究中,正电子发射断层扫描成像和 CSF 中 A $\beta$ 42、T-tau 和 P-T181-tau 的浓度被推荐作为 AD 诊断的生物标志物,但是考虑到检验技术的昂贵及高患病率,寻找替代方法非常紧要。研究发现外泌体和 CSF 中的生物标志物间存在相关性,因此血液来源的外泌体突显了其优点,侵入性小且能对比自不同细胞类型的生物标志物。血液神经源性外泌体中 A $\beta$ 42、T-tau 和 P-T181-tau 可以将 AD 患者和健康对照组区分开来,且研究发现外泌体生长相关蛋白 43 (growth associated protein, GAP43)、神经颗粒蛋白、突触体相关蛋白 25 (synaptosomal associated protein, SNAP25) 和突触结合蛋白 1 (synaptotagmin1) 的联合,可以在认知障碍发生前 5~7 年检测出 AD,如果血液检测成为可能,那么就可以进行大规模早期筛查并早期治疗,减轻个人、家庭乃至社会的负担,还有许多研究中报道了血源性外泌体 miRNA 可作为 AD 患者的生物标志物,并且血源性 miRNA 已被证明是 AD 无症状期的预测因子。研究表明在 AD 中共有 20 种血浆源性外泌体 miRNA 显示出显著差异,其中 7 种 miRNA,包括 miR-185-5p、miR-342-3p、miR-141-3p、miR-342-5p、miR23b-3p、miR-338-3p 和 miR-3613-3p,可以高精度地预测 AD 的状态。就诊的 AD 患者 miR-223 水平显著低于正在接受治疗的 AD 患

者,表明可以用 miR-223 评估疾病进展。血源性外泌体还可用作鉴别诊断,AD 患者血清外泌体 miR-384(可下调 A $\beta$  降解酶的表达)的水平明显高于血管性痴呆和帕金森病性痴呆患者,证明 miR-384 可以用于区分 AD、血管性痴呆和帕金森病性痴呆,另外 AD 患者外泌体中 miR451a 和 miR-21-5p 水平显著低于路易体痴呆,说明 miR451a 和 miR-21-5p 可以用作区分 AD 和路易体痴呆<sup>[42-46]</sup>。

外泌体在 AD 进展中也发挥重要作用。小胶质细胞本身可以摄取含有完整和低磷酸化的 tau 蛋白或 A $\beta$  的神经元外泌体,并发挥清除作用,而小胶质细胞源性外泌体 (microglia-derived exosomes, MG-exos),一方面在 AD 发病过程中发挥负调节作用,能够携带 tau 蛋白和 A $\beta$ ,可能会强烈增加 A $\beta$  的神经毒性,还能传递促炎信号<sup>[47]</sup>。另一方面 MG-exos 在 AD 发病过程中起保护作用,MG-exos 可以以 TREM2 (TREM2 是一种重要的膜蛋白,在小胶质细胞外泌体膜上表达,且只控制外泌体的分泌,不影响外泌体的大小) 依赖的方式与 A $\beta$  结合,改变 A $\beta$  周围的炎症环境,并促进小胶质细胞吞噬 A $\beta$ <sup>[48]</sup>。慢性间歇性缺氧可引起 AD 小鼠脑内 tau 蛋白的病理性扩散,使记忆损伤加重。MG-exos 的 miR-146a-5p 可能通过靶向 HIF1 $\alpha$ /mtROS 通路,抑制核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3, NLRP3) 炎性体减轻间歇性缺氧诱导的认知障碍,因而 MG-exos 的 miR-146a-5p 被认为是一种有希望的治疗策略<sup>[49]</sup>。在 AD 中,间充质干细胞源性外泌体 (mesenchymal stem cell-derived exosomes, MSC-exos) 能减少 A $\beta$  沉积,防止突触损伤,保护海马细胞免受氧化应激,并减少神经元凋亡,来自脂肪间充质干细胞衍生的外泌体含有脑啡肽酶,能显著降低 A $\beta$ <sub>1-40</sub> 和 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 的水平,可被用作脑啡肽酶的药物递送系统,在 AD 大鼠模型中改善空间记忆能力,减少海马神经元损伤、老年斑的积累,并减轻脑部炎症。MSC-exos 参与病理异常区域的免疫调节和神经炎症改善,能显著改善 AD 转基因小鼠的空间学习能力和记忆障碍,还可通过抑制活化的小胶质细胞、反应性星形胶质细胞和细胞因子的释放,发挥抗炎作用,并改善 AD 患者味蕾及其神经支配的破坏性结构变化<sup>[34,50-51]</sup>。

## 2.2 外泌体在帕金森病中的作用

PD 是世界上第二大流行的神经退行性疾病,

主要病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元的缺失和错误折叠的不溶性  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn) 聚集形成的路易小体。因为 PD 的运动和非运动神经元都受到影响,所以会出现运动症状(运动迟缓、静息性震颤、四肢僵硬和姿势不稳定,还会伴有平衡和协调问题)和非运动症状(睡眠障碍、低体温、抑郁和便秘)<sup>[52-53]</sup>。目前,左旋多巴是治疗 PD 最有效的药物,但左旋多巴治疗不能延缓 PD 的进展,且大多数 PD 患者在接受多巴胺药物治疗约 6.5 年后会出现运动并发症,其中最常见的是左旋多巴诱导的运动障碍,表现为异常运动,如刻板运动、舞蹈样运动和抛射运动,还会出现头部的肌张力障碍,这些症状极大地影响 PD 患者的生活质量,寻找新的治疗方法迫在眉睫<sup>[54-56]</sup>。

多巴胺负载的干细胞来源外泌体在 PD 治疗中,使大脑中多巴胺的含量增加了 15 倍以上。MSC-exos 很容易穿透 BBB,到达实验大鼠 BBB 黑质内的多巴胺能神经元,并且可以减轻阿扑吗啡的不对称旋转,减少多巴胺能神经元的凋亡。在进行性 PD 模型中, MSC-exos 能减轻认知障碍,这与神经元胆固醇代谢的改变相关。此外, MSC-exos 可能通过传递 miR-100-5p 抑制靶基因 NADPH 氧化酶 4 的表达,进而减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,减轻氧化应激,显著增加纹状体中多巴胺及其代谢产物的水平,说明 MSC-exos 能显著改善 PD 动物多巴胺能神经元的功能。同样地,干细胞来源的外泌体通过调节内源性和外源性 miRNA 的转移来促进神经分化,传递 miR-133b (PD 中下调的 miRNA 之一),促进 PD 的体外和体内实验模型中轴突的生长<sup>[39,57-59]</sup>。虽然外泌体对 PD 有积极作用,但同时也发现 PD 患者血浆标本中神经元源性外泌体  $\alpha$ -syn 明显升高,且神经元源性外泌体可以通过向小胶质细胞传递 PD 相关 miRNA,促进  $\alpha$ -syn 聚集和神经炎症,从而促进 PD 的发生和发展。在小鼠模型中携带 PD 相关突变体 LRRK2G2019S 的星形胶质细胞源性外泌体 (astrocyte derived exosomes, AS-exos) 与正常 AS-exos 数量相当,但携带 PD 相关突变体 LRRK2G2019S 的 AS-exos 在被多巴胺能神经元内化后不能提供完全的神经营养支持,直接促进 PD 的进展。MG-exos 能通过小胶质细胞-神经元传递  $\alpha$ -syn 低聚物,而  $\alpha$ -syn 又诱导 MG-exos 分泌增加,从而形成恶性循环,加剧 MG-exos 介导的  $\alpha$ -syn 病理扩散。当外泌体释放毒性蛋白,促

进炎症反应,导致 PD 进展时,抑制外泌体释放的药物可能有助于缓解 PD 的进展。中性鞘磷脂酶 2 (neutral sphingomyelinase 2, nSMase2) 能水解鞘磷脂产生的神经酰胺,从而促进脑内外泌体的形成, nSMase2 的抑制剂 DDL-112 可在体外细胞模型中抑制外泌体产生,因而用 DDL-112 治疗会减少黑质中  $\alpha$ -syn 的聚集并改善运动功能<sup>[60-61]</sup>。

外泌体 miRNA 不受核糖核酸酶降解的影响,在体液中稳定存在,可作为 PD 的生物标志物。PD 患者血清和 CSF 来源的外泌体中 miR-24、miR-151a-5p、miR-485-5p、miR-331-5p 和 miR-214 显著升高,并且血清外泌体中 miR-19b 下调和 miR-24、miR-195 上调也被认为是 PD 的诊断标志物。此外,外泌体中 miR-425-5p、miR-21-3p 和 miR-199a-5p 可以区分 PD 和常被误诊的进行性核上性麻痹,血清中的 miR-223-3p 可用于区分 PD 和非 NDs,也可以区分 AD 和 PD<sup>[50,62-63]</sup>。

### 2.3 外泌体在亨廷顿病中的作用

HD 是一种罕见的进行性、无法治愈的神经退行性疾病,发病年龄 35~45 岁,并在发病后 15~17 年死亡。HD 还是一种常染色体显性遗传性神经退行性疾病,由 4 号染色体上亨廷顿蛋白 (huntingtin, HTT) 基因的 CAG 重复扩增引起,导致突变 HTT 的翻译,产生细胞内突变亨廷顿蛋白 (mutant huntingtin, mHTT) 的聚集体,而聚集体的积累会引发线粒体功能障碍、纹状体细胞的死亡(因转录失调、凋亡途径的激活和生理蛋白-蛋白相互作用的改变导致)。HD 的特点是进行性的运动失调(舞蹈病、异常眼运动、言语紊乱、吞咽困难等)、认知功能障碍(痴呆)和精神障碍(抑郁、焦虑、冷漠等),且进行性运动障碍是导致生命终止并发症的“主谋”。目前还没有缓解疾病进展的治疗方法,HD 的治疗主要还集中在症状管理上,目的是控制运动和精神紊乱<sup>[58,64-65]</sup>。

外泌体可用于改善 HD 的症状。AS-exos 可降低 HD mHTT 聚集体的密度<sup>[65]</sup>。人脂肪干细胞分泌含有神经营养因子(与 HD 进展呈负相关)的外泌体能够抵消凋亡的蛋白,并通过增加 PGC-1 和磷酸化 CREB 的蛋白水平来减少线粒体功能障碍,并有研究表明在体外 HD 模型中,脂肪干细胞源性外泌体降低细胞内 mHTT 聚集,进而降低神经元的凋亡程度<sup>[58]</sup>。在有症状的 HD 患者血浆中,发现 miR-877-5p、miR-223-3p、miR-223-5p、miR-30 d-5p、miR-

128、miR-22-5p、miR-222-3p、miR-338-3p、miR-130b-3p、miR-425-5p、miR-628-3p、miR-361-5p、miR-942 等 13 种 miRNAs 表达上调。神经元源性外泌体可以将靶向 HTT 的 miRNA 转移到 HD 患者的神经元中,从而抑制 HTT mRNA 的表达。通过腺相关病毒血清型 5 (adeno-associated virus serotype 5, AAV5) 递送的靶向人亨廷顿蛋白的工程化 microRNA (huntingtin-targeting microRNA, miHTT) 在体内外均显示出显著降低 HTT 的作用。研究人员从诱导多能干细胞神经元中,开发了含有 AAV5-miHTT 的外泌体,而这种外泌体中的治疗性 miHTT 分子可以浓度依赖的方式被其他神经元吸收,因此含有 AAV5-miHTT 的外泌体可能用于未来 HD 的基因治疗<sup>[43,58,60,64]</sup>。

## 2.4 外泌体是可能感染过 SARS-CoV-2 的 NDs 患者最具潜力的治疗方法

2019 年末 SARS-CoV-2 的出现,引发了新型冠状病毒肺炎的爆发。这种罕见的冠状病毒传播性极强,在全球范围内迅速蔓延,造成了巨大的公共负担<sup>[66]</sup>。SARS-CoV-2 以多种方式影响大脑,早期短暂的炎症反应被认为具有神经保护性,而长时间的神经炎症激活会引起脑结构和组织的损伤。感染 SARS-CoV-2 后通常会有神经精神症状,包括头晕、睡眠障碍、认知缺陷、谵妄、幻觉和抑郁等,所有这些信号都表明神经组织受到损害,这可能会大大增加神经退行性疾病的发病率,并促进痴呆的发生<sup>[8,67]</sup>。外泌体,特别是 MSC-exos 被用于 COVID-19 的治疗,MSC-exos 能减少细胞因子风暴,逆转与 COVID-19 相关的宿主抗病毒防御机制,并增强了线粒体的修复功能<sup>[9]</sup>。多项研究表明,COVID-19 相关的神经系统后遗症可能在感染急性期后持续很长时间,外泌体既可治疗 COVID-19,又可治疗 NDs,因而可成为感染过 SARS-CoV-2 的 NDs 患者最具潜力的治疗方法<sup>[66]</sup>。

## 3 总结与展望

外泌体是由两次质膜内陷产生的,受多种因素调节最终被释放到细胞外环境,通过多种方式发挥生物学效应。外泌体具有良好的稳定性、免疫耐受性,通过将其内容物递送给受体细胞,影响许多生物进程,还可通过 BBB 进入中枢神经系统,能全身递送且清除率低,可以在靶组织中停留较长时间,多次 IV 没有任何副作用,因而可作为 NDs 治疗最

有希望的药物递送载体。同时,外泌体还可作为 NDs 的生物标志物和鉴别诊断的工具,尤其是血液来源的外泌体,侵入性小还能够比较不同细胞类型的生物标志物,如果血液源性外泌体的检测能得到推广,那么大规模筛查和及早治疗就会成为可能。外泌体虽有如此的光明前景,但一些因素也限制了其临床应用,例如需要提高外泌体的分离技术来保证分离的外泌体纯度以及结构和生物完整性,还要减少长期储存对外泌体的损伤,并确保安全的剂量和给药方式<sup>[68]</sup>,这些都需要继续探索,找到最优解。此外,不同类型细胞来源的外泌体以及年轻细胞来源和逐渐衰老细胞来源的外泌体在治疗 NDs 中是否有差异,因外泌体对 NDs 的双重作用,有时外泌体参与了 NDs 的进展,在使用外泌体抑制性药物的同时,有益的外泌体是否也会失去作用,或者是在用外泌体治疗时,这些外泌体是否会参与病理物质的传播,如何找到一个平衡点,使治疗性外泌体处于优势地位,假使这些问题能够解决,将迎来外泌体全面应用于神经退行性疾病的新阶段。

## 参考文献:

- [1] YANG Y, ZHENG R, ZHAO L. Population aging, health investment and economic growth: based on a cross-country panel data analysis [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18 (4): 1801.
- [2] GOLRIZ KHATAMI S, MUBEEN S, HOFMANN-APITIUS M. Data science in neurodegenerative disease: its capabilities, limitations, and perspectives [J]. *Curr Opin Neurol*, 2020, 33 (2): 249-254.
- [3] FAN Y, CHEN Z, ZHANG M. Role of exosomes in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of central nervous system diseases [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 291.
- [4] RASTOGI S, SHARMA V, BHARTI P S, et al. The evolving landscape of exosomes in neurodegenerative diseases: exosomes characteristics and a promising role in early diagnosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(1): 440.
- [5] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [6] KUMARI M, ANJI A. Small but mighty-exosomes, novel intercellular messengers in neurodegeneration [J]. *Biology*, 2022, 11(3): 413.
- [7] DOYLE L M, WANG M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727.
- [8] VERKHRATSKY A, LI Q, MELINO S, et al. Can COVID-19 pandemic boost the epidemic of neurodegenerative diseases? [J]. *Biol Direct*, 2020, 15(1): 28.
- [9] GURUNATHAN S, KANG M H, KIM J H. Diverse effects of

- exosomes on COVID-19: a perspective of progress from transmission to therapeutic developments [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 716407.
- [10] BAZZAN E, TINÈ M, CASARA A, et al. Critical review of the evolution of extracellular vesicles' knowledge: from 1946 to today [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6417.
- [11] JAN A T, RAHMAN S, BADIERAH R, et al. Expedition into exosome biology: a perspective of progress from discovery to therapeutic development [J]. *Cancers*, 2021, 13(5): 1157.
- [12] COUCH Y, BUZÀS E I, DI VIZIO D, et al. A brief history of nearly EV-erything-The rise and rise of extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(14): e12144.
- [13] ZHANG Y, BI J, HUANG J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917–6934.
- [14] DAVIDSON S M, BOULANGER C M, AIKAWA E, et al. Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies: from exosomes to microvesicles [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 119(1): 45–63.
- [15] WEN J, CREAVERN D, LUAN X, et al. Comparison of immunotherapy mediated by apoptotic bodies, microvesicles and exosomes; apoptotic bodies' unique anti-inflammatory potential [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 478.
- [16] RÄDLER J, GUPTA D, ZICKLER A, et al. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(5): 1231–1250.
- [17] PAN B T, JOHNSTONE R M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro; selective externalization of the receptor [J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967–978.
- [18] GURUNATHAN S, KANG M H, KIM J H. A comprehensive review on factors influences biogenesis, functions, therapeutic and clinical implications of exosomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 1281–1312.
- [19] JAN A T, RAHMAN S, KHAN S, et al. Biology, pathophysiological role, and clinical implications of exosomes: a critical appraisal [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 99.
- [20] SONBHADRA S, MEHAK, PANDEY L M. Biogenesis, isolation, and detection of exosomes and their potential in therapeutics and diagnostics [J]. *Biosensors*, 2023, 13(8): 802.
- [21] ZHANG Y, LIU Y, LIU H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9: 19.
- [22] LAU N C H, YAM J W P. From exosome biogenesis to absorption: key takeaways for cancer research [J]. *Cancers*, 2023, 15(7): 1992.
- [23] HAN Q F, LI W J, HU K S, et al. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 207.
- [24] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 75.
- [25] DENG X, HU X, WANG S, et al. Neural stem cell-derived exosomes regulate cell proliferation, migration, and cell death of brain microvascular endothelial cells *via* the miR-9/Hes1 axis under hypoxia [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024, 7(1): 24–35.
- [26] CHOI H, CHOI Y, YIM H Y, et al. Biodistribution of exosomes and engineering strategies for targeted delivery of therapeutic exosomes [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(4): 499–511.
- [27] HU Q, SU H, LI J, et al. Clinical applications of exosome membrane proteins [J]. *Precis Clin Med*, 2020, 3(1): 54–66.
- [28] GAURAV I, THAKUR A, IYASWAMY A, et al. Factors affecting extracellular vesicles based drug delivery systems [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1544.
- [29] GURUNATHAN S, KANG M H, JEYARAJ M, et al. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes [J]. *Cells*, 2019, 8(4): 307.
- [30] LAI J J, CHAU Z L, CHEN S Y, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development [J]. *Adv Sci*, 2022, 9(15): e2103222.
- [31] JAKUBEC M, MAPLE-GRØDEM J, AKBARI S, et al. Plasma-derived exosome-like vesicles are enriched in lyso-phospholipids and pass the blood-brain barrier [J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0232442.
- [32] KHATAMI S H, KARAMI N, TAHERI-ANGANEH M, et al. Exosomes: promising delivery tools for overcoming blood-brain barrier and glioblastoma therapy [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(8): 4659–4678.
- [33] GHOSH S, GHOSH S. Exosome: the “off-the-shelf” cellular nanocomponent as a potential pathogenic agent, a disease biomarker, and neurotherapeutics [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 878058.
- [34] GUY R, OFFEN D. Promising opportunities for treating neurodegenerative diseases with mesenchymal stem cell-derived exosomes [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1320.
- [35] LUKIW W J, POGUE A I. Vesicular transport of encapsulated microRNA between glial and neuronal cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 5078.
- [36] CIEŚLIK M, NAZIMEK K, BRYNIARSKI K. Extracellular vesicles-oral therapeutics of the future [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(14): 7554.
- [37] PASSERI E, ELKHOURY K, MORSINK M, et al. Alzheimer's disease: treatment strategies and their limitations [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13954.
- [38] STAFF N P, JONES D T, SINGER W. Mesenchymal stromal cell therapies for neurodegenerative diseases [J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(5): 892–905.
- [39] HARRELL C R, VOLAREVIC A, DJONOV V, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as new remedy for the treatment of neurocognitive disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1433.
- [40] BREIJYEH Z, KARAMAN R. Comprehensive review on

- Alzheimer's disease: causes and treatment [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5789.
- [41] SONG Z, QU Y, XU Y, et al. Microarray microRNA profiling of urinary exosomes in a 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(3): 233–242.
- [42] BEATA B K, WOJCIECH J, JOHANNES K, et al. Alzheimer's disease-biochemical and psychological background for diagnosis and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1059.
- [43] HE M, ZHANG H N, TANG Z C, et al. Diagnostic and therapeutic potential of exosomal microRNAs for neurodegenerative diseases [J]. *Neural Plast*, 2021, 2021: 8884642.
- [44] JIA L, ZHU M, KONG C, et al. Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(1): 49–60.
- [45] JIA L, QIU Q, ZHANG H, et al. Concordance between the assessment of A $\beta$ 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(8): 1071–1080.
- [46] LI Y, MENG S, DI W, et al. Amyloid- $\beta$  protein and microRNA-384 in NCAM-labeled exosomes from peripheral blood are potential diagnostic markers for Alzheimer's disease [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(7): 1093–1107.
- [47] GUO M, HAO Y, FENG Y, et al. Microglial exosomes in neurodegenerative disease [J]. *Front Mol Neurosci*, 2021, 14: 630808.
- [48] HUANG S, LIAO X, WU J, et al. The Microglial membrane receptor TREM2 mediates exosome secretion to promote phagocytosis of amyloid- $\beta$  by microglia [J]. *FEBS Lett*, 2022, 596(8): 1059–1071.
- [49] ZHANG Y, MIAO Y, XIONG X, et al. Microglial exosomes alleviate intermittent hypoxia-induced cognitive deficits by suppressing NLRP3 inflammasome [J]. *Biol Direct*, 2023, 18(1): 29.
- [50] VAZ M, SOARES MARTINS T, HENRIQUES A G. Extracellular vesicles in the study of Alzheimer's and Parkinson's diseases: Methodologies applied from cells to biofluids [J]. *J Neurochem*, 2022, 163(4): 266–309.
- [51] GUO M, YIN Z, CHEN F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome: a promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1): 109.
- [52] DOROSZKIEWICZ J, GROBLEWSKA M, MROCZKO B. Molecular biomarkers and their implications for the early diagnosis of selected neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4610.
- [53] GAO C, JIANG J, TAN Y, et al. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 359.
- [54] ZHANG F, LIU M, TUO J, et al. Levodopa-induced dyskinesia: interplay between the N-methyl-D-aspartic acid receptor and neuroinflammation [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1253273.
- [55] HERIS R M, SHIRVALILOO M, ABBASPOUR-AGHDAM S, et al. The potential use of mesenchymal stem cells and their exosomes in Parkinson's disease treatment [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 371.
- [56] RAHMAN M M, CHAKRABORTI R R, POTOL M A, et al. Epalrestat improves motor symptoms by reducing oxidative stress and inflammation in the reserpine induced mouse model of Parkinson's disease [J]. *Anim Model Exp Med*, 2020, 3(1): 9–21.
- [57] HUBER C C, WANG H. Pathogenic and therapeutic role of exosomes in neurodegenerative disorders [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(1): 75–79.
- [58] NATALE F, FUSCO S, GRASSI C. Dual role of brain-derived extracellular vesicles in dementia-related neurodegenerative disorders: cargo of disease spreading signals and diagnostic-therapeutic molecules [J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1): 50.
- [59] HE S, WANG Q, CHEN L, et al. MiR-100a-5p-enriched exosomes derived from mesenchymal stem cells enhance the antioxidant effect in a Parkinson's disease model *via* regulation of Nox4/ROS/Nrf2 signaling [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 747.
- [60] XIA X, WANG Y, ZHENG J C. Extracellular vesicles, from the pathogenesis to the therapy of neurodegenerative diseases [J]. *Transl Neurodegener*, 2022, 11(1): 53.
- [61] ZHU C, BILOUSOVA T, FOCHT S, et al. Pharmacological inhibition of nSMase2 reduces brain exosome release and  $\alpha$ -synuclein pathology in a Parkinson's disease model [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 70.
- [62] WANG X, ZHOU Y, GAO Q, et al. The role of exosomal microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3232869.
- [63] CITTERIO L A, MANCUSO R, AGOSTINI S, et al. Serum and Exosomal miR-7-1-5p and miR-223-3p as Possible Biomarkers for Parkinson's Disease [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 865.
- [64] ANANBEH H, VODICKA P, KUPCOVA SKALNIKOVA H. Emerging roles of exosomes in Huntington's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4085.
- [65] YU Z, TENG Y, YANG J, et al. The role of exosomes in adult neurogenesis; implications for neurodegenerative diseases [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(2): 282–288.
- [66] MYSIRIS D S, VAVOUGIOS G D, KARAMICHALI E, et al. Post-COVID-19 Parkinsonism and Parkinson's disease pathogenesis: the exosomal cargo hypothesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9739.
- [67] ELIZALDE-DÍAZ J P, MIRANDA-NARVÁEZ C L, MARTÍNEZ-LAZCANO J C, et al. The relationship between chronic immune response and neurodegenerative damage in long COVID-19 [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1039427.
- [68] JIA Y, YU L, MA T, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications [J]. *Theranostics*, 2022, 12(15): 6548–6575.

郭孝静,张博,吴珊红,等. PI3K/Akt 信号通路在周围神经损伤中的作用及中医药干预研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 116-125.

Guo XJ, Zhang B, Wu SH, et al. Role of PI3K/Akt signaling pathway in peripheral nerve injury and research progress in traditional Chinese medicine interventions [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 116-125.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.015

# PI3K/Akt 信号通路在周围神经损伤中的作用 及中医药干预研究进展

郭孝静<sup>1</sup>, 张博<sup>1</sup>, 吴珊红<sup>2</sup>, 张立<sup>2</sup>, 王艳<sup>2\*</sup>

(1.黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学附属第二医院, 哈尔滨 150001)

**【摘要】** 周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)可由挫伤、骨折等创伤引起,导致感觉功能异常、运动功能受限、神经性疼痛、肌肉萎缩等多种继发性病变,严重影响患者的生活质量。PNI后会出现瓦勒变性,涉及轴突变性及髓鞘崩解现象。此外,由PNI引起神经性疼痛(NP)的一个至关重要的靶点是背根神经节(DRG),其作为感觉传导的初级神经元,在疼痛信号的传递中扮演着重要角色。因此,这些靶点的变化都会引发一系列复杂的信号通路变化。其中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路作为重要的调控细胞生死存亡的重要信号传导通路,在PNI中表现为可促进雪旺细胞(Schwann cells, SCs)增殖迁移进而促进轴突生长、髓鞘形成等以促进神经再生,以及支持DRG神经元的存活以减轻NP。目前治疗方法包括有干细胞的移植、神经营养药物等,但都存在一定的局限性。研究显示,中医药以其成本低廉、副作用较少的优势,在PNI治疗领域逐渐引起重视并获得了一定程度的应用。本文就PNI中的氧化应激、凋亡、自噬、炎症、血管生成、细胞周期等病理生理机制与PI3K/Akt信号通路的关系及其相关分子靶点的研究展开论述,并深入分析基于PI3K/Akt信号通路的中药单体、中药复方及针灸对PNI治疗的潜在作用机制,以期为PNI的中医药治疗提供系统规范的理论指导及相关药物的研发提供有益的参考依据。

**【关键词】** 中医药;周围神经损伤;PI3K/Akt信号通路;作用机制;研究进展

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0116-10

## Role of PI3K/Akt signaling pathway in peripheral nerve injury and research progress in traditional Chinese medicine interventions

GUO Xiaojing<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>1</sup>, WU Shanhong<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>2\*</sup>

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China.

2. the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001)

**【Abstract】** Peripheral nerve injury (PNI), caused by contusions, fractures, and other traumas, may lead to abnormal sensory function, limited motor capabilities, neuropathic pain, and muscle atrophy, which can severely impact the patient's quality of life. Post-PNI, Wallerian degeneration occurs, involving axonal degeneration and myelin sheath collapse. Notably, the dorsal root ganglia (DRG), as the primary sensory neurons in pain signal transmission, are crucial targets in neuropathic pain (NP) induced by PNI, and changes in these targets trigger a series of complex signaling

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82274623, 81973926)。

**【作者简介】** 郭孝静(1996—),女,博士研究生,研究方向:周围神经损伤的基础研究。E-mail:656193893@qq.com

**【通信作者】** 王艳(1967—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:周围神经损伤康复及儿童康复。E-mail:swallow-1113@163.com

pathway alterations. Among these, the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, as a vital regulator of cell survival and death, promotes Schwann cell proliferation and migration, thereby enhancing axonal growth and myelination to facilitate nerve regeneration, and supports the survival of DRG neurons to alleviate NP. Current treatment method, including stem cell transplantation and neurotrophic medications, all have certain limitations. Traditional Chinese medicine (TCM) has the advantages of low cost and few side effects, and is widely used for the treatment of PNI. This article reviews the relationship between oxidative stress, apoptosis, autophagy, inflammation, angiogenesis, the cell cycle, and other pathophysiological mechanisms in PNI and the PI3K/Akt signaling pathway, as well as its associated molecular targets. We also discuss the potential mechanisms of action of TCM monomers, compound formulas, and acupuncture based on the PI3K/Akt signaling pathway in the treatment of PNI, aiming to provide systematic and standardized theoretical guidance for the healing of PNI with TCM and a useful reference for the development of related medications.

**【Keywords】** traditional Chinese medicine; peripheral nerve injury; PI3K/Akt signal pathway; mechanism; research progress

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

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)是一种常见的临床疾病,通常由突然挤压、横断、强外力或其他医源性损伤引起,导致感觉和运动障碍、神经性疼痛和其他继发性病变<sup>[1]</sup>。雪旺细胞(Schwann cells, SCs)是周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)髓鞘形成的主要细胞,可促进动作电位的跳跃式传导,其具有产生神经营养因子、组织髓鞘分解、促进轴突生长、募集巨噬细胞、支持神经元存活等多种功能<sup>[2]</sup>。PNI后,远端神经残端会发生沃勒变性,SCs去分化、迁移、增殖,转变为可以清除髓鞘碎片和分泌神经营养因子的修复型SCs,引导轴突再生并重建从损伤部位到靶器官的连接,为周围神经再生提供一个良好的微环境。因此,PNI后神经恢复是一个复杂的过程,促进SCs存活并抑制其凋亡对PNI后神经修复至关重要。此外,作为疼痛传入的初级神经元背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)对PNI后感觉的传递也发挥关键作用<sup>[3]</sup>。PNI的发病机制复杂多样,涉及活性氧(reactive oxygen species, ROS)、细胞凋亡、自噬、炎症等,导致一系列的信号通路的激活,其中,磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)通路是控制信号传导和细胞分化的重要生存机制,涉及氧化应激、凋亡、自噬、炎症、血管生成、细胞周期等,在调节细胞存活增殖等方面具有重要作用<sup>[4]</sup>。

目前,对于PNI的治疗包括干细胞的移植,但存在供体不足,供体物和移植植物大小不一等局限性。此外,还包括有神经营养药物的治疗等,存在价格昂贵等局限性。而中医药在应对PNI的防治

方面表现出显著成效,其独特的优势体现在多靶点调控以及较少的不良反应上。通过细胞及动物实验进一步证实,中医药可通过调节PI3K/Akt信号通路发挥药效,可促进轴突再生、髓鞘再生等过程。但目前国内外文献尚未有中医药通过PI3K/Akt信号通路发挥疗效的系统综述。因此,本文就PNI中的氧化应激、凋亡、自噬、炎症、血管生成、细胞周期等病理生理机制与PI3K/Akt信号通路的关系及其相关分子靶点的研究展开论述,并深入分析基于PI3K/Akt信号通路中药单体、中药复方及针灸对PNI治疗的潜在作用机制,以期为PNI的中医药疗愈提供系统规范的理论指导及相关药物的研发提供有益的参考依据。

## 1 PI3K/Akt 信号通路

PI3K/Akt信号通路是一个重要的细胞内外信号转导桥梁,在细胞增殖、黏附、迁移、代谢和存活中发挥关键作用。PI3K对于有丝分裂反应和细胞增殖、存活和蛋白质合成是必需的。活化的PI3K诱导磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP2)的磷酸化,产生第二信使磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol-3-4,5-bisphosphate, PIP3),磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)在该途径中充当负介质并逆转该反应<sup>[5]</sup>。Akt,是丝氨酸/苏氨酸激酶家族中进化保守的丝氨酸蛋白激酶,是PI3K转导的重要信使。Akt由Akt1、Akt2和Akt3三个亚型组成,下游作用包括激活和抑制糖原合成酶激酶3(glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 $\beta$ )和叉头框蛋白(Forkhead box protein, FoxO)转录因子,有助于

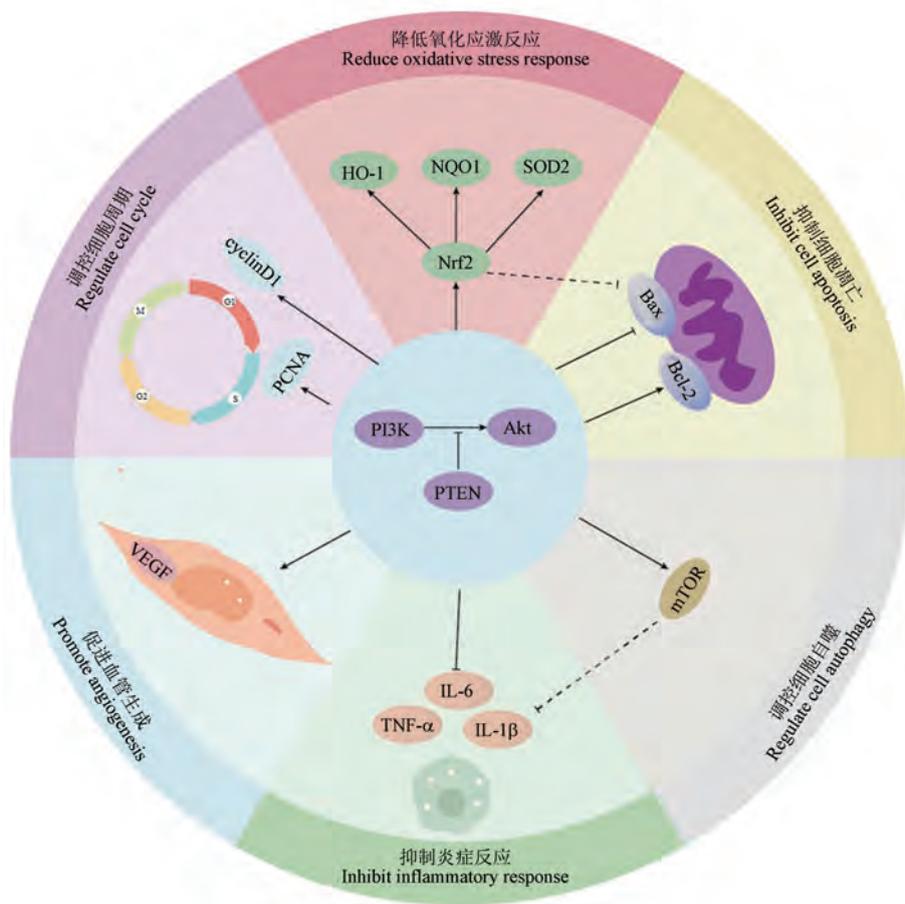
细胞生长、细胞周期调节、葡萄糖代谢、自噬、抗炎等。PI3K/Akt 信号通路在细胞内的氧化应激、自噬、凋亡、炎症、血管生成、细胞周期中扮演着重要的角色,因此研究这一信号通路有助于深入理解并研究 PNI 的病理生理机制(图 1)。

## 2 PI3K/Akt 信号通路在 PNI 中的作用

### 2.1 降低氧化应激反应

以过量 ROS 为特征的氧化应激是 PNI 的关键始动因素<sup>[6]</sup>,过量 ROS 使得氧化-抗氧化还原系统被打破,导致线粒体功能障碍、脂质过氧化和细胞

凋亡<sup>[7]</sup>。SCs 中过量的 ROS 导致 DNA 合成、蛋白质表达及线粒体功能障碍。因此,抑制过量 ROS 的产生对于维持 PNI 后 SCs 的功能以及 SCs 和细胞间相互作用至关重要。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor transcription erythroid-like factor 2, Nrf2) 在调节氧化还原平衡中发挥重要作用,可上调抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 表达<sup>[8]</sup>,并诱导血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达<sup>[9]</sup>。PNI 后, Nrf2 加速髓鞘碎片清除,促进轴突髓鞘再生<sup>[10]</sup>。此外, PNI 与内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 和未折叠蛋白反



注: Nrf2:核因子 E2 相关因子 2; HO-1:血红素加氧酶-1; NQO1: NAD(P)H 醌氧化还原酶-1; SOD2:线粒体超氧化物歧化酶 2; Bax: Bcl-2 相关 X 蛋白; Bcl-2: B 细胞淋巴瘤-2; mTOR:哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; IL-6:白细胞介素-6; IL-1β:白细胞介素-1β; TNF-α:肿瘤坏死因子-α; VEGF:血管内皮生长因子; PCNA:细胞核抗原; cyclinD1:细胞周期蛋白 D1; PI3K:磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶; Akt:蛋白激酶 B; PTEN:磷酸酯酶与张力蛋白同源。

图 1 PI3K/Akt 信号通路被激活后在 PNI 中发挥的作用

Note. Nrf2, Nuclear factor transcription erythroid-like factor 2. HO-1, Heme oxygenase-1. NQO1, NADPH dehydrogenase [quinone] 1. SOD2, Superoxide dismutase 2. Bax, Bcl-2 associated X protein. Bcl-2, B-cell lymphoma-2. mTOR, Mammalian target of rapamycin. IL-6, Interleukin-6. IL-1β, Interleukin-1β. TNF-α, Tumor necrosis factor-α. VEGF, vascular endothelial growth factor. PCNA, Proliferating cell nuclear antigen. cyclinD1, Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor D1. PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase. Akt, Protein kinase B. PTEN, Phosphatase and tensin homolog.

Figure 1 Role of the activated PI3K/Akt signaling pathway in PNI

应(unfolded protein response, UPR)有关<sup>[11]</sup>。UPR 是坐骨神经挤压损伤后轴突再生的早期反应之一<sup>[12]</sup>,可导致 SC 中促凋亡转录因子 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)的表达。

PI3K/Akt 信号通路在调节细胞的氧化应激水平中起着关键作用。研究表明,SCs 中的氧化代谢中断可通过抑制 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路,从而阻碍神经再生<sup>[13]</sup>。相反,激活 PI3K/Akt 信号通路可促进抗氧化蛋白 Nrf2、NAD(P)H 醌氧化还原酶-1(NADPH dehydrogenase [quinone] 1, NQO1)、线粒体超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2)和 HO-1 的表达,同时上调凋亡相关蛋白 Bcl-2、下调 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax),从而促进 SCs 增殖、轴突再生和功能恢复<sup>[14]</sup>。此外, Ngr1 通过激活 PI3K/Akt 通路促进外周轴突再生<sup>[12]</sup>。综上,PI3K/Akt 通路可介导氧化应激来影响 PNI 的发生发展。

## 2.2 调控 SCs 自噬

自噬是细胞内容物被双层膜结构包裹随后转运到溶酶体形成自噬溶酶体继而降解的过程。自噬不足或过度均对细胞有害。自噬可促进受损细胞器清除,从而保护神经细胞<sup>[15]</sup>。而过度的自噬会导致细胞器的异常清除,导致细胞死亡<sup>[16-17]</sup>。PNI 后,自噬可以清除轴突中的髓鞘碎片和受损细胞器,加速受损神经的修复<sup>[18-20]</sup>。研究指出, mTOR 对自噬过程和神经元保护具有显著的调节作用,其活性激活可以促进自噬基因的表达,加速髓鞘碎片的清除<sup>[21-22]</sup>。PI3K/Akt 信号通路对 SCs 中的自噬和迁移起着重要的调节作用,可分泌多种物质刺激轴突再生和髓鞘形成<sup>[23-24]</sup>。体内外研究发现, CXC 型趋化因子配体 12(chemokine CXC motif ligand 12, CXCL12)通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路增强 SCs 自噬能力,从而促进 SCs 的迁移来促进面神经功能修复<sup>[25]</sup>。可见, PI3K/Akt 信号通路通过影响自噬参与 PNI 的发生发展。

## 2.3 抑制细胞凋亡

凋亡是细胞有序的死亡过程,在形态学上表现为细胞体积收缩、染色质凝结、核间体 DNA 断裂、细胞骨架重组和凋亡小体形成<sup>[26]</sup>。凋亡有 3 种途径,一种是涉及线粒体的内在途径,也被称为 BCL-2 调控的途径,另一种是死亡受体启动的外在途径,最后一种是 ERS 途径<sup>[27]</sup>。肿瘤坏死因子受体 2

(tumor necrosis factor receptor-2, TNFR-2)在调节 SCs 抗凋亡能力中起着重要的作用<sup>[28]</sup>。PNI 后,损伤神经、DRG、脊髓中的细胞凋亡率增加<sup>[29-31]</sup>,导致 NP 的出现和神经生长及修复的缓慢。PI3K/Akt 通路是参与细胞凋亡的关键信号通路。激活 PI3K/Akt 信号通路可以减少 PNI 后 SCs 及 DRG 凋亡。PTEN 基因是 PI3K/Akt 通路的主要负调控因子之一,抑制 PTEN 可促进成体外周轴突再生<sup>[32]</sup>。研究表明,由皮肤前体细胞分化而来的 SCs 所分泌的细胞外囊泡,通过 miR-21-5p 对 PTEN 基因进行负调控,从而激活 PI3K/Akt 信号通路,进而调节下游信号分子的表达,如 Bax 和 Bcl-2。其中, Bax/Bcl-2 比率降低,有助于改善 DRGs 的神经突生长<sup>[33]</sup>。可见, PI3K/Akt 信号通路通过参与细胞凋亡参与 PNI 的发生发展。

## 2.4 抑制炎症反应

炎症细胞、炎症细胞因子和趋化因子在 PNI 的发病机制中起着至关重要的作用。损伤诱导的炎症反应通过产生炎性介质促进巨噬细胞和其他免疫细胞向受损神经和 DRG 的定向迁移,产生细胞因子和趋化因子激活 SCs 和调节 DRG 神经元的活性<sup>[34]</sup>。PNI 通常通过炎症诱发 NP,这种疼痛具体表现为对机械刺激的异常敏感,即机械性痛觉过敏,以及在非痛刺激下也会产生疼痛感,即异常性疼痛症状<sup>[35]</sup>。IL-1 $\beta$ 、干扰素- $\gamma$ (interferon gamma, IFN- $\gamma$ )、IL-17、IL-6 和 TNF- $\alpha$  在 NP 动物模型的神经组织中增加。其中, IL-6 和 TNF- $\alpha$  在神经性疼痛的发生、巨噬细胞的激活以及通过瞬态感受器电位阳离子通道(transient receptor potential cation channel, TRPV1)致敏的疼痛中起着关键作用<sup>[36-37]</sup>。此外,在坐骨神经再生过程中,巨噬细胞在诱导神经桥中的脉管系统发展和引导 SCs 迁移过程中起着重要作用<sup>[38]</sup>。然而,巨噬细胞的过度迁移会释放多种促炎因子, TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平显著升高。研究表明, PI3K/Akt 信号通路与巨噬细胞的迁移和炎性介质的释放相关,从而影响 NP 的发生发展<sup>[39]</sup>。Maresin 1(MaR1)是一种抗炎和促分解介质,已证明可以通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路来促进神经再生以改善疼痛超敏反应并保护 DRG 神经元,同时减轻了 PNI 小鼠脊髓背角促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的产生,从而抑制了炎症反应<sup>[40]</sup>。Botticelli 等<sup>[41]</sup>通过小鼠坐骨神经分离出的原代 SCs 来模拟炎症模型,发现  $\alpha 7$  烟碱乙酰胆碱受体的激

活可以上调中 PI3K<sup>p85</sup> 蛋白, Akt<sup>Thr308</sup> 和 p70 S6K<sup>Thr389</sup> 的磷酸化蛋白水平, 表明  $\alpha 7$  烟碱受体的激活可以调节 PI3K/Akt/mTORC1 信号通路来抑制促炎细胞因子的释放, 从而改善 SCs 的迁移能力并促进细胞骨架蛋白的重塑。综上, PI3K/Akt 通路通过参与受损神经和 DRG 炎症反应来修复 PNI 及减轻 NP。

## 2.5 促进血管生成

血管形成对神经再生同样至关重要, 在周围神经再生的早期阶段, 内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 提供血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 迅速形成微血管, 提供氧气和营养供应<sup>[42]</sup>。研究表明, 微血管 ECs 可吞噬髓鞘碎片, 促进神经损伤后的巨噬细胞募集和纤维化<sup>[43]</sup>, 为神经再生提供必需营养物质。此外, ECs 迁移受到 SCs 的影响<sup>[44]</sup>。PI3K/Akt 信号通路与 PNI 血管生成相关。最近一项研究表明, 内皮细胞衍生的外泌体通过 miR199-5 靶向 PTEN 基因, 以 PI3K/Akt 依赖的方式促进 SC 的表型转化, 并抑制其凋亡<sup>[5]</sup>。另外, 有研究显示, 经富含血小板血浆衍生的外泌体处理的间充质干细胞 (MSCs) 通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进 PNI 后 SCs 增殖和迁移, 同时诱导血管生成<sup>[45]</sup>。综上, PI3K/Akt 信号通路通过参与血管生成, 进而影响神经再生来参与 PNI 的发生发展。

## 2.6 调控细胞周期

神经细胞周期的变化对神经再生至关重要。细胞周期由 G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub> 期和 M 期四个阶段组成, 其正常运作是细胞增殖的关键<sup>[46]</sup>。PI3K/Akt 信号通路通过调节这些细胞周期阶段来影响神经再生。Akt 通过抑制 GSK-3 $\beta$  和还原蛋白 27 激酶抑制剂 1 (p27kip1), 增强细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 的表达, 从而促进细胞周期进程和细胞增殖, 进而影响髓鞘的再生<sup>[47-49]</sup>。Akt 磷酸化的抑制易导致 G<sub>1</sub> 期停滞, 引发细胞凋亡, 阻碍神经再生<sup>[50]</sup>。有研究显示, 激活 PI3K/Akt 信号通路可促进 G<sub>1</sub>-S 期的转换, cyclinD1 下调、p21 上调, 促进了 SCs 增殖<sup>[51]</sup>。可见, PI3K/Akt 信号通路通过调控细胞周期影响 PNI 的发生发展。

## 3 中医药调控 PI3K/Akt 信号通路防治 PNI

在众多的古籍中虽未直接记载 PNI, 但根据其疼痛、肌萎缩等临床症状, 可归因于“痹证”“痿证”

等范畴<sup>[52]</sup>。《素问·痹论》记载“风寒湿三气杂至合而为痹”, 认为痹证的病因是风寒湿气所致。《中藏经》记载“痹者, 闭也。五脏六腑感于邪气, 乱于真气, 闭而不仁, 故曰痹”, 认为痹症的病因是邪气侵体导致气机淤阻不通。《金匱要略》记载“外因重视湿邪, 内因重视肝脾胃”, 强调外感邪气, 脾胃气虚, 正气不足。因此, 治则祛瘀通络, 补益虚损, 扶助正气, 主要以补益药、活血祛瘀药为主。中医药以整体观念和辨证论治为核心, 以多靶点、多层次为特点, 中药单体、复方及针灸以其多通路、双向调节在 PNI 中发挥作用, 且不良反应较少。因此, 对于 PNI 的中医药分析对于防治 PNI 具有重要意义。

### 3.1 单味中药

中药活性成分是发挥中药药效的重要物质基础。这些成分主要通过调控 PI3K/Akt 信号通路达到抗氧化、调节自噬、抗凋亡、促进血管新生和细胞周期转变等目的, 从而促进细胞增殖、髓鞘和轴突再生, 进而促进神经再生。

#### 3.1.1 天麻

《本草纲目》中记载天麻具有助阳气、补五劳七伤等功效, 可治风湿麻痹等病症。天麻素是其主要成分, 具有抗炎、抗氧化作用<sup>[53]</sup>。Zuo 等<sup>[54]</sup>发现天麻素通过激活 RSC96 SCs 中的 Akt 磷酸化来促进 RSC96 SCs 的增殖。李璐希<sup>[55]</sup>通过动物实验进一步证明了天麻素通过 PI3K/Akt/mTOR 促进坐骨神经离断大鼠的运动功能和神经再生。

#### 3.1.2 地龙

地龙提取物具有抗肿瘤和神经保护作用。Chang 等<sup>[56]</sup>研究发现地龙提取物促进 PI3K/Akt 的磷酸化, 激活增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达, 促进细胞周期 G<sub>1</sub> 期的进展, 诱导细胞周期调节蛋白 cyclin D1、cyclin E 和 cyclin A 的表达, 通过 PI3K/Akt 信号促进 RSC96 细胞的增殖和存活。

#### 3.1.3 黄芪

黄芪甲苷具有抗炎、抗氧化和神经保护等生物活性。Yin 等<sup>[57]</sup>研究表明黄芪甲苷通过增强 RSC96 细胞的自噬活性, 缓解细胞凋亡, 减轻了周围神经髓鞘损伤, 并改善了神经功能, 通过调节 miR-155 介导的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路促进自噬减少凋亡。此外, 黄芪作为中草药领域中的珍贵补益佳品, 在增补人体气血、强壮体魄以及提升免疫系统功能方面发挥重要作用。Zhang 等<sup>[58]</sup>通过体内外实验发现黄芪的活性成分黄芪多糖 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 显

著增加了 ECs 迁移和血管的形成,可能通过激活 Akt/eNOS 信号通路以加速血管生成而发挥作用。

### 3.1.4 姜黄

姜黄素具有抗炎、抗氧化作用。Zhao 等<sup>[59]</sup>研究发现姜黄素可促进坐骨神经损伤大鼠细胞自噬、髓鞘再生和轴突再生,通过调节 Akt 通路加速细胞自噬,减少 SCs 凋亡,促进髓鞘化,加速神经修复。

### 3.1.5 葛根

葛根素是一种从葛根中提取的异黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎等多种药理作用。王雨等<sup>[60]</sup>发现葛根素通过调控 PI3K/Akt 信号通路可改善臂丛神经根性撕脱伤大鼠的脊髓前角  $\alpha$  运动神经元死亡,与其抑制 iNOS 蛋白表达、促进 CGRP 蛋白表达相关。

### 3.1.6 益智仁

原儿茶酸具有抗菌、抗氧化、抗炎和神经保护的作用。Ju 等<sup>[61]</sup>发现益智仁的提取物原儿茶酸能够促进 RSC96 细胞的增殖,并通过调节 IGF-1/PI3K/Akt 信号来调节细胞周期相关蛋白来促进细胞增殖和细胞存活。

### 3.1.7 白藜芦醇

白藜芦醇是一种天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和抗心血管病等生物活性。Ding 等<sup>[62]</sup>研究发现,白藜芦醇可以通过激活 Akt 信号通路促进 p300 的磷酸化,并增加 VEGF 的表达,显著改善坐骨神经损伤后的运动功能恢复,促进神经再生。

### 3.1.8 鹿茸

鹿茸具有抗炎、抗氧化作用,可起到神经保护作用。毛仁群<sup>[63]</sup>通过体外实验发现鹿茸的提取物鹿茸多肽可促进 SCs 的迁移,与轴突导向因子受体 UNC5B 结合发挥对 SCs 的迁移作用。通过激活 P38 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路改善坐骨神经损伤大鼠的运动功能和神经传导速度,促进轴突再生和髓鞘形成。

### 3.1.9 地黄

梓醇是一种从地黄的根部提取的化合物,作为多效性神经保护剂,可对神经元及胶质细胞产生保护作用。Zhu 等<sup>[64]</sup>发现梓醇可显著改善坐骨神经损伤小鼠功能,增加有髓神经纤维的密度和厚度,可减少 L4-L6 脊髓前角细胞凋亡数量,上调 p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K、GAP-43 和 BDNF 的表达,通过激活 Akt/mTOR 信号通路增强轴突生长,见表 1。

## 3.2 中药复方

中药复方在 PNI 中发挥着重要作用。丹红注射液,由丹参和红花以 3:1 的剂量比例制成,含有多种重要生物活性成分,其中包括水溶性物质如丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸和咖啡酸,以及脂溶性化合物如丹参酮 A 和隐丹参酮。在体内具有抗氧化、抑制血小板黏附和聚集、改善微循环、改善血液流变学、调节免疫等多种药理活性。Gao 等<sup>[65]</sup>发现丹红注射液通过激活 PI3K/Akt 通路能够上调 CXCL12 表达水平,从而促进 SCs 增殖迁移,对面神经功能恢复和髓磷脂再生具有推动作用。

## 3.3 其他

针灸可通过 PI3K/Akt 通路抑制细胞凋亡从而治疗 PNI。闫泓池<sup>[66]</sup>发现针刺“环跳”穴可以促进坐骨神经损伤大鼠 L4-L5 神经节中的神经纤维的修复,提高神经传导速度,从而提高运动功能。此外,PI3K、Akt、Bcl-2 蛋白表达上调,表明针刺可激活 PI3K/Akt 信号通路从而抑制神经元细胞的凋亡,且深刺组效果明显于浅刺组。此外,陈静<sup>[67]</sup>研究发现艾灸治疗可通过增强面神经损伤家兔中 PI3K/Akt 通路信号转导,从而促进损伤面神经的修复。

## 4 小结与展望

近年来,PNI 患病人数愈来愈多,严重危害患者的生活质量。PNI 的发病机制是一个多环节、多因素的复杂过程,与氧化应激、炎症反应、自噬、凋亡、细胞周期调控、血管生成等过程密切相关。其中,PI3K/Akt 信号通路在促进细胞存活方面扮演了重要角色,其通过调控 IGF-1、mTOR、Nrf2 等关键因子,显著影响 SCs、DRG 神经元、ECs 的增殖、凋亡与自噬等病理生理过程。中药单体、复方及针灸疗法均能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,促进髓鞘再生与轴突再生,从而有效促进神经再生。中医药通过调控 PI3K/Akt 信号通路治疗 PNI 多以补气活血通络药物为主,此治疗策略与中医“正气存内,邪不可干”的核心理念相契合,其中,使用频率较高的药物有黄芪、天麻、地龙等补气活血通络药物,因其显著疗效而倍受关注,其深入研究有望为中医药在 PNI 治疗中的应用提供更多科学依据与有效手段。然而,PI3K/Akt 信号通路的调控已成为 PNI 治疗的重要靶点,但当前仍面临诸多挑战。一方面,中医药在 PNI 治疗中的研究多集中于中药单体,而对中药复方及针灸疗法的探索尚显不足,故今后可加大对

表 1 中药单体或活性成分通过干预 PI3K/Akt 信号通路治疗 PNI 的分子机制

Table 1 Molecular mechanism of traditional Chinese medicine monomers or active components in the treatment of PNI by interfering with PI3K/Akt signal pathway

中药单体或活性成分 Chinese medicine monomer or active ingredient	中药成分 Chinese medicine ingredient	模型 Model	作用机制 Mechanism of action	机制 Mechanism
天麻素 <sup>[54]</sup> Gastrodin	苷类 Glycoside	RSC96 细胞 RSC96 cells	PI3K/Akt ↑, MAPK/ERK1/2 ↓	SCs 增殖 ↑ SCs proliferation ↑
天麻素 <sup>[55]</sup> Gastrodin	苷类 Glycoside	坐骨神经切断 SD 大鼠 Sciatic nerve dissection in SD rats	PI3K/Akt/mTOR ↑	髓鞘再生 ↑ Myelin sheath regeneration ↑
地龙提取物 <sup>[56]</sup> Dilong	苷类 Glycoside	RSC96 细胞 RSC96 cells	PI3K/Akt ↑	细胞周期 ↑、SCs 增殖 ↑ Cell cycle ↑, SCs proliferation ↑
黄芪甲苷 <sup>[57]</sup> Astragaloside IV	苷类 Glycoside	RSC96 细胞 RSC96 cells	PI3K/Akt/mTOR ↑	自噬 ↑、凋亡 ↓ Autophagy ↑, apoptosis ↓
黄芪多糖 <sup>[58]</sup> Radix astragalus polysaccharide	多糖类 Polysaccharide	人脐静脉内皮细胞+坐骨神经挤压伤 SD 大鼠 Human umbilical vein endothelial cells + sciatic nerve crush injury in SD rats	Akt/eNOS ↑	血管生成 ↑、轴突再生 ↑、髓鞘再生 ↑ Angiogenesis ↑, axonal regeneration ↑, myelin sheath regeneration ↑
姜黄素 <sup>[59]</sup> Curcumin	黄酮类 Flavonoids	坐骨神经挤压伤 SD 大鼠+ RSC96 细胞 Sciatic nerve crush injury in SD rats + RSC96 cells	Akt/mTOR ↑	细胞自噬 ↑、髓鞘再生 ↑、轴突再生 ↑、 凋亡 ↓ Autophagy ↑, myelin sheath regeneration ↑, axonal regeneration ↑, apoptosis ↓
葛根素 <sup>[60]</sup> Puerarin	黄酮类 Flavonoids	臂丛神经根性撕脱伤 SD 大鼠 Brachial plexus radicular avulsion injury in SD rats	PI3K/Akt	氧化应激 ↓ Oxidative stress ↓
原儿茶酸 <sup>[61]</sup> Protocatechuic acid	酚类 Phenol	RSC96 细胞 RSC96 cells	IGF-I/PI3K/Akt ↑	凋亡 ↓、SCs 增殖 ↑、细胞周期 ↑ Apoptosis ↓, SCs proliferation ↑, cell cycle ↑
白藜芦醇 <sup>[62]</sup> Resveratrol	酚类 Phenol	坐骨神经挤压伤 SD 大鼠 Sciatic nerve crush injury in SD rats	Akt/p300/VEGF ↑	血管生成 ↑ Angiogenesis ↑
鹿茸多肽 <sup>[63]</sup> Velvet antler peptide	多肽类 Peptide	RSC96 细胞 + 坐骨神经损伤 SD 大鼠 RSC96 cells + sciatic nerve crush injury in SD rats	P38 MAPK ↑, PI3K/Akt ↑	氧化应激 ↓、SCs 增殖 ↑、轴突再生 ↑、髓鞘再生 ↑ Oxidative stress ↓, SCs proliferation ↑, axonal regeneration ↑, myelin sheath regeneration ↑
梓醇 <sup>[64]</sup> Catalpol	萜类 Terpene	坐骨神经挤压损伤 KM 小鼠 Sciatic nerve crush injury in KM mice	Akt/mTOR/ 70S6K/ ↑	脊髓前角凋亡 ↓、髓鞘再生 ↑ Spinal cord anterior horn cell apoptosis ↓, myelin sheath regeneration ↑

注：“↑”表示表达水平增加，“↓”表示表达水平降低。

Note. “↑” indicates an increase in expression level, “↓” indicates a decrease in expression level.

该领域的研究。另一方面,当前 PNI 研究主要集中在细胞和动物实验阶段,缺乏充足的临床数据与循证医学证据支持。为推动该领域的深入发展,未来需着重开展高质量、大规模的临床试验,以更全面、准确地评估 PNI 的实际应用效果。同时,鉴于中药靶点较多的特点,未来可利用高通量质谱分析、分

子对接等先进技术,深入探索中药成分对 PI3K/Akt 信号通路的调控机制,为 PNI 的防治提供更为准确、有效的治疗策略。

#### 参考文献:

[1] WOFFORD K L, SHULTZ R B, BURRELL J C, et al.

- Neuroimmune interactions and immunoengineering strategies in peripheral nerve repair [J]. *Prog Neurobiol*, 2022, 208: 102172.
- [ 2 ] ZHOU X, LV Y, XIE H, et al. RNA sequencing of exosomes secreted by fibroblast and Schwann cells elucidates mechanisms underlying peripheral nerve regeneration [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(8): 1812–1821.
- [ 3 ] CHEN Q, ZHANG X Y, WANG Y P, et al. Unveiling adcyap1 as a protective factor linking pain and nerve regeneration through single-cell RNA sequencing of rat dorsal root ganglion neurons [J]. *BMC Biol*, 2023, 21(1): 235.
- [ 4 ] DAI Y, LU T, LI L, et al. Electrospun composite PLLA-PPSB nanofiber nerve conduits for peripheral nerve defects repair and regeneration [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(10): e2303539.
- [ 5 ] HUANG J, ZHANG G, LI S, et al. Endothelial cell-derived exosomes boost and maintain repair-related phenotypes of Schwann cells *via* miR199-5p to promote nerve regeneration [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 10.
- [ 6 ] WANG J, CHEN P, HAN G, et al. Rab32 facilitates Schwann cell pyroptosis in rats following peripheral nerve injury by elevating ROS levels [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 194.
- [ 7 ] ZENG Y, HE Y, WANG L, et al. Dihydroquercetin improves experimental acute liver failure by targeting ferroptosis and mitochondria-mediated apoptosis through the SIRT1/p53 axis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155533.
- [ 8 ] WANG Y, LIU Z, MA J, et al. Lycopene attenuates the inflammation and apoptosis in aristolochic acid nephropathy by targeting the Nrf2 antioxidant system [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102494.
- [ 9 ] QIU C, LI Z, PENG P. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect MC3T3-E1 osteoblasts from dexamethasone-induced apoptosis *via* induction of the Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Regen Ther*, 2024, 27: 1–11.
- [ 10 ] TOSYALI H K, BORA E S, ÇİNAROĞLU O S, et al. Oxytocin mitigates peripheral nerve damage *via* Nrf2 and irislin pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2023, 27(23): 11340–11350.
- [ 11 ] NIELLA R V, CORRÊA J M X, DOS SANTOS J F R, et al. Post-treatment with maropitant reduces oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and neuroinflammation on peripheral nerve injury in rats [J]. *PLoS One*, 2024, 19(3): e0287390.
- [ 12 ] WANG D, ZHENG T, GE X, et al. Unfolded protein response-induced expression of long noncoding RNA Ngr1 supports peripheral axon regeneration by activating the PI3K-Akt pathway [J]. *Exp Neurol*, 2022, 352: 114025.
- [ 13 ] ZHANG N, JI Q, CHEN Y, et al. TREM2 deficiency impairs the energy metabolism of Schwann cells and exacerbates peripheral neurological deficits [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(3): 193.
- [ 14 ] LI B, WANG X. Photobiomodulation enhances facial nerve regeneration *via* activation of PI3K/Akt signaling pathway-mediated antioxidant response [J]. *Lasers Med Sci*, 2022, 37(2): 993–1006.
- [ 15 ] YANG J, YU Z, JIANG Y, et al. SIRT3 alleviates painful diabetic neuropathy by mediating the FoxO3a-PINK1-Parkin signaling pathway to activate mitophagy [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14703.
- [ 16 ] YUAN Z L, MO Y Z, LI D L, et al. Inhibition of ERK downregulates autophagy *via* mitigating mitochondrial fragmentation to protect SH-SY5Y cells from OGD/R injury [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 204.
- [ 17 ] ZENG L, HE J, LIU C, et al. Melatonin attenuates ropivacaine-induced apoptosis by inhibiting excessive mitophagy through the parkin/PINK1 pathway in PC12 and HT22 cells [J]. *Inflammation*, 2022, 45(2): 725–738.
- [ 18 ] ZENG X, BIAN W, LIU Z, et al. Muscle-derived stem cell exosomes with overexpressed miR-214 promote the regeneration and repair of rat sciatic nerve after crush injury to activate the JAK2/STAT3 pathway by targeting PTEN [J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1146329.
- [ 19 ] XU J, PENG Q, CAI J, et al. The Schwann cell-specific G-protein  $G\alpha_o$  (Gnao1) is a cell-intrinsic controller contributing to the regulation of myelination in peripheral nerve system [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2024, 12(1): 24.
- [ 20 ] CHEN S H, WANG H W, YANG P C, et al. Schwann cells acquire a repair phenotype after assembling into spheroids and show enhanced *in vivo* therapeutic potential for promoting peripheral nerve repair [J]. *Bioeng Transl Med*, 2024, 9(2): e10635.
- [ 21 ] ZHONG W, CHEN J, HE Y, et al. The polysaccharides from *Balanophora polyandra* enhanced neuronal autophagy to ameliorate brain function decline in natural aging mice through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Neuroreport*, 2024, 35(8): 509–517.
- [ 22 ] GE C, LIU D, SUN Y. The promotive effect of activation of the Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in oligodendrocytes on nerve myelin regeneration in rats with spinal cord injury [J]. *Br J Neurosurg*, 2024, 38(2): 284–292.
- [ 23 ] MIN Q, PARKINSON D B, DUN X P. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge [J]. *Glia*, 2021, 69(2): 235–254.
- [ 24 ] QU W R, ZHU Z, LIU J, et al. Interaction between Schwann cells and other cells during repair of peripheral nerve injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(1): 93–98.
- [ 25 ] GAO D, TANG T, ZHU J, et al. CXCL12 has therapeutic value in facial nerve injury and promotes Schwann cells autophagy and migration *via* PI3K-AKT-mTOR signal pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 460–468.
- [ 26 ] LI M, WANG Z W, FANG L J, et al. Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 467.
- [ 27 ] HE W, LI Z Q, GU H Y, et al. Targeted therapy of spinal cord injury: inhibition of apoptosis is a promising therapeutic strategy

- [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(7): 4222–4239.
- [28] GAO Z, MIN C, XIE H, et al. TNFR2 knockdown triggers apoptosis-induced proliferation in primarily cultured Schwann cells [J]. *Neurosci Res*, 2020, 150: 29–36.
- [29] ZHANG Z, ZHANG M, SUN Y, et al. Effects of adipose derived stem cells pretreated with resveratrol on sciatic nerve regeneration in rats [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 5812.
- [30] UTA D, ISHIBASHI N, TAO S, et al. Photobiomodulation inhibits neuronal firing in the superficial but not deep layer of a rat spinal dorsal horn [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 710: 149873.
- [31] AL-ARBEED T A, RENNO W M, AL-HASSAN J M. Neuroregeneration of injured peripheral nerve by fraction B of catfish epidermal secretions through the reversal of the apoptotic pathway and DNA damage [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1085314.
- [32] YOU M, XING H, YAN M, et al. Schwann cell-derived exosomes ameliorate paclitaxel-induced peripheral neuropathy through the miR-21-mediated PTEN signaling pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(12): 6840–6851.
- [33] CONG M, SHEN M, WU X, et al. Improvement of sensory neuron growth and survival *via* negatively regulating PTEN by miR-21-5p-contained small extracellular vesicles from skin precursor-derived Schwann cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 80.
- [34] GUIMARÃES R M, ANÍBAL-SILVA C E, DAVOLI-FERREIRA M, et al. Neuron-associated macrophage proliferation in the sensory Ganglia is associated with peripheral nerve injury-induced neuropathic pain involving CX3CR1 signaling [J]. *eLife*, 2023, 12: e78515.
- [35] DU J, CHENG N, DENG Y, et al. Astrocyte senescence-like response related to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 65.
- [36] SUN J, LIAO Z, LI Z, et al. Down-regulation miR-146a-5p in Schwann cell-derived exosomes induced macrophage M1 polarization by impairing the inhibition on TRAF6/NF- $\kappa$ B pathway after peripheral nerve injury [J]. *Exp Neurol*, 2023, 362: 114295.
- [37] FENG R, MURALEEDHARAN SARASWATHY V, MOKALLED M H, et al. Self-renewing macrophages in dorsal root Ganglia contribute to promote nerve regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120(7): e2215906120.
- [38] SUN Y, ZHANG Y, GUO Y, et al. Electrical aligned polyurethane nerve guidance conduit modulates macrophage polarization and facilitates immunoregulatory peripheral nerve regeneration [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 244.
- [39] OSTHUES T, ZIMMER B, RIMOLA V, et al. The lipid receptor G2A (GPR132) mediates macrophage migration in nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1740.
- [40] WEI J, SU W, ZHAO Y, et al. Maresin 1 promotes nerve regeneration and alleviates neuropathic pain after nerve injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 32.
- [41] BOTTICELLI E, GUERRIERO C, FUCILE S, et al.  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors may improve schwann cell regenerating potential *via* metabotropic signaling pathways [J]. *Cells*, 2023, 12(11): 1494.
- [42] CHEN J N, YANG X J, CONG M, et al. Promotive effect of skin precursor-derived Schwann cells on brachial plexus neurotomy and motor neuron damage repair through milieu-regulating secretome [J]. *Regen Ther*, 2024, 27: 365–380.
- [43] WU C, PAN Y, WANG L, et al. Inhibition of HDAC6 promotes microvascular endothelial cells to phagocytize myelin debris and reduces inflammatory response to accelerate the repair of spinal cord injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(3): e14439.
- [44] HUANG Y, YE K, HE A, et al. Dual-layer conduit containing VEGF-A-Transfected Schwann cells promotes peripheral nerve regeneration *via* angiogenesis [J]. *Acta Biomater*, 2024, 180: 323–336.
- [45] ZHANG Y, YI D, HONG Q, et al. Platelet-rich plasma-derived exosomes enhance mesenchymal stem cell paracrine function and nerve regeneration potential [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 699: 149496.
- [46] LUZINA I G, RUS V, LOCKATELL V, et al. Regulator of cell cycle protein (RGCC/RGC-32) protects against pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(2): 146–157.
- [47] JIANG Z, ZHANG W, LIU C, et al. Facilitation of cell cycle and cellular migration of rat schwann cells by O-carboxymethyl chitosan to support peripheral nerve regeneration [J]. *Macromol Biosci*, 2023, 23(10): e2300025.
- [48] AKRAM R, ANWAR H, JAVED M S, et al. Axonal regeneration: underlying molecular mechanisms and potential therapeutic targets [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(12): 3186.
- [49] GAO L, WANG C, QIN B, et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase suppresses neuronal apoptosis by increasing glycolysis and “cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of p27 after traumatic spinal cord injury in rats [J]. *Cell Transplant*, 2020, 29: 963689720950226.
- [50] ZHANG L, LI C, MARHABA AZIZ, et al. ITF2357 induces cell cycle arrest and apoptosis of meningioma cells *via* the PI3K-Akt pathway [J]. *Med Oncol*, 2022, 40(1): 21.
- [51] WU W, LIU Q, LIU Y, et al. Dixdc1 targets CyclinD1 and p21 *via* PI3K pathway activation to promote Schwann cell proliferation after sciatic nerve crush [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 956–963.
- [52] 韩易言, 马铁明. 针刺在周围神经损伤修复中的作用及机制探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(6): 154–157.
- HAN Y Y, MA T M. Role and mechanism of acupuncture in repair of peripheral nerve injury [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2022, 40(6): 154–157.
- [53] PENG Z, WANG S, CHEN G, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(4): 661–673.

- [54] ZUO W, XU F, ZHANG K, et al. Proliferation-enhancing effects of gastrodin on RSC96 Schwann cells by regulating ERK1/2 and PI3K signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 747-753.
- [55] 李璐希. 基于 PI<sub>3</sub>K/AKT 信号通路探讨天麻素对大鼠坐骨神经离断伤修复的作用机制 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2023.
- LI L X. Mechanisms of tianmuin on the repair of sciatic nerve dissection in rats based on PI<sub>3</sub>K/AKT signaling pathway [D]. Zunyi: Zunyi Medical University, 2023.
- [56] CHANG Y M, KUO W H, LAI T Y, et al. RSC96 schwann cell proliferation and survival induced by *Dilong* through PI3K/Akt signaling mediated by IGF-I [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 216148.
- [57] YIN Y, QU H, YANG Q, et al. Astragaloside IV alleviates Schwann cell injury in diabetic peripheral neuropathy by regulating microRNA-155-mediated autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153749.
- [58] ZHANG G, HUANG J, HAO S, et al. *Radix astragalus* polysaccharide accelerates angiogenesis by activating AKT/*ENOS* to promote nerve regeneration and functional recovery [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 838647.
- [59] ZHAO Z, LI X, LI Q. Curcumin accelerates the repair of sciatic nerve injury in rats through reducing Schwann cells apoptosis and promoting myelination [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 1103-1110.
- [60] 王雨, 陈传奇, 王文晟, 等. 葛根素对臂丛神经根性撕脱伤脊髓前角 iNOS、CGRP 蛋白表达及 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019, 37(5): 517-522.
- WANG Y, CHEN C Q, WANG W S, et al. Effects of Puerarin on iNOS, CGRP protein expression and PI3K/Akt signaling pathway in the anterior horn of the spinal cord in radicular avulsion injury of brachial plexus [J]. *Chin J Clin Anatomy*, 2019, 37(5): 517-522.
- [61] JU D T, LIAO H E, SHIBU M A, et al. Nerve regeneration potential of protocatechuic acid in RSC96 schwann cells by induction of cellular proliferation and migration through IGF-IR-PI3K-Akt signaling [J]. *Chin J Physiol*, 2015, 58(6): 412-419.
- [62] DING Z, CAO J, SHEN Y, et al. Resveratrol promotes nerve regeneration *via* activation of p300 acetyltransferase-mediated VEGF signaling in a rat model of sciatic nerve crush injury [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 341.
- [63] 毛仁群. 鹿茸多肽对雪旺细胞增殖、迁移和神经再生干预作用及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2022.
- MAO R Q. Intervention of deer antler peptide on proliferation, migration and neural regeneration of xuewang cells and its mechanism [D]. Suzhou: Soochow University, 2022.
- [64] ZHU H, WANG Y, YANG X, et al. Catalpol improves axonal outgrowth and reinnervation of injured sciatic nerve by activating Akt/mTOR pathway and regulating BDNF and PTEN expression [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3): 1311-1326.
- [65] GAO D K, SUN L H, SUN X Y, et al. DHI increases the proliferation and migration of schwann cells through the PI3K/AKT pathway and the expression of CXCL12 and GDNF to promote facial nerve function repair [J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(5): 1329-1340.
- [66] 闫泓池. 环跳穴的深浅不同刺法对坐骨神经损伤大鼠 L4-L5 神经节中 PI3K、AKT、Bcl-2 表达的影响 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- YAN H C. Effects of deep and shallow different stabbing methods of the Huanjiao acupoint on the expression of PI3K, AKT, and Bcl-2 in the L4-L5 ganglion of rats with sciatic nerve injury [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [67] 陈静. 管灸对面神经损伤家兔 PI3K/Akt 及 PLC/PKC 信号通路的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- CHEN J. Effects of tube moxibustion on PI3K/Akt and PLC/PKC signal pathways in rabbits with facial nerve injury [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2020.

[收稿日期]2024-06-17

赵琦,陈萍,杨丽萍,等. PCOS中胰岛素抵抗、高雄激素血症与线粒体氧化应激的关系探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 126-131.

Zhao Q, Chen P, Yang LP, et al. Relationship between insulin resistance, hyperandrogenism, and mitochondrial oxidative stress in polycystic ovarian syndrome [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 126-131.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.016

# PCOS中胰岛素抵抗、高雄激素血症与线粒体氧化应激的关系探讨

赵琦<sup>1</sup>, 陈萍<sup>2</sup>, 杨丽萍<sup>1\*</sup>, 孙建华<sup>1,2\*</sup>, 马子博<sup>1</sup>

(1.河南中医药大学第一临床医学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学第一附属医院妇产科, 郑州 450000)

**【摘要】** 多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)是一种常见于妇产科的生殖内分泌代谢疾病。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、高雄激素血症(hyperandrogenemia, HA)是PCOS的两个重要特征,在其发生发展过程中起到重要作用。有研究发现,PCOS患者与线粒体氧化应激存在一定关系,这种氧化应激又受到多种因素的影响,尤其是IR和HA。该文综述了IR和HA与线粒体氧化应激之间的关系,以及对PCOS患者线粒体氧化应激的影响。

**【关键词】** 多囊卵巢综合征;胰岛素抵抗;高雄激素血症;线粒体;氧化应激

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0126-06

## Relationship between insulin resistance, hyperandrogenism, and mitochondrial oxidative stress in polycystic ovarian syndrome

ZHAO Qi<sup>1</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>, YANG Liping<sup>1\*</sup>, SUN Jianhua<sup>1,2\*</sup>, MA Zibo<sup>1</sup>

(1. the First Clinical Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a prevalent reproductive endocrine metabolic disorder within obstetrics and gynecology. Two pivotal features of PCOS, insulin resistance (IR) and hyperandrogenemia (HA), are both instrumental in its pathogenesis. There exists a discernible correlation between PCOS and mitochondrial oxidative stress, a relationship heavily influenced by various factors, most notably IR and HA. This article endeavors to elucidate the interplay between IR, HA, and mitochondrial oxidative stress while also exploring the impacts of insulin resistance and hyperandrogenemia on mitochondrial oxidative stress among PCOS patients.

**【Keywords】** polycystic ovarian syndrome; insulin resistance; hyperandrogenaemia; mitochondria; oxidative stress

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

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81973596);河南中医药大学博士科研启动基金项目(RSBSJJ2019-29);河南中医药大学重点学科建设项目(15102044-2020);河南省中医药传承与创新人才工程(仲景工程)中医药青苗人才培养项目(豫卫中医函[2021]16号)。

**【作者简介】** 赵琦(1996—),女,博士研究生,研究方向:孕期心理应激影响对子代脑发育影响机制及其中医药防治研究。

E-mail: 1194195812@qq.com

**【通信作者】** 杨丽萍(1966—),女,博士,教授,研究方向:孕期心理应激影响对子代脑发育影响机制及其中医药防治研究。

E-mail: bioylp@126.com

孙建华(1988—),女,博士,讲师,主治医师,研究方向:中医药防治生殖内分泌与不孕症。E-mail: 1280588688@qq.com

\* 共同通信作者

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是妇产科常见的生殖内分泌代谢疾病, 其主要特征包括卵巢多囊改变、稀发排卵、高雄激素血症 (hyperandrogenemia, HA) 和胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)。临床上, PCOS 患者常表现为月经不规律、不孕、痤疮、黑棘皮症和肥胖, 部分患者或伴有高血压、高血脂、糖尿病、高胆固醇、高甘油三酯等相关代谢综合征。PCOS 全球发病率高达 5% ~ 10%, 目前有关其发病机制尚未明确, 考虑其是一种复杂的多基因疾病, 尚未存在治愈方法, 临床上多以对症治疗为主, 青春期调经, 育龄期助孕, 因人而异<sup>[1]</sup>。

线粒体是内分泌系统关键细胞器, 越来越多的研究者认为 PCOS 发病机制可能与线粒体功能障碍存在相关性, 包括线粒体生物合成减少和能量代谢障碍, 线粒体动力学改变及自噬异常, 氧化应激及炎症反应<sup>[2]</sup>。细胞进行有氧呼吸及能量代谢主要在线粒体中进行, 三羧酸循环与氧化磷酸化是负责最终氧化反应的共同途径。线粒体通过氧化磷酸化产生供细胞生命活动的能量, 并释放活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 如超氧化物和过氧化氢, 这些物质不稳定且对细胞有潜在毒性。适量的 ROS 对增殖、代谢、基因表达和免疫反应等生物学功能具有关键的影响<sup>[3]</sup>。线粒体氧化应激是指线粒体内部发生的一种情况, 即线粒体产生的自由基和氧化物质积累过多, 导致细胞内氧化还原平衡失调, ROS 产生过多及细胞色素 C 的释放, 进一步诱导细胞炎症反应及凋亡<sup>[4]</sup>。

PCOS 患者常伴有 HA 及 IR, 且多出现内分泌代谢紊乱。近来有研究表明, PCOS 患者存在线粒体氧化应激状态, 主要表现为 ROS 水平升高, 线粒体 DNA 损伤、线粒体膜电位丧失、脂质过氧化<sup>[5]</sup>。然而, 线粒体氧化应激也被认为是 HA 及 IR 等代谢异常疾病的特征。那么 PCOS 患者的氧化应激是否和 HA 及 IR 有关呢? 本文综述了 IR、HA 与线粒体氧化应激的关系, 以及 IR、HA 对 PCOS 患者线粒体氧化应激状态的影响。以期对 PCOS 临床治疗提供新思路 and 科学依据。

## 1 IR、HA 及线粒体氧化应激

### 1.1 IR 与线粒体氧化应激

IR 被认为是对胰岛素代谢作用 (包括胰岛素介导的葡萄糖处理) 的敏感性或反应性降低, 导致  $\beta$

细胞代偿性产生过多的胰岛素。生理条件下, 胰岛素介导的血管内皮产生一氧化氮导致血流量增加, 从而增强葡萄糖的处理。线粒体氧化应激可损害线粒体功能与结构, 进而扰乱三羧酸循环与氧化磷酸化, 减少三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 生成, 导致细胞能量供应不足, 影响胰岛素信号传导, 降低细胞对胰岛素的敏感性和葡萄糖的摄取与利用。由于葡萄糖是细胞主要能量来源, 其摄取与利用不足会进一步导致能量短缺, 损害线粒体功能, 加剧氧化应激, 形成恶性循环。IR 在 PCOS 患者卵巢功能、子宫内膜及糖脂代谢中起到重要的调节作用, 是引起育龄女性不孕的重要原因之一<sup>[6]</sup>。线粒体氧化应激可以激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK), 其促进胰岛素受体底物和胰岛素受体的丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 导致酪氨酸磷酸化降低, 抑制其下游磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 途径, 并最终对胰岛素的代谢作用产生抵抗。PI3K/AKT 信号通路可由胰岛素触发, 从而导致葡萄糖转运蛋白 4 型 (glucose transporter 4, GLUT4) 易位并发生葡萄糖摄取, 而异常的 PI3K/AKT 信号通路与 PCOS 病理密切相关<sup>[7]</sup>。在 SIRT3 诱导的 PCOS 颗粒细胞葡萄糖代谢缺陷减少后, 线粒体功能障碍会增加氧化应激。线粒体氧化应激诱导的 p38 MAPK 和 PI3K/AKT 的异常信号传导可能是 SIRT3 减少与 PCOS 颗粒细胞中葡萄糖代谢异常之间的联系<sup>[8]</sup>。

### 1.2 HA 与线粒体氧化应激

HA 是一种以雄激素水平升高为特征的疾病, 类固醇激素是性激素合成的关键前体, 其水平升高会促进雄激素合成增加, 从而引起体内雄激素水平的升高。这些雄激素包括睾酮、二氢睾酮、雄烯二酮、脱氢表雄酮和硫酸脱氢表雄酮。在女性机体中, 雄激素一般来源于卵巢、肝、肾上腺、皮肤及皮下脂肪组织。调查显示, 有 5% ~ 10% 的女性患有 HA<sup>[9]</sup>。女性患 HA 的主要病因是 PCOS, 约占病例的 80%, 其余包括药物、肿瘤及雄激素自然分泌过多<sup>[10]</sup>。线粒体是脂肪酸  $\beta$  氧化的关键场所, 氧化应激可能影响线粒体内酶的活性和结构, 阻碍脂肪酸的正常氧化, 进而扰乱脂质代谢。此外, 线粒体氧化应激增加自由基生成, 引发脂质过氧化, 破坏细胞膜完整性, 进一步影响脂质代谢。血中低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇和甘油三酯水平的升高, 同

时高密度脂蛋白胆固醇水平的降低,是脂质代谢紊乱的主要特征。雄激素合成的关键步骤包括胆固醇转化为孕酮再转化为雄激素,总胆固醇水平升高会导致雄激素合成增加。有研究表明,PCOS 患者的卵泡液中存在大量肝素结合表皮生长因子样生长因子(heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)。液体中丰富的 HB-EGF 可能通过 JNK/ERK 途径引起雌激素的过度分泌,导致颗粒细胞凋亡和线粒体功能障碍<sup>[11]</sup>。雌激素都是由雄激素合成的。睾酮可以被氧化成雌二醇,也就是雌激素的主要存在形式。这个氧化过程是不可逆的,是雌二醇在体内的唯一合成途径。雌激素分泌过多主要是由于雄激素过度分泌,最终导致线粒体功能障碍。一项体外研究表明,氧化应激增加了卵巢类固醇产生酶的活性,并刺激了雄激素的产生<sup>[12]</sup>。

### 1.3 线粒体氧化应激导致的 IR 与 HA

如上文所述,线粒体氧化应激会导致 IR,HA 通常也与氧化应激相关,那么线粒体的氧化应激所导致的 IR 与 HA 之间是否存在关联?许多研究者从多个方面解释线粒体氧化应激在 IR 和 HA 中的作用。线粒体氧化应激会导致 ATP 生成不足,进而造成细胞能量供应不足,并影响葡萄糖的摄取和利用。同时,氧化应激可能通过抑制脂肪氧化酶活性,引发脂质过氧化,导致脂质代谢紊乱,表现为体内胆固醇和甘油三酯水平升高。这些代谢紊乱不仅促进雄激素合成增加,还通过影响胰岛素信号转导,导致胰岛素分泌过多和胰岛素敏感性降低,从而使葡萄糖更难进入细胞,导致血糖水平升高。表现出 HA 和 IR 的肥胖 PCOS 患者卵泡生成异常和卵母细胞能力差的风险更高。HA 损害下丘脑-垂体-性腺轴,导致促性腺激素释放激素脉冲频率持续增加,促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)分泌过多,进而抑制促卵泡生成激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的分泌。高胰岛素血症刺激卵巢 theca 细胞中的 LH 活性并促进卵巢 HA,从而阻止卵泡成熟并促进卵泡闭锁<sup>[13]</sup>。IR 可以引发一系列促炎事件,包括高血糖和氧化应激。雄激素促进前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞并增加脂肪分解,导致游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)释放增加。患有 PCOS 的女性卵泡液中具有较高的 FFA 水平,导致卵泡微环境中的脂毒性和内质网应激<sup>[14]</sup>。在 IR 期间,氧化应激加剧,表现为蛋白质羰基、游离脂肪酸、丙二醛的增加,以及还原型谷胱甘

肽的减少<sup>[15]</sup>。这些结果表明,HA 和 IR 通过直接或间接增加线粒体氧化应激,从而损害 PCOS 中的卵泡成熟和卵母细胞质量,而不伴随卵泡丢失<sup>[16]</sup>。

## 2 PCOS 与线粒体氧化应激

### 2.1 PCOS 患者存在线粒体氧化应激状态

线粒体氧化应激是指在线粒体内氧化还原反应中产生大量 ROS 的过程。线粒体是细胞的主要能量生产中心,通过氧化磷酸化生成 ATP。在此过程中,氧分子被还原为水,但有时不完全还原会产生 ROS。当 ROS 生成量超过细胞内抗氧化防御系统的清除能力时,就会引发氧化应激,导致氧化损伤并影响细胞的生存和功能。氧化应激不仅是线粒体功能异常的结果,也能引起线粒体功能障碍。线粒体 DNA 易受氧化损伤,进而影响线粒体的生物合成和功能。在 PCOS 等疾病中,氧化应激的增加与细胞功能障碍、炎症和代谢异常等病理生理过程密切相关。ROS 生成过多是 PCOS 主要的发病因素,直接与线粒体 DNA 复制和线粒体氧化磷酸化效率相联系。当抗氧化酶的水平低于必要水平时,ROS 会损害生物分子。这一观点得到了循环 ROS 标志物(丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶)的证实,在 PCOS 患者中这些标志物显著升高<sup>[17]</sup>。升高的 ROS 又会损伤 DNA 修复蛋白,导致进一步的突变、线粒体氧化磷酸化功能障碍和更多 ROS 的产生,如此往复形成恶性循环。一些患有 PCOS 的女性抗氧化防御机制降低,这可能导致 ROS 产生和抗氧化防御之间的失衡,导致氧化应激增加。此外,LH、FSH 和其他生殖激素的之间的失衡可能会影响卵巢功能,并可能导致 ROS 的产生<sup>[13]</sup>。卵泡液中抗氧化因子与 ROS 之间的失衡可能会影响卵母细胞质量,从而导致 PCOS 患者异常排卵和不孕症<sup>[18]</sup>。

### 2.2 伴有 IR PCOS 患者存在线粒体氧化应激

葡萄糖和脂肪酸代谢途径通过胰岛素的作用相互连接。胰岛素通过抑制糖异生和糖原分解来影响葡萄糖代谢,导致循环葡萄糖水平下降。胰岛素还通过抑制激素敏感的脂肪酶来增加脂质合成并抑制脂解。在 PCOS 患者中,胰岛素途径的早期步骤,如减少对葡萄糖的高摄取和对脂解的抑制,结果导致循环中葡萄糖和脂肪酸水平升高,出现内分泌代谢紊乱。PCOS 患者常伴有 IR,导致细胞对胰岛素信号通路的反应降低,葡萄糖利用减少,进

而导致 ATP 生成不足和能量供应不足。线粒体是细胞的能量生产中心,ATP 生成不足会导致过量的 ROS 产生,损害线粒体功能和结构,进一步影响氧化磷酸化过程,形成恶性循环。在 IR 患者中,高血糖通过 NADPH 氧化酶 p47 (phagocyte oxidase, phox) 组分增加 ROS 产生,促使单核细胞释放肿瘤坏死因子  $\alpha$ ,增强了 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[19]</sup>。NF- $\kappa$ B 反过来通过刺激 NADPH 氧化酶加剧氧化应激,从而增加 ROS 的产生并维持炎症反应。伴有 IR 的 PCOS 患者多存在肥胖,NADPH 氧化酶在肥胖个体中对产生 ROS 起着关键作用。在脂肪细胞中,增加的脂肪酸水平通过激活 NADPH 氧化酶触发氧化应激。当 IR 被用作 PCOS 中糖代谢替代物时,性激素的产生会增加。PCOS 女性的脂肪细胞和血清中胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1) 酪氨酸磷酸化水平较低,但 IRS-1 丝氨酸磷酸化水平显著升高<sup>[20]</sup>。脂肪组织和卵泡颗粒细胞 IRS-1 水平较低,而 PCOS 黄体颗粒细胞的 IRS-1 水平较高。PCOS 个体的脂肪细胞和血清可能含有增加数量的活性细胞外信号调节蛋白激酶 1 和 2,但胰岛素受体、GLUT4 和 PI3K 水平降低<sup>[21]</sup>。氧化应激和 IR 密切相关,氧化应激可能是 PCOS 中 IR 的主要诱因,通过引起胰岛素受体后的功能障碍,干扰胰岛素信号传导,从而加重细胞对胰岛素的反应降低。

### 2.3 伴有 HA PCOS 患者存在线粒体氧化应激

HA 是 PCOS 的一个典型特征,也在其发病机制中起到核心作用。PCOS 患者循环中雄激素水平升高,主要是由于雄激素的产生和代谢之间的不平衡<sup>[22]</sup>。PCOS 患者出现脂质代谢异常,呈现高水平总胆固醇及甘油三酯,类固醇激素增多,雄激素合成增多。有研究证明,雄激素过高会促使卵巢颗粒细胞的焦亡、凋亡和自噬,可能导致 PCOS 中卵泡发育不良<sup>[23]</sup>。有研究表明,伴有 HA 的 PCOS 患者中,HA 增加了白细胞对高血糖的敏感性,且可能加剧了氧化应激。在 PCOS 女性中,存在睾酮过剩情况。雄激素(如睾酮)在细胞内可能影响线粒体的功能和能量代谢<sup>[24]</sup>。研究表明,雄激素可以影响线粒体的数量和形态,以及线粒体内蛋白质合成和能量产生过程<sup>[25]</sup>。过高的雄激素水平可能扰乱线粒体内氧化还原反应过程,增加氧化应激的发生。这可能导致线粒体内 ROS 的生成增加,从而影响线粒体的功能和细胞内氧化还原平衡,最终导致细胞凋亡的发生。尽管存在较高水平的前体激素——雄甾酮,

但睾酮仍然是在 PCOS 女性体内循环的最丰富和最有效的传统雄激素。睾酮给药已被证实会影响氧化应激相关指标,与白细胞中 ROS 水平的增加、p47 (phox) 基因的上调以及更高的血浆 TBARS 水平相关<sup>[26]</sup>。卵巢被认为是 PCOS 女性中过多传统雄激素的主要来源,但一些患有 PCOS 的女性也可能来自肾上腺过度产生雄激素<sup>[27]</sup>。在氧化应激状态下,雄激素生物学调节因子肝细胞核因子-4 $\alpha$  的表达降低,导致性激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 水平降低,这会加剧 HA<sup>[28]</sup>。

### 2.4 IR 和(或)HA 对 PCOS 患者线粒体氧化应激的影响

对于 PCOS 患者而言,IR 和 HA 与线粒体氧化应激之间似乎都存在关联(图 1)。那么 PCOS 患者线粒体氧化应激是由 IR 还是 HA,或是二者的共同作用? PCOS 患者胰岛素和雄激素水平呈正相关:高胰岛素水平导致雄激素水平升高。胰岛素通过增加卵泡膜细胞雄激素的产生,充当协同促性腺激素的作用,还增加了肾上腺皮质对促肾上腺皮质激素的敏感性,进一步提高雄激素水平<sup>[29]</sup>。升高的 LH 脉冲分泌频率导致卵巢的黄体细胞和间质细胞雄激素过度产生。IR 中的胰岛素水平升高直接与 LH 协同作用,刺激卵巢的黄体细胞和间质细胞生长并抑制 SHBG 的产生,后者与血液中的性激素结合,使其更不易于被利用<sup>[30]</sup>。有研究表明,当体内胰岛素水平异常升高时,SHBG 的合成被过量的胰岛素抑制,从而导致游离雄激素水平增加<sup>[6]</sup>。此外,胰岛素通过与垂体受体结合,促使卵巢和肾上腺在负反馈调节的影响下分泌过多的雄激素。FSH 依赖的芳香化酶活性和卵巢颗粒细胞中促黄体生成素受体的生成被过量的雄激素抑制,导致雌二醇产量下降。卵巢颗粒细胞中 FSH 的活性增加,及卵泡抗缪勒管激素 (anti-mullerian hormone, AMH) 的表达上调都是由于雄激素升高所导致的,这些最终又会导致卵巢功能发生病理性改变。有研究发现,PCOS 患者代谢紊乱恶性循环的开始通常是由 IR 等代谢异常导致的,PCOS 患者的 IR 会被雄激素、血脂和胰岛素之间的相互作用加重,进一步影响线粒体氧化应激<sup>[2]</sup>。PCOS 患者 HA 的发生,主要是由于体内升高的胰岛素对卵巢产生促性腺激素的作用所致;而雄激素则可能诱导脂肪组织的积累,尤其是腹部脂肪,并加重皮下脂肪组织的 IR<sup>[31]</sup>。二者在 PCOS 病理状态下相互影响,共同导致线粒

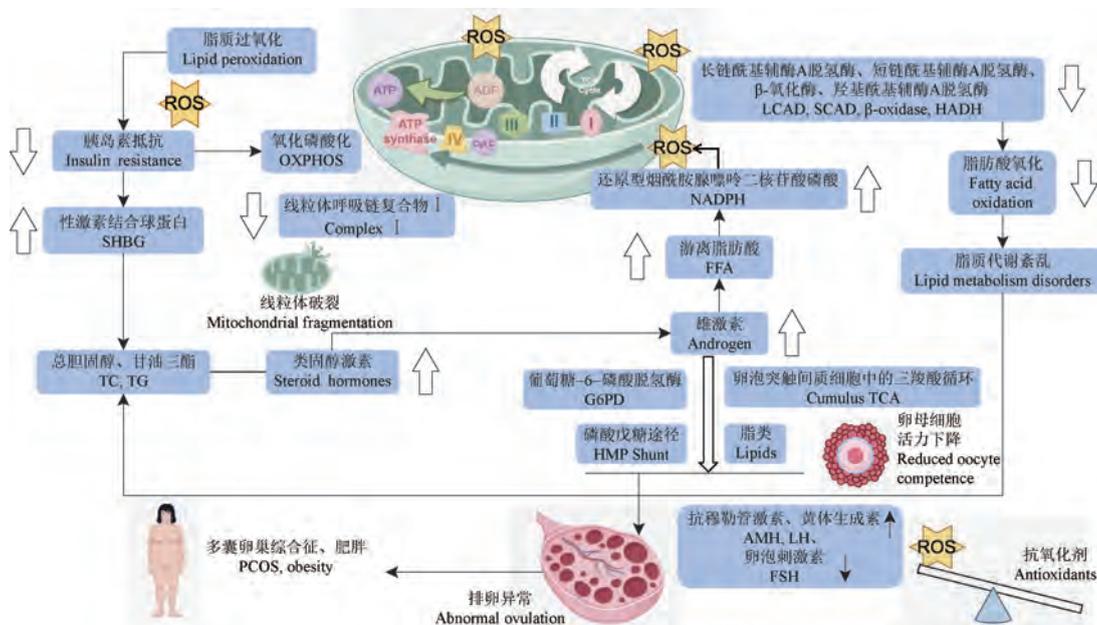


图 1 PCOS 中 IR、HA 及线粒体氧化应激之间的关系

Figure 1 Relationship between IR, HA, and mitochondrial oxidative stress in PCOS

体氧化应激。

综上所述,由于 PCOS 的病因和发病机制尚不明确,作为一种多因性疾病,正影响着越来越多女性的健康。目前临床治疗主要以对症处理为主,治疗措施存在一定的局限性。因此,明确 PCOS 的病因和发病机制将有助于其治疗。本文重点梳理了线粒体氧化应激与 PCOS 之间的关系,指出线粒体氧化应激对 PCOS 的发生和发展具有重要影响,并且 PCOS 患者的 IR 和 HA 与线粒体氧化应激之间存在相互关联。是否可以通过改善线粒体氧化应激状态来治疗 PCOS,还有待进一步研究。

#### 参考文献:

[ 1 ] WALTER K. What is polycystic ovary syndrome? [J]. JAMA, 2022, 327(3): 294.

[ 2 ] 卢铃菁, 张蛟, 姜玥, 等. 多囊卵巢综合征线粒体功能障碍机制及中医药干预研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(1): 1-14.

LU L J, ZHANG J, JIANG Y, et al. Mechanism of mitochondrial dysfunction in polycystic ovary syndrome and traditional Chinese medicine intervention: a review [J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(1): 1-14.

[ 3 ] CACCIOTTOLA L, DONNEZ J, DOLMANS M M. Oxidative stress, mitochondria, and infertility: Is the relationship fully established? [J]. Fertil Steril, 2021, 116(2): 306-308.

[ 4 ] LI Y, SUN J, WU R, et al. Mitochondrial MPTP: a novel target of ethnomedicine for stroke treatment by apoptosis inhibition [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 352.

[ 5 ] KALTSAS A, ZIKOPOULOS A, MOUSTAKLI E, et al. The silent threat to women's fertility: uncovering the devastating effects of oxidative stress [J]. Antioxidants, 2023, 12(8): 1490.

[ 6 ] 韩亚鹏, 孙姮, 赵珊珊, 等. 多囊卵巢综合征伴胰岛素抵抗与肥胖诱发的下丘脑炎症通路相关性研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(2): 119-124.

HAN Y P, SUN H, ZHAO S S, et al. Research progress on the correlation between polycystic ovary syndrome-insulin resistance and obesity-induced hypothalamic inflammatory pathway [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 26(2): 119-124.

[ 7 ] LEE A Y, CHRISTENSEN S M, DUONG N, et al. Sirt3 pharmacologically promotes insulin sensitivity through PI<sub>3</sub>/AKT/mTOR and their downstream pathway in adipocytes [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3740.

[ 8 ] ZHANG Q, REN J, WANG F, et al. Mitochondrial and glucose metabolic dysfunctions in granulosa cells induce impaired oocytes of polycystic ovary syndrome through Sirtuin 3 [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 187: 1-16.

[ 9 ] SHARMA A, WELT C K. Practical approach to hyperandrogenism in women [J]. Med Clin North Am, 2021, 105(6): 1099-1116.

[ 10 ] YADAV V, SHARMA Y. Hyperandrogenism [J]. Indian J Pediatr, 2023, 90(10): 1018-1024.

[ 11 ] HUANG J C, DUAN C C, JIN S, et al. HB-EGF induces mitochondrial dysfunction via estrogen hypersecretion in granulosa cells dependent on cAMP-PKA-JNK/ERK-Ca<sup>2+</sup>-FOXO1 pathway [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(5): 2047-2059.

[ 12 ] PIOTROWSKI P C, RZEP CZYNSKA I J, KWINTKIEWICZ J, et al. Oxidative stress induces expression of CYP11A, CYP17, Star and 3 $\beta$  HSD in rat theca-interstitial cells [J]. Soc Gynecol

- Investig, 2005, 12: 319A.
- [13] JEANES Y M, REEVES S. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges [J]. *Nutr Res Rev*, 2017, 30(1): 97-105.
- [14] NIU Z, LIN N, GU R, et al. Associations between insulin resistance, free fatty acids, and oocyte quality in polycystic ovary syndrome during *in vitro* fertilization [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(11): E2269-E2276.
- [15] AWONUGA A O, CAMP O G, ABU-SOUD H M. A review of nitric oxide and oxidative stress in typical ovulatory women and in the pathogenesis of ovulatory dysfunction in PCOS [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2023, 21(1): 111.
- [16] LEROY J L M R, MEULDERS B, MOORKENS K, et al. Maternal metabolic health and fertility: we should not only care about but also for the oocyte! [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2022, 35(2): 1-18.
- [17] MOHAMMADI M. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review [J]. *Int J Prev Med*, 2019, 10: 86.
- [18] NUÑEZ-CALONGE R, CORTÉS S, GUTIERREZ GONZALEZ L M, et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors [J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 32(4): 446-456.
- [19] LU J, WANG Z, CAO J, et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 80.
- [20] COPPS K D, WHITE M F. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2 [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(10): 2565-2582.
- [21] GUNAY G, TAŞKIN M I, SENER N, et al. The role of ERK-1 and ERK-2 gene polymorphisms in PCOS pathogenesis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2022, 20(1): 95.
- [22] LISSAMAN A C, GIRLING J E, CREE L M, et al. Androgen signalling in the ovaries and endometrium [J]. *Mol Hum Reprod*, 2023, 29(6): gaad017.
- [23] ARMANINI D, BOSCARO M, BORDIN L, et al. Controversies in the pathogenesis, diagnosis and treatment of PCOS: focus on insulin resistance, inflammation, and hyperandrogenism [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4110.
- [24] SHAN H, LUO R, GUO X, et al. Abnormal endometrial receptivity and oxidative stress in polycystic ovary syndrome [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 904942.
- [25] BHATTACHARYA K, DEY R, SEN D, et al. Polycystic ovary syndrome and its management: in view of oxidative stress [J]. *Biomol Concepts*, 2024, 15(1): 20220038.
- [26] TOSTES R C, CARNEIRO F S, CARVALHO M H, et al. Reactive oxygen species: players in the cardiovascular effects of testosterone [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016, 310(1): R1-R14.
- [27] STENER-VICTORIN E, DENG Q. Epigenetic inheritance of polycystic ovary syndrome-challenges and opportunities for treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(9): 521-533.
- [28] SUN Y, LI S, LIU H, et al. Oxidative stress promotes hyperandrogenism by reducing sex hormone-binding globulin in polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2021, 116(6): 1641-1650.
- [29] ABRAHAM GNANADASS S, DIVAKAR PRABHU Y, VALSALA GOPALAKRISHNAN A. Association of metabolic and inflammatory markers with polycystic ovarian syndrome (PCOS): an update [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2021, 303(3): 631-643.
- [30] ROSENFELD R L, EHRMANN D A. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(5): 467-520.
- [31] CADAGAN D, KHAN R, AMER S. Thecal cell sensitivity to luteinizing hormone and insulin in polycystic ovarian syndrome [J]. *Reprod Biol*, 2016, 16(1): 53-60.

[收稿日期]2024-05-10

李靖,徐东阳,李昌卿,等. 缺氧细胞模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 132-144.

Li J, Xu DY, Li CQ, et al. Research progress on hypoxic cell models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 132-144.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.017

## 缺氧细胞模型的研究进展

李靖<sup>1,2,3#</sup>, 徐东阳<sup>1#</sup>, 李昌卿<sup>1</sup>, 苏梦瑶<sup>1</sup>, 王志娟<sup>1</sup>, 赵明俊<sup>1</sup>, 赵家龙<sup>1</sup>,  
杨君仪<sup>1</sup>, 杨巧蝶<sup>1</sup>, 康龙丽<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 西藏民族大学医学部基础医学院, 陕西 咸阳 712082; 2. 西藏民族大学高原相关疾病分子遗传机制与干预研究重点实验室, 陕西 咸阳 712082; 3. 西藏民族大学高原环境与疾病相关机理研究高校重点实验室, 陕西 咸阳 712082)

**【摘要】** 在临床上,许多疾病的发生与发展过程中常伴随着细胞缺氧的现象。缺氧不仅是疾病进展的一个重要标志,而且在推动疾病进程中也扮演着关键角色。因此,改善组织缺氧可能为治疗相关疾病提供新的策略。为了从细胞和分子层面深入研究这类疾病,构建细胞缺氧模型显得尤为重要。目前,常用的缺氧细胞模型主要分为化学性缺氧模型、物理性缺氧模型和糖氧剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)模型。本文将对不同类型的缺氧细胞模型进行综述,探讨在疾病研究中的应用与局限性。

**【关键词】** 缺氧细胞; 物理缺氧; 化学缺氧; 复氧

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0132-13

## Research progress on hypoxic cell models

LI Jing<sup>1,2,3#</sup>, XU Dongyang<sup>1#</sup>, LI Changqing<sup>1</sup>, SU Mengyao<sup>1</sup>, WANG Zhijuan<sup>1</sup>, ZHAO Mingjun<sup>1</sup>, ZHAO Jialong<sup>1</sup>,  
YANG Junyi<sup>1</sup>, YANG Qiaodie<sup>1</sup>, KANG Longli<sup>1,2,3\*</sup>

(1. School of Basic Medicine, Ministry of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China.

2. Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude

Disease of Tibet Autonomous Region, Xizang Minzu University, Xianyang 712082. 3. Key Laboratory of

High Altitude Environment and Genes Related to Disease of Tibet Autonomous Region, Xizang Minzu

University, Xianyang 712082)

**【Abstract】** Hypoxia is associated with the occurrence and development of many diseases in clinical settings. Cell hypoxia not only serves as a vital marker for disease advancement, but also plays a pivotal role in exacerbating the disease process, and improving tissue hypoxia may thus provide new strategies for the treatment of related diseases. Further investigation of these diseases at the cellular and molecular levels requires the establishment of a cellular hypoxia model. Current extensively employed hypoxic cell models can be categorized primarily into three types: chemical hypoxia, physical hypoxia, and glucose deprivation hypoxia models. This article reviews the various types of hypoxic cell models and scrutinizes their applications and limitations in disease research.

**【Keywords】** hypoxic cell; physical hypoxia; chemical hypoxia; reoxygenation

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

**【基金项目】** 西藏民族大学“青年学人培育计划”资助项目(21MDX03); 西藏高原相关疾病分子机制与干预研究重点实验室开放项目(KF2022005); 国家自然科学基金(U20A20395, 82460333); 西藏自治区基地与人才基金(XZ202401JD0031); 藏秦喜马拉雅·人才发展支持计划“高峰学者”(202001)。

**【作者简介】** 李靖(1989—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 高原病分子机制研究。E-mail: lijing@xzmu.edu.cn

徐东阳(2002—), 男, 本科, 研究方向: 缺氧细胞模型研究。E-mail: 1446044291@qq.com #共同第一作者

**【通信作者】** 康龙丽(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 环境与疾病相关机理研究。E-mail: longli\_kang@163.com

缺氧是指因组织氧气供应不足或利用氧气障碍而导致的组织代谢、功能以及形态结构发生异常变化的病理过程。目前,已知的缺氧可分为以下 4 类:低张性缺氧,主要是由于吸入气体中的氧分压过低、肺通气或肺换气功能障碍,或是静脉血混入动脉血所引起;血液性缺氧,由贫血、血红蛋白数量减少或血红蛋白无法有效结合氧,以及与氧的亲合力过高导致氧气不易释放等原因造成;组织性缺氧,是由组织细胞利用氧气的障碍引起;循环性缺氧,则是由组织血流量不足或供氧不足导致。缺氧在全身各系统疾病的发生与发展中起着至关重要的作用,因此,改善组织缺氧可能成为治疗缺氧相关疾病的新途径。细胞是生物体的基本结构和功能单位,细胞缺氧在全身各系统疾病的发生与发展中扮演着重要角色<sup>[1-4]</sup>。体外培养细胞因其操作简便、重复性好、检测方便等优点,成为了研究细胞缺氧相关疾病的重要手段。因此,建立细胞缺氧模型成为研究此类疾病的关键方法和基本手段。

## 1 缺氧细胞概述

### 1.1 缺氧细胞模型的选择标准

在肿瘤细胞缺氧模型中,常以细胞存活率降低不明显、缺氧相关因子如低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达升高作为判断模型成功的标准,因为这与体内肿瘤细胞的真实环境相符,可以用于研究肿瘤细胞在缺氧状态下的转移与浸润能力。正常组织缺氧模型的判断标准与肿瘤细胞相似。尹春月等<sup>[5]</sup>依据这些标准建立了绒毛外滋养细胞(extravillous trophoblasts, EVT)的缺氧细胞模型,使其更贴近人类妊娠时的细胞状态。在研究临床药物或中药对细胞的保护作用以及模拟缺氧损伤性疾病时,通常选择细胞存活率在 50%~70%的条件下进行研究。在诱导细胞增殖的低氧实验中,通常以细胞凋亡率低、增殖旺盛作为判断模型是否成功的标准。在研究低氧相关因子时,常以对细胞生存率影响小、低氧相关基因表达显著增高为标准。

### 1.2 线粒体细胞呼吸链

在人体内,超过 90%的氧气在线粒体中被消耗,用于氧化磷酸化反应的最终电子受体,以产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),为人体提供必要的能量。线粒体细胞呼吸链主要由线粒

体内膜上的 4 种蛋白复合物组成,每个复合物都由多种酶蛋白、金属离子、辅酶或辅基构成。这些复合物之间传递电子并生成质子,最终氧气在复合体 IV 上被还原,并与质子结合形成水。复合物传递电子时会在线粒体基质和线粒体膜间隙之间产生的显著的质子浓度梯度,将沿着浓度梯度经过 ATP 酶返回线粒体基质并驱动 ATP 的生成,为人体各器官的活动提供能量<sup>[6]</sup>。当机体遭遇缺氧,或者线粒体细胞呼吸链功能受损,将导致 ATP 生成不足,从而引发疲劳、心功能衰竭等缺氧症状。

### 1.3 HIF-1 $\alpha$

HIF-1 $\alpha$  是人体在缺氧条件下的主要调节因子。在正常氧条件下,HIF-1 $\alpha$  的氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODDD)与脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain, PHD)结合,HIF-1 $\alpha$  被羟基化,随后被 pVHL(von hippel-lindau tumor suppressor protein)识别并泛素化,最终被蛋白酶体降解<sup>[7]</sup>。然而,在缺氧环境中,HIF-1 $\alpha$  不会被 PHD 羟基化,因此不会降解。此时,位于胞质中的 HIF-1 $\alpha$  进入细胞核,与缺氧相关因子如低氧诱导因子-1 $\beta$  (hypoxia-inducible factor-1 $\beta$ , HIF-1 $\beta$ )结合,并与转录辅助激活因子腺病毒 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)相互作用,形成转录复合物<sup>[8]</sup>。该复合物促使促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、VEGF 等基因的表达增加,帮助机体适应低氧环境。

## 2 缺氧细胞模型

### 2.1 化学性缺氧

化学性缺氧模型的构建一般通过向培养基中添加特定化学物质来实现,其目的是模拟体内的组织缺氧状态,通过耗尽培养基中的氧气或干扰细胞对氧气的利用来实现。这些化学物质根据其作用机制可分为三类:稳定 HIF-1 $\alpha$  型缺氧模型诱导剂,如氯化钴(cobalt chloride, CoCl<sub>2</sub>)、去铁胺(deferoxamine, DFO)和二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethylxaloylglycine, DMOG);氧耗型缺氧模型诱导剂,如连二亚硫酸钠(sodium dithionite, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>);以及呼吸链阻断型缺氧模型诱导剂,如氰化钠(sodium cyanide, NaCN)和叠氮钠(sodium azide, NaN<sub>3</sub>)。其中,CoCl<sub>2</sub> 诱导法因其稳定可靠的

缺氧效果以及不受外部环境影响而被广泛采用。然而,细胞对  $\text{CoCl}_2$  的最适浓度和处理时间仍有待进一步确定。需注意的是,这些常用的缺氧诱导剂可能对细胞和人体都有潜在危害,因此在选择时必须慎重。

### 2.1.1 $\text{CoCl}_2$

研究显示,  $\text{Co}^{2+}$  能够取代 PHD 中的  $\text{Fe}^{2+}$ , 导致 PHD 失活并抑制 HIF-1 $\alpha$  的羟基化, 从而引起 HIF-1 $\alpha$  的聚集而产生类似细胞缺氧的效应<sup>[9]</sup>。此外,  $\text{Co}^{2+}$  还能直接抑制羟基化的 HIF-1 $\alpha$  与 pVHL 的结合, 进一步抑制 HIF- $\alpha$  的泛素化和降解<sup>[10]</sup>。低浓度的  $\text{CoCl}_2$  可能会轻微提高细胞存活率, 但随着浓度的增加, 细胞存活率会逐渐下降。常用的处理时间为 24 h, 浓度通常为 150~400  $\mu\text{mol/L}$ 。通过改变浓度和处理时间, 还可以研究不同程度缺氧对细胞生物行为(如增殖、迁移、侵袭和凋亡)以及某些蛋白表达的影响。 $\text{CoCl}_2$  诱导的缺氧细胞模型在众多研究领域中具有广泛应用, 包括但不限于肿瘤细胞的缺氧微环境、新生儿窒息引起的脑部低氧、脑卒中和糖尿病视网膜病变等疾病的研究, 见表 1。

### 2.1.2 DFO

在临床治疗中, 去铁胺是慢性铁过载症的一种常用方法。研究发现, 去铁胺能够与 PHD 所必需的辅助因子  $\text{Fe}^{2+}$  结合, 导致 PHD 失活并抑制 HIF-1 $\alpha$  的羟基化过程, 进而阻止其被降解, 从而在细胞内产生类似缺氧的效应<sup>[17]</sup>。与其他缺氧诱导剂不同, 去铁胺对细胞无明显毒害作用, 因此被广泛应用于低氧模拟研究中<sup>[18]</sup>。此外, 去铁胺还具备免疫调节和抗氧化等生理功能, 常与组织工程技术及生物材

料结合使用, 以促进骨折愈合、糖尿病创面修复等治疗过程<sup>[19]</sup>。去铁胺也是铁死亡途径的抑制剂, 因此在铁死亡相关疾病模型的研究中具有重要意义<sup>[20]</sup>。在 DFO 诱导的细胞缺氧实验中, 常用的浓度为 100~150  $\mu\text{mol/L}$ , 处理时间通常为 24 h, 主要用来诱导 HIF-1 $\alpha$  的高表达。然而, DFO 几乎不用于模拟细胞缺氧损伤或临床给药试验, 这可能与其潜在的抗氧化作用有关, 可能会影响实验结果的准确性。DFO 在缺氧实验中的应用见表 2。

### 2.1.3 DMOG

DMOG 是一种非特异性的 PHD 抑制剂, 其研究显示能够抑制 PHD 的活性, 导致 HIF-1 $\alpha$  的聚集。值得注意的是, DMOG 产生的缺氧环境与物理性缺氧有所不同, 可能会引起细胞发生除缺氧以外的其他变化<sup>[27]</sup>。正因为这一特性, DMOG 在缺氧相关实验中几乎不作为缺氧模拟剂使用, 而更多地被用作 HIF-1 $\alpha$  的稳定剂, 以研究 HIF-1 $\alpha$  对疾病的影响, 从而为疾病治疗提供新的策略。例如, 稳定 HIF-1 $\alpha$  可以减轻肾小管间质损伤后对肾小球的不利影响, 缓解因糖皮质激素过量引起的类固醇性股骨头坏死, 以及减少牙周炎中的骨吸收等<sup>[28-30]</sup>。此外, DMOG 也常与组织工程技术和生物材料结合使用, 以促进血管生成和骨损伤的修复<sup>[31-34]</sup>。

### 2.1.4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  是一种氧结合剂, 能够在短时间内与培养基内的氧气结合, 从而导致细胞的低张性缺氧。研究表明, 这种方法不会损伤细胞膜, 且 2 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  溶液能够维持无氧状态约 1 h, 而 pH 值不会发生变化<sup>[35]</sup>。相比之下, 1 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

表 1  $\text{CoCl}_2$  诱导的缺氧细胞模型  
Table 1  $\text{CoCl}_2$  induced hypoxic cell model

细胞 Cells	$\text{CoCl}_2$ 浓度/( $\mu\text{mol/L}$ ) Concentration of $\text{CoCl}_2$	诱导时间/h Induction period	模拟疾病 Simulate diseases
人类卵巢癌细胞系 SKOV3 <sup>[11]</sup> Human ovarian cancer cells SKOV3	200	24	
人乳腺癌 MDAMB-231 细胞 <sup>[12]</sup> Human breast cancer MDAMB-231 cells	200	24	体内肿瘤细胞缺氧环境 Hypoxic environment of tumor cells in the body
人肝癌 HepG2 细胞 <sup>[13]</sup> Human liver cancer HepG2 cells	150	24	
人脑胶质瘤细胞系 U251 <sup>[14]</sup> Human glioma cells line U251	400	24	新生儿窒息脑内低氧环境 Hypoxic environment in the brain of newborns with asphyxia
小鼠神经胶质瘤 N2a 细胞 <sup>[15]</sup> Mouse neuroblastoma N2a cells	300	24	持久性缺血造成的脑卒中 Cerebral apoplexy due to prolonged ischemia
人视网膜色素上皮细胞 <sup>[16]</sup> Human retinal color epithelial cells	200	24	糖尿病视网膜病变 Diabetic retinopathy

表 2 DFO 诱导的缺氧细胞模型  
Table 2 DFO induced hypoxic cell model

细胞 Cells	DFO 浓度/( $\mu\text{mol/L}$ ) Concentration of DFO	诱导时间/h Induction period	DFO 作为缺氧模拟剂在实验中的应用 Application of DFO as a hypoxia simulator in experiments
小鼠骨样细胞系 MLO-Y4 <sup>[21]</sup> Mouse bone like cells line MLO-Y4	100	12, 24, 48	证明了低氧状态下核因子 $\kappa\text{B}$ 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ligand, RANKL) 的表达增高 Proved the receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ligand under low oxygen conditions increased
舌鳞癌 SCC-15 细胞 <sup>[22]</sup> Tongue squamous cells carcinoma SCC-15 cells	100	24	证明了低氧条件下 SOX2 (SRY-like HMG box 2) 和 OCT4 (octamer binding factor 4) 的表达增高 Proved the increased expression of SOX2 and OCT4 under hypoxic conditions
BV2 小胶质细胞 <sup>[23]</sup> BV2 microglia	80	24	缺氧炎症 (hypoxic inflammation, HI) 相关脑损伤 Hypoxic inflammatory related brain injury
ID8 小鼠卵巢癌细胞、人卵巢癌细胞 OVCAR-4 <sup>[24]</sup> ID8 mouse ovarian cancer cells, human ovarian cancer cells OVCAR-4	150	24	证明了 ST6 $\beta$ -半乳糖苷 $\alpha$ -2, 6-唾液酸转移酶 1 (ST6 $\beta$ -galactoside alpha-2, 6sialyltransferase 1, ST6GAL1) 可使 ID8 细胞和 OV4 细胞在低氧条件下更具侵袭性 Proving that ST6GAL1 can make ID8 cells and OV4 cells more invasive under hypoxic conditions
脂肪来源的间充质细胞 <sup>[25]</sup> Adipose-derived stem cells	150, 300	24	证明了低氧可以恢复糖尿病患者脂肪来源的间充质细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 的血管生成潜力 It proves that hypoxia can restore the angiogenic potential of ADSCs in diabetic patients
人脐静脉内皮细胞 <sup>[26]</sup> Human umbilical vein endothelial cells	100	48	低氧预处理, 上调 HIF-1 $\alpha$ 表达 Hypoxia pretreatment and upregulation of HIF-1 $\alpha$ express

只能造成约 20 min 的缺氧<sup>[36]</sup>。因此, 缺氧的时间会随着浓度的变化而变化。随着  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  浓度的增加和处理时间的延长, 细胞的存活率会逐渐降低。常用的浓度为 2~5 mmol/L, 处理时间通常为 1~4 h。  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  也常用于构建缺氧/复氧模型, 其中缺氧时浓度通常为 2.5~5 mmol/L, 处理时间为 30 min~4 h, 复氧时只需将含有  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  的培养基更换为正常培养基, 复氧时间通常为 4~24 h。  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  诱导的缺氧细胞模型在脑缺血性疾病、肝细胞氧化应激、心肌细胞缺血再灌注损伤等疾病的研究中得到了广泛应用, 见表 3。

### 2.1.5 NaCN 和 $\text{NaN}_3$

研究显示, 氰离子 ( $\text{CN}^-$ ) 和叠氮离子 ( $\text{N}_3^-$ ) 一旦进入细胞, 便会抑制复合体 IV (细胞色素 C 氧化酶), 阻断呼吸链中的电子传递, 导致细胞无法利用氧气产生 ATP, 从而引起能量代谢障碍。然而, 这两种物质具有极高的毒性, 对人类和细胞均会造成伤害, 因此应用较为有限。王丽丽等<sup>[43]</sup>通过使用 NaCN 和舒芬太尼处理大鼠心肌细胞, 证实了舒芬太尼对心肌细胞的保护作用。饶淑云等<sup>[44]</sup>通过在缺糖培养大鼠心肌细胞中加入 5 mmol/L NaCN, 培养 24 h 后观察到乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase,

LDH)、肌酸激酶 (creatin kinase, CK) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 表达增高, 成功建立了缺氧细胞模型, 并证明了西红花酸对心肌细胞的保护作用。关付等<sup>[45]</sup>使用 1 mmol/L 的  $\text{NaN}_3$  处理大鼠心肌细胞, 成功建立了缺氧模型。

## 2.2 物理性缺氧

物理性缺氧的方法包括改变培养环境中气体比例或隔离细胞与外界环境, 类似于体内的低张性缺氧。这种方法更贴近人体内的缺氧环境, 但其缺点包括成本较高和难以精确控制缺氧程度。

### 2.2.1 混合气体培养法

混合气体培养法涉及将氧气 ( $\text{O}_2$ )、氮气 ( $\text{N}_2$ ) 和二氧化碳 ( $\text{CO}_2$ ) 按照不同比例预先制备好后通入密闭的培养装置或三气培养箱中。简单的培养装置应包含一个进气口和一个出气口, 以便于控制通气并排出装置内原有的气体。过程中需要监测  $\text{O}_2$  浓度, 当达到期望值时停止通气, 然后将密封好的装置放入 37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中进行培养。三气培养箱是最常用且理想的装置, 能够精确控制各气体参数, 设置不同的缺氧条件, 操作简便, 是建立缺氧细胞模型的理想选择。然而, 打开和关闭培养箱后, 气体达到平衡所需时间较长, 可能会导致缺氧环境变化, 且设备成本较高。缺氧条件可

以选择 0%、1%、2%、3%、4% 的 O<sub>2</sub>, 最常用的缺氧条件为 1% O<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>, 处理时间可以是 12、24、36、72 h, 其中 24 h 是最常用的处理时间, 但最佳处理时间会因细胞类型而异。除了建立缺氧细胞模型外, 还可以通过改变处理时间来研究不同程度缺氧对细胞的影响。混合气体培养法建立的缺氧细胞模型在细胞凋亡、缺血性脑卒中、肿瘤细胞缺

氧环境等疾病研究中得到了广泛应用, 见表 4。

### 2.2.2 液体石蜡覆盖法

液体石蜡由于其不溶于水的特性, 对人体无害。研究显示, 在培养基表面滴加无菌石蜡, 直至完全覆盖培养基表面, 可以实现培养基与外界环境的隔绝, 使细胞耗尽培养基中的氧气, 从而达到缺氧的效果。然而, 石蜡可能无法完全覆盖培养基表

**表 3** Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 诱导的缺氧细胞模型  
**Table 3** Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induced hypoxic cell model

细胞 Cells	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 浓度 Concentration of Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	诱导时间 Induction period	模拟疾病 Simulate diseases
SD 大鼠脊髓神经细胞 <sup>[37]</sup> Spinal cord neurons in SD rats	2 mmol/L	90 min	脊髓损伤 Spinal cord injury
小鼠海马神经元 HT22 HT22 cells in mouse hippocampal neurons	2 mmol/L	缺氧 1 h, 复氧 24 h Hypoxia for 1 h, reoxygenation for 24 h	脑缺血性疾病 Cerebral ischemic disease
大鼠肝细胞 BRL-3A <sup>[39]</sup> Rat liver cells BRL-3A	5 mmol/L	缺氧 4 h, 复氧 2 h Hypoxia for 4 h, reoxygenation for 2 h	肝细胞氧化应激 Hepatocellular oxidative stress
H9c2 心肌细胞 <sup>[40]</sup> H9c2 myocardial cells	2.5 mmol/L	缺氧 30 min, 复氧 4 h Hypoxia for 30 min, reoxygenation for 4 h	心肌细胞缺血再灌注损伤 Myocardial cell ischemia-reperfusion injury
人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y <sup>[41]</sup> Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y	5 mmol/L, 无糖培养基 5 mmol/L, sugar free culture medium	缺糖缺氧 1 h, 复氧 3 h Hypoxia for 1 h, reoxygenation for 3 h	脑缺血性疾病、脑梗死、缺血性脑卒中、慢性脑灌注不足等 Cerebral ischemic disease, cerebral infarction, ischemic stroke, chronic cerebral hypoperfusion, etc.
PC12 细胞 <sup>[42]</sup> PC12 cells	1 mmol/L, 无糖 RPMI1640 培养液 1 mmol/L, sugar free RPMI1640 culture medium	2 h	

**表 4** 混合气体诱导的缺氧模型  
**Table 4** Hypoxia cell model induced by mixed gases

细胞 Cells	混合气体比例 Mixed gas ratio	缺氧时间/h Hypoxia period	应用范围 Application scope
小鼠 GC-1spg 精原细胞 <sup>[46]</sup> Mouse GC-1spg spermatogonia	3% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 92% N <sub>2</sub>	36	细胞凋亡 Cell apoptosis
小鼠神经干细胞 C17.2 <sup>[47]</sup> Mouse neural stem cells C17.2	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	12	缺血性脑卒中 Ischemic stroke
人宫颈癌细胞株 Hela <sup>[48]</sup> Human cervical cancer cells line Hela	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	24	体内肿瘤细胞缺氧环境
人肾小管上皮细胞 <sup>[49]</sup> Human renal tubular epithelial cells	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	24	缺氧-炎症反应促进肾纤维化进展 Hypoxia inflammatory response promotes the progression of renal fibrosis
乳鼠原代心肌细胞 <sup>[50]</sup> Primary myocardial cells of suckling mice	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	24	心肌梗死等心肌缺氧性疾病 Myocardial hypoxia diseases such as myocardial infarction
成纤维细胞 <sup>[51]</sup> Fibroblasts	3% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 92% N <sub>2</sub>	24	瘢痕疙瘩 Keloids
膀胱上皮细胞 <sup>[52]</sup> Bladder epithelial cells	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	12	缺氧加重膀胱纤维化 Hypoxia exacerbates bladder fibrosis
人类乳腺癌细胞系 <sup>[53]</sup> Human breast cancer cells line	1% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、 94% N <sub>2</sub>	24	缺氧相关基因表达 Hypoxia related gene expression

面,导致缺氧程度难以控制。此外,石蜡是一种脂性物质,不易清洗,如果清洗不彻底,在显微镜下可能会影响视野。

### 2.2.3 厌氧袋/厌氧罐法

该方法需要使用一个密闭的培养盒、厌氧产气袋和氧气指示剂。其缺氧机制是通过厌氧袋耗尽密闭培养盒中的氧气并产生二氧化碳。操作方法是将培养皿、厌氧袋和氧气指示剂放入培养罐中,密封培养罐并观察氧气指示剂颜色的变化。厌氧袋/厌氧罐法诱导的缺氧细胞模型在心肌和肝细胞缺血再灌注损伤、组织瓣移植、缺血性中风等疾病的研究中得到了广泛应用,见表 5。

## 2.3 糖氧剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 模型

糖类是人体主要的能源来源,人体摄入的糖类最终会在细胞内被分解成葡萄糖。在有氧条件下,葡萄糖通过糖酵解途径产生丙酮酸,随后丙酮酸进入线粒体参与细胞呼吸链。在体外培养细胞时,培养基通常以葡萄糖作为能源。研究显示,若培养基中缺乏糖分,细胞的呼吸链会中断,导致细胞呼吸停止,从而引起细胞缺氧<sup>[58]</sup>。这种情况类似于组织血流量不足时产生的循环性缺氧,因此,OGD 被认为是模拟缺血缺氧性疾病的理想选择。

OGD 的方法包括将正常培养基替换为低糖或无糖培养基,并将细胞置于低氧环境中培养。细胞可以被直接放入低氧环境中,或者在培养基中加入特定化学物质来造成细胞缺氧。最常用的方法是使用无糖培养基,并将细胞置于缺氧环境中,处理时间通常为 12 h。这种缺氧类似于组织性缺氧和低张性缺氧。研究表明,混合气体 OGD 模型更符合脑血流量不足时脑微血管病变和脑神经损伤的微环境改变,因此是研究脑血管病变与脑神经关系的最理想的体外模型<sup>[59]</sup>。

化学性 OGD 模型应用较少,最常添加的化学物质包括  $\text{CoCl}_2$  和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 。该方法主要用于建立缺氧/复氧模型。OGD 缺氧条件通常为 0%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95%  $\text{N}_2$  和无糖培养基,缺氧时间多在 1.5 ~ 4 h,复氧时间通常为 24 h。OGD 诱导的缺氧细胞模型广泛应用于缺血缺氧性疾病的研究以及模拟缺血再灌注损伤的研究,见表 6。

## 3 缺氧细胞模型的优缺点比较及选择策略

物理性缺氧方法能够最真实地模拟体内缺氧环境,但需要严格控制缺氧条件,并监测缺氧环境的稳定性,类似于体内的低张性缺氧。化学性缺氧方法能够稳定地造成缺氧效果,不受外界环境的影

表 5 厌氧袋/厌氧罐法诱导的缺氧细胞模型  
Table 5 Anaerobic bag/anaerobic tank induced hypoxic cell model

细胞 Cells	缺氧条件 Hypoxic conditions	缺氧时间 Hypoxia period	模拟疾病 Simulate diseases
H9c2 心肌细胞 <sup>[54]</sup> H9c2 myocardial cells	Anaero Pack 厌氧产气袋, Earle's 无糖平衡盐溶液 Anaero Pack anaerobic gas bag, Earle's sugar free equilibrium salt solution	缺氧 8 h 复氧 12 h Hypoxia for 8 h, reoxygenation for 12 h	心肌缺血再灌注损伤 Myocardial ischemia-reperfusion injury
人正常肝细胞 LO2 <sup>[55]</sup> Normal human liver cell LO2	GENbag 厌氧产气袋, 无糖培养基 GENbag anaerobic gas bag, sugar free culture medium	缺氧 6 h 复氧 2 h Hypoxia for 6 h, reoxygenation for 2 h	肝细胞缺血再灌注损伤如肝脏切除和肝移植手术、低血容性休克 Hepatocellular ischemia-reperfusion injury, such as liver resection and liver transplantation surgery, hypovolemic shock
人脐静脉内皮细胞 <sup>[56]</sup> Human umbilical vein endothelial cells	Anaero Pack 厌氧产气袋, 低糖无血清培养基 Anaero Pack anaerobic gas bag, low sugar serum-free culture medium	缺氧 3 h, 6 h, 9 h 复氧 2 h Hypoxia for 3 h, 6 h, 9 h, reoxygenation for 2 h	组织瓣移植 Tissue flap transplantation
神经元和星形胶质细胞 <sup>[57]</sup> Neurons and astrocytes	Anaero Pack 厌氧产气袋, 无糖平衡盐溶液 Anaero Pack anaerobic gas bag, sugar free equilibrium salt solution	缺糖缺氧 1 h, 复氧 24 h Hypoxia due to sugar deficiency for 1 h, reoxygenation for 24 h	缺血性中风 Ischemic stroke

表 6 OGD 诱导的缺氧模型  
Table 6 Hypoxia cell model induced by OGD

细胞 Cells	缺氧条件 Hypoxic conditions	缺氧时间 Hypoxia period	模拟疾病 Simulate diseases
PC12 细胞 <sup>[60]</sup> PC12 cells	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 无糖培养基	12 h	
BV2 小胶质细胞 <sup>[61]</sup> BV2 microglia	1% O <sub>2</sub> 、94% N <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> , 无糖培养基	8 h	
大鼠原代神经星形胶质细胞 <sup>[62]</sup> Primary rat astrocytes	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 无糖培养基	12 h	
小鼠皮层神经元 <sup>[63]</sup> Mouse cortical neurons	1% O <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> , 无糖培养基	1% O <sub>2</sub> , 94% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , sugar free culture medium	脑缺血性疾病、脑梗死、缺血性脑卒中、慢性脑灌注不足等 Cerebral ischemic disease, cerebral infarction, ischemic stroke, chronic cerebral hypoperfusion, etc.
BV2 小胶质细胞 <sup>[64]</sup> BV2 microglia	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 无糖培养基	0% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 95% N <sub>2</sub> , sugar free culture medium	缺糖缺氧 4 h, 复氧 24 h Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 24 h
SH-SY5Y 细胞 <sup>[65]</sup> SH-SY5Y cells	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 低糖培养基	0% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 95% N <sub>2</sub> , low sugar medium	缺糖缺氧 4 h, 复氧 12 h Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 12 h
HT22 细胞、PC12 细胞 <sup>[66]</sup> HT22 cells, PC12 cells	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 无糖培养基	0% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 95% N <sub>2</sub> , sugar free culture medium	缺糖缺氧 2 h, 复氧 24 h Hypoxia due to sugar deficiency for 2 h, reoxygenation for 24 h
H9c2 心肌细胞 <sup>[67]</sup> H9c2 myocardial cells	0% O <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> 、95% N <sub>2</sub> , 无糖培养基	0% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 95% N <sub>2</sub> , sugar free culture medium	缺糖缺氧 4 h, 复氧 24 h Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 24 h
H9c2 心肌细胞 <sup>[68]</sup> H9c2 myocardial cells	1% O <sub>2</sub> 、94% N <sub>2</sub> 、5% CO <sub>2</sub> , 低糖培养基	1% O <sub>2</sub> , 94% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , low sugar medium	24 h 心肌缺血性疾病 Myocardial ischemic disease

响,但可能会对细胞造成一定程度的损伤。此外,CoCl<sub>2</sub>、DFO 和 DMOG 通过稳定 HIF-1 $\alpha$  模拟的是细胞缺氧后的状态,并不能模拟细胞缺氧的过程;Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 模拟的是细胞的低张性缺氧;NaCN 和 NaN<sub>3</sub> 通过破坏细胞呼吸链,产生类似于组织性缺氧的效果。

在不同的领域中,对不同的缺氧细胞模型有着不同的选择,下面将从模型角度与实验目的分别展开讨论。

### 3.1 模型角度

在考虑物理性缺氧时,三气培养箱是最理想的选择,因其能够精确控制气体比例,操作简便。

然而,三气培养箱的价格较高,开启后缺氧条件可能会发生变化,如果实验室条件不允许,厌氧袋和厌氧罐由于体积小、成本低,可以作为一个替代选择。

对于化学性缺氧,CoCl<sub>2</sub> 是推荐的选择,因其应用广泛,并且已被证实可以调节缺氧相关的下游靶标,如葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 和 VEGF 的表达,这与物理性缺氧的调节机制相似<sup>[69-70]</sup>。但是 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 更符合研究缺血缺氧性疾病的发病机制,因此 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 是化学缺氧中研究该类疾病最合适的选择。DFO 因其具有抗氧化等特性,不用于缺氧损伤性疾病的研究。

DMOG 会引起缺氧以外的变化,在缺氧实验中应用较少。NaCN 和 NaN<sub>3</sub> 对人体和细胞都有害,不建议使用。

### 3.2 实验角度

目前,建立缺氧细胞模型多用于模拟人体内真实的缺氧环境,缺氧损伤性疾病和研究缺氧环境下相关基因的表达。OGD 模型最符合缺血缺氧性疾病和缺血再灌注损伤的发病机制,因此是研究这类

疾病的首选模型。模拟人体真实缺氧环境时,三气培养箱或 CoCl<sub>2</sub> 是最常用的方法。厌氧袋/厌氧罐法或 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 可作为第二选择。当研究缺氧条件下相关基因的表达时,常选用三气培养箱或 CoCl<sub>2</sub>, DFO 是第二选择。

总之,在选择缺氧模型时,应综合考虑研究疾病的发病机制以及实验室的条件。本文对上述缺氧模型进行了总结,具体见表 7。

表 7 缺氧细胞模型原理、优缺点比较及应用情况

Table 7 Principle, advantages and disadvantages comparison, and application of hypoxia cell models

缺氧方法 Hypoxia methods	原理 Principle	优点 Advantage	缺点 Shortcoming	应用范围 Application scope	
混合气体 Mixed gas	改变环境中氧气比例,降低氧分压 Changing the oxygen ratio in the environment and reducing oxygen partial pressure	精确控制各气体的参数,设定不同的缺氧条件 Accurately control the parameters of each gas and set different hypoxia conditions	仪器昂贵,打开后缺氧条件发生变化 Instrument is expensive, and the hypoxia conditions change after opening	常用,可用于癌细胞、心肌细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as cancer cells and cardiomyocytes	
物理缺氧 Physical hypoxia	厌氧罐/厌氧袋 Anaerobic tank/bag	厌氧袋耗尽密闭环境中的氧气并产生二氧化碳 Anaerobic bags deplete oxygen in a closed environment and produce carbon dioxide	实用、体积小、成本低 Practical, small in size, and low in cost	不能精确判断氧气含量,需要实时监测氧气浓度 Unable to accurately determine oxygen content, requires real-time monitoring of oxygen concentration	较常用,可用于心肌细胞、神经系统细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as myocardial cells and nervous system cells
液体石蜡 Liquid paraffin	将培养基与外界环境隔开,细胞耗尽培养基中的氧气 Isolate the culture medium from the external environment and deplete the oxygen in the culture medium for cells	安全无毒、成本低 Safe and non-toxic, with low cost	缺氧效果不稳定,不能判断缺氧程度,且难以清洗,影响显微镜下成像 Hypoxia effect is unstable, the degree of hypoxia cannot be determined, and it is difficult to clean, which affects imaging under the microscope	不常用 Not commonly used	
CoCl <sub>2</sub>	置换 PHD 中的 Fe <sup>2+</sup> ,使 PHD 失活,从而抑制 HIF-1α 的降解 Replacing Fe <sup>2+</sup> in PHD to inactivate PHD and inhibit the degradation of HIF-1α	成本低、不受外界环境影响、缺氧效果稳定 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	对细胞有毒,不同细胞作用浓度和时间不同 Toxic to cells, with varying concentrations and times of action on different cells	常用,可用于肿瘤细胞、神经系统细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as tumor cells and nervous system cells	
DFO	与 Fe <sup>2+</sup> 结合,抑制 HIF-1α 的降解 Combining with Fe <sup>2+</sup> to inhibit the degradation of HIF-1α	成本低、不受外界环境影响、缺氧效果稳定,对细胞无毒性 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect, and non-toxic to cells	不同细胞作用浓度和时间不同 Different cell action concentrations and times vary	较常用,可用于肿瘤细胞、骨细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as tumor cells and bone cells	
化学缺氧 Chemical hypoxia	DMOG Inhibiting the activity of PHD, causing HIF-1α accumulation	抑制 PHD 的活性,造成 HIF-1α 聚集 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	不同细胞作用浓度和时间不同 Different cell action concentrations and times vary	不常用 Not commonly used	

续表 7

缺氧方法 Hypoxia methods	原理 Principle	优点 Advantage	缺点 Shortcoming	应用范围 Application scope
NaCN、NaN <sub>3</sub>	抑制细胞色素 C 氧化酶， 阻断呼吸链电子传递 Inhibiting cytochrome C oxidase and blocking respiratory chain electron transfer	成本低、不受外界环境 影响、缺氧效果稳定 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	剧毒，对人体有害，不同细 胞作用浓度和时间不同 Highly toxic, harmful to the human body, with different cell concentrations and durations of action	不常用 Not commonly used
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	耗尽培养基中的氧气 Depleting the oxygen in the culture medium	成本低、不受外界环境 影响、缺氧效果稳定、 速度快 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect, and fast speed	不同细胞作用浓度和时间 不同 Different cell action concentrations and times vary	较常用，主要用于心肌细 胞和神经系统细胞的缺 氧/复氧模型 Commonly used, mainly used for hypoxia/ reoxygenation models of myocardial cells and nervous system cells
缺糖缺氧 Sugar deficiency and hypoxia	缺糖使呼吸链中断，缺氧 环境造成细胞缺氧 Sugar deficiency disrupts the respiratory chain, and an hypoxic environment causes cellular hypoxia	缺血缺氧性疾病的最 理想模型 Most ideal model for ischemic and hypoxic diseases	操作较复杂 Operation is more complex	常用，主要用于心肌细胞 和神经系统细胞的缺氧/ 复氧模型 Commonly used, mainly used for hypoxia/ reoxygenation models of myocardial cells and nervous system cells

#### 4 小结与展望

建立缺氧细胞模型是研究缺氧性疾病及其他导致组织缺氧的疾病的重要研究手段。众多疾病都会导致组织和细胞缺氧，而缺氧又可能促进疾病的发展。例如，肿瘤细胞因快速增殖而需求大量能量，但在正常条件下，能量供应已无法满足其需求，从而在肿瘤细胞内产生缺氧区域。缺氧会促进 HIF-1 $\alpha$  的表达，以维持肿瘤细胞的生长，并促进其增殖和转移<sup>[71]</sup>。此外，缺氧也会加速各组织器官纤维化的进程<sup>[72-74]</sup>。然而，缺氧对人类也有积极作用，如通过诱导 HIF-1 $\alpha$  表达促进血管生成，进而促进伤口愈合<sup>[75]</sup>。

缺氧是一个复杂的过程，不仅仅涉及细胞缺氧，体内多种机制都可能导致组织缺氧。人类的呼吸过程包括肺通气、肺泡内的气体交换、气体在血液中的运输以及组织内的气体交换，任何一个环节的障碍都可能导致缺氧。体外培养细胞无法模拟这些过程，因此与体内实验相结合是必要的。在建立缺氧细胞模型时，应考虑疾病的缺氧类型、发病机制等因素，选择合适的细胞模型，以更好地模拟该疾病。现有的缺氧模型造成缺氧的方式较为单一，缺氧效果不稳定，三气培养箱在使用过程中，培养箱门的开闭会造成箱内氧气含量波动，影响缺氧效果。与化学方法联合，或许能使缺氧环境更加稳

定，如在培养基中加入 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 耗尽培养基中的 O<sub>2</sub>，再将细胞放入无氧外环境中。联合应用这些方法是否能取得更好的效果，值得进一步探讨。

在模拟某些疾病时，在缺氧的基础上结合多种机制和条件所建立的细胞模型或许可以更符合细胞造模的需要。刘金学<sup>[76]</sup>将心肌细胞置于缺氧环境中并测定培养基的 pH 值，建造出心肌细胞缺氧酸中毒的模型。心肌细胞酸中毒是心肌缺血缺氧性疾病发生发展中的一个重要环节，建立该类疾病模型时，在检测其细胞存活率的基础上同时检测培养基的 pH 值会更加符合其发病过程。此外，通过改变椎间盘髓核细胞的培养基渗透压<sup>[77]</sup>联合缺氧，会更加符合椎间盘退变的发病机制。

随着西藏旅游业的发展，越来越多的人进入高原，许多人因不适应突然的低氧环境而易发生高原反应，严重者可能出现高原肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE) 和高原脑水肿 (high altitude cerebral edema, HACE)，这对进入高原人员的安全构成严重威胁。提前做好预防是降低发病率的关键，目前临床防治主要依赖西药对症治疗，但个体差异可能导致不良反应。随着网络药理学等生物信息学科的进步，利用中药活性成分等天然化合物从靶点和相关通路入手防治疾病成为新趋势。HAPE 和 HACE 的发病机制尚未完全明确，且涉及多种分子机制，因此对其研究至关重要。将动

物置于高原环境模拟舱中是建立 HAPE 和 HACE 模型,但这无法很好地从分子层面进行研究。因此,与结合细胞实验相结合,建立缺氧细胞模型可以解决这一问题。

#### 参考文献:

- [ 1 ] LODGE K M, VASSALLO A, LIU B, et al. Hypoxia increases the potential for neutrophil-mediated endothelial damage in chronic obstructive pulmonary disease [ J ]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(8) : 903-916.
- [ 2 ] LU J, PENG Y, ZOU J, et al. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  is a regulator of autophagy in osteoarthritic chondrocytes [ J ]. *Cartilage*, 2021, 13(2\_suppl) : 1030S-1040S.
- [ 3 ] BAI R, LI Y, JIAN L, et al. The hypoxia-driven crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages: mechanisms and clinical treatment strategies [ J ]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1) : 177.
- [ 4 ] ZHAO H, WONG R J, STEVENSON D K. The impact of hypoxia in early pregnancy on placental cells [ J ]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18) : 9675.
- [ 5 ] 尹春月, 龙禹. 氯化钴模拟法构建绒毛外滋养细胞缺氧模型 [ J ]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(9) : 645-649, 653.  
YIN C Y, LONG Y. Construction of a new model for extravillous trophoblast cell hypoxia using cobalt chloride [ J ]. *Prog Obstet Gynecol*, 2023, 32(9) : 645-649, 653.
- [ 6 ] 周春燕, 药立波. *生物化学与分子生物学* [ M ]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.  
ZHOU C Y, YAO L B. *Biochemistry and molecular biology* [ M ]. 9th edition. Beijing: People's Health Press, 2018.
- [ 7 ] OHH M, PARK C W, IVAN M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein [ J ]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7) : 423-427.
- [ 8 ] KARUPPAGOUNDER S S, RATAN R R. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(7) : 1347-1361.
- [ 9 ] MUÑOZ-SÁNCHEZ J, CHÁNEZ-CÁRDENAS M E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model [ J ]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4) : 556-570.
- [ 10 ] YUAN Y, HILLIARD G, FERGUSON T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$  [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18) : 15911-15916.
- [ 11 ] AO Q, SU W, GUO S, et al. SENP1 desensitizes hypoxic ovarian cancer cells to cisplatin by up-regulating HIF-1 $\alpha$  [ J ]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 16396.
- [ 12 ] 郭树鹏, 栾莉莉, 崔志馨, 等. 青箱苷 A 抑制缺氧乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭能力的研究 [ J ]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(12) : 30-35.
- GUO S P, LUAN L L, CUI Z X, et al. Study on celosin A inhibiting the abilities of proliferation, migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells during oxygen deprivation [ J ]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(12) : 30-35.
- [ 13 ] 韦燕飞, 吕贝贝, 金丽杰, 等. 缺氧条件下白花丹醌对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与侵袭及 HIF-1 $\alpha$  表达的影响 [ J ]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(14) : 1789-1795.  
WEI Y F, LYU B B, JIN L J, et al. Effects of plumbagin on proliferation, apoptosis, invasion and expression of HIF-1 $\alpha$  in hepatocellular HepG2 cells under hypoxia condition [ J ]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(14) : 1789-1795.
- [ 14 ] 呼格吉乐, 王婷, 苏慧敏. EPO 对窒息诱导新生大鼠脑损伤和 CoCl<sub>2</sub> 诱导人脑胶质瘤细胞系 U251 缺氧的改善作用 [ J ]. *山东医药*, 2023, 63(9) : 46-51.  
HU G, WANG T, SU H M. Effects of EPO on brain injury after neonatal asphyxia in rats and hypoxia induced by CoCl<sub>2</sub> in human glioma cell line U251 [ J ]. *Shandong Med J*, 2023, 63(9) : 46-51.
- [ 15 ] 刘菲, 张昊, 刘博, 等. 氯化钴诱导的 N2a 细胞缺氧损伤模型的机制研究 [ J ]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(2) : 249-253.  
LIU F, ZHANG H, LIU B, et al. Mechanism of cobalt chloride induced hypoxia on N2a cells [ J ]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2020, 36(2) : 249-253.
- [ 16 ] 胡晗. 从缺氧-VEGF 途径研究黄芪对人视网膜色素上皮细胞的影响 [ D ]. 荆州: 长江大学, 2022.  
HU H. Study on the effect of *Astragalus membranaceus* on human retinal pigment epithelial cells from hypoxia-VEGF pathway [ D ]. Jingzhou: Yangtze University, 2022.
- [ 17 ] TEVLIN R, LONGAKER M T, WAN D C. Deferoxamine to minimize fibrosis during radiation therapy [ J ]. *Adv Wound Care*, 2022, 11(10) : 548-559.
- [ 18 ] ZHANG Y, YAPRYNTSEVA M A, VDOVIN A, et al. Modeling hypoxia facilitates cancer cell survival through downregulation of p53 expression [ J ]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345 : 109553.
- [ 19 ] ZHU Y, CHANG B, PANG Y, et al. Advances in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilizer deferoxamine in tissue engineering [ J ]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2023, 29(4) : 347-357.
- [ 20 ] GUO Z, LIN J, SUN K, et al. Deferoxamine alleviates osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis and activating the Nrf2 pathway [ J ]. *Front Pharmacol*, 2022, 13 : 791376.
- [ 21 ] 朱杰, 唐燧, 吴情, 等. 低氧状态下骨细胞参与破骨细胞形成的作用机制研究 [ J ]. *华西口腔医学杂志*, 2019, 37(5) : 463-468.  
ZHU J, TANG Y, WU Q, et al. Mechanism of participation of osteocytes in the formation of osteoclasts under hypoxia [ J ]. *West Chin J Stomatol*, 2019, 37(5) : 463-468.
- [ 22 ] 王开, 荆得宝, 于素平, 等. 模拟低氧对舌鳞癌 SCC-15 细胞系中 SOX2 和 OCT4 表达的影响 [ J ]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(7) : 891-896.  
WANG K, JING D B, YU S P, et al. Effect of simulated hypoxia on expression SOX2 and OCT4 of tongue squamous cell

- carcinoma SCC-15 cells [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2017, 38(7): 891-896.
- [23] CHEN S, FAN F, ZHANG Y, et al. Metabolites from scutellarin alleviating deferoxamine-induced hypoxia injury in BV2 cells cultured on microfluidic chip combined with a mass spectrometer [J]. Talanta, 2023, 259: 124478.
- [24] JONES R B, SILVA A D, ANKENBAUER K E, et al. Role of the ST6GAL1 sialyltransferase in regulating ovarian cancer cell metabolism [J]. Glycobiology, 2023, 33(8): 626-636.
- [25] TAJALI R, EIDI A, AHMADI TAFTI H, et al. Restoring the angiogenic capacity of the human diabetic adipose-derived mesenchymal stem cells primed with deferoxamine as a hypoxia mimetic agent: role of HIF-1 $\alpha$  [J]. Adv Pharm Bull, 2023, 13(2): 350-360.
- [26] HAO C, YOU J, QIU H, et al. Hypoxic preconditioning improves the survival and pro-angiogenic capacity of transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells *via* HIF-1 $\alpha$  signaling in a rat model of bronchopulmonary dysplasia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 605: 111-118.
- [27] CHEN R, AHMED M A, FORSYTH N R. Dimethyloxallylglycine (DMOG), a hypoxia mimetic agent, does not replicate a rat pheochromocytoma (PC12) cell biological response to reduced oxygen culture [J]. Biomolecules, 2022, 12(4): 541.
- [28] ZOU J, YANG J, ZHU X, et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor ameliorates glomerular injury sensitization after tubulointerstitial injury [J]. Kidney Int, 2021, 99(3): 620-631.
- [29] SHAO W, LI Z, WANG B, et al. Dimethyloxallylglycine attenuates steroid-associated endothelial progenitor cell impairment and osteonecrosis of the femoral head by regulating the HIF-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. Biomedicines, 2023, 11(4): 992.
- [30] CHEN M H, WANG Y H, SUN B J, et al. HIF-1 $\alpha$  activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 107901.
- [31] ZIPPUSCH S, BESECKE K F W, HELMS F, et al. Chemically induced hypoxia by dimethyloxallylglycine (DMOG)-loaded nanoporous silica nanoparticles supports endothelial tube formation by sustained VEGF release from adipose tissue-derived stem cells [J]. Regen Biomater, 2021, 8(5): rbab039.
- [32] CHEN L, HUANG X, CHEN H, et al. Hypoxia-mimicking scaffolds with controlled release of DMOG and PTHrP to promote cartilage regeneration *via* the HIF-1 $\alpha$ /YAP signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 716-729.
- [33] LIU Z Q, SHANG L L, GE S H. Immunomodulatory effect of dimethyloxallyl Glycine/nanosilicates-loaded fibrous structure on periodontal bone remodeling [J]. J Dent Sci, 2021, 16(3): 937-947.
- [34] ABU-SHAHBA A G, GEBRAAD A, KAUR S, et al. Proangiogenic hypoxia-mimicking agents attenuate osteogenic potential of adipose stem/stromal cells [J]. Tissue Eng Regen Med, 2020, 17(4): 477-493.
- [35] 许蜀闽, 王培勇, 马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- XU S M, WANG P Y, MA H Y. Preparation of hypoxic surroundings with sodium dithionite for cell culture [J]. Acta Acad Med Mil Tertiae, 2005, 27(4): 359-360.
- [36] ZHAO R Z, JIANG S, RU N Y, et al. Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(10): 980-988.
- [37] 许瑞卿. 黄连素对体外培养脊髓神经细胞缺氧损伤所诱导自噬的影响 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2021.
- XU R Q. Effect of berberine on autophagy induced by hypoxia injury in cultured spinal cord neurons *in vitro* [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2021.
- [38] 王丹, 田春艳, 陈桂生, 等. 连二亚硫酸钠诱导 HT22 细胞缺氧复氧模型的制备 [J]. 宁夏医科大学学报, 2020, 42(10): 983-986.
- WANG D, TIAN C Y, CHEN G S, et al. Preparation of hypoxia-reoxygenation model in HT22 cells induced by sodium bisulfite [J]. J Ningxia Med Univ, 2020, 42(10): 983-986.
- [39] 孙晨, 戈胜, 宁夏青, 等. 连二亚硫酸钠诱导大鼠肝细胞氧化应激模型的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(6): 2217-2223.
- SUN C, GE S, NING X Q, et al. Oxidative stress model of BRL-3A cells induced by sodium hydrosulfite [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2023, 50(6): 2217-2223.
- [40] CHU D, ZHANG Z. Trichosanthis pericarpium aqueous extract protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating PI3K/Akt/NO pathway [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2409.
- [41] 刘莉娜, 王红梅, 周建明, 等. 连二亚硫酸钠诱导 SY5Y 细胞缺糖缺氧模型及泽泻白术药对的作用观察 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(3): 464-469.
- LIU L N, WANG H M, ZHOU J M, et al. Drug screening against damage of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induced SH-SY5Y cells by oxygen-glucose deprivation and effect of herb pair of Zexie-Baizhu [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(3): 464-469.
- [42] 高莉, 彭晓明, 霍仕霞, 等. 类叶升麻苷对缺糖缺氧诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2015, 37(8): 1821-1823.
- GAO L, PENG X M, HUO S X, et al. Protective effect of *Cimicifuga*-like glycoside on PC12 cell injury induced by glucose deficiency and hypoxia [J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(8): 1821-1823.
- [43] 王丽丽, 赵建力, 刘保江. 舒芬太尼对培养大鼠乳鼠缺氧心肌细胞损伤保护作用的研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(1): 73-74.
- WANG L L, ZHAO J L, LIU B J. Protective effect of sufentanil on hypoxic myocardial cell injury in cultured neonatal rats [J].

- Chin J Integr Med Cardio /Cerebrovasc Dis, 2010, 8(1): 73-74.
- [44] 饶淑云, 钱之玉. 西红花酸对缺糖缺氧心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 427-429.  
RAO S Y, QIAN Z Y. Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2004, 35(4): 427-429.
- [45] 关付, 于波, 齐国先. 原代培养大鼠心肌细胞化学性缺氧模型的建立 [A]. 中华医学会心血管病学分会第八次全国心血管病学术会议汇编 [C]; 2006.  
GUAN F, YU B, QI G X. Establishment of a model of chemical hypoxia in primary cultured rat cardiomyocytes [A]. The 8th national academic conference on cardiovascular diseases of the cardiovascular branch of the Chinese medical association [C]; 2006.
- [46] 宋诚, 王纪田, 石拴霞, 等. 缺氧条件下 GC-1 细胞凋亡的作用机制研究 [J]. 生命科学研究, 2023, 27(6): 544-550, 564.  
SONG C, WANG J T, SHI S X, et al. Mechanism of apoptosis in GC-1 cells under hypoxic conditions [J]. Life Sci Res, 2023, 27(6): 544-550, 564.
- [47] 包春生, 高玉峰. 黑苏嘎-25 对缺氧诱导的神经干细胞增殖、凋亡及炎症反应的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(22): 5579-5583.  
BAO C S, GAO Y F. Effects of heisuga-25 on proliferation, apoptosis and inflammation of neural stem cells induced by hypoxia [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(22): 5579-5583.
- [48] 付承筑, 王天生, 王柏翔, 等. 缺氧条件下卡拉胶寡糖对肿瘤细胞迁移的影响 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(9): 41-47.  
FU C Z, WANG T S, WANG B X, et al. Effects of carrageenan oligosaccharides on tumor cell migration under hypoxia [J]. Chin Food Addit, 2022, 33(9): 41-47.
- [49] 周圆, 王蒙, 王凌晨, 等. 肾衰 II 号方抑制 NLRP3 炎症小体改善慢性缺氧诱导 HK-2 细胞损伤的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4443-4448.  
ZHOU Y, WANG M, WANG L C, et al. Mechanism of Shen Shuai II Recipe attenuates chronic hypoxia-induced injury in HK-2 cell by inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(8): 4443-4448.
- [50] 吴连连, 胡安康. 胰岛素样生长因子-1 预处理对原代心肌细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 生物化工, 2022, 8(4): 66-69.  
WU L L, HU A K. Protective effect of insulin-like growth factor-1 pretreatment on hypoxic injury of primary myocardial cells [J]. Biol Chem Eng, 2022, 8(4): 66-69.
- [51] WANG Q, WANG P, QIN Z, et al. Altered glucose metabolism and cell function in keloid fibroblasts under hypoxia [J]. Redox Biol, 2021, 38: 101815.
- [52] LI Q, HONG Y, CHEN J, et al. Hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  expression promotes neurogenic bladder fibrosis via EMT and pyroptosis [J]. Cells, 2022, 11(23): 3836.
- [53] YANG Y, CHEN C, ZUO Q, et al. NARF is a hypoxia-induced coactivator for OCT4-mediated breast cancer stem cell specification [J]. Sci Adv, 2022, 8(49): eabo5000.
- [54] 任萍, 曹俊岭, 林珀吏, 等. 基于分子对接技术探讨木犀草素调控脂氧合酶途径抗 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤的分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5665-5673.  
REN P, CAO J L, LIN P L, et al. Molecular mechanism of luteolin regulating lipoxygenase pathway against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in H9c2 cardiomyocytes based on molecular docking [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5665-5673.
- [55] 聂芳, 李可, 王媛, 等. TTC36 蛋白在缺氧复氧诱导的肝脏缺血再灌注损伤中的表达 [J]. 川北医学院学报, 2021, 36(7): 832-835, 845.  
NIE F, LI K, WANG Y, et al. Expression of TTC36 protein in liver ischemia-reperfusion injury induced by hypoxia-reoxygenation [J]. J N Sichuan Med Coll, 2021, 36(7): 832-835, 845.
- [56] 牛其芳, 李德龙, 杨杨, 等. 人血管内皮细胞缺氧复氧损伤细胞模型的建立 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(4): 295-299.  
NIU Q F, LI D L, YANG Y, et al. Establishment of human vascular endothelial hypoxia/reoxygenation injury cell model [J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2019, 17(4): 295-299.
- [57] LI C, SUI C, WANG W, et al. Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by modulating the BDNF-TrkB/PI3K/Akt and MAPK/Erk1/2 signaling axes in neuron-astrocyte cocultures [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 599543.
- [58] LIU Y, LUAN Y, GUO Z, et al. Periostin attenuates oxygen and glucose deprivation-induced death of mouse neural stem cells via inhibition of p38 MAPK activation [J]. Neurosci Lett, 2022, 774: 136526.
- [59] 杨辉, 侯琼琼, 易健, 等. 补脑 I 号联合骨髓间充质干细胞对缺氧缺血性脑微血管内皮细胞损伤 VEGF/ICAM-1 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5482-5486.  
YANG H, HOU Q Q, YI J, et al. Effects of brain tonic I combined with bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of VEGF and ICAM-1 in cerebral microvascular endothelial cells damaged by hypoxia and hypoglycemia [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(9): 5482-5486.
- [60] 蒋邦治, 唐永刚, 韩志安, 等. LncRNA BDNF-AS 靶向 miR-765 影响缺氧缺糖诱导的 PC12 细胞神经损伤的实验研究 [J]. 河北医药, 2022, 44(20): 3075-3078, 3083.  
JIANG B Z, TANG Y G, HAN Z A, et al. Experimental study of LncRNA BDNF-AS targeting miR-765 to affect PC12 cell nerve damage induced by hypoxia and glucose deprivation [J]. Hebei Med J, 2022, 44(20): 3075-3078, 3083.
- [61] 杨春澜, 孟祥武, 郑龙, 等. 大黄素通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路减轻缺糖/缺氧对小胶质细胞的损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(12): 2285-2289.

- YANG C L, MENG X W, ZHENG L, et al. Emodin reduces hypoglycemia/hypoxia-induced injury of microglia by TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(12): 2285-2289.
- [62] 李钰佳, 李定祥, 彭珣, 等. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 自噬相关通路探讨左归降糖通脉方对 AGEs 合并缺糖缺氧星形胶质细胞炎性损伤的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(16): 90-99.
- LI Y J, LI D X, PENG X, et al. Effects of Zuogui Glucose Reducing and Tongwei Formula on inflammatory injury of AGEs combined with glucose and hypoxia astrocytes based on AMPK/mTOR/ULK1 autophagy-related pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2022, 28(16): 90-99.
- [63] YUAN Y, ZHAI Y, CHEN J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923.
- [64] HU Z, YUAN Y, ZHANG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6219715.
- [65] ZENG X, ZHANG Y D, MA R Y, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion *via* the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 25.
- [66] CHEN C, CHEN W, ZHOU X, et al. Hyperbaric oxygen protects HT22 cells and PC12 cells from damage caused by oxygen-glucose deprivation/reperfusion *via* the inhibition of Nrf2/System Xc-/GPX4 axis-mediated ferroptosis [J]. *PLoS One*, 2022, 17(11): e0276083.
- [67] LIU X J, LV Y F, CUI W Z, et al. Icaritin inhibits hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis of cardiomyocytes *via* regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(11): 2966-2976.
- [68] 宋海岩, 连辉, 张毅敏, 等. 低氧诱导因子对缺氧缺糖诱导的心肌细胞损伤模型中自噬的调控作用 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2018, 36(4): 419-422.
- SONG H Y, LIAN H, ZHANG Y M, et al. The regulation of hypoxic induced factor on autophagy of myocardial cells in oxygen-glucose deprivation model [J]. *Chin J Clin Anat*, 2018, 36(4): 419-422.
- [69] LOLMÈDE K, DURAND DE SAINT FRONT V, GALITZKY J, et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(10): 1187-1195.
- [70] ZAPATA-MORALES J R, GALICIA-CRUZ O G, FRANCO M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein diminishes sodium glucose transport 1 (SGLT1) and SGLT2 protein expression in renal epithelial tubular cells (LLC-PK1) under hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1): 346-357.
- [71] JING X, YANG F, SHAO C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 157.
- [72] WANG B, LI Z L, ZHANG Y L, et al. Hypoxia and chronic kidney disease [J]. *EBioMedicine*, 2022, 77: 103942.
- [73] MOHAMMAD OMAR J, HAI Y, JIN S. Hypoxia-induced factor and its role in liver fibrosis [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e14299.
- [74] BAO Q, ZHANG B, SUO Y, et al. Intermittent hypoxia mediated by TSP1 dependent on STAT3 induces cardiac fibroblast activation and cardiac fibrosis [J]. *eLife*, 2020, 9: e49923.
- [75] DUSCHER D, NEOFYTOU E, WONG V W, et al. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(1): 94-99.
- [76] 刘金学. MiR-126 在缺氧—酸中毒诱导的心肌细胞凋亡和血管内皮炎症中的作用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- LIU J X. Role of miR-126 in myocardial cell apoptosis and vascular endothelial inflammation induced by hypoxia-acidosis [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2023.
- [77] 林文波. 渗透压和 Ca<sup>2+</sup> 调控椎间盘髓核细胞中 CCN2/CTGF 的表达和机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- LIN W B. Osmotic pressure and Ca<sup>2+</sup> regulate the expression and mechanism of CCN2/CTGF in nucleus pulposus cells of intervertebral disc [D]. Shanghai: Chinese People's Liberation Army Navy Military Medical University, 2019.

[收稿日期]2024-04-15

张建,王冬,齐天天,等. *PPAR $\gamma$*  基因在骨关节炎中作用机制及其关键信号通路作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 145-152.

Zhang J, Wang D, Qi TT, et al. Research progress in the mechanism and role of key signaling pathways of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene in osteoarthritis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 145-152.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.018

# *PPAR $\gamma$* 基因在骨关节炎中作用机制及其关键信号通路作用的研究进展

张 建<sup>1</sup>, 王 冬<sup>2</sup>, 齐天天<sup>1,3,4</sup>, 吴凉彬<sup>1,3,4</sup>, 杨 琪<sup>1</sup>, 于 斐<sup>5\*</sup>

(1.北京大学深圳医院,广东 深圳 518036;2.滨州市滨城区市立医院,山东 滨州 256600;  
3.骨科生物材料国家地方联合工程研究中心,广东 深圳 518036;4.深圳市骨科疾病与生物材料  
研究重点实验室,广东 深圳 518036;5.深圳市第二人民医院,广东 深圳 518035)

**【摘要】** 骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是中老年人群中发病率较高的一种慢性退行性疾病,可导致患者关节疼痛、畸形和功能障碍,给患者及家庭造成痛苦。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , *PPAR $\gamma$* ) 是近年来发现的一种配体依赖的转录调节因子,可调控脂肪和糖类代谢、炎症及免疫进程。研究显示,*PPAR $\gamma$*  基因对 OA 软骨退变、滑膜炎、脂肪病变起重要作用,并可通过腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)、Wnt、沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 等信号通路影响 OA 进展。本文就 *PPAR $\gamma$*  基因通过关节相关组织及关键信号通路调控 OA 病变的作用及机制作一综述。

**【关键词】** *PPAR $\gamma$*  基因;骨关节炎;关节组织;信号通路;作用机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0145-08

## Research progress in the mechanism and role of key signaling pathways of the peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ gene in osteoarthritis

ZHANG Jian<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>2</sup>, QI Tiantian<sup>1,3,4</sup>, WU Liangbin<sup>1,3,4</sup>, YANG Qi<sup>1</sup>, YU Fei<sup>5\*</sup>

(1. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China. 2. Binzhou City Bincheng District Municipal Hospital, Binzhou 256600. 3. National & Local Joint Engineering Research Center of Orthopedic Biomaterials, Shenzhen 518036.  
4. Shenzhen Key Laboratory of Orthopaedic Diseases and Biomaterials Research, Shenzhen 518036.  
5. Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035)

**【Abstract】** Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease with a high incidence rate among middle-aged and elderly people. It can cause joint pain, deformity, and functional impairment, leading to a heavy burden on patients and their families. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (*PPAR $\gamma$* ) is a recently discovered ligand-dependent transcriptional regulatory factor that can regulate fat and carbohydrate metabolism, inflammation, and immune processes. Research has shown that the *PPAR $\gamma$*  gene plays an important role in OA cartilage degeneration, synovitis inflammation, and adipose lesions, and can affect OA progression through signaling pathways such as the AMP-activated protein kinase, Wnt,

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (82102076);广东省基础与应用基础研究基金项目 (2022A1515220111, 2022A1515220055, 2021A1515110311)。

**【作者简介】** 张建 (1977—),男,副主任医师,研究方向:周围神经损伤修复。E-mail:fan52099@sohu.com

**【通信作者】** 于斐 (1989—),男,博士,主治医师,研究方向:骨、软骨、周围神经损伤修复。E-mail:oscarfyu@163.com

and sirtuin 1 pathways. This review focuses on the role and mechanism of the *PPAR $\gamma$*  gene in OA, in relation to joint-related tissues and key signaling pathways.

【Keywords】 *PPAR $\gamma$*  gene; osteoarthritis; joint tissues; signaling pathway; mechanism of action

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

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以关节软骨退变和继发性骨质增生为病理特征, 受衰老、外伤、肥胖、遗传等因素影响的慢性退行性疾病<sup>[1]</sup>, 可累及关节软骨、滑膜、软骨下骨、肌肉、关节囊等组织, 并多发于髌、膝、脊柱等部位。OA 好发于 50 岁以上的中老年人, 患者多有关节疼痛、僵硬、肿胀、活动障碍等症状<sup>[2]</sup>。骨科医生多对 OA 进行阶梯治疗, 即症状最轻时通过改善患者生活方式和指导其进行体育锻炼等非药物治疗, 症状进一步发展后采用非甾体抗炎药进行药物治疗, 症状严重时则进行关节置换等手术治疗<sup>[3]</sup>。但鉴于 OA 的发病原因并不明确, 临床治疗效果有限。

*PPARs* 是核激素受体家族中的配体激活受体, 分为 *PPAR $\alpha$* 、*PPAR $\beta/\delta$*  和 *PPAR $\gamma$*  三种亚型, 不同亚型 *PPARs* 在染色体定位、机体不同器官中表达及功能调节方面有区别 (表 1), 3 种亚型与自身的配体结合后可引起本身构象变化, 调控其下游靶基因, 并在骨科疾病如 OA<sup>[7]</sup>、骨质疏松<sup>[8]</sup>、周围神经损伤<sup>[9]</sup> 中起重要作用。近年研究提示, 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferators-activated receptors  $\gamma$ , *PPAR $\gamma$* )、第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (*PTEN*)、固醇调节元件结合蛋白 (*SREBPs*) 等基因在 OA 关节功能变化及发病机制的调控中起着重要作用, 成为了 OA 研究领域的热点<sup>[10]</sup>。本文就 *PPARs* 3 种亚型中的 *PPAR $\gamma$*  在

OA 中作用机制作一综述, 为 OA 研究提供理论支持。

## 1 *PPAR $\gamma$* 基因介绍

*PPARs* 基因最早是在爪蟾中发现<sup>[11]</sup>, 而 *PPAR $\gamma$*  是 *PPARs* 基因家族的亚型之一, 又被称为 *NR1C3*, 根据其启动子和拼接方式的不同, *PPAR $\gamma$*  又可分为 4 种亚型: *PPAR $\gamma$ 1*、*PPAR $\gamma$ 2*、*PPAR $\gamma$ 3* 和 *PPAR $\gamma$ 4*。其中 *PPAR $\gamma$ 1*、3、4 编码的蛋白质相同, 而 *PPAR $\gamma$ 2* 编码蛋白质的 N 端多出 28 个氨基酸残基<sup>[12]</sup>。*PPAR $\gamma$*  本质上是一类配体依赖的转录调节因子, 具有高度保守的 DNA 结合区<sup>[13]</sup>。*PPAR $\gamma$*  与其配体结合后可激活视黄醇 X 受体 (RXR) 形成异质二聚体, 后与 DNA 应答元件-过氧化物酶体增殖体反应元件 (PPREs) 结合, 最终作用于脂肪和糖类代谢、炎症及免疫进程相关的靶基因, 并进一步通过腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路<sup>[14]</sup>、Wnt 信号通路<sup>[15]</sup>、沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 信号通路<sup>[16]</sup> 等的参与参与软骨、滑膜、软骨下骨、肌肉等组织退变并影响 OA 等骨科疾病的发病进程<sup>[17]</sup>。

## 2 *PPAR $\gamma$* 基因对 OA 相关组织的影响

OA 可以累及关节软骨、滑膜、脂肪等组织, 发病后最重要的病理改变是关节软骨磨损和代谢异常, 并且先发于负重部位的关节软骨。关节周围滑

表 1 *PPARs* 家族 3 种亚型在机体中的分布及功能  
Table 1 Distribution and function of three subtypes of *PPARs* family members in the body

亚型 Subtype	定位 Location	表达部位 Expression site	功能 Function
<i>PPAR<math>\alpha</math></i>	22q12-q13.1	肝、心脏、肾、骨骼肌、血管壁等 Liver, heart, kidney, skeletal muscle, vascular wall, etc.	调控脂肪细胞分化、脂质储存, 维持葡萄糖稳态, 参与炎症等 <sup>[4]</sup> Regulating adipocyte differentiation, lipid storage, maintaining glucose homeostasis, participating in inflammation, etc.
<i>PPAR<math>\beta/\delta</math></i>	6p21.1-21.2	胃、脑、结肠等 Stomach, brain, colon, etc.	调控细胞基础代谢及脂质代谢平衡, 维持巨噬细胞功能等 <sup>[5]</sup> Regulating cellular basal metabolism and lipid metabolism balance, maintaining macrophage function, etc.
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	3p25	心肌、血管平滑肌、脂肪等 Heart muscle, vascular smooth muscle, fat, etc.	调控脂肪细胞分化、脂质代谢, 影响炎症与免疫, 参与衰老进程等 <sup>[6]</sup> Regulating adipocyte differentiation and lipid metabolism, affecting inflammation and immunity, participating in the aging process, etc.

膜等组织也会产生炎症反应,与软骨、软骨下骨相互串扰,形成恶性循环。髌下、髌上脂肪垫等为代表的局部脂肪组织也可因炎症反应及内分泌异常改变等因素潜在地破坏关节稳态。这一过程也伴随着其他组织的改变,如负重部位软骨下骨骨密度增加,非负重部位囊性变,伴关节囊变性增厚、肌肉产生疼痛性保护性挛缩,导致关节出现畸形、脱位<sup>[18]</sup>。因此,PPAR $\gamma$  基因可以作用于关节相关的组织,影响 OA 的病程<sup>[19]</sup>。

## 2.1 PPAR $\gamma$ 对 OA 软骨退变的影响

关节软骨退变是 OA 发生的基础,当 OA 发生时,软骨稳态失衡,颜色淡黄并失去光泽,软骨磨损后表面粗糙并出现局部软化、弹性减弱,随疾病加重软骨脱落暴露软骨下骨<sup>[20]</sup>。因此,软骨退变对 OA 的发生至关重要,而研究 PPAR $\gamma$  基因在其中的作用有利于阐述 OA 病变的发病机制。Chen 等<sup>[21]</sup>构建了持续释放 PPAR $\gamma$  激动剂吡格列酮的软骨靶向纳米胶束,该胶束离体可被软骨细胞快速摄取,抑制双氧水诱导的软骨细胞凋亡及活性氧(ROS)增加,并恢复细胞中线粒体的膜电位,在体可抑制基质金属蛋白酶(MMPs)表达,并减少 II 型胶原和蛋白聚糖的降解,延缓 OA 病程。Ni 等<sup>[22]</sup>提出使用当归多糖激活 PPAR $\gamma$  后延缓 OA 病程的假说,发现当归多糖能通过 PPAR $\gamma$ /SOD2/ROS 途径在 OA 软骨变化中起作用,这一过程中叔丁基氢过氧化物诱导的软骨细胞中 PPAR $\gamma$  和氧化物歧化酶 2 表达激活,清除活性氧并改善细胞线粒体代谢,提高软骨细胞活力并减轻其凋亡,同时,其减轻了 OA 大鼠的软骨变性,加速细胞外基质合成。也有学者研究口服吡格列酮对手术引起的动物 OA 模型的作用,发现吡格列酮激活 PPAR $\gamma$  不仅延缓了动物 OA 的进展,也抑制了脱铁性贫血标志物酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 的表达,恢复了推定激酶 1/Parkin 依赖性的线粒体自噬,通过改善软骨细胞线粒体功能、抑制其脱铁起到软骨保护作用<sup>[23]</sup>。PPAR $\gamma$  在少见部位的 OA 中也起到重要作用,在颞下颌关节 OA(TMJOA)中,DNA 去甲基化剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5Aza)可通过逆转 PPAR $\gamma$  抑制进而减缓软骨退变,并通过平衡合成、分解代谢因子来平衡软骨稳态,在肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) 诱导的炎症 TMJOA 软骨细胞中 5Aza 也可通过 PPAR $\gamma$  启动子的高甲基化减缓软骨细胞的炎症反应,从而为 TMJOA 的治疗提供了新思路<sup>[24]</sup>。骨质疏松性 OA(OPOA)中使用脉

冲电磁场治疗可延缓软骨变性和骨丢失,增加骨密度,这一过程可能与 PPAR $\gamma$  上调、软骨细胞凋亡和炎症的抑制以及自噬障碍改善有关<sup>[25]</sup>。Ikuta 等<sup>[26]</sup>则对少见基因 Kruppel 样锌指转录因子 15(KLF15)在 OA 中的作用进行了探讨,发现 KLF15 敲除可以降低 PPAR $\gamma$ 、MMPs 表达,减少自噬和上调细胞凋亡加重 OA 的进程。

由此可知,PPAR $\gamma$  激活或增多对 OA 软骨退变具有重要的保护作用,其可能通过影响软骨细胞中的 ROS 水平、线粒体功能、细胞脱铁作用、炎症反应等调控软骨细胞的自噬及凋亡过程,引起破坏性酶类分泌变化,进而造成合成代谢产物和分解代谢产物的平衡改变,再影响到软骨细胞外基质的合成及分解代谢,调控 OA 病程。加强 PPAR $\gamma$  对软骨细胞中细胞器功能的影响研究,从软骨细胞功能改变角度讨论 OA 的发病机制,或许是未来的一个研究方向。

## 2.2 PPAR $\gamma$ 对 OA 滑膜炎的影响

传统理念认为 OA 过程中的滑膜病变要晚于软骨组织,但也有学者认为滑膜在 OA 病变中起到始动作用,OA 滑膜变化与类风湿关节炎的滑膜变化不同,滑膜组织可出现增殖型滑膜炎和纤维型滑膜炎两种状态,前者滑膜水肿,关节液增多,后者关节液减少,滑膜组织可被条索状纤维组织代替<sup>[27]</sup>。Harasymowicz 等<sup>[28]</sup>收集了 69 例终末期 OA 患者在全膝关节置换术中的滑膜和髌下脂肪垫,发现肥胖 OA 患者滑膜和髌下脂肪垫中 PPAR $\gamma$  表达水平较瘦 OA 患者低,初步证实了 PPAR $\gamma$  在肥胖 OA 患者炎症诱导 OA 中起作用。Tavallae 等<sup>[29]</sup>观察到晚期膝 OA 患者滑液中 miRNA-27b-3p 水平增加,并且小鼠膝 OA 滑膜中 miRNA-27b-3p 的表达量也升高,RNA 测序发现 OA 滑膜中 PPAR $\gamma$ /人 ADAM 金属肽酶含血小板反应蛋白 1 基元 8(ADAMTS8)信号轴起到重要作用,并且 miRNA-27b-3p 可影响关键细胞外基质基因表达。Liu 等<sup>[30]</sup>聚焦于 OA 滑膜的巨噬细胞,发现此类巨噬细胞中磷酸甘油酸变位酶 5(PGAM5)表达升高,其团队通过条件性敲除发现,BGAM5 可通过蛋白激酶 B(AKT)-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/p38/细胞外调节蛋白激酶(ERK)途径增强巨噬细胞的 M1 型极化,并通过 STAT6-PPAR $\gamma$  途径抑制了巨噬细胞 M2 型极化,为治疗 OA 的靶向巨噬细胞策略提供了见解。Sadatsuki 等<sup>[31]</sup>对一种硫酸乙酰肝素蛋白多糖

perlecan 进行了研究并发现,perlecan 调节性别决定区 Y 框蛋白 9 (*Sox9*) 和 *PPAR $\gamma$*  基因表达是滑膜间充质干细胞向软骨和脂肪分化所必需的,而 perlecan 在软骨-滑膜交界处的滑膜中表达又是膝 OA 骨赘形成不可缺少的。

因此,*PPAR $\gamma$*  是滑膜组织影响 OA 疾病进程的关键靶点,其可能通过对体重等代谢因素调控、滑膜中巨噬细胞极化、滑膜间充质干细胞向其他类型细胞分化以及某些特殊 microRNA 和基因影响自身炎症过程并参与 OA 进展。也由此可知,深入研究 *PPAR $\gamma$*  通过滑膜组织中不同细胞类型对滑膜炎的影响,并探讨转录组层面的改变,能够更快地让研究者理清 OA 的发病机制。

### 2.3 *PPAR $\gamma$* 对 OA 脂肪病变的影响

脂肪组织在关节形成中不可缺少,其可以介导肥胖参与 OA,并为 OA 发病机制的研究及其治疗提供新思路。全身及局部脂肪组织均能够影响 OA 发展进程<sup>[32]</sup>。全身脂肪组织,如皮下、肌间、肌肉内、内脏脂肪组织等,可通过增加全身体重影响关节负重,进而通过机械因素参与 OA 调控,也可通过脂肪浸润入侵至其他组织,加重其他组织退变。局部脂肪组织能够促进滑液分泌,缓冲关节摩擦及压力,其含量增多或减少均可对关节产生不利影响。Bonet 等<sup>[33]</sup>认为,分化信号和转录因子、细胞外基质成分和重塑因子、关节细胞和脂肪组织细胞衍生的介质、缺氧诱导转录因子、脂质、晚期糖基化终产物和 miRNA 等,均是脂肪组织作为参与关节相关细胞功能改变的生物学交叉点分子层面的影响因素。Dragojević 等<sup>[34]</sup>则认为,骨髓中脂肪生成增加可以影响 OA 或 OP,从 OA 或 OP 髌关节置换术患者中获得骨样本,发现 OA 骨中 *PPAR $\gamma$ 2*、脂联素、Runt 相关转录因子 2 (*RUNX2*) 和骨钙素的表达显著高于 OP 骨,证实 OA 脂肪生成和成骨细胞生成高于 OP。也有研究者探讨了早晚期膝 OA 髌下脂肪垫脂肪代谢、能量稳态、脂肪生成和炎症相关基因的差异,发现晚期 OA 患者髌下脂肪垫中,*PPAR- $\gamma$* 、二酰基甘油酰基转移酶 2 (*DGAT2*)、*CD36* 和甲状腺激素反应基因 (*THRSP*) 等脂肪生成基因上调,与早期 OA 组织相比,终末期 *PPAR- $\gamma$ 2* 的蛋白表达是早期的 5.4 倍,*PPAR- $\gamma$ 1* 的蛋白表达比早期高 1.4 倍<sup>[35]</sup>。Kitamura<sup>[36]</sup>实验证实在成年小鼠胫骨建立克隆细胞系 CL-1 中,可自发的表达软骨细胞 (II 型胶原、X 型胶原、聚集蛋白聚糖) 和脂肪细胞 (*PPAR $\gamma$* 、*aP*) 的特

异性基因,将其移植到小鼠皮下可形成软骨组织和脂肪组织,这一过程可被转化生长因子  $\beta$  (*TGF $\beta$* ) 影响,进而证实了骨、软骨、脂肪组织之间关系密切,可为 OA 研究提供工具。

总之,*PPAR $\gamma$*  作为与脂肪组织及脂肪细胞关系密切的因子及标志物,可以影响关节周围细胞向脂肪细胞分化,并在 OA 不同阶段通过调控其亚型表达等一系列方式,调控局部及全身脂肪组织变化,影响 OA 的病变。所以,*PPAR $\gamma$*  介导的细胞脂肪化及脂肪组织增多,可因代谢改变及细胞、组织功能改变调控 OA 进程,这也是骨科学者应该关注的领域。

### 3 *PPAR $\gamma$* 调控 OA 进展的相关机制

当细胞中发生某种反应时,信号可以从细胞内外进行传递,从而使机体可以对细胞发生的变化做出应对,这种信息传递过程便要依靠信号通路。信号通路可以维持正常生理过程,在疾病中起到重要作用,而信号通路有多种,大多数信号通路相互关联,可以影响靶因子参与 OA 等疾病的发生发展<sup>[37]</sup>。*AMPK* 信号通路、*Wnt* 信号通路、*SIRT1* 信号通路是其中比较重要的信号通路,现就这 3 条信号通路进行论述。

#### 3.1 *PPAR $\gamma$* 通过调控 *AMPK* 信号通路影响 OA 进展的相关机制

*AMPK* 信号通路在能量调控中起到重要作用,可感知真核细胞能量状态并在真核生物中普遍表达,可被 5'-磷酸腺苷 (*AMP*) 活化。在生物中,*AMPK* 以三聚体形式存在,包含催化亚基  $\alpha$  和调节亚基  $\beta$ 、 $\gamma$ ,是研究糖尿病和其他代谢性疾病的关键通路。细胞压力、运动和激素等均可以激活该通路,并靶向下游因子作用于 OA 等疾病<sup>[38]</sup>。

中药应用也能参与 *PPAR $\gamma$*  通过 *AMPK* 通路对 OA 的影响,Li 等<sup>[39]</sup>制备了三色散精油纳米乳液,在鉴定出该乳液具体成分的基础上发现,其可以减缓膝 OA 大鼠滑膜组织的炎症细胞浸润和 I 型胶原沉积,而且白细胞介素 *IL-1 $\beta$* 、*IL-18*、瞬时受体电位锚蛋白 1 (*TRPA1*) 表达减少。同时,该乳液增加了 *AMPK* 的磷酸化水平,激活了 *PPAR $\gamma$* 、*PPAR $\gamma$*  共激活因子-1 $\alpha$  (*PGC-1 $\alpha$* ) 以及 *AMPK-mTOR* 信号通路。Ma 等<sup>[40]</sup>探讨了同型半胱氨酸 (*Hcy*) 在 OA 中的作用,发现 *Hcy* 可以降低软骨细胞中 *SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ /PPAR- $\gamma$*  信号传导,通过调控氧化应激及细

胞凋亡引起线粒体功能障碍,并通过调控核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 等炎症因子影响软骨细胞功能,这一现象也发生在饮食诱导的高同型半胱氨酸血症动物模型中,为靶向软骨降解治疗 OA 提供了思路。也有团队研究了长链非编码 RNA (LncRNA) 对 OA 的影响,发现 LncRNA OIP5-AS1 过表达可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的软骨细胞损伤,并激活线粒体自噬,同时其可与 FUS 相互作用上调  $PPAR\gamma$  mRNA、调节 AMPK/Akt/mTOR 信号传导;而且  $PPAR\gamma$  过表达也可以激活 AMPK/Akt/mTOR 信号通路,同时减轻 LPS 诱导的软骨细胞损伤, $PPAR\gamma$  敲除则逆转了 OIP5-AS1 对细胞线粒体自噬的作用<sup>[41]</sup>。Zhao 等<sup>[42]</sup>则证实,AMPK 被激活后,软骨细胞对促炎因子的分解代谢作用受到抑制,并且 PGC-1 $\alpha$  这个  $PPAR\gamma$  的共激活因子与叉头框蛋白 O3a (FOXO3A) 一起上调软骨细胞中的抗氧化基因。

$PPAR\gamma$  与 AMPK 信号通路关系密切,其可影响 OA 滑膜组织、软骨组织的功能状态,中成药成分、代谢终产物、LncRNA 等都可将三者相互关联, $PPAR\gamma$  可通过 AMPK 信号通路介导炎症、细胞外基质分泌、氧化应激、线粒体等细胞器功能、靶基因表达等参与 OA 发病。在  $PPAR\gamma$  与 AMPK 信号通路的研究中,我们可以关注不同因子刺激后关节相关组织中细胞功能变化,以及  $PPAR\gamma$  与 AMPK 信号通路上下游因子的变化对 OA 发病影响,并因此寻找新的作用靶点。

### 3.2 $PPAR\gamma$ 通过调控 Wnt 信号通路影响 OA 进展的相关机制

Wnt 信号通路家族成员属于高度保守的分泌型糖蛋白,在细胞增殖、分化、迁移、衰老凋亡中起到重要作用。根据信号通路作用不同可分为经典的 Wnt (Wnt/ $\beta$ -catenin) 信号通路和非经典的 Wnt (Wnt /Planar polarity、Wnt /Ca<sup>2+</sup>) 信号通路,两种通路均与骨、软骨的病理生理状态变化关系密切<sup>[43]</sup>。

Wnt 信号通路是骨稳态调控的重要通路,Bolamperti 等<sup>[44]</sup>分析了女性骨折及女性非骨折 OA 患者的骨骼与血液相匹配的标本,发现与 OA 患者相比,骨折患者标本中 Wnt 通路抑制基因的表达降低, $\beta$  连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 表达量升高,靶向  $PPAR\gamma$  基因的小分子 RNA miR-130a 在 OA 血清中上调,说明  $PPAR\gamma$  及 Wnt 通路可能参与 OA 及骨折过程中的成骨激活。Lu 等<sup>[45]</sup>使用薯蓣皂苷治疗大鼠 OA,发现该药物可通过抑制内质网应激、氧化应激、细

胞凋亡和炎症过程,起到保护关节软骨及软骨细胞外基质的作用,在这一过程中 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路受到抑制, $PPAR\gamma$  表达上调。Pasold 等<sup>[46]</sup>构建了 STR/ort 小鼠 OA 动物模型,发现此类小鼠股骨生长板的关节软骨细胞和肥大软骨细胞数量受到影响,体外使用向软骨细胞分化的间充质干细胞 (MSCs) 研究发现, Wnt 拮抗剂分泌的卷曲相关蛋白 1 (*Sfrp1*) 与细胞中  $\beta$ -catenin、Wnt 靶基因  $PPAR\gamma$ 、*RUNX2* 表达相关,进一步说明 *Sfrp1* 下调可激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路导致关节软骨早衰及 OA 进展。也有学者证实,核受体超家族成员鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 II (COUP-TF II) 在 MSCs 的细胞分化中起重要作用,敲除小鼠中 COUP-TF II 可影响小鼠的骨密度、肌肉质量、软骨及脂肪形成,而 Wnt 信号通路、*RUNX2*、 $PPAR\gamma$  和 *SOX9* 的联合调节可影响 MSCs 的可塑性<sup>[47]</sup>。

MSCs 的多能分化在 OA 病程中起重要的作用,而其分化过程也受到  $PPAR\gamma$  与 Wnt 信号通路的影响。此外,分化后的细胞及细胞器的功能也受两者的影响,通过小分子 RNA、中药等因子的干预,可以调控软骨、软骨下骨、肌肉、脂肪等组织的退变,影响 OA 发病。也因此, $PPAR\gamma$  与 Wnt 信号通路的关系也是 OA 领域的研究热点,结合基因工程技术构建模型细胞或模式动物,在此基础上探讨  $PPAR\gamma$  与 Wnt 信号通路的改变,也能为 OA 治疗提供新思路。

### 3.3 $PPAR\gamma$ 通过调控 SIRT1 信号通路影响 OA 进展的相关机制

*SIRT1* 又被称为长寿基因,是一个具有高度保守核心序列的 III 型去乙酰化酶基因,可通过催化蛋白质赖氨酸  $\epsilon$  位去乙酰化对机体衰老、能量代谢、细胞周期等起到调节作用。*SIRT1* 信号通路可以对软骨细胞的损伤和退变、机体的能量代谢起到重要作用,进而影响 OA 等疾病进程<sup>[48]</sup>。

Qu 等<sup>[49]</sup>也研究了 MSCs 成脂肪及成软骨分化过程,发现鸟嘌呤核苷酸交换因子 *Vav1* 在 MSCs 中高表达,细胞中 *Vav1* 缺失可导致 MSCs 成软骨细胞分化能力减弱、成脂肪细胞分化能力增强;动物中 *Vav1* 缺失可导致小鼠软骨组织减少、脂肪含量增加,这可能是由于 *SIRT1* 影响  $PPAR\gamma$  和 *SOX9* 的乙酰化过程,并进一步影响下游因子造成。因此,软骨组织和脂肪组织的生成受到  $PPAR\gamma$  与 *SIRT1* 信号通路的影响,而两者含量的多少可以影响 OA 病程。Abed 等<sup>[50]</sup>获得了 OA 患者与正常尸检人群的

骨软骨组织,发现 SIRT1 在 OA 患者软骨下骨中表达减少,而原代培养的 OA 成骨细胞中,PPAR $\gamma$  的表达不随 SIRT1 特异性激动剂白藜芦醇剂量增加而变化,而其矿化能力、Wnt3a 因子等的表达量变化。因此,PPAR $\gamma$  及 SIRT1 信号通路在不同关节组织中表达量有所区别,对不同刺激物的反应也不同。也有学者认为,AMPK/SIRT1/PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  信号轴在 OA 脂质代谢中起到重要作用,其通过维持线粒体功能、调节能量代谢、细胞内环境维稳、防止细胞自噬和凋亡等方式延缓 OA 进程<sup>[51]</sup>。而 Huang 等<sup>[52]</sup>实验证实,晚期糖基化终产物(AGEs)可通过 PPAR $\gamma$ /AMPK/SIRT1 信号通路诱导人关节软骨细胞中的炎症反应,AGEs 可增加此细胞中炎症因子表达,以浓度和时间依赖的方式抑制 AMPK 磷酸化水平及 SIRT1 表达,AMPK 和 SIRT1 的激动剂或拮抗剂分别消除和增强 AGEs 诱导的炎症。

与其他通路类似,PPAR $\gamma$  与 SIRT1 信号通路参与 OA 进程时也是通过影响软骨、脂肪、软骨下骨等关节组织的变化造成的,细胞因子、药物、代谢终产物等可以通过 SIRT1 信号通路的去乙酰化作用调控靶基因的表达,并影响关节周围组织细胞的功能状态。SIRT1 信号通路与机体衰老关系密切,而 OA

是一种老龄化疾病,PPAR $\gamma$  又可以调控 SIRT1 信号通路,三者之间形成了一个网络,通过对 PPAR $\gamma$  与 SIRT1 信号通路的研究,能够明确 OA 发病中的组织细胞变化,并针对性地提出治疗措施。

#### 4 结语与展望

随着世界范围内人口老龄化进程加剧,慢性退行性疾病 OA 患者数量逐步增多,对其研究迫在眉睫。作为核激素受体家族中的配体激活受体亚型之一,PPAR $\gamma$  可通过 AMPK 信号通路、Wnt 信号通路、SIRT1 信号通路等调控关节相关组织变化,如产生软骨退变、滑膜炎、脂肪病变等,并参与 OA 疾病进程(图 1)。在以往的研究中,学者多关注 PPAR $\gamma$  对 OA 关节单一组织的影响,而关节本身是一个多组织构成的整体,不同组织之间存在串扰,通过基因编辑、高通量技术、生物材料构建等新颖的方法,调控 PPAR $\gamma$  基因在关节多组织中的表达,从整体层面探讨多组织退变或炎症在 OA 发病中的作用机制,也许会是未来研究的一个方向。也只有全面了解 OA 发病机制的基础上,才能够给骨科医生带来更多的理论支持,为非手术治疗终末 OA 提供便利,也更好地造福患者。

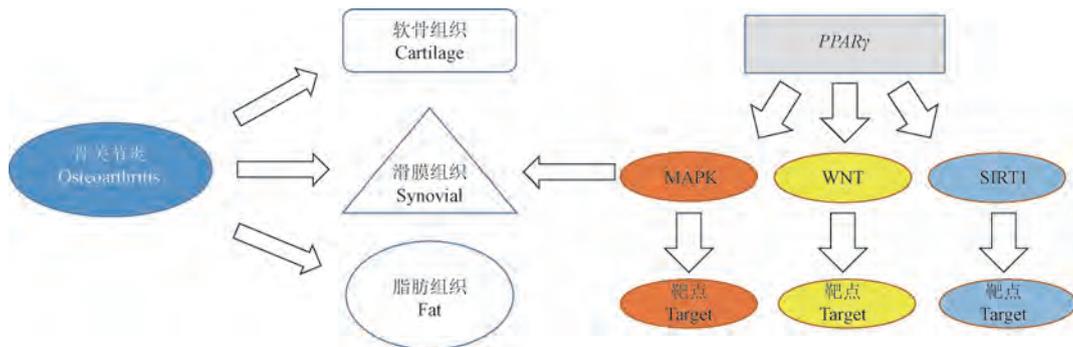


图 1 PPAR $\gamma$  介导信号通路对 OA 组织的影响

Figure 1 Effect of PPAR $\gamma$ -mediated signaling pathway on OA tissue

#### 参考文献:

[ 1 ] SAMPATH S J P, VENKATESAN V, GHOSH S, et al. Obesity, metabolic syndrome, and osteoarthritis-an updated review [J]. Curr Obes Rep, 2023, 12(3): 308-331.

[ 2 ] DUONG V, OO W M, DING C, et al. Evaluation and treatment of knee pain: a review [J]. JAMA, 2023, 330(16): 1568-1580.

[ 3 ] KARASAVVIDIS T, PAGAN MOLDEHNER C A, HADDAD F S, et al. Current concepts in alignment in total knee arthroplasty [J]. J Arthroplasty, 2023, 38(7 Suppl 2): S29-S37.

[ 4 ] PU Y, CHENG C K, ZHANG H, et al. Molecular mechanisms and therapeutic perspectives of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonists in cardiovascular health and disease [J]. Med Res Rev, 2023, 43(6): 2086-2114.

[ 5 ] GAETE P V, NIEVES-BARRETO L D, GUATIBONZA-GARCÍA V, et al. Medium-chain fatty acids modify macrophage expression of metabolic and inflammatory genes in a PPAR  $\beta/\delta$ -dependent manner [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 11573.

[ 6 ] YU L, GAO Y, AARON N, et al. A glimpse of the connection between PPAR $\gamma$  and macrophage [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1254317.

[ 7 ] PASCUAL-GARRIDO C, KIKUCHI K, CLOHISY J C, et al.

- Revealing a natural model of pre-osteoarthritis of the hip through study of femoroacetabular impingement [J]. *HSS J*, 2023, 19(4): 434–441.
- [ 8 ] KIM J S, KIM J W, YEE J, et al. Interactive associations between *PPAR* $\gamma$  and *PPARGC1A* and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(7): 1035.
- [ 9 ] YANG Y, HE Z, WU S. Ursolic acid alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy through *PPAR* $\gamma$  activation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 484: 116883.
- [10] YUAN H, YI N, LI D, et al. *PPAR* $\gamma$  regulates osteoarthritis chondrocytes apoptosis through caspase-3 dependent mitochondrial pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 11237.
- [11] ISSEMAN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 645–650.
- [12] 李利平, 付方明. *PPAR* $\gamma$  研究进展 [J]. *国外医学内分泌学分册*, 2003, 23(1): 29–32.  
LI L P, FU F M. Progress in the study of *PPAR* $\gamma$  [J]. *Endocrinology*, 2003, 23(1): 29–32.
- [13] JANANI C, RANJITHA KUMARI B D. *PPAR* gamma gene—a review [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(1): 46–50.
- [14] SHEN J, LIU Y, WANG Q, et al. Integrated network pharmacology, transcriptomics, and metabolomics analysis to reveal the mechanism of salt *Eucommia* cortex in the treatment of chronic kidney disease mineral bone disorders *via* the *PPARG*/*AMPK* signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314: 116590.
- [15] SARDAR A, GAUTAM S, SINHA S, et al. Nanoparticles of naturally occurring *PPAR* $\gamma$  inhibitor betulinic acid ameliorates bone marrow adiposity and pathological bone loss in ovariectomized rats *via* *Wnt*/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Life Sci*, 2022, 309: 121020.
- [16] XIE H, CAO L, YE L, et al. MicroRNA-29b-3p/sirtuin-1/peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  suppress osteogenic differentiation [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2023, 59(2): 109–120.
- [17] FENG Z, HUANG Q, ZHANG X, et al. *PPAR* $\gamma$  activation alleviates osteoarthritis through both the *Nrf2*/*NLRP3* and *PGC-1*  $\alpha$ / $\Delta\psi_m$  pathways by inhibiting pyroptosis [J]. *PPAR Res*, 2023, 2023: 2523536.
- [18] ABRAMOFF B, CALDERA F E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 293–311.
- [19] CHEN X, ZHU X, DONG J, et al. Reversal of epigenetic peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  suppression by diacerein alleviates oxidative stress and osteoarthritis in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(1/2/3): 40–53.
- [20] FUJII Y, LIU L, YAGASAKI L, et al. Cartilage homeostasis and osteoarthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11): 6316.
- [21] CHEN J, XU W, DAI T, et al. Pioglitazone-loaded cartilage-targeted nanomicelles (Pio@C-HA-DOs) for osteoarthritis treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 5871–5890.
- [22] NI S, YI N, YUAN H, et al. *Angelica sinensis* polysaccharide improves mitochondrial metabolism of osteoarthritis chondrocytes through *PPAR* $\gamma$ /*SOD2*/*ROS* pathways [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(11): 5394–5406.
- [23] XUE X, DAI T, CHEN J, et al. *PPAR* $\gamma$  activation suppresses chondrocyte ferroptosis through mitophagy in osteoarthritis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 620.
- [24] HUA B, QIU J, YE X, et al. Epigenetic *PPAR* $\gamma$  preservation attenuates temporomandibular joint osteoarthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 111014.
- [25] LIU J, ZHOU J, HUANG X, et al. Protective effects of pulsed electromagnetic field therapy attenuates autophagy and apoptosis in osteoporotic osteoarthritis model rats by activating *PPAR* $\gamma$  [J]. *Electromagn Biol Med*, 2024, 43(1/2): 61–70.
- [26] IKUTA K, HAYASHI S, KIKUCHI K, et al. Krüppel-like factor 15 deficiency exacerbates osteoarthritis through reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in mice [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2024, 32(1): 28–40.
- [27] SANCHEZ-LOPEZ E, CORAS R, TORRES A, et al. Synovial inflammation in osteoarthritis progression [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2022, 18(5): 258–275.
- [28] HARASYMOWICZ N S, CLEMENT N D, AZFER A, et al. Regional differences between perisynovial and infrapatellar adipose tissue depots and their response to class II and class III obesity in patients with osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, 69(7): 1396–1406.
- [29] TAVALLAEE G, LIVELY S, ROCKEL J S, et al. Contribution of microRNA-27b-3p to synovial fibrotic responses in knee osteoarthritis [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2022, 74(12): 1928–1942.
- [30] LIU Y, HAO R, LV J, et al. Targeted knockdown of *PGAM5* in synovial macrophages efficiently alleviates osteoarthritis [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 15.
- [31] SADATSUKI R, KANEKO H, KINOSHITA M, et al. Perlecan is required for the chondrogenic differentiation of synovial mesenchymal cells through regulation of *Sox9* gene expression [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(4): 837–846.
- [32] GULER M, ALI S, JACQUES C. Osteoarthritis and obesity: Crucial role of adipose tissue [J]. *Med Sci*, 2022, 38(8/9): 749–751.
- [33] BONET M L, GRANADOS N, PALOU A. Molecular players at the intersection of obesity and osteoarthritis [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(14): 2103–2128.
- [34] DRAGOJEVIĆ J, LOGAR D B, KOMADINA R, et al. Osteoblastogenesis and adipogenesis are higher in osteoarthritic than in osteoporotic bone tissue [J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(5): 392–397.
- [35] GANDHI R, TAKAHASHI M, VIRTANEN C, et al. Microarray analysis of the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: relationship with joint inflammation [J]. *J Rheumatol*, 2011, 38

- (9): 1966–1972.
- [36] KITAMURA H. Establishment of a bipotent cell line CL-1 which differentiates into chondrocytes and adipocytes from adult mouse [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(1): 25–37.
- [37] DENG Z, CHEN F, LIU Y, et al. Losartan protects against osteoarthritis by repressing the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway *via* upregulation of PPAR $\gamma$  [J]. *J Orthop Translat*, 2021, 29: 30–41.
- [38] LIAO T, MEI W, ZHANG L, et al. L-carnitine alleviates synovitis in knee osteoarthritis by regulating lipid accumulation and mitochondrial function through the AMPK-ACC-CPT1 signaling pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 386.
- [39] LI M, ZHANG L, LIU Z, et al. Sane powder essential oil nanoemulsion negatively regulates TRPA1 by AMPK/mTOR signaling in synovitis: knee osteoarthritis rat model and fibroblast-like synoviocyte isolates [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 4736670.
- [40] MA C H, CHUIA Y C, WU C H, et al. Homocysteine causes dysfunction of chondrocytes and oxidative stress through repression of SIRT1/AMPK pathway: a possible link between hyperhomocysteinemia and osteoarthritis [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 504–512.
- [41] SUN Z, TANG J, YOU T, et al. lncRNA OIP5-AS1 promotes mitophagy to alleviate osteoarthritis by upregulating PPAR- $\gamma$  to activate the AMPK/Akt/mTOR pathway [J]. *Mod Rheumatol*, 2024, 34(6): 1265–1276.
- [42] ZHAO X, TERKELTAUB R, LOTZ M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits chondrocyte catabolic response to pro-inflammatory cytokines and up-regulates anti-oxidant genes *via* PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and forkhead box O factor 3 (FOXO3A) [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20: S44–S45.
- [43] TONUTTI A, GRANATA V, MARRELLA V, et al. The role of WNT and IL-1 signaling in osteoarthritis: therapeutic implications for platelet-rich plasma therapy [J]. *Front Aging*, 2023, 4: 1201019.
- [44] BOLAMPERTI S, VILLA I, SPINELLO A, et al. Evidence for altered canonical Wnt signaling in the trabecular bone of elderly postmenopausal women with fragility femoral fracture [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 8169614.
- [45] LU J, ZHANG T, SUN H, et al. Protective effects of dioscin against cartilage destruction in a monosodium iodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1029–1038.
- [46] PASOLD J, OSTERBERG A, PETERS K, et al. Reduced expression of Sfrp1 during chondrogenesis and in articular chondrocytes correlates with osteoarthritis in STR/ort mice [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(5): 649–659.
- [47] XIE X, QIN J, LIN S H, et al. Nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TF II) modulates mesenchymal cell commitment and differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(36): 14843–14848.
- [48] PAPAGEORGIOU A A, ROUSSOS A, PAPATHANASIOU I, et al. MiR-217 regulates SIRT1 expression and promotes inflammatory and apoptotic responses in osteoarthritis [J]. *Genes*, 2023, 14(12): 2155.
- [49] QU P, WANG L, MIN Y, et al. Vav1 regulates mesenchymal stem cell differentiation decision between adipocyte and chondrocyte *via* Sirt1 [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(7): 1934–1946.
- [50] ABED É, DELALANDRE A, LAJEUNESSE D. Beneficial effect of resveratrol on phenotypic features and activity of osteoarthritic osteoblasts [J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1): 151.
- [51] 梁传财, 易鹏, 邱波. AMPK/SIRT1/PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  轴及其相关因子在骨关节炎脂质代谢中的作用 [J]. *生物技术进展*, 2021, 11(6): 718–723.
- LIANG C C, YI P, QIU B. Effects of AMPK/SIRT1/PPAR $\gamma$ /PGC1 $\alpha$  axis and related factors on lipid metabolism in osteoarthritis [J]. *Curr Biotechnol*, 2021, 11(6): 718–723.
- [52] HUANG H, WANG Z J, ZHANG H B, et al. The function of PPAR $\gamma$ /AMPK/SIRT-1 pathway in inflammatory response of human articular chondrocytes stimulated by advanced glycation end products [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(8): 1303–1309.

[收稿日期]2024-05-28

刘波,陈祥和,陆鹏程,等. 表观遗传学在运动改善帕金森障碍中的作用机制研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 153-162.

Liu B, Chen XH, Lu PC, et al. Research progress in the roles of epigenetic mechanisms in improving Parkinson's disease through exercise [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 153-162.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.019

# 表观遗传学在运动改善帕金森障碍中的作用 机制研究进展

刘波<sup>1</sup>, 陈祥和<sup>2</sup>, 陆鹏程<sup>3</sup>, 杨康<sup>4\*</sup>

(1.江苏旅游职业学院体育部,江苏扬州 225127;2.扬州大学体育学院,江苏扬州 225127;  
3.盐城海洋职业学校,江苏盐城 224145;4.江苏省苏北人民医院康复医学科,江苏扬州 225127)

**【摘要】** 帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种高度复杂的神经退行性疾病,其发病机制受DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA的影响。在对帕金森患者脑组织及血液的研究中表明,DNA甲基化/组蛋白修饰水平改变、ncRNA及其靶基因的变异可能引发大脑神经退行性变化,并作为帕金森病的潜在非侵入性生物标志物。运动可通过逆转表观遗传改善衰老、PD引发的神经退行性病变。本文综述表观遗传在PD中的发病机制,探讨运动在其中扮演的角色,为运动通过调节表观遗传机制来改善PD提供理论参考。

**【关键词】** 表观遗传学;帕金森病;运动;机制

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)11-0153-10

## Research progress in the roles of epigenetic mechanisms in improving Parkinson's disease through exercise

LIU Bo<sup>1</sup>, CHEN Xianghe<sup>2</sup>, LU Pengcheng<sup>3</sup>, YANG Kang<sup>4\*</sup>

(1. Jiangsu College of Tourism Office of Physical Education, Yangzhou 225127, China. 2. School of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225127. 3. Yancheng Ocean Vocational School, Yancheng, 224145.  
4. Department of Rehabilitation Medicine, Subei People's Hospital, Yangzhou 225127)

**【Abstract】** Parkinson's disease (PD) is a highly complex neurodegenerative disease, and its pathogenesis is influenced by DNA methylation, histone modification, and non-coding RNA. Research on Parkinson's brain tissue and blood has shown that changes in DNA methylation/histone modification levels and variations in ncRNA and its target genes may trigger neurodegeneration changes in the brain and serve as potential non-invasive biomarkers for PD. Exercise can ameliorate the neurodegenerative diseases caused by aging and PD by reversing epigenetic changes. This article reviews the role of epigenetics in the pathogenesis of PD, explores the benefits of exercise, and provides a theoretical reference for research into improving PD by regulating epigenetics through exercise.

**【Keywords】** epigenetics; Parkinson's disease; sports; mechanism

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

**【基金项目】** 国家社会科学基金教育学青年课题(CLA200279);中国博士后科学基金特别资助(2021T140580);中国博士后科学基金面上资助(2019M661957);江苏省哲学社会科学基金(20TYC001)。

**【作者简介】** 刘波(1996—),男,硕士,研究方向:运动促进健康。E-mail:lb20200322@126.com

**【通信作者】** 杨康(1994—),男,硕士,医师,研究方向:运动改善帕金森,运动与脑健康。E-mail:jrz1122334@163.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是世界第二大神经退行性疾病,由 James Parkinson 于 1817 年首次提出,到 2030 年全世界预计有 830 万 PD 患者<sup>[1]</sup>。PD 特征是黑质纹状体多巴胺能神经元的深度和选择性丢失,其临床表现包括运动障碍,如静止性震颤、运动迟缓、步态困难及强直。目前的药物治疗只能缓解症状,无法进一步阻止多巴胺能神经元的死亡,且因对导致多巴胺能神经元死亡的疾病过程的了解有限,致使神经保护疗法的开发过程变得困难。随着对导致多巴胺能神经元死亡的病因不断深入探究,国内外学者发现遗传易感性和环境因素的结合似乎起着关键作用,并在实验中被证实。如 PD 发病过程中的 DNA 甲基化水平变化、组蛋白修饰过程及非编码 RNA 的相互作用,这些过程又可通过体力活动被改变,进而对机体产生积极影响。

## 1 帕金森障碍机制

PD 是由中脑黑致密部(substantia nigra pars compacta, SN<sub>pc</sub>)多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性、STR 内 DA 水平降低,并表现出嗜酸性包涵体即路易小体为特征的神经退行性疾病。DA 是负责学习和执行功能的神经递质,多巴胺能神经元可将其神经纤维从 SN<sub>pc</sub> 延伸到纹状体并在纹状体内释放 DA,DA 水平下降可使 PD 患者表现出特征性运动功能障碍如运动迟缓、肌肉僵硬、静息震颤和姿势不稳,以及非特征性症状如焦虑、抑郁、痴呆、睡眠障碍、便秘、嗅觉减退和丧失等,进一步降低患者生活质量<sup>[2]</sup>。编码  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -syn)的 SNCA 基因产生的突变与家族性帕金森相关。目前,导致氨基酸替代的 6 点突变与 PD 的常染色体显性形式有关,而 SNCA 位点的重复和三倍性也与 PD 的常染色体显性形式有关。 $\alpha$ -syn 的神经毒性有多种解释,但均是通过激活细胞凋亡途径和神经元死亡来实现。在 PC12 细胞系中,A53T 突变体  $\alpha$ -syn 的过表达可通过以下机制导致神经元死亡:(1)诱导线粒体细胞色素 C 释放,导致呼吸链断裂,活性氧(reactive oxygen species, ROS)泄漏,线粒体功能障碍。在人神经母细胞瘤细胞中, $\alpha$ -syn 的过表达导致 ROS 升高和呼吸链抑制。(2)增加内质网应激。在 SHSY 细胞中, $\alpha$ -syn 的过表达也刺激了线粒体细胞色素 C 的释放<sup>[3]</sup>。以上过程均会导致 SNCA 基因突变,引发 PD。

## 2 表观遗传学在帕金森障碍中的机制研究

### 2.1 DNA 甲基化在帕金森障碍中的机制研究

由  $\alpha$ -syn 构成的路易小体(Lewy bodies, LBs)的过度积累会导致黑质纹状体变性,而  $\alpha$ -syn 受 DNA 甲基化调控<sup>[4]</sup>。 $\alpha$ -syn 在细胞质中会隔离 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1),使细胞核整体甲基化水平降低并导致 SNCA 基因过表达,全基因组分析显示,PD 患者血中 SNCA 基因低甲基化<sup>[5]</sup>,这使得 SNCA 过表达并产生大量的  $\alpha$ -syn。另一项研究发现,PD 脑样本和 SNCA 转基因小鼠模型中 DNMT1 核水平降低,导致 SNCA、SEPW1 和 PRKAR2A 基因上游 CpG 岛 DNA 甲基化不足<sup>[6]</sup>。DNA 甲基化参与 PD 的神经炎症,研究表明,PD 患者 SN<sub>pc</sub> 细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )启动子中的 DNA 甲基化程度远远低于其他脑区的 DNA,而 TNF- $\alpha$  启动子活性的 CpGs 二核苷酸中的特异性甲基化降低了转录因子 AP-2 和 Sp1 的结合,这使得 TNF- $\alpha$  启动子活性降低,从而增加了多巴胺能神经元对 TNF- $\alpha$  介导的炎症的敏感性<sup>[7]</sup>。一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)是由 NOS2 基因编码的促炎因子,高表达于 PD 患者的 SN<sub>pc</sub>。NOS2 基因受 DNA 甲基化调控,NOS2 基因启动子区中 CpG 位点的高甲基化会降低 iNOS 活性,而低甲基化会增加 iNOS 活性<sup>[8]</sup>。有研究发现,PD 患者 NOS2 甲基化水平较低,导致更高的 iNOS 活性,而抑制 iNOS 能减少神经元应激,下调由基质金属蛋白酶引起的小胶质细胞激活,减缓神经损伤<sup>[9]</sup>。TET 基因与神经炎症相关,其家族编码的 TET 酶在 DNA 去甲基化中起重要作用。通过对 1657 名 PD 患者和 1394 名对照受试者的研究中发现,TET1 基因可通过调节 5hmC 水平和基因表达来参与 PD 发生<sup>[10]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助因子-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )是转录共调节因子,星形胶质细胞中 PGC-1 $\alpha$  过表达可以显著减少炎症因子白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)及趋化因子配体 2 的产生和分泌,从而减少 ROS 的产生并抑制氧化损伤和炎症,降低神经变性,改善 PD<sup>[11]</sup>。有研究发现,PGC-1 $\alpha$  在 PD 发病过程中被下调,对其脑样本进行分析显示 PGC-1 $\alpha$  启动子区甲基化水平增加<sup>[12]</sup>。用棕榈酸处理  $\alpha$ -syn 转基因小鼠会造成其实质黑质中

PGC-1 $\alpha$  启动子高甲基化以及低表达,促进炎症相关基因表达<sup>[13]</sup>,而过表达 PGC-1 $\alpha$  可促进 PD 模型线粒体中呼吸链核编码基因的表达,并表现出神经保护作用<sup>[14]</sup>。研究发现,在诱导帕金森基因突变患者多能干细胞分化为多巴胺能神经元过程中,儿茶酚-O-甲基转移酶 (catechol-O-methyltransferase, COMT) 基因启动子处的单个 CpG 位点甲基化水平降低和 COMT 表达增加,同时 COMT 在黑质多巴胺能神经元中的过表达使得突触多巴胺传递受损,并产生与 PD 初始阶段运动协调受损相关的催化行为<sup>[15]</sup>。因此,COMT 上调可被视为 PD 的初始失调。但 SNpc 中 Tet2 的下调可以逆转 PD 诱导的运动缺陷和多巴胺能神经元损伤<sup>[16]</sup>。相关基因甲基化水平变化趋势及其作用见表 1。

## 2.2 组蛋白修饰在帕金森障碍中的机制研究

组蛋白是染色体的基本结构蛋白,包括 H1、H3、H2A、H2B、H4,其参与组蛋白乙酰化、磷酸化、甲基化、泛素化等,组蛋白变异可通过染色质异常凝聚致使 DNA 转录机制功能障碍进而引发各种疾病。组蛋白乙酰化是涉及多巴胺能神经元的一个关键表观遗传特征,该过程可消除组蛋白的正电荷,减少与 DNA 磷酸基团的相互作用,使得染色质结构更加松弛及有利于增强基因转录,上述过程可被组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 逆转,降低转录活性。

组蛋白甲基化优先发生在 H3 和 H4 组蛋白的

精氨酸或赖氨酸残基上,以调节对 DNA 损伤的反应。 $\alpha$ -syn 过表达可增强 H3K9me1、H3K9me2 和 H3K9me2 靶基因 (如 L1CAM 和 SNAP25) 的组蛋白甲基化并降低其表达,用组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 2 (euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2, EHMT2) 抑制剂 UNC0638 处理可使 L1CAM 和 SNAP25 的 mRNA 表达恢复,表明  $\alpha$ -syn 通过 EHMT2 增强 H3K9 甲基化,导致 H3K9me2 升高,最终损害 PD 神经元的突触活性<sup>[17]</sup>。在 PD 病理进程中,神经毒性刺激会诱导钙蛋白酶介导的丝氨酸/苏氨酸激酶 Cdk5 亚基 p35 裂解为 p25,之后与 HDAC1 相互作用并将 p25/Cdk5 募集到含有 HDAC1 的辅助抑制复合物,使 HDAC1 失活,导致双链 DNA 断裂、细胞周期蛋白异常表达及神经元死亡<sup>[18]</sup>。Sugeno 等<sup>[19]</sup> 研究发现, $\alpha$ -syn 可直接与组蛋白结合,上调组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT) 并降低 PD 细胞模型中组蛋白 H3 乙酰化水平,最终导致 sirtuin 活性降低、 $\alpha$ -syn 异常聚集、线粒体功能障碍和氧化应激,导致多巴胺损伤和神经炎症,抑制初级运动皮层中的基因转录并加速多巴胺能神经元的退化。除 H3 外,内侧前额叶皮层和杏仁核中多巴胺-2 受体基因的 H4 乙酰化水平增加会导致其活性增加,而 H3 和 H4 的超乙酰化会导致 cAMP 反应元件结合蛋白积累<sup>[20]</sup>,加速神经元变性;HAT 抑制剂漆树酸可抑制 H3 和 H4 的乙酰化水平,恢复多巴胺能神经元变性,表明

表 1 PD 患者基因甲基化水平变化趋势及作用

Table 1 Trends and effects of gene methylation levels in PD patients

基因 Genes	甲基化水平 Methylation level	作用 Effects
SNCA <sup>[5-6]</sup>	降低 Reduce	产生大量 $\alpha$ -突触蛋白 Generate a large amount of alpha synaptic proteins
TNF- $\alpha$ <sup>[7]</sup>	降低 Reduce	提高多巴胺能神经元对 TNF- $\alpha$ 介导的炎症敏感性 Enhance the sensitivity of dopaminergic neurons to TNF- $\alpha$ -mediated inflammation
NOS2 <sup>[8-9]</sup>	降低 Reduce	神经元应激加强、神经损伤加重 Enhanced neuronal stress and aggravated nerve damage
TET <sup>[10]</sup>	降低 Reduce	加重神经炎症 Aggravate neuroinflammation
PGC-1 $\alpha$ <sup>[11-14]</sup>	升高 Increase	IL-6、ROS 表达上升,神经元出现氧化损伤、炎症反应加强,出现变性 IL-6 and ROS expression increase, leading to oxidative damage and increased inflammatory response in neurons, resulting in degeneration
COMT <sup>[15-16]</sup>	降低 Reduce	使突触多巴胺传递受损,损害运动协调能力 Impaired synaptic dopamine transmission and impaired motor coordination ability

组蛋白乙酰化在 PD 发病机制中起重要作用<sup>[21]</sup>。 $\beta$ 2AR 激动剂沙丁胺醇是一种透脑哮喘药物,可以有效降低 PD 发生率,研究发现  $\beta$ 2AR 配体可通过影响 SNCA 启动子和增强子组蛋白 H3K27 赖氨酸的乙酰化水平来调节转录<sup>[22]</sup>。除丁胺醇外,烟酰胺可以诱导组蛋白的高度乙酰化,增加大脑各种神经营养因子和抗凋亡因子表达,从而起到对帕金森的保护作用<sup>[23]</sup>。Zhang 等<sup>[24]</sup>实验结果显示, $\alpha$ -syn 预形成原纤维会诱导 H3K9me2 组蛋白 H3 二甲基化并增加常染色体组蛋白甲基转移酶 EHMT1/2 表达,从而造成突触丢失及功能障碍,使用抑制剂 A-366 能显著恢复原代神经元中突触蛋白表达,改善 PD 小鼠运动障碍。

### 2.3 非编码 RNA 在帕金森障碍中的机制研究

各种非编码 RNA 如 microRNA、lncRNA、环状 RNA 及 tRNA 衍生片段等具有调节基因表达和改变代谢途径的功能。因此,可能作为各种疾病的诊断生物标志物或治疗靶点,包括神经退行性疾病,尤其是帕金森病。

#### 2.3.1 ncRNA 调控 $\alpha$ -syn 表达

$\alpha$ -syn 上调是促进其在路易小体中聚集的重要因素,部分 ncRNA 可调节 PD 中  $\alpha$ -syn 的表达和聚集。长链非编码 RNA—NEAT1 过表达能促进  $\alpha$ -syn 的转录及增强 PD 中的 Bax/Bcl-2 比值,提高半胱天冬酶-3 活性及  $\alpha$ -syn 的表达,而抑制 NEAT1 可促进 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的 PD 小鼠脑神经细胞活力并抑制细胞凋亡<sup>[25]</sup>;miR-34b/c 下调会阻碍其靶向  $\alpha$ -syn 的 3' UTR,导致  $\alpha$ -syn 上调,而  $\alpha$ -syn 中的单核苷酸多态性也会降低 miR-34b/c,反向促进  $\alpha$ -syn 的结合能力<sup>[26]</sup>;热休克蛋白 70 (HSP) 参与清除聚集的  $\alpha$ -syn,而 miR-16-1 介导的 HSP70 下调与  $\alpha$ -syn 聚集增加有关<sup>[27]</sup>;miR-133b 可降低  $\alpha$ -syn 表达、Bax/Bcl 比值和 pAkt 活化,促进神经元存活<sup>[28]</sup>;进一步研究发现,miR-133b 还可靶向 RhoA 来抑制轴突生长。

#### 2.3.2 ncRNA 在线粒体功能障碍中的机制研究

线粒体功能障碍是帕金森综合征和多巴胺能神经元变性的主要原因,ncRNA 可调节线粒体功能障碍,从而导致多巴胺能神经元丧失。自噬是通过靶向溶酶体来降解细胞质蛋白聚集体和有缺陷细胞器的重要途径,自噬紊乱与细胞中功能失调的线粒体有关,这会导致 PD 中的神经变性。由于磷酸

酶基因诱导的 kinase 1 蛋白激酶 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 对诱导线粒体自噬极其重要,因此 PINK1 突变会导致自噬紊乱进而引发 PD。NEAT1 能抑制 PINK1 蛋白降解,提高 PINK1 的蛋白水平,而过多的 PINK1 会被多巴胺能神经元选择性吸收,使线粒体功能受损进而诱导其变性,进而引发 PD 病理症状。Yan 等<sup>[29]</sup>发现,MPTP 在体外和体内均可提高 NEAT1、PINK1 蛋白和 LC3-II/LC3-I 表达并降低 TH 神经元数量,而敲低 NEAT1 能有效抑制 MPTP 诱导的体内自噬,缓解多巴胺能神经元损伤。目前,在 PD 模型中已发现部分靶向 PINK1 的 microRNA,如 miR-27a 和 miR-27b 能通过抑制 PINK1 表达来降低自噬标志物 LC3 (LC3-II) 活性形式的积累,抑制受损线粒体的溶酶体降解<sup>[30]</sup>。

线粒体氧化应激失调也是引发 PD 的重要因素。蛋白质去糖酶 DJ-1 在调节 PD 中的氧化应激过程中起重要作用。在功能上,DJ-1 通过增加 miR-221 表达来保护神经元免于凋亡,从而抑制促凋亡 BIM。目前,miR-221 在 PD 中的直接靶标尚不清楚,但 DJ-1 可能通过 MAPK/ERK 信号通路调节 miR-221 转录<sup>[31]</sup>。但在另一研究中,DJ-1 转录本被 miR-494 靶向负调节表达,从而损害了细胞的抗氧化防御<sup>[32]</sup>。

#### 2.3.3 ncRNA 在细胞凋亡中的机制研究

lncRNA NORAD 在 DNA 损伤后被激活,其来自 Chr20q11.23 的外显子转录本,可隔离 PUMILIO 蛋白来促进基因组稳定性。通过 MPP<sup>+</sup> 处理后,细胞中的 NORAD 下调,细胞毒性增加,半胱天冬酶 3/7 活化程度提高,同时产生 ROS 并释放 LDH。而通过慢病毒表达的 NORAD 可保护细胞免受 MPP<sup>+</sup> 细胞毒性<sup>[33]</sup>。另一种 ncRNA 为 tRNA 衍生的片段,与 PD 组织中的细胞应激和神经变性有关<sup>[34]</sup>。另外,部分 microRNA 也可通过直接抑制基因表达来调节 PD 相关细胞凋亡。如 miR-126 参与调节神经元毒性和细胞死亡过程,在 6-OHDA 处理的 PD 细胞模型中,miR-126 上调并直接靶向 p85b、IRS-1、SPRED1 以抑制 IGF-1/PI3K/AKT 信号传导,导致神经毒性<sup>[35]</sup>。MiR-96 在 MPTP 处理的 PD 小鼠模型中上调,靶向 CACNG5。CACNG5 和 Bcl-2 抑制与 iNOS 活化和细胞凋亡有关<sup>[36]</sup>。此外,MPTP 处理后的小鼠脑中 miR-342-3p 上调。MiR-342-3p 直接靶向 Wnt 信号通路中的 p21 活化激酶 1 (p21-activated kinase 1, PAK1),并降低谷氨酸转运蛋白亚型 1

(glutamate transporter, GLT-1) 和 L-谷氨酸/L-天冬氨酸转运蛋白的表达水平,而这些作用会损害神经元活性并导致细胞凋亡<sup>[37]</sup>。

目前研究表明, lncRNA/microRNA/mRNA 网络对 PD 细胞凋亡有重要作用。MPP<sup>+</sup> 处理小鼠后, 长链非编码 RNA—HOTAIR 促进细胞凋亡并降低细胞活力, 而敲低 HOTAIR 能通过抑制半胱天冬酶 3 活性来保护多巴胺能神经元免于死亡。RAB3IP 蛋白促进自噬并参与 PD 的神经元死亡, microRNA-126-5p 能靶向 RAB3IP 来促进细胞凋亡, 而 HOTAIR 可防止 microRNA-126-5p 靶向 RAB3IP 来破坏多巴胺能神经元, 实现神经保护<sup>[38]</sup>。表明 HOTAIR/miR-126-5p/RAB3IP 轴与 PD 有关, 同时也是 PD 的治疗靶点。小核仁 RNA 宿主基因 1 (SNHG1) 在 MPP<sup>+</sup> 处理的细胞和动物模型中上调, 敲低 SNHG1 可降低 LC3-II 表达和 MPP<sup>+</sup> 诱导的细胞死亡。在 PD 患者血中, microRNA-221/222 出现下调, 而提高 MicroRNA-221/222 表达能促进 LC3-II 形成并降低 MPP<sup>+</sup> 诱导的神经毒性<sup>[39]</sup>。p29 是 mTOR 磷酸化和细胞死亡的关键调节因子, SNHG1 可以作为 miR-221/222 的 miRNA 海绵, 并防止靶向 p29<sup>[30]</sup>。

### 3 运动改善帕金森障碍的表观遗传机制研究

#### 3.1 运动通过 DNA 甲基化改善帕金森障碍

定期运动可以通过神经可塑性、血管生成以及调节氧化损伤和神经炎症等机制对 PD 产生保护作用, 不仅如此, 还可通过表观遗传修饰对基因调控和表达产生特异性影响<sup>[40]</sup>。有研究显示, 帕金森患者进行 3 个月有氧运动可以有效增加尾状核诱发多巴胺释放和腹侧纹状体反应性, 改善轻至中度帕金森患者的运动障碍(包括震颤、小脑共济失调和肌肉强直)和非运动表现(包括自主神经功能障碍和认知缺陷)<sup>[41]</sup>, 这与运动调控基因甲基化改变有关。较高的体力活动可以改变 SNCA 的甲基化状态, 并降低总  $\alpha$ -syn 和寡聚-突触核蛋白的表达, 改善患者症状<sup>[42]</sup>。糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白 B (glycoprotein non-metastatic melanoma protein B, GPNMB) 是一种 I 型跨膜蛋白, 可减轻有害蛋白质聚集并调节神经炎症, 发挥神经保护作用及影响 PD 发病。全基因组关联研究 (GWAS) 发现, 位于 7 号染色体上 GPNMB 基因外显子区域的 CpG 位点与 GPNMB 基因的甲基化状态相关, 通过对台湾省 1442 名受试者进行分析发现, 运动可显著降低男性

GPNMB cg17274742 的甲基化水平并上调 GPNMB 基因表达, 发挥其抗炎和免疫平衡作用<sup>[43]</sup>。SNCA 的内含子 1 甲基化降低会增加  $\alpha$ -syn 表达并导致 PD 发病, Daniele 等<sup>[42]</sup>对久坐不动人群和运动员研究发现, 较高的身体活动能提高 SNCA 内含子 1 甲基化水平并降低  $\alpha$ -syn 蛋白水平, 且年龄越大, SNCA 甲基化水平就越低。前文已述, 线粒体功能障碍是诱发帕金森病的重要因素, 而过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptors- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ )/PGC-1 $\alpha$  通路和线粒体功能关系密切。PGC-1 $\alpha$  是线粒体生物发生和氧化应激的关键调节剂, PPAR- $\gamma$  可以诱导 PGC-1 $\alpha$  以及线粒体转录因子 A (transcription factor a mitochondrial, TFAM) 的表达来调节线粒体的合成, PGC-1 $\alpha$  表达上调可通过上述通路来抵制氧化应激, 降低 ROS 水平, 实现抗神经元凋亡作用。Sellami 等<sup>[44]</sup>研究发现, 6 个月的有氧运动会降低 PGC-1 $\alpha$  基因的启动子甲基化水平并促进其表达, 并通过 PPAR- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  通路来抵抗氧化应激, 减少神经元凋亡及改善线粒体功能。PINK1 参与  $\alpha$ -syn 聚集和多巴胺能神经元稳态的调节, 其高甲基化在早发性帕金森病的病因中起重要作用, 研究认为, 运动能通过调控 PINK1 甲基化水平来抑制其表达, 并激活 PINK1/Parkin 通路, 增强线粒体自噬活性及促进线粒体健康, 最终保留老年大脑的认知功能<sup>[45]</sup>。相关基因甲基化水平变化趋势及其作用见表 2。

#### 3.2 运动通过组蛋白修饰改善帕金森障碍

组蛋白修饰是多巴胺能神经元发育、分化和维持的关键环节, 运动则可以调节组蛋白乙酰化过程, 导致选择性转录或抑制与神经退行性疾病相关的特定基因。已有研究显示, 急性运动干预可引起海马中 HATs 或同类 HDACs 的转录轨迹表现出异质性, 提高 HDAC1 和 Sirt3 表达, 并在干预后 0.5 h 达到峰值, 对小鼠大脑产生有利影响<sup>[46]</sup>。如 CREB 结合蛋白及其同源物 p300 在阿尔茨海默症大脑的额叶皮层和海马体中显著减少, 这会引发学习和记忆缺陷, 而跑台运动可增加啮齿动物模型皮层和海马体的整体 HAT 活性, 并降低 HDAC2、HDAC3 和 HDAC5, 增加组蛋白乙酰化, 提高大脑神经可塑性并改善记忆<sup>[47]</sup>。此外, 运动还可引起海马中相关组蛋白乙酰化, 包括 H3K9、H4K5 和 H4K12, 并改善衰老引起的记忆衰退<sup>[48]</sup>。国外一项研究显示, 为期 8 周的多模式锻炼方案能改善老年人认知功能、平

表 2 运动干预 PD 过程中的基因甲基化变化趋势

Table 2 Trends in gene methylation changes during exercise intervention in PD process

基因 Genes	甲基化水平 Methylation level	作用 Effects
SNCA <sup>[42]</sup>	升高 Increase	降低总 $\alpha$ -syn 和寡聚-突触核蛋白的表达,改善 PD 症状 Reduce the expression of total $\alpha$ -synuclein and oligomeric synuclein to improve PD symptoms
GPNMB <sup>[43]</sup>	降低 Reduce	提高抗炎和免疫平衡功能 Improve anti-inflammatory and immune balance function
PGC-1 $\alpha$ <sup>[44]</sup>	降低 Reduce	通过 PPAR- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$ 通路抵抗氧化应激,减少神经元凋亡及改善线粒体功能 Resist oxidative stress, reduce neuronal apoptosis, and improve mitochondrial function through the PPAR- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$ pathway
PINK1 <sup>[45]</sup>	升高 Increase	激活 PINK1/Parkin 通路,增强线粒体自噬活性及促进线粒体健康 Activate PINK1/Parkin pathway, enhance mitochondrial autophagy activity and promote mitochondrial health

衡、活动能力、功能能力和生活质量等指标,同时伴随整体组蛋白 H3 乙酰化和脑源性神经营养因子水平的提高<sup>[49]</sup>。与上述研究相近,Lavratti 等<sup>[50]</sup>发现为期 90 d,每周 3 次,每次 1 h 的有氧运动和力量练习能显著降低精神分裂患者脑中组蛋白 H4 乙酰化水平,降低相关基因的转录活性和基因表达。以上研究均表明,运动可以通过改变组蛋白修饰状态来影响脑组织,并产生有利影响。在 PD 方面,Oliveira 等<sup>[51]</sup>通过对 19 名 PD 患者进行 4 周水上运动干预后发现,其组蛋白 H4 乙酰化水平和脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)表达显著上升,同时 PD 患者的 6 min 步行测试、活动能力(the timed up and go, TUG)明显提高,跌倒风险(berg balance scale, BBS)显著降低。动物实验中,短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)能通过 G 蛋白受体 41 (G-protein receptor 41, GPR41) 和 HDAC 促进 CD4 T 细胞和固有淋巴细胞(innate lymphoid cells, ILCs)产生白细胞介素-22(interleukin-22, IL-22),并促进肠上皮粘膜屏障的完整性,而 8 周运动训练能提高 PD 小鼠肠内产生 SCFAs 的肠道菌群的丰度,促进回肠紧密连接蛋白的恢复,并改善 PD 症状,实现运动介导的肠-炎症-脑的级联反应<sup>[52]</sup>。研究表明,运动可通过调节组蛋白修饰水平来改善 PD 症状,但由于目前研究较少,因此后续还需进一步研究。

### 3.3 运动通过非编码 RNA 改善帕金森障碍

PD 患者和健康个体之间的 miRNA 水平存在显著差异,包括 miR-30b、miR-30c、miR-26a、miR-450b-3p、miR-148b、miR-1、miR-22\* (\* 代表相较于其他 RNA 出现了更为显著的变化)、miR-29a、miR-103a-3p、miR-30b-5p、miR-29a-3p、miR-1249、miR-20a、miR-18b、miR-378c、miR-4293、miR-652、miR-15a\*、

miR-29c、miR-376c、miR-143 和 miR-19b (下调 miRNA) 和 miR-1826、miR-626、miR-505、miR-16-2a\*、miR-26a2\*、miR-30a、miR-7、miR-9-3p、miR-9-5p、miR-129、miR-132、miR-423、miR-365、miR-486、miR-1260、miR-218 和 miR-331-5p (上调 miRNA), 运动则可通过调节 microRNA 表达来影响帕金森病理生理过程。梁艺焯<sup>[53]</sup>研究显示,15 名 PD 患者在 4 周有氧运动干预后,其血清中 10 个 miRNA 显著上调,25 个显著下调( $P < 0.05$ ),同时 PD 患者的运动症状、认知功能及生活质量得到明显改善。MiR-106a-5p 调节自噬相关基因 ATG7 表达,其表达抑制与多巴胺能神经元的死亡和  $\alpha$ -syn 的积累有关,另外 miR-106a-5p 还可调节缺氧诱导因子 1 基因表达,并与各种神经退行性疾病的细胞死亡有关<sup>[54]</sup>; miR-103a-3p 可调节 DKK1 表达并阻断经典 Wnt 通路,导致 PD 的神经毒性<sup>[55]</sup>。国外一项研究显示,8 名 PD 患者在接受 8 周的自行车间歇训练后,血清中 miR-106a-5p、miR-103a-3p 和 miR-29a-3p 的表达水平升高,同时 PD 患者认知功能得到显著改善,表明运动能通过调节 miR-106a-5p、miR-103a-3p 表达来抑制神经细胞死亡和变性,并改善 PD 症状<sup>[56]</sup>。MiR-29 家族在 PD 患者血清中显著下调,8 周运动干预能上调外泌体介导的大鼠血浆 miR-29b 和脑组织 miR-29b 表达水平,达到脑保护作用<sup>[57]</sup>。MiRNA-299-5p 能通过靶向 SP1 对 MPTP 诱导的 PD 小鼠中神经细胞凋亡发挥抑制作用,其在 PD 患者中表达下调,张焯君等<sup>[58]</sup>及 Cai 等<sup>[59]</sup>发现有氧运动可通过去甲基化刺激血管内皮 miRNA-299-5p 表达,从而逆转 PD 神经细胞凋亡过程。MiR-320d 在正常个体与 PD 患者血中水平存在明显差异,且与 PD 发病显著相关,而经过参加马拉松比赛后,运动员血中 miR-320d 表达上调,表明 miR-320d 是响应高容

量和相对低强度耐力运动的生物标志物<sup>[60]</sup>。MiR-181 家族是一种与运动反应高度相关的肌肉相关 miRNA, 而间充质干细胞细胞外囊泡转移的 miR-181a-2-3p 可以通过抑制 NOX4/p38 MAPK 轴调节 EGR1 来抑制 PD 中的氧化应激, 据报道, 有氧运动能上调 miR-181 循环水平<sup>[61]</sup>。Zhang 等<sup>[62]</sup> 研究发现, 对 13 名 PD 患者进行 3 个月的家庭和社区锻炼干预后, miR-1268a、miR-181a-2-3p、miR-320c、miR-320d、miR-619-5p、miR-877-5p、miR-115-5p、miR116-5p、miR209-3p、miR255-5p 表达上调, 而 miR181-3p 表达下调, 表明以上 miRNA 在 PD 患者发病机制中发挥作用。其中部分 miRNA 又与 PD 病理学相关通路密切联系, 如多巴胺能神经元氧化应激会触发 p38 MAPK 通路, 导致细胞凋亡激活, 而 miR-181a-2-3p 的上调可抑制 MAPK 通路并减少 PD 中的氧化应激<sup>[63]</sup>; Wnt 通路在细胞和动物 PD 模型中都发挥神经保护作用, 恢复活性和非活性 Wnt 信号转导之间的平衡对于多巴胺能神经元的发育和 PD 中破坏的细胞生物学功能至关重要, 而上述研究中 miR-320 家族表达的上调可通过调节 Wnt 信号通路来调节 PD 神经元发育<sup>[64]</sup>。相关基因甲基化水平变化趋势及其作用见表 3。

#### 4 总结

表观遗传可通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、

ncRNA 来参与 PD 的发病机制, 并在神经退行性病变和神经元死亡方面发挥重要功能, 但目前对 PD 的表观遗传机制仍有待进一步研究。尽管目前许多研究已揭示了 PD 的不同表观遗传学机制, 但表观遗传学改变尚未转化为适合临床应用的生物标志物, 其困难一方面在于医学伦理所造成的桎梏, 如获取 PD 患者死亡后的脑组织; 另一方面在于 PD 患者不同脑区所显示出的不同的表观遗传修饰模式。因此, 在未来需要更多研究来确定帕金森病患者的特定表观遗传修饰模式作为生物标志物。运动在改善神经退行性疾病和逆转衰老、预防与年龄有关的疾病方面具有较高的潜力, 这与表观遗传在其中发挥作用密切相关。如中短期有氧运动可对 GPNMB、SNCA、PGC-1 $\alpha$ 、PINK1 等基因的甲基化水平产生影响并调节其表达; 对脑中 HATs 和 HDACs 活性的改变及 H3、H4 乙酰化水平产生影响; 通过调节特异性 ncRNA 如 miR-106a-5p、miR-103a-3p、miR-29、miRNA-299-5p、miR-320d、miR-181、miR-181a-2-3p、miR-320c 等表达水平来改善 PD 障碍。但由于表观遗传尚未转化为适合临床应用的生物标志物, 因此无法建立精准的运动改善 PD 的表观遗传学机制方案, 未来希望可以将表观遗传学转化为 PD 诊断和治疗的新生物标志物, 实现精准运动改善 PD 的有效机制。

表 3 运动干预 PD 过程中的 ncRNA 变化趋势  
Table 3 Trend of ncRNA changes during exercise intervention in PD process

基因 Gene	甲基化水平 Methylation level	作用 Effect
miR-106a-5p、 miR-103a-3p <sup>[54-56]</sup>	升高 Increase	抑制神经细胞死亡和变性, 并改善 PD 症状 Inhibit neuronal cell death and degeneration, and improve PD symptoms
miR-29 <sup>[57]</sup>	升高 Increase	与神经细胞凋亡有关, 起脑保护作用 Related to neuronal apoptosis and exerting brain protective effects
miRNA-299-5p <sup>[58-59]</sup>	升高 Increase	逆转 PD 神经细胞凋亡过程 Reverse the process of PD neuronal apoptosis
miR-320d <sup>[60]</sup>	升高 Increase	是响应高容量和相对低强度耐力运动的生物标志物, 在正常个体和 PD 患者血中存在显著差异 It is a biomarker that responds to high-capacity and relatively low-intensity endurance exercise, with significant differences in blood levels between normal individuals and PD patients
miR-181 <sup>[62]</sup>	升高 Increase	通过抑制 NOX4/p38 MAPK 轴调节 EGR1 来抑制 PD 中的氧化应激 Inhibition of oxidative stress in PD by regulating EGR1 through inhibition of NOX4/p38 MAPK axis
miR-181a-2-3p <sup>[63]</sup>	升高 Increase	抑制 MAPK 通路并减少 PD 中的氧化应激 Inhibition of MAPK pathway and reduction of oxidative stress in PD
miR-320c <sup>[64]</sup>	升高 Increase	通过 Wnt 信号通路调节 PD 神经元发育 Regulating PD neuron development through Wnt signaling pathway

## 参考文献:

- [ 1 ] Pavese N, Ledingham D. Parkinson's, where are we heading [J]. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2024, 85(7): 1-5.
- [ 2 ] 薛培源, 李星江, 邢健, 等. 中脑黑质 NM-MRI 在帕金森病诊断中的研究及应用进展 [J]. *临床放射学杂志*, 2024, 43(4): 662-665.
- XUE P Y, LI X J, XING J, et al. Research and application progress of NM-MRI in the diagnosis of Parkinson's disease [J]. *J Clin Radiol*, 2024, 43(4): 662-665.
- [ 3 ] 黄潇枫, 盛灵慧, 刘希, 等. MPTP 对小鼠多巴胺能神经元细胞 MN9D 凋亡的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2024, 59(2): 167-171.
- HUANG X F, SHENG L H, LIU X, et al. Effects of MPTP on apoptosis of mouse dopaminergic neuron MN9D cells [J]. *J Zhengzhou Univ Med Sci*, 2024, 59(2): 167-171.
- [ 4 ] GOMEZ-PINILLA F, THAPAK P. Exercise epigenetics is fueled by cell bioenergetics: Supporting role on brain plasticity and cognition [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 220: 43-55.
- [ 5 ] GEORGIU A, DEMETRIU C A, CHRISTOU Y P, et al. Genetic and environmental factors contributing to Parkinson's disease: a case-control study in the Cypriot population [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 1047.
- [ 6 ] MASLIAH E, DUMAOP W, GALASKO D, et al. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes [J]. *Epigenetics*, 2013, 8(10): 1030-1038.
- [ 7 ] QIN H Y, LIU J Y, FANG C L, et al. DNA methylation: The epigenetic mechanism of Alzheimer's disease [J]. *Ibrain*, 2023, 9(4): 463-472.
- [ 8 ] HUDSON J, FARKAS L. Epigenetic regulation of endothelial dysfunction and inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12098.
- [ 9 ] BROOM L, MARINOVA-MUTAFCHIEVA L, SADEGHIAN M, et al. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(5): 633-640.
- [ 10 ] SHU L, QIN L, MIN S, et al. Genetic analysis of DNA methylation and hydroxymethylation genes in Parkinson's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 84: 242.e13-242.e16.
- [ 11 ] NIJLAND P G, WITTE M E, VAN HET HOF B, et al. Astroglial PGC-1 $\alpha$  increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 170.
- [ 12 ] ERYILMAZ I E, CECENER G, ERER S, et al. Epigenetic approach to early-onset Parkinson's disease: low methylation status of SNCA and PARK2 promoter regions [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(11): 965-972.
- [ 13 ] SU X, CHU Y, KORDOWER J H, et al. PGC-1 $\alpha$  promoter methylation in Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134087.
- [ 14 ] MARTIN E, BETUING S, PAGÈS C, et al. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1-induced neuroprotection in Huntington's disease: role on chromatin remodeling at the PGC-1 $\alpha$  promoter [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(12): 2422-2434.
- [ 15 ] KUZUMAKI N, SUDA Y, IWASAWA C, et al. Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease [J]. *Brain*, 2019, 142(6): 1675-1689.
- [ 16 ] WU T T, LIU T, LI X, et al. TET2-mediated Cdkn2A DNA hydroxymethylation in midbrain dopaminergic neuron injury of Parkinson's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(8): 1239-1252.
- [ 17 ] SONG H, CHEN J, HUANG J, et al. Epigenetic modification in Parkinson's disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1123621.
- [ 18 ] ZHANG M, WANG W, YE Q, et al. Histone deacetylase inhibitors VPA and WT161 ameliorate the pathological features and cognitive impairments of the APP/PS1 Alzheimer's disease mouse model by regulating the expression of APP secretases [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2024, 16(1): 15.
- [ 19 ] SUGENO N, JÄCKEL S, VOIGT A, et al.  $\alpha$ -Synuclein enhances histone H3 lysine-9 dimethylation and H3K9me2-dependent transcriptional responses [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36328.
- [ 20 ] WHITTLE N, MAURER V, MURPHY C, et al. Enhancing dopaminergic signaling and histone acetylation promotes long-term rescue of deficient fear extinction [J]. *Transl Psychiatry*, 2016, 6(12): e974.
- [ 21 ] SINGH R, RATHORE A S, DILNASHIN H, et al. HAT and HDAC: enzyme with contradictory action in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 6(4): 6.
- [ 22 ] GEBREMEDHIN K G, RADEMACHER D J. Histone H3 acetylation in the postmortem Parkinson's disease primary motor cortex [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 627: 121-125.
- [ 23 ] MITTAL S, BJØRNEVIK K, IM D S, et al.  $\beta$ 2-Adrenoreceptor is a regulator of the  $\alpha$ -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease [J]. *Science*, 2017, 357(6354): 891-898.
- [ 24 ] ZHANG Z, WANG R, ZHOU H, et al. Inhibition of EHMT1/2 rescues synaptic damage and motor impairment in a PD mouse model [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 128.
- [ 25 ] LIU Y, LU Z. Long non-coding RNA NEAT1 mediates the toxic of Parkinson's disease induced by MPTP/MPP+ via regulation of gene expression [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(8): 841-848.
- [ 26 ] KABARIA S, CHOI D C, CHAUDHURI A D, et al. Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances  $\alpha$ -synuclein expression in Parkinson's disease [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(3): 319

- 325.
- [27] ZHANG Z, CHENG Y. MiR-16-1 promotes the aberrant  $\alpha$ -synuclein accumulation in parkinson disease via targeting heat shock protein 70 [J]. *Sci World J*, 2014, 2014: 938348.
- [28] NIU M, XU R, WANG J, et al. MiR-133b ameliorates axon degeneration induced by MPP (+) *via* targeting RhoA [J]. *Neuroscience*, 2016, 325: 39-49.
- [29] YAN W, CHEN Z Y, CHEN J Q, et al. LncRNA NEAT1 promotes autophagy in MPTP-induced Parkinson's disease through stabilizing PINK1 protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1019-1024.
- [30] KIM J, FIESEL F C, BELMONTE K C, et al. MiR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11(1): 55.
- [31] ESPINOZA S, SCARPATO M, DAMIANI D, et al. SINEUP non-coding RNA targeting GDNF rescues motor deficits and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 642-652.
- [32] XIONG R, WANG Z, ZHAO Z, et al. MicroRNA-494 reduces DJ-1 expression and exacerbates neurodegeneration [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(3): 705-714.
- [33] SANG Q, LIU X, WANG L, et al. CircSNCA downregulation by pramipexole treatment mediates cell apoptosis and autophagy in Parkinson's disease by targeting miR-7 [J]. *Aging*, 2018, 10(6): 1281-1293.
- [34] MAGEE R, LONDIN E, RIGOUTSOS I. TRNA-derived fragments as sex-dependent circulating candidate biomarkers for Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 65: 203-209.
- [35] KIM W, LEE Y, MCKENNA N D, et al. MiR-126 contributes to Parkinson's disease by dysregulating the insulin-like growth factor/phosphoinositide 3-kinase signaling [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(7): 1712-1721.
- [36] DONG Y, HAN L L, XU Z X. Suppressed microRNA-96 inhibits iNOS expression and dopaminergic neuron apoptosis through inactivating the MAPK signaling pathway by targeting CACNG5 in mice with Parkinson's disease [J]. *Mol Med*, 2018, 24(1): 61.
- [37] WU Y Y, CHIU F L, YEH C S, et al. Opportunities and challenges for the use of induced pluripotent stem cells in modelling neurodegenerative disease [J]. *Open Biol*, 2019, 9(1): 180177.
- [38] LIN Q, HOU S, DAI Y, et al. LncRNA HOTAIR targets miR-126-5p to promote the progression of Parkinson's disease through RAB3IP [J]. *Biol Chem*, 2019, 400(9): 1217-1228.
- [39] WU Y Y, KUO H C. Functional roles and networks of non-coding RNAs in the pathogenesis of neurodegenerative diseases [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 49.
- [40] MAZO C E, MIRANDA E R, SHADIOW J, et al. High intensity acute aerobic exercise elicits alterations in circulating and skeletal muscle tissue expression of neuroprotective exerkines [J]. *Brain Plast*, 2022, 8(1): 5-18.
- [41] SACHELI M A, NEVA J L, LAKHANI B, et al. Exercise increases caudate dopamine release and ventral striatal activation in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2019, 34(12): 1891-1900.
- [42] DANIELE S, COSTA B, PIETROBONO D, et al. Epigenetic modifications of the  $\alpha$ -synuclein gene and relative protein content are affected by ageing and physical exercise in blood from healthy subjects [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3740345.
- [43] CHEN Y C, LIAW Y C, NFOR O N, et al. Epigenetic regulation of Parkinson's disease risk variant GPNMB cg17274742 methylation by sex and exercise from Taiwan Biobank [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15(5): 1235840.
- [44] SELLAMI M, BRAGAZZI N, PRINCE M S, et al. Regular, intense exercise training as a healthy aging lifestyle strategy: preventing DNA damage, telomere shortening and adverse DNA methylation changes over a lifetime [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 652497.
- [45] XU M, ZHU J, LIU X D, et al. Roles of physical exercise in neurodegeneration; reversal of epigenetic clock [J]. *Transl Neurodegener*, 2021, 10(1): 30.
- [46] QIAN P, WANG S, ZHANG T, et al. Transcriptional expression of histone acetyltransferases and deacetylases during the recovery of acute exercise in mouse hippocampus [J]. *J Mol Neurosci*, 2024, 74(2): 34.
- [47] LI D, JIA J, ZENG H, et al. Efficacy of exercise rehabilitation for managing patients with Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(10): 2175-2188.
- [48] DE MEIRELES L C F, BERTOLDI K, CECHINEL L R, et al. Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 634: 19-24.
- [49] FRAGA I, WEBER C, GALIANO W B, et al. Effects of a multimodal exercise protocol on functional outcomes, epigenetic modulation and brain-derived neurotrophic factor levels in institutionalized older adults; a quasi-experimental pilot study [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12): 2479-2485.
- [50] LAVRATTI C, DORNELES G, POCHMANN D, et al. Exercise-induced modulation of histone H4 acetylation status and cytokines levels in patients with schizophrenia [J]. *Physiol Behav*, 2017, 168: 84-90.
- [51] OLIVEIRA G S, IRACI L, PINHEIRO G S, et al. Effect of exercise and grape juice on epigenetic modulation and functional outcomes in PD: a randomized clinical trial [J]. *Physiol Behav*, 2020, 227: 113135.
- [52] WANG Y, PU Z, ZHANG Y, et al. Exercise training has a protective effect in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mice model with improved neural and intestinal

- pathology and modified intestinal flora [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 439: 114240.
- [53] 梁艺烜. 有氧运动通过循环 microRNA 靶向轴突引导通路改善帕金森病的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2022. LIANG Y H. Mechanism of aerobic exercise improving Parkinson's disease through circulating microRNA targeting axon guidance pathway [D]. Changchun: Jilin University, 2022.
- [54] WANG Y, WEN Q, CHEN R, et al. Iron-inhibited autophagy via transcription factor ZFP27 in Parkinson's disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(22): 3614-3627.
- [55] LIU J, WU M, FENG G, et al. Downregulation of LINC00707 promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating DKK1 via targeting miR-103a-3p [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(3): 1029-1038.
- [56] DA SILVA F C, RODE M P, VIETTA G G, et al. Expression levels of specific microRNAs are increased after exercise and are associated with cognitive improvement in Parkinson's disease [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2): 618.
- [57] PATIL K S, BASAK I, DALEN I, et al. Combinatory microRNA serum signatures as classifiers of Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 64: 202-210.
- [58] 张烨君, 李倩, 娄展, 等. MiR-299-5p 靶向 SP1 对帕金森模型细胞凋亡的作用及机制 [J]. *贵州医科大学学报*, 2023, 48(5): 515-526. ZHANG Y J, LI Q, LOU Z, et al. Effect of miR-299-5p targeting SP1 on apoptosis of Parkinson's model cells and its mechanism [J]. *J Guizhou Med Univ*, 2023, 48(5): 515-526.
- [59] CAI Y, WANG M, ZONG Y, et al. Demethylation of miR-299-5p by aerobic exercise relieves insulin resistance in the vascular endothelium by repressing resistin [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2023, 195: 110176.
- [60] CHATTERJEE P, ROY D. Comparative analysis of RNA-Seq data from brain and blood samples of Parkinson's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 557-564.
- [61] LI D, WANG P, WEI W, et al. Serum microRNA expression patterns in subjects after the 5-km exercise are strongly associated with cardiovascular adaptation [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 755656.
- [62] ZHANG Z, WU Z, HU S, et al. Identification of serum microRNA alterations associated with long-term exercise-induced motor improvements in patients with Parkinson disease [J]. *Medicine*, 2024, 103(13): e37470.
- [63] BOHUSH A, NIEWIADOMSKA G, FILIPEK A. Role of mitogen activated protein kinase signaling in Parkinson's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2973.
- [64] HU S, MAO G, ZHANG Z, et al. MicroRNA-320c inhibits development of osteoarthritis through downregulation of canonical Wnt signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 228: 242-250.

〔收稿日期〕2024-05-13

马驰远,王新志,刘向哲,等.小胶质细胞胞葬在阿尔茨海默病中的作用研究进展[J].中国比较医学杂志,2024,34(11):163-168.

Ma CY, Wang XZ, Liu XZ, et al. Research progress on the role of microglia efferocytosis in Alzheimer's disease [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 163-168.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.020

# 小胶质细胞胞葬在阿尔茨海默病中的作用研究进展

马驰远<sup>1,2</sup>,王新志<sup>1</sup>,刘向哲<sup>1</sup>,韩珍珍<sup>3</sup>,郭明<sup>4</sup>,刘昊飞<sup>1</sup>,李潇<sup>5\*</sup>

(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 450000;  
3.郑州市金水区总医院,郑州 450000;4.郑州市未来路街道养老中心,郑州 450000;  
5.河南中医药大学,郑州 450046)

**【摘要】** 小胶质细胞胞葬作用是指小胶质细胞吞噬受损和死亡细胞的过程,具有抗炎和促损伤修复的作用。最新研究表明,小胶质细胞胞葬在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)病理过程中发挥重要作用,可能是治疗AD的新靶标。因此本文综述了小胶质细胞胞葬与AD病理机制的关系以及胞葬相关分子作为AD治疗靶标的潜力,以期AD的治疗提供新思路和新方法。

**【关键词】** 小胶质细胞;胞葬;阿尔茨海默病;认知障碍;神经炎症

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0163-06

## Research progress on the role of microglia efferocytosis in Alzheimer's disease

MA Chiyuan<sup>1,2</sup>, WANG Xinzhì<sup>1</sup>, LIU Xiangzhe<sup>1</sup>, HAN Zhenzhen<sup>3</sup>, GUO Ming<sup>4</sup>, LIU Haofei<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>5\*</sup>

(1. Department of Brain Disease Center, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. Zhengzhou Jinshui District General Hospital, Zhengzhou 450000. 4. Zhengzhou Weilai Road Street Elder Care Center, Zhengzhou 450000. 5. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

**【Abstract】** Microglia efferocytosis, the process by which microglia phagocytose damaged and dead cells, has anti-inflammatory and pro-damage repair effects. Recent studies have shown that microglia efferocytosis plays a crucial role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) and may be a novel therapeutic target for AD. This paper reviews the relationship between microglia efferocytosis and AD pathogenesis and the potential of using efferocytosis-related molecules as therapeutic targets for AD. The aim of this review is to provide new ideas and approaches for the treatment of AD.

**【Keywords】** microglia; efferocytosis; Alzheimer's disease; cognitive impairment; neuroinflammation

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

**【基金项目】** 中医药传承与创新“百千万”人才工程(岐黄工程)-国家中医药领军人才支持计划(国中医药人教发[2018]12号);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(豫卫中医函[2021]8号);河南省科技攻关项目(242102311277);国家资助博士后研究人员计划(GZC20240442);河南省自然科学基金(232300420271);河南省中医药科学研究专项(2022JDZX116)。

**【作者简介】** 马驰远(1990—),男,硕士,主治医师,研究方向:中医药防治脑血管疾病的研究。E-mail:634605009@qq.com

**【通信作者】** 李潇(1993—),女,博士,讲师,研究方向:针灸的神经调节机制研究。E-mail:lslslixiao@126.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以认知障碍为主要症状的老年神经退行性疾病, 以细胞外  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid- $\beta$ , A $\beta$ ) 斑块和细胞内微管蛋白形成的神经纤维缠结为主要病理特征<sup>[1-2]</sup>。随着人口老龄化进程的加快, AD 病例数量呈指数级增长, 给患者家庭和社会带来了巨大负担<sup>[3]</sup>。由于 AD 的病理机制尚不明确, 仍未找到有效改善 AD 后期认知障碍的方法, 且临床上用于治疗 AD 的一线药物易导致诸多不良反应<sup>[4-5]</sup>。因此, 进一步探索 AD 的病理机制并寻找新的干预靶点是医学领域面临的重大挑战, 同时也是当前人类社会的迫切需要。

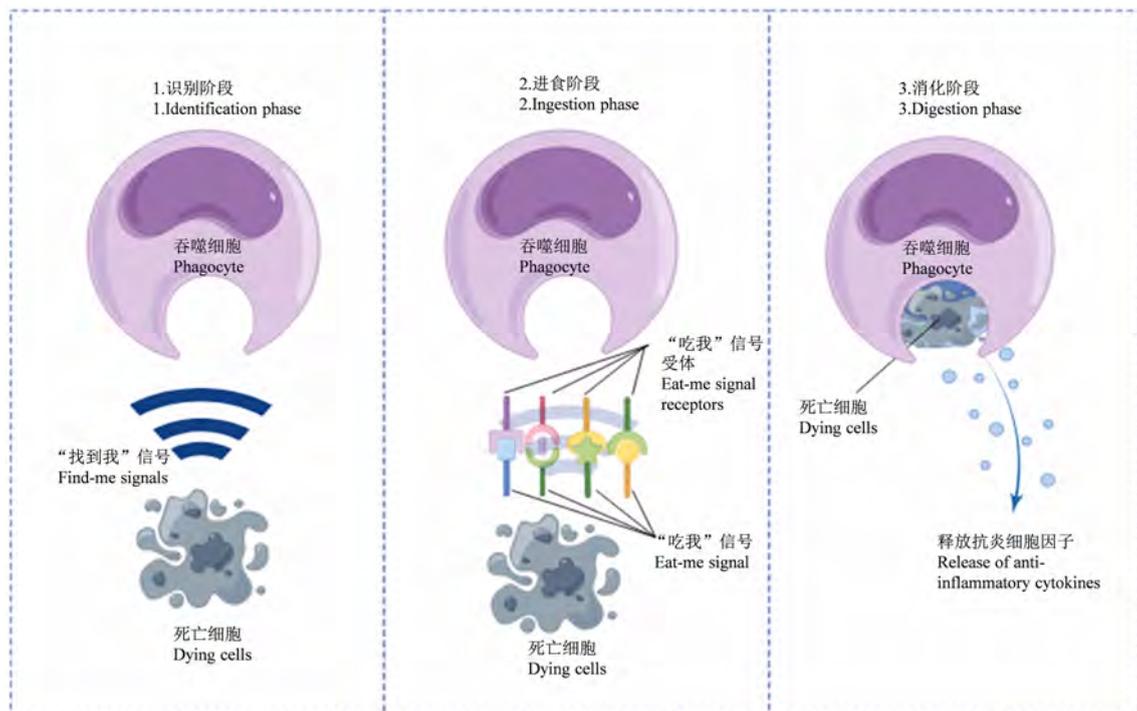
小胶质细胞作为中枢神经系统的“专职”吞噬细胞<sup>[6-7]</sup>, 是 AD 病理过程的关键参与者<sup>[8-9]</sup>。活化的小胶质细胞表现为两种功能相反的表型, M1 促炎表型释放炎症介质并诱导炎症和神经毒性, 而 M2 抗炎表型通过发挥吞噬和抗炎作用保护神经细胞<sup>[10-11]</sup>。小胶质细胞吞噬作用的一个重要功能就是通过胞葬作用清除死亡细胞<sup>[12]</sup>, 以防止细胞继发性坏死和细胞内容物释放引起的炎症反应<sup>[13-14]</sup>。

近年来, 越来越多的研究表明小胶质细胞胞葬 (microglial efferocytosis, ME) 在 AD 病理过程中发挥重要作用, 因此从胞葬的角度探讨 AD 的发生发展过程有助于进一步阐明 AD 的病理机制, 并为临床治疗提供新思路。

## 1 胞葬概述

胞葬是指巨噬细胞吞噬受损和死亡细胞的过程<sup>[15-16]</sup>。与吞噬细胞对病原体的吞噬作用不同, 胞葬不仅是一种碎片清理机制, 还具有抗炎作用, 对于维持组织稳态和促进损伤修复具有重要意义<sup>[13-14, 17]</sup>。这是由于人体每天大约有超过 3000 亿个细胞死亡<sup>[18]</sup>, 巨噬细胞通过胞葬作用迅速清除这些死亡细胞, 能有效防止死亡细胞及其释放的细胞内损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs) 引起机体免疫反应<sup>[14]</sup>。

胞葬过程大致可分为 3 个关键阶段 (图 1): (1) 识别阶段, 凋亡细胞通过释放可溶性介质发出“发现我 (find-me)”信号, 以募集吞噬细胞; 与此同时, 这些可溶性介质能调节吞噬细胞的细胞骨架, 并上



注: 1. 识别阶段: 吞噬细胞识别死亡细胞释放的“find-me”信号; 2. 进食阶段: 吞噬细胞识别死亡细胞释放的“eat-me”信号; 3. 消化阶段: 吞噬细胞消化死亡细胞的同时释放抗炎介质。

图 1 胞葬的 3 个关键阶段 (由 Figdraw 绘制)

Note. 1. Identification phase, Phagocytes recognise the “find-me” signal released by dying cells. 2. Ingestion phase, Phagocytes recognise the “eat-me” signal released by dying cells. 3. Digestion phase, Phagocytes digest dying cells, releasing anti-inflammatory mediators.

Figure 1 Three key stages of efferocytosis (By Figdraw)

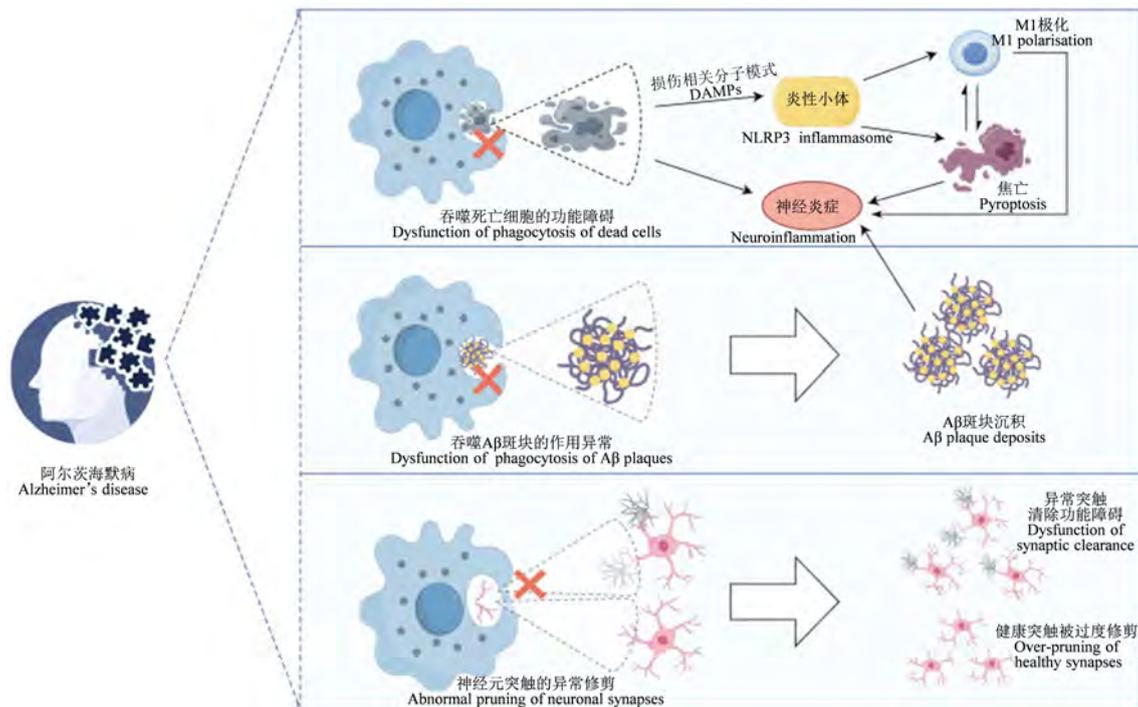
调吞噬受体和激活胞葬信号,为进食和消化阶段做准备<sup>[19]</sup>。(2) 进食阶段,死亡细胞表面暴露的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)等释放“吃我(eat-me)”信号,被吞噬细胞上的 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白结构域蛋白 4(T cell Ig and mucin domain, TIM-4)、脑组织特异性血管生成抑制因子 1(brain-specific angiogenesis inhibitor 1, BAI1)等受体识别,从而触发吞噬信号,引起细胞骨架的相应变化<sup>[14]</sup>。同时,活跃健康的细胞通过释放白细胞分化抗原 47(cluster of differentiation 47, CD47)、分化抗原 31(cluster of differentiation 31, CD31)等“别吃我(do not eat-me)”信号,以避免被巨噬细胞吞噬<sup>[20]</sup>。(3) 消化阶段:死亡细胞被吞噬细胞识别和吞噬后,细胞碎片等凋亡物质会极大增加巨噬细胞免疫代谢压力,因此吞噬细胞通过加强胆固醇代谢和促进前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、白细胞介素-10(interleukin, IL-10)等抗炎介质释放<sup>[7,14,21]</sup>增强对细胞内容物的降解作用。在胞葬的各阶段中,凋亡细胞和吞噬细胞通过细胞间通讯作用协同清除凋亡细胞,以促进炎症消退和组织修复<sup>[14]</sup>。

## 2 ME 功能障碍和 AD

### 2.1 ME 失调导致 AD 神经炎症

在 AD 的病理过程中,持续的神经炎症会导致突触异常修剪或丢失,造成认知能力损害<sup>[11]</sup>。同时,神经炎症还会引起小胶质细胞 M2 极化和吞噬功能被抑制,并促进促炎细胞因子释放,最终进一步加剧神经炎症<sup>[22-23]</sup>,造成神经元和突触损失<sup>[11,24-25]</sup>。在这一复杂的病理过程中,小胶质细胞是重要的触发者和参与者,其不同阶段、不同激活状态下对 AD 的进展具有不同的影响<sup>[11,24]</sup>。

ME 通过清除死亡细胞促进小胶质细胞向 M2 抗炎表型极化,从而释放抗炎细胞因子、营养因子等,发挥抗炎作用,加速组织修复<sup>[15,20,26]</sup>,是促进炎症消退的重要机制<sup>[15,27]</sup>。ME 功能障碍会造成大量受损和死亡细胞在组织中积累,这些细胞碎片本身能作为内源性因子刺激免疫系统,能促进炎症反应;另外,未清除的死亡细胞释放大量 DAMPs 以及核蛋白(如 HMGB1)<sup>[14]</sup>, DAMPs 通过激活 NLRP3 炎症体<sup>[28]</sup>造成小胶质细胞 M1 极化/焦亡恶性循环,进一步加剧炎症反应(图 2),导致脑稳态失调和



注:ME 功能障碍通过导致神经炎症、A $\beta$  斑块沉积和神经元突触异常修剪,参与 AD 的病理机制。

图 2 ME 功能障碍与 AD 病理机制密切相关(由 Figdraw 绘制)

Note. ME dysfunction is involved in the pathomechanism of AD by causing neuroinflammation, A $\beta$  plaque deposition and abnormal pruning of neuronal synapses.

Figure 2 ME dysfunction is closely related to the pathological mechanism of AD(By Figdraw)

神经变性<sup>[29]</sup>。因此,ME 是 AD 神经炎症的潜在治疗靶点。

## 2.2 ME 功能障碍导致 A $\beta$ 斑块沉积

髓样细胞触发受体 2 (triggering receptor on myeloid cells 2, TREM2) 是一种先天性免疫受体,其表达水平与神经炎症和 AD 发病风险密切相关<sup>[30-32]</sup>。TREM2 能促进小胶质细胞发挥吞噬功能,在胞葬中发挥关键作用<sup>[33-35]</sup>。有研究表明, TREM2 的水平降低会损害小胶质细胞对 A $\beta$  的吞噬作用,从而导致 A $\beta$  沉积和神经炎症<sup>[24,36]</sup>,诱导 APP/PS1 小鼠的认知功能障碍<sup>[24]</sup>(图 2)。而增强 TREM2 信号传导可以恢复小胶质细胞/巨噬细胞的吞噬能力<sup>[35]</sup>,促进 A $\beta$  的清除,减少神经炎症<sup>[24,37]</sup>。

此外,ME 功能障碍后,神经炎症也能促使 A $\beta$  斑块的沉积和 tau 蛋白的异常过度磷酸化,进而抑制小胶质细胞的免疫吞噬作用,不仅加重 A $\beta$  斑块和 tau 蛋白聚集,更进一步加重神经炎症,导致 A $\beta$  斑块沉积和神经炎症的恶性循环,最终造成认知能力损害<sup>[11]</sup>。

## 2.3 ME 功能障碍导致突触的异常修剪

ME 的另一个重要作用是修剪不活跃神经元的突触<sup>[38]</sup>以优化神经回路和神经网络的工作效率<sup>[13]</sup>。ME 功能障碍可引起健康突触的过度修剪和异常突触清除功能障碍(图 2),这是 AD 的重要病理特征<sup>[13,39]</sup>。有研究表明,这种突触修剪机制同样由死亡细胞发出的“find me”<sup>[40]</sup>、“eat-me”<sup>[41]</sup>和“do not eat-me”<sup>[38]</sup>信号介导<sup>[13]</sup>,表明 ME 在 AD 认知障碍中发挥重要作用。

## 3 靶向 ME 治疗 AD 的潜在靶点

### 3.1 靶向“识别阶段”

磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是由凋亡细胞释放的“find-me”信号,与 A $\beta$  沉积、过度 tau 磷酸化水平呈负相关性,可作为 AD 治疗的靶点<sup>[3]</sup>。CX3CR1 在小胶质细胞中高度表达,其配体 CX3CL1 由神经元表达<sup>[42]</sup>,具有神经保护和神经营养作用;CX3CR1/CX3CL1 信号通过介导小胶质细胞和神经元通讯调节 ME 对突触的修剪作用<sup>[43]</sup>,在 AD 病理机制中发挥重要作用,也可作为“识别阶段”的治疗靶点。另外,在细胞凋亡的早期阶段,三磷酸腺苷(ATP)和三磷酸尿苷(UTP)释放后向吞噬细胞上的 P2Y2 受体发送信号,并引导巨噬细胞迁移,因此 P2Y2 受体能通过促进胞葬发挥保护作用

用<sup>[14,44]</sup>。在 AD 中,P2Y2 能刺激 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 的降解和摄取<sup>[45]</sup>,并参与调节小胶质细胞对死亡神经元的清除。

### 3.2 靶向“进食阶段”

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是促进突触修剪的“eat-me”信号分子,通常在凋亡或损伤细胞的树突上表达<sup>[41,43]</sup>。TREM2 是小胶质细胞上的细胞表面受体,能促进突触修剪。TREM2 可以通过识别并靶向消除 PS 调控突触的修剪<sup>[43]</sup>,因此可作为靶向“进食阶段”的治疗靶点。CD31 又称血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM1),是一种“do not eat-me”信号分子,通过调控 APOE4 参与 AD 的发病机制<sup>[46]</sup>;CD47 也是一种“do not eat-me”信号分子,在 AD 海马中的表达水平显著升高,且与磷酸化 tau 蛋白共表达<sup>[47]</sup>,因此 CD31 和 CD47 也可作为靶向“进食阶段”的治疗靶点。此外,细胞外信号调节激酶 5 (extracellular signal regulated kinase, ERK5)能同时增加“eat-me”和“find-me”信号分子的表达,并能促进 M2 极化<sup>[48]</sup>,因此是 AD 等神经退行性疾病的潜在治疗靶点。

### 3.3 靶向“消化阶段”

死亡细胞被吞噬细胞识别和吞噬后,吞噬细胞主要通过加强胆固醇代谢和促进抗炎介质释放加快对细胞内容物的降解作用。胆固醇转运蛋白 ATP 结合盒转运子 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)是在胞葬后期“消化阶段”中起重要作用的蛋白,能促进胆固醇流出,并受 BAI1/ELMO1/Rac1 途径的调控<sup>[7,14]</sup>。此外,ABCA1 与 ANXA1、MEGF10、GULP1 等分子之间也存在反馈轴<sup>[49]</sup>。已有研究表明,过表达 ABCA1 有利于维持 AD 胆固醇稳态和外周动脉血管的正常功能,保持血脑屏障的完整性,并最终防止 AD<sup>[50]</sup>。因此,ABCA1、BAI1/ELMO1/Rac1 途径以及 ANXA1、MEGF10、GULP1 是靶向“消化阶段”治疗 AD 的潜在靶标。

## 4 展望

由于 AD 的病理机制尚不明确,目前仍未找到安全高效的治疗方法<sup>[51-52]</sup>,AD 已成为全球范围内亟待解决的医疗难题。近年来,随着国内外对胞葬分子机制的深入研究,为 AD 的治疗提供了许多新思路。因此,本文综述了 ME 的 3 个关键阶段、ME

与 AD 病理机制的关系以及 ME 识别阶段、进食阶段和消化阶段的相关分子作为 AD 治疗靶标的潜力。在今后的研究中,应继续以 ME 为切入点,深入研究 AD 的病理机制和干预靶点,以发掘治疗 AD 的新方法和新靶标。

#### 参考文献:

- [ 1 ] JUCKER M, WALKER L C. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention [J]. *Cell*, 2023, 186(20): 4260-4270.
- [ 2 ] GUSTAVSSON A, NORTON N, FAST T, et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(2): 658-670.
- [ 3 ] CUSTODIA A, ROMAUS-SANJURJO D, ARAMBURU-NÚÑEZ M, et al. Ceramide/sphingosine 1-phosphate axis as a key target for diagnosis and treatment in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8082.
- [ 4 ] REARDON S. FDA approves Alzheimer's drug lecanemab amid safety concerns [J]. *Nature*, 2023, 613(7943): 227-228.
- [ 5 ] VAN DYCK C H, SWANSON C J, AISEN P, et al. Lecanemab in early Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(1): 9-21.
- [ 6 ] MÁRQUEZ-ROPERO M, BENITO E, PLAZA-ZABALA A, et al. Microglial corpse clearance: lessons from macrophages [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 506.
- [ 7 ] MORIOKA S, MAUERÖDER C, RAVICHANDRAN K S. Living on the edge: efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology [J]. *Immunity*, 2019, 50(5): 1149-1162.
- [ 8 ] SARLUS H, HENEKA M T. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3240-3249.
- [ 9 ] LEPIARZ-RABA I, GBADAMOSI I, FLOREA R, et al. Metabolic regulation of microglial phagocytosis: Implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. *Transl Neurodegener*, 2023, 12(1): 48.
- [ 10 ] GUO S, WANG H, YIN Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 815347.
- [ 11 ] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [ 12 ] HALL-ROBERTS H, DANIEL E D, JAMES W S, et al. *In vitro* quantitative imaging assay for phagocytosis of dead neuroblastoma cells by iPSC-Macrophages [J]. *J Vis Exp*, 2021, 168: e62217.
- [ 13 ] ROMERO-MOLINA C, GARRETTI F, ANDREWS S J, et al. Microglial efferocytosis: Diving into the Alzheimer's disease gene pool [J]. *Neuron*, 2022, 110(21): 3513-3533.
- [ 14 ] POON I K H, RAVICHANDRAN K S. Targeting efferocytosis in inflammaging [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2024, 64: 339-357.
- [ 15 ] ZHANG G, LI Q, TAO W, et al. Sigma-1 receptor-regulated efferocytosis by infiltrating circulating macrophages/microglial cells protects against neuronal impairments and promotes functional recovery in cerebral ischemic stroke [J]. *Theranostics*, 2023, 13(2): 543-559.
- [ 16 ] RAZI S, YAGHMOORIAN KHOJINI J, KARGARIJAM F, et al. Macrophage efferocytosis in health and disease [J]. *Cell Biochem Funct*, 2023, 41(2): 152-165.
- [ 17 ] SHI H, MOORE M P, WANG X, et al. Efferocytosis in liver disease [J]. *JHEP Rep*, 2024, 6(1): 100960.
- [ 18 ] MA L, CHEN C, LIU D, et al. Apoptotic extracellular vesicles are metabolized regulators nurturing the skin and hair [J]. *Bioact Mater*, 2023, 19: 626-641.
- [ 19 ] MEHROTRA P, RAVICHANDRAN K S. Drugging the efferocytosis process: concepts and opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(8): 601-620.
- [ 20 ] BOADA-ROMERO E, MARTINEZ J, HECKMANN B L, et al. The clearance of dead cells by efferocytosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 398-414.
- [ 21 ] MORIOKA S, PERRY J S A, RAYMOND M H, et al. Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release [J]. *Nature*, 2018, 563(7733): 714-718.
- [ 22 ] HUANG Y, LI X, LUO G, et al. Pyroptosis as a candidate therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 996646.
- [ 23 ] ZHAO R. Exercise mimetics: a novel strategy to combat neuroinflammation and Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 40.
- [ 24 ] AL-GHRAIYBAH N F, WANG J, ALKHALIFA A E, et al. Glial cell-mediated neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10572.
- [ 25 ] MEGUR A, BALTRUKIENĖ D, BUKELSKIENĖ V, et al. The microbiota-gut-brain axis and Alzheimer's disease: neuroinflammation is to blame? [J]. *Nutrients*, 2020, 13(1): 37.
- [ 26 ] NAKAHASHI-ODA C, FUJIYAMA S, NAKAZAWA Y, et al. CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke [J]. *Sci Immunol*, 2021, 6(64): eabe7915.
- [ 27 ] DORAN A C, YURDAGUL A Jr, TABAS I. Efferocytosis in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(4): 254-267.
- [ 28 ] YANG Y, WANG H, KOUADIR M, et al. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 128.
- [ 29 ] ZHAO J, ZHANG W, WU T, et al. Efferocytosis in the central nervous system [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 773344.
- [ 30 ] POPESCU A S, BUTLER C A, ALLENDORF D H, et al. Alzheimer's disease-associated R47H TREM2 increases, but wild-type TREM2 decreases, microglial phagocytosis of

- synaptosomes and neuronal loss [J]. *Glia*, 2023, 71(4): 974–990.
- [31] DECZKOWSKA A, WEINER A, AMIT I. The physiology, pathology, and potential therapeutic applications of the TREM2 signaling pathway [J]. *Cell*, 2020, 181(6): 1207–1217.
- [32] KONISHI H, KIYAMA H. Non-pathological roles of microglial TREM2/DAP12: TREM2/DAP12 regulates the physiological functions of microglia from development to aging [J]. *Neurochem Int*, 2020, 141: 104878.
- [33] ZHAO Y, WU X, LI X, et al. TREM2 is a receptor for  $\beta$ -amyloid that mediates microglial function [J]. *Neuron*, 2018, 97(5): 1023–1031.
- [34] WANG X, HE Q, ZHOU C, et al. Prolonged hypernutrition impairs TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development [J]. *Immunity*, 2023, 56(1): 58–77.
- [35] HU M, LIN Y, MEN X, et al. High-salt diet downregulates TREM2 expression and blunts efferocytosis of macrophages after acute ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 90.
- [36] WANG Y, LIN Y, WANG L, et al. TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment *via* PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice [J]. *Aging*, 2020, 12(20): 20862–20879.
- [37] EWERS M, BIECHELE G, SUÁREZ-CALVET M, et al. Higher CSF sTREM2 and microglia activation are associated with slower rates of  $\beta$ -amyloid accumulation [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(9): e12308.
- [38] FAUST T E, GUNNER G, SCHAFFER D P. Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(11): 657–673.
- [39] GRIFFITHS J, GRANT S G N. Synapse pathology in Alzheimer's disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2023, 139: 13–23.
- [40] NONAKA S, NAKANISHI H. Microglial clearance of focal apoptotic synapses [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 707: 134317.
- [41] SCOTT-HEWITT N, PERRUCCI F, MORINI R, et al. Local externalization of phosphatidylserine mediates developmental synaptic pruning by microglia [J]. *EMBO J*, 2020, 39(16): e105380.
- [42] BIVONA G, IEMMOLO M, GHERSI G. CX3CL1 pathway as a molecular target for treatment strategies in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8230.
- [43] CORNELL J, SALINAS S, HUANG H Y, et al. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4): 705–716.
- [44] HONG J, HONG S G, LEE J, et al. Exercise training ameliorates cerebrovascular dysfunction in a murine model of Alzheimer's disease: role of the P2Y2 receptor and endoplasmic reticulum stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 318(6): H1559–H1569.
- [45] MERIGHI S, POLONI T E, TERRAZZAN A, et al. Alzheimer and purinergic signaling: just a matter of inflammation? [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1267.
- [46] ZHANG Z, GAN Q, HAN J, et al. CD31 as a probable responding and gate-keeping protein of the blood-brain barrier and the risk of Alzheimer's disease [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(7): 1027–1041.
- [47] PHONGPREECHA T, GAJERA C R, LIU C C, et al. Single-synapse analyses of Alzheimer's disease implicate pathologic tau, DJ1, CD47, and ApoE [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(51): eabk0473.
- [48] HEO K S, CUSHMAN H J, AKAIKE M, et al. ERK5 activation in macrophages promotes efferocytosis and inhibits atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2014, 130(2): 180–191.
- [49] CHEN W, LI L, WANG J, et al. The ABCA1-efferocytosis axis: a new strategy to protect against atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 518: 1–8.
- [50] LEWANDOWSKI C T, LAHAM M S, THATCHER G R J. Remembering your A, B, C's: Alzheimer's disease and ABCA1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(3): 995–1018.
- [51] YU Y, LV J, MA D, et al. Microglial ApoD-induced NLRC4 inflammasome activation promotes Alzheimer's disease progression [EB/OL]. [2024-03-23]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ame2.12361>.
- [52] 魏玉婷, 朱田田, 苏明莉, 等. D-半乳糖法制备 AD 动物模型的综合总结与初步评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(6): 846–856.
- WEI Y T, ZHU T T, SU M L, et al. Classification and research progress on animal models of Alzheimer's disease prepared by D-galactose [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(6): 846–856.

[收稿日期] 2024-05-06

李磊,袁启东,彭喜涛,等. microRNA 在深静脉血栓形成领域中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 169-176.  
Li L, Yuan QD, Peng XT, et al. Research progress on microRNAs in deep vein thrombosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 169-176.  
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.021

# microRNA 在深静脉血栓形成领域中的研究进展

李磊<sup>1,2</sup>,袁启东<sup>3\*</sup>,彭喜涛<sup>3</sup>,朱瑾<sup>3</sup>,彭俊才<sup>3</sup>,何长海<sup>1,2</sup>,付利晴<sup>1,2</sup>

(1.河南中医药大学第一附属医院周围血管科,郑州 450000;2.河南中医药大学第一临床医学院,郑州 450000;  
3.河南省直第三人民医院,郑州 450000)

**【摘要】** miRNA 是一类内源性 RNA 分子,长度通常为 19~25 个核苷酸,通过识别同源序列并介入转录、翻译或表观遗传过程,来调节基因的表达水平。miRNA 在深静脉血栓形成的发生、发展及治疗中展现出潜在的应用价值。深静脉血栓形成(DVT)是指深静脉腔内的血液异常凝结,阻塞静脉管腔,导致静脉回流障碍,多见于下肢,血栓脱落入肺可引起死亡。本文综述了近年来关于 miRNA 在 DVT 中的多元化作用机制。鉴于通过针对性的治疗手段调节 miRNA 的表达可能对 DVT 的康复具有促进作用,本文还详细讨论了 miRNA 在 DVT 临床诊断和治疗中的潜在应用,旨在为 DVT 领域的临床和基础研究提供有价值的参考。

**【关键词】** 深静脉血栓形成;miRNA;作用机制;生物标志物;治疗

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0169-08

## Research progress on microRNAs in deep vein thrombosis

LI Lei<sup>1,2</sup>, YUAN Qidong<sup>3\*</sup>, PENG Xitao<sup>3</sup>, ZHU Jin<sup>3</sup>, PENG Juncai<sup>3</sup>, HE Changhai<sup>1,2</sup>, FU Liqing<sup>1,2</sup>

(1. Department of Peripheral Vascular Diseases, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China. 2. the First Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000.  
3. the Third People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000)

**【Abstract】** MicroRNAs (miRNAs) comprise a class of endogenous RNA molecules with a typical length of 19~25 nucleotides. They regulate gene expression levels by identifying homologous sequences and intervening in transcription, translation, or epigenetic processes. miRNAs have potential applications in relation to the pathogenesis, progression, and treatment of deep vein thrombosis (DVT). DVT refers to the abnormal coagulation of blood within the lumen of the deep veins, blocking the venous lumen and obstructing the venous return, especially in the lower limbs. Furthermore, detachment of the thrombus and entry into the lungs can lead to death. This article comprehensively reviews recent research findings regarding the diverse mechanisms of action of miRNAs in relation to DVT. Given that the regulation of miRNA expression using targeted therapeutic approaches may promote the recovery of DVT, this article also discusses the potential applications of miRNAs for the clinical diagnosis and treatment of DVT, and aims to provide valuable references and insights for future clinical and basic research in the field of DVT.

**【Keywords】** deep vein thrombosis; miRNA; mechanism of action; biomarker; treatment

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

[作者简介] 李磊(1998—),男,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治周围血管疾病。E-mail:115383352734@163.com

[通信作者] 袁启东(1966—),男,硕士,主任医师,研究方向:中西医结合周围血管疾病临床及实验研究。E-mail:13674979787@163.com

静脉血栓栓塞(venous thromboembolism, VTE)是指在一定条件下,静脉内血液不正常凝结,使血管不完全或完全阻塞的疾病,年发病率为 1~2/1000 人次,是仅次于急性心肌梗死和中风的第三大血管疾病<sup>[1-2]</sup>,主要包括深静脉血栓形成(deep venous thrombosis, DVT)和肺栓塞(pulmonary embolism, PE)。发生在深静脉的 VTE 即为 DVT,典型症状为患侧肢体肿胀、疼痛和活动障碍,如未得到及时有效的治疗,轻者可引起血栓后综合征(post-thrombotic syndrome, PTS),对生活质量造成严重影响甚至残疾,静脉血栓破坏静脉反流,导致慢性深静脉功能障碍,若血栓脱落可造成致死性肺栓塞<sup>[3]</sup>。诊断 DVT 最常用的指标是 D-二聚体试验,但该检查易出现假阳性,特异性较低,临床常联合使用其他凝血标志物。由于缺乏与静脉血栓形成相关的特异性临床体征和非特异性症状,可能造成诊断延迟或不准确,最终导致患者预后不良。长期以来,为减轻与静脉血栓栓塞相关的疾病风险及实现 VTE 的早期准确诊断,寻找一种敏感、可靠的生物标志物至关重要。

微小 RNA(micro-ribonucleic-acid, miRNA)是一种短的内源性非编码 RNA 分子,通过促进 mRNA 的降解或靶向 mRNA 的 3' UTR 来调节基因表达<sup>[4]</sup>。miRNA 具有稳定的分子特性以及多个靶基因相互作用的能力,是主导人类重要生物功能以及细胞间通讯的介质,参与众多分子过程和疾病的发生发展,已被证明能够影响许多重要的生物学过程。miRNA 被包裹到外泌体或微泡中,以稳定的化学结构循环于血清、血浆等体液中,使其具有可检测性<sup>[5]</sup>。miRNA 浓度和表达的变化可以反映疾病的进程,近几年的研究中,作为新的生物标志物的 miRNA 被广泛用于一系列疾病的诊断和预后,包括动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>、心肌梗死<sup>[7]</sup>、缺血性脑卒中<sup>[8]</sup>、肺癌<sup>[9]</sup>、男性不孕症<sup>[10]</sup>、肾疾病<sup>[11]</sup>、关节炎<sup>[12]</sup>等。总之,miRNA 作为一种新兴的蛋白质表达调控者,探究其在 DVT 的发生机制以及通过其寻找新的诊疗方法具有很大的潜力。

## 1 深静脉血栓形成的机制及相关危险因素

1856 年,Virchow 首次将血栓形成的发病机制归纳为血管内皮细胞损伤、血流瘀滞和血液成分异常<sup>[13]</sup>。DVT 发生的病理机制<sup>[14]</sup>涉及静脉血流改变与静脉瓣膜、内皮功能障碍、血细胞募集、凝血活

化、炎症因子、miRNA、细胞因子、趋化因子等多方面。首先,当正常血流受到干扰时,静脉瓣膜的缺氧环境导致内皮细胞活化,内皮中有利于中性粒细胞和单核细胞等血细胞募集的黏附分子表达增加,血栓形成的微环境形成<sup>[15]</sup>。其次,早期血小板在静脉瓣膜窝被募集,参与白细胞的结合和活化,中性粒细胞和单核细胞分别通过中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)的形成和组织因子(tissue factor, TF)的表达,通过内源性和外源性凝血途径激活凝血,同时捕获更多的血细胞,导致血栓的形成和增多<sup>[14,16]</sup>。同时,多种因素均可影响 DVT 的发生发展,诸如纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)等相关分子机制以及免疫学机制<sup>[17]</sup>。危险因素层面,DVT 是由癌症、长期卧床、外科手术、妊娠、口服避孕药等获得性危险因素和易栓症等遗传性危险因素相互作用引发的<sup>[14]</sup>。后天因素,比如吸烟、肥胖、年龄增长也会增加静脉血栓的风险<sup>[18]</sup>。近期的研究中,Lindström 等<sup>[19]</sup>报道了 16 个新的与凝血、抗凝、炎症等因素相关 VTE 易感位点的存在。因此,病理机制、分子机制、免疫学机制等机制与危险因素的协同相互作用,使 DVT 的发生和发展成为可能。

## 2 miRNA 概述

第一个 miRNA 于 1993 年在秀丽隐杆线虫中被发现<sup>[20]</sup>,并于 2000 年在人体内发现<sup>[21]</sup>。miRNA 是一类内源性、长度 19~25 个短核苷酸片段的非编码调控单链 RNA 分子,miRNA 的成熟过程始于细胞核,首先在 RNA 聚合酶 II 中被转录,形成长达数千个核苷酸状如发夹结构的初级 miRNA (pri-miRNA),然后于细胞核内经过微处理器复合物切割生成前体 miRNA (pre-miRNA),而后前体 miRNA 释放到细胞质,经过加工处理生成双链 miRNA,最终成为成熟的 miRNA。成熟的 miRNA 与受体细胞结合参与转录并通过碱基配对与大量的 mRNA 相互作用,在转录后水平上通过抑制翻译或 mRNA 降解来调节基因表达,同时调控多种细胞和分子途径,几乎所有的细胞活动中 miRNA 都可发挥关键作用,参与许多疾病的病理生理,例如细胞的增殖、分化、迁移和凋亡<sup>[22-23]</sup>。特别的是,miRNA 也靶向调控其他非编码 RNA,如长链非编码 RNA (lncRNA) 或环状 RNA (circRNA)<sup>[24]</sup>。相关研究报道,不同的

miRNA 在 DVT 发生后,通过多种细胞和(或)分子间通信,采取不同的调控方式,实现减少血栓形成或促进血栓再通和溶解的目的<sup>[25-26]</sup>。

### 3 miRNA 与深静脉血栓形成

近年来,一系列的研究报道 miRNA 在各种疾病的发生发展以及治疗中都发挥了不可替代的作用,在血管疾病方面,miRNA 在急性心肌梗死和急性缺血性脑卒中的研究占据重要地位,近年来,人们对特异性 miRNA 在 DVT 的作用进行了大量研究,亦逐渐深入。有研究报道,miRNA 能与中性粒细胞、凝血因子、内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和纤溶酶原激活物抑制剂相互作用<sup>[27]</sup>。

#### 3.1 miRNA 通过调控中性粒细胞胞外诱捕网参与血栓病理过程

Laridan 等<sup>[28]</sup>的研究证实,当正常凝血系统的平衡失调,白细胞中数量最丰富的中性粒细胞受到炎症刺激或病原体入侵,进而产生可以捕获和消除病原体的中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)。然而,部分由 DNA 和不同颗粒蛋白构成的 NETs 可能会诱导与炎症和血栓形成相关的促凝反应。NETs 为红细胞、血小板和血小板黏附分子提供了促进血栓形成的支架的同时,还通过中性粒细胞丝氨酸蛋白酶的活性激活内源性和外源性凝血途径。

miRNA 以多种机制促进或抑制 NETs 的生成,而 NETs 作为血栓形成的物质基础之一,由此可以推断,miRNA 可通过调控 NETs 参与血栓的形成或溶解<sup>[29]</sup>。Águila 等<sup>[29]</sup>通过研究 miR-146a 在中性粒细胞胞外陷阱相关死亡(neutrophil extracellular traps-osis, NETosis)中的作用,表明 miR-146a 以未知的机制参与 NETs 的形成,高水平的 miR-146a 可以促进 NETs 的形成,并且 miR-146a 的部分或全部缺失会改变中性粒细胞形成 NETs 的内在能力。Chen 等<sup>[30]</sup>在研究中证实,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的高 miR-505 含量的外泌体与人纯化的中性粒细胞的相互作用增加了体外 NETs 的形成。Jiao 等<sup>[31]</sup>发现,血小板来源的外泌体 miR-15b-5p 和 miR-378a-3p 通过靶向多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)中的磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1(phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)抑制 Akt/mTOR 通路活性,从而通过激活自噬促进 NETs 的形成。前几年,在

鸡模型中有两项关于 miR-1696 和 miR-16-5p 通过相关机制参与 NETs 形成的研究,第一项研究, Yang 等<sup>[32]</sup>发现,miR-1696 通过抑制谷胱甘肽过氧化物酶 3(glutathione peroxidase 3, GPx3),以及有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和活性氧(ROS)的形成,干扰 PI3K/Akt 通路,导致 NETs 的产生。然而,miR-1696 迄今没有证明 GPx3 在哺乳动物的 NET 的形成中起作用的研究。第二项研究中, Yin 等<sup>[33]</sup>在研究中发现,空气污染物硫化氢(H<sub>2</sub>S)上调了 miR-16-5p 的表达,影响了 NETosis 的两个潜在调节因子的表达,即 Raf-1 原癌基因丝氨酸/苏氨酸激酶(RAF1)和磷酸肌醇 3 激酶调控亚基 1(phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)。上述两项研究结果值得进一步研究以揭示 miR-1696 和 miR-16-5p 在哺乳动物中参与 NETs 生成的机制,以便进一步研究 miRNA 在血栓及凝血机制中的作用。Hawez 等<sup>[34]</sup>研究表明,miR-155 可以通过靶向肽酰基精氨酸脱亚胺酶(peptidylarginine deiminase 4, PAD4) mRNA 上的特定位点促进 NETs 的诱导和排出。同时,根据研究结果,miR-155 可作为拮抗急性炎症 NETs 形成的潜在作用靶点。

miRNA 通过不同机制调控 NETs 的生成,从而影响血栓形成,其中特定 miRNA 如 miR-146a、miR-505、miR-15b-5p、miR-378a-3p、miR-1696、miR-16-5p 和 miR-155 显示出在 NETs 形成和血栓机制中的潜在作用。进一步研究 miR-1696 和 miR-16-5p 在哺乳动物中参与 NETs 生成的机制以及 miRNA 在血栓及凝血机制中的广泛作用,对于理解 DVT 的机制及开发新的治疗方法具有重要意义。另外,这些 miRNA 是否会通过影响其他细胞,参与 NETs 的形成,尚需要进一步研究加以证明。

#### 3.2 miRNA 通过调控凝血因子参与血栓病理过程

##### 3.2.1 纤维蛋白原

纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)是一种由肝细胞合成的蛋白质,具有至关重要的凝血功能。其分子量大致为 340 kDa,由 3 对不同的多肽链— $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  链组成。Fg 在血栓形成的过程中扮演着核心角色,作为关键的反应底物,直接参与并推动了血栓形成的重要步骤。研究表明,Fg 和红细胞不仅是静脉血栓形成的主要组成部分和静脉血栓栓塞风险的決定因素,而且还积极参与与静脉血栓栓塞的生理病理,阻断 Fg 与静脉血栓的结合对于减少静脉血栓栓塞

和静脉血栓栓塞相关后遗症的发生率具有很高的潜在治疗价值<sup>[35]</sup>。Fort 等<sup>[36]</sup>通过转染人肝癌细胞系(HuH-7)及 Fg 浓度测定的研究确定了 23 个下调 Fg 产生的 miRNA (hsa-miR-29a、hsa-miR-29c、hsa-miR29b 等)和 4 个上调 Fg 产生的 miRNA (hsa-miR-365、hsa-miR-126、hsa-miR-592 等)。纤维蛋白是由凝血酶作用于 Fg 而形成的,聚合而成血凝块,抗凝血酶(antithrombin, AT)是一种由肝生成的抗酶,能抑制血清中的凝血酶活化,从而防止纤维蛋白的形成<sup>[37]</sup>。Jian 等<sup>[1]</sup>通过构造 DVT 大鼠模型创新性地证实了 miR-200c-3p 靶向 AT 基因 SERPINC1,减少丝氨酸蛋白酶家族 C 成员 1(SERPINC1)的翻译,增强 AT 的活性,从而改善 VTE 的严重程度。

### 3.2.2 组织因子

组织因子(tissue factor, TF),作为一个由 263 个氨基酸残基构成的跨膜单链糖蛋白,通常位于血管壁的外膜细胞之中。一旦血管壁的完整性受到破坏,TF 便会暴露于循环血液中,通过与因子 VII/VIIa 结合而启动凝血级联外部途径发挥生理性凝血作用。Eisenreich 等<sup>[38]</sup>讨论了 miRNA 对 TF 及其同分异构体的产生以及 TF 的生物学功能(如血栓形成)的调节作用。Sahu 等<sup>[39]</sup>基于生物信息学与体内动物模型和人体研究相结合的方法,发现 miR-145 选择性调节 TF 的表达来介导静脉血栓形成(venous thrombosis, VT)的发展,确定了 TF 是 miR-145 的靶基因。研究同时观察到 miR-145 在 VT 患者中的表达水平下降,miR-145 与 TF 的表达水平成反比。目前,许多 miRNA(miR-223、miR-451、miR-19 等)已被证明可调节 TF 表达<sup>[5]</sup>。

### 3.2.3 凝血因子 XI

凝血因子 XI(coagulation factor, FXI),作为一种由肝合成的丝氨酸蛋白酶原,在内源性凝血途径中发挥着关键作用。血栓栓塞性疾病的高发生率与 FXI 的水平升高相关。Nourse 等<sup>[40]</sup>通过观察发现,FXI 是含有 miRNA 数量最多的凝血因子。Salloum-Asfar 等<sup>[41]</sup>观察到,在人肝中,FXI 的表达受一种特异性 miRNA 即 miR-181a-5p 的直接调控,miR-181a-5p 导致 FXI 和 F11 mRNA 水平显著降低。在人类健康的肝中,F11 mRNA 水平与 miR-181a-5p 水平负相关关系明显。同时,近几年研究发现 F11 mRNA 的 3' UTR 被 miR-181a-5p 功能靶向<sup>[40]</sup>。上述两项研究证实了 miRNA 的生物学重要性,说明了 miRNA 翻译后调控可能控制血浆 FXI 活性,FXI 水平升高易

致血栓形成,而 FXI 缺乏的患者可预防 VTE 和缺血性卒中。

综上,miRNA 通过精准调控纤维蛋白原、组织因子和凝血因子 XI 的表达,整体而言,miRNA 在凝血系统的多个部分中起重要调控作用,影响血栓形成和栓塞风险。这些发现解释了部分 miRNA 在凝血机制中所发挥的作用,为 DVT 的预防和治疗提供了新思路、新视角和新靶点。

## 3.3 miRNA 通过调控纤溶酶原激活物抑制剂参与血栓病理过程

纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI)分为 PAI-1 和 PAI-2,PAI-1 在调节血浆纤溶活性方面起主要作用。PAI-1 属于丝氨酸蛋白酶家族,是血管事件进展中的关键蛋白,与动脉血栓形成和静脉血栓形成以及微血管血栓形成有关。PAI-1 通过抑制尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)和组织型纤溶酶原激活剂(tPA)来调节纤溶系统,从而减弱纤溶酶原激活和纤维蛋白降解<sup>[42]</sup>。Karnewar 等<sup>[43]</sup>研究发现,线粒体靶向七叶素通过去乙酰化酶 1 激活改变 miR-19b 和 miR-30c 可显著抑制小鼠模型血清中 PAI-1 水平的升高,减少血管细胞衰老,抑制促炎反应和促血栓形成事件。

尽管目前缺乏大量的证据表明 miRNA 直接调控 PAI-1 的表达,但考虑到 miRNA 在基因表达调控中的广泛作用,以及 PAI-1 在纤溶系统中的重要地位,推测 miRNA 可能通过间接方式影响 PAI-1 的活性或表达水平。这可能需要进一步的研究来揭示具体的作用机制。

## 4 miRNA 在 DVT 中的临床应用

### 4.1 miRNA 有潜力成为 DVT 的生物标志物

生物标志物对于疾病的诊断以及后期监测具有良好的辅助作用,同时有助于了解疾病的病因,探究疾病的发病机制。目前临床上对 DVT 的诊断主要依靠临床症状和各种辅助检查,这些辅助检查包括 D-二聚体检测、彩色多普勒超声、CT 和 MRI 静脉成像以及血管造影,但各有优劣。目前 miRNA 已作为多种疾病(心脑血管疾病、癌症等)的潜在诊断和预后生物标志物<sup>[44]</sup>。miRNA 同样在 DVT 的发生发展中扮演了重要角色,其成为 DVT 诊断方法和评估患者预后的可能性正在被众多学者关注。

Xu 等<sup>[45]</sup>通过对 130 例患者血浆样本 miRNA 的病例对照研究发现,DVT 患者术前和术后样本

中, D-二聚体、miR-125a-5p、miR-223-3p 的血浆水平联合分析可显著提高 DVT 诊断的敏感性、特异性和诊断效果, 具有作为 DVT 诊断指标的潜力。ROC 曲线分析进一步证实, miR-125a-5p 和 miR-223-3p 是诊断 DVT 的良好预测因子。Lu 等<sup>[25]</sup>的研究表明, 受 miRNA-185 控制的晚期糖基化终末产物受体与血管内皮细胞的增殖和凋亡相关。miRNA-185 可以作为一种潜在的生物标志物用于 DVT 的诊断和治疗过程。Anijs 等<sup>[5]</sup>通过总结先前的研究, 得出 miRNA 是改善癌症和非癌症患者 VTE 风险预测的有希望的候选生物标志物的结论。更好地了解 miRNA 如何促进 VTE 和癌症相关静脉血栓形成的发生发展, 有助于发现新的生物标志物。Yang 等<sup>[46]</sup>利用生物信息学及 ROC 曲线分析并通过双荧光素酶报告实验发现, DVT 患者外周血中 miR-181c-5p 表达下调, miR-181c-5p 可以通过负向调节 FBJ 骨肉瘤病毒癌基因 (osteosarcoma oncogene, FOS) 减轻氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的内皮细胞 (endothelial cell, EC) 损伤和血栓形成相关因子的表达, miR-181c-5p 对 DVT 具有较高的临床诊断价值。

综上, 血浆中特定 miRNA 水平联合分析能显著提高 DVT 诊断的准确性, 且特定 miRNA 如 miR-125a-5p、miR-223-3p、miR-181c-5p 等在 DVT 诊断和治疗中显示出潜在价值, 为诊断 DVT 提供了新的候选生物标志物。

#### 4.2 miRNA 有潜力成为 DVT 的治疗靶点

研究发现, 在 DVT 动物模型中, 来源于骨髓的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 通过促进内皮细胞再生、血管再生和血管重建、以旁分泌机制促进血栓溶解、防止血栓的扩散和复发等机制促进深静脉血栓的消退, 再通血管<sup>[47]</sup>。EPCs 可能具有静脉血栓形成的临床转化和靶向细胞治疗的潜力。作为内皮细胞前体细胞的 EPCs, 向外周血迁移并分化为成熟内皮细胞的过程受多种 miRNA 的调控。miRNA 的失调导致 EPCs 的功能障碍, 从而调节 DVT 的发生和发展。

相关实验及临床研究表明, miRNA 通过多种机制介导 EPCs 的迁移、增殖, 参与 DVT 过程, 最终实现减少 EPCs 的迁移、促进内皮细胞再生、血管生成及静脉再通、增强 EPCs 在 DVT 中溶解血栓的能力并显著减少静脉血栓等目标。miRNA 在调节 EPCs 功能中起着至关重要的作用 (见表 1)。

Jin 等<sup>[56]</sup>研究发现, 在 DVT 患者中, miR-195-5p 的表达水平显著上升, 而这种上升与血清 B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma2, Bcl-2) 的表达下调存在明显的关联性。当 miR-195-5p 的表达水平上升时, 会抑制人脐静脉内皮细胞的活力并诱导其凋亡, 但值得注意的是, 提高 Bcl-2 的表达水平可以有效地逆转这种抑制和凋亡现象。miR-195-5p 可能通过调节血管内皮细胞的凋亡参与 DVT 的过程。体内研究表明, 负载 miR-126 的 EPC 衍生的外泌体治疗后, 血栓组织溶解能力和血管再通能力增强<sup>[57]</sup>。在 DVT 动物模型中, 显著促进了血栓的溶解, 以外泌体为载体的 miR-126 调节可能是潜在的治疗 DVT 手段。同样, 在 Du 等<sup>[58]</sup>的研究中, miR-150 通过激活 Akt/FOXO1 并抑制 c-Myb 信号通路影响 EPCs 分化, 从而在体外调节早期内皮祖细胞 (early EPCs, eEPCs) 和内皮克隆形成细胞 (endothelial colony-forming cells, ECFCs) 的功能。在体内, miR-150 转染的 eEPCs 与 ECFCs 共同注射可促进血管再通和血栓溶解。

综上所述, miR-150、miR-195-5p、miR-181c-5p/FOS 轴等 miRNA 有望成为临床治疗 DVT 有价值的治疗靶点, 成为新的治疗选择。同时可为 DVT 治疗方法的开发提供新的方向和实验依据。

#### 5 总结与展望

miRNA 通过调控与血栓形成相关的基因表达, 在 DVT 形成过程中发挥重要作用。研究发现, miRNA 在 DVT 患者与正常人血浆中的表达水平存在显著差异。通过检测血浆中特定 miRNA 的表达水平, 可以为 DVT 的诊断寻找新的思路和方法。通过调控与血栓形成相关的 miRNA 表达, 可能有助于减少 DVT 的发生和发展, 为实现 DVT 的有效治疗提供新的途径。

当前关于 miRNA 在 DVT 形成中的作用机制尚不完全清楚, 可以进一步探讨 miRNA 与 DVT 形成相关的基因、信号通路之间的相互作用关系, 为深入理解 DVT 的发病机理提供新的线索。目前 DVT 的诊断主要依赖于影像学检查和血液学指标检测。未来研究可以进一步探索基于 miRNA 的 DVT 诊断新技术, 提高诊断的准确性和敏感性。例如, 可以开发基于 miRNA 表达谱的 DVT 诊断芯片或试剂盒, 实现快速、便捷的诊断。如今 DVT 的治疗主要依赖于抗凝药物和溶栓药物。将来可以进一步探

表 1 miRNA 在内皮祖细胞中的作用机制及意义

Table 1 Mechanism and significance of miRNA in endothelial progenitor cells

miRNA	作用机制 Mechanism of action	意义 Significance
miR-483-3p <sup>[47]</sup>	靶向血清反应因子。 Target serum reaction factor.	减少 EPCs 的迁移和血管形成, 增强溶栓能力。 Reduce EPCs migration and angiogenesis and enhance thrombolysis.
miR-205 <sup>[48]</sup>	靶向磷酸酶和张力蛋白磷酸酶同源物, 通过 Akt/自噬通路调节基质金属蛋白酶-2 表达。 Targeting phosphatase and tensin homolog; regulation of matrix metalloproteinase-2 expression through Akt/autophagy pathway.	增强 EPCs 功能; 促进血管生成, 减少静脉血栓; 促进静脉再通和血栓溶解。 Enhance EPCs function; promote angiogenesis, reduce venous thrombosis; promote venous recanalization and thrombolysis.
miR-9-5p <sup>[49]</sup>	通过 PI3K/Akt/自噬通路靶向瞬时受体电位离子通道蛋白-7。 Targeting transient receptor potential melastatin-7 through PI3K/Akt/autophagy pathway.	介导 EPCs 细胞的迁移、侵袭、增殖, 加速静脉血栓的消退和血管再通。 Mediate the migration, invasion and proliferation of EPCs cells, accelerate the regression of venous thrombosis and vascular recanalization.
miR-21 <sup>[50]</sup>	靶向 FAS 配体。 Targeted FAS ligand.	调节 EPCs 的增殖和血管生成; 促进血栓溶解和血管再通。 Regulate the proliferation and angiogenesis of EPCs; promote thrombolysis and revascularization.
miR-150 <sup>[51]</sup>	靶向 SRC 激酶信号抑制剂-1。 Targeted SRC kinase signaling inhibitor 1.	促进静脉血栓溶解。 Promote venous thrombolysis.
miR-126 <sup>[52]</sup>	通过 PI3K/Akt 通路直接靶向 PIK3R2 基因。 Target PIK3R2 gene directly through PI3K/Akt pathway.	增强成管能力; 增强血管再通能力; 促进血栓溶解。 Enhance the ability of tube formation; enhance the ability of vascular recanalization; promote thrombolysis.
miR-204-5p <sup>[53]</sup>	靶向 SPRED1。 Target SPRED1.	加速 EPCs 迁移和血管生成; 促进血栓溶解。 Accelerate EPCs migration and angiogenesis; promote thrombolysis.
miR-206 <sup>[54]</sup>	增加缝隙连接基因 $\alpha 1$ 的表达。 Increase the expression of gap junction protein $\alpha 1$ .	抑制 EPCs 自噬, 增强 EPC 的增殖、迁移和血管生成能力; 增加血栓溶解率。 Inhibit EPCs autophagy, enhance the proliferation, migration and angiogenesis of EPC, and increase the rate of thrombolysis.
miR-125a-5p <sup>[26]</sup>	上调髓系细胞白血病-1。 Up-regulation of myeloid cell leukemia sequence 1.	增强 EPCs 迁移和血管生成; 促进血栓溶解。 Strengthen EPCs migration and angiogenesis; promote thrombolysis.
miR-136-5p <sup>[55]</sup>	抑制硫氧还蛋白互作蛋白。 Inhibit the thioredoxin-interacting protein.	促进静脉血栓的溶解。 Stimulate venous thrombolysis.

索基于 miRNA 的 DVT 治疗方法, 为 DVT 的治疗提供新的思路和方法。同时, 也可以探索 miRNA 与其他治疗手段的联合应用, 以提高治疗效果和降低复发率。

总之, miRNA 在深静脉血栓形成领域的研究具有广阔的前景和应用价值。今后应进一步深入探索 miRNA 在 DVT 形成中的具体机制、开发基于 miRNA 的 DVT 诊断新技术和治疗方法等, 为 DVT 的防治提供新的思路 and 手段。

#### 参考文献:

[ 1 ] JIAN X, YANG D, WANG L, et al. Downregulation of microRNA-200c-3p alleviates the aggravation of venous thromboembolism by targeting serpin family C member 1 [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 11156-11168.

[ 2 ] 陈思宇, 但敏, 姜永生. 肿瘤相关静脉血栓栓塞风险评估模型的研究进展 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2024, 53

(3): 409-413.

CHEN S Y, DAN M, JIANG Y S. Research progress of risk assessment models for cancer-associated venous thromboembolism [J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2024, 53(3): 409-413.

[ 3 ] WENGER N, SEBASTIAN T, ENGELBERGER R P, et al. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis: Similar but different [J]. *Thromb Res*, 2021, 206: 88-98.

[ 4 ] BURLACU C C, NEAG M A, MITRE A O, et al. The role of miRNAs in dexmedetomidine's neuroprotective effects against brain disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5452.

[ 5 ] ANIJS R J S, NGUYEN Y N, CANNegiETER S C, et al. MicroRNAs as prognostic biomarkers for (cancer-associated) venous thromboembolism [J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(1): 7-17.

[ 6 ] SHARMA A R, SHARMA G, BHATTACHARYA M, et al. Circulating miRNA in atherosclerosis: a clinical biomarker and early diagnostic tool [J]. *Curr Mol Med*, 2022, 22(3): 250-262.

- [ 7 ] SEARLES C D. MicroRNAs and cardiovascular disease risk [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2024, 26(2): 51–60.
- [ 8 ] 李泓宇, 兰瑞, 付雪琴, 等. miRNA 在缺血性脑卒中神经保护领域的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(11): 110–117.  
LI H Y, LAN R, FU X Q, et al. Progress of research into the roles of miRNA in neuroprotection against ischemic stroke [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(11): 110–117.
- [ 9 ] LOBERA E S, VARELA M A, JIMENEZ R L, et al. miRNA as biomarker in lung cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(11): 9521–9527.
- [ 10 ] FOROUHARI S, MAHMOUDI E, SAFDARIAN E, et al. MicroRNA: a potential diagnosis for male infertility [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(10): 1226–1236.
- [ 11 ] SMITH D A, REDMAN J E, FRASER D J, et al. Identification and detection of microRNA kidney disease biomarkers in liquid biopsies [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2023, 32(6): 515–521.
- [ 12 ] LIU H, YAN L, LI X, et al. MicroRNA expression in osteoarthritis: a meta-analysis [J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23(7): 3737–3749.
- [ 13 ] KYRLE P A, EICHINGER S. Is Virchow's triad complete? [J]. *Blood*, 2009, 114(6): 1138–1139.
- [ 14 ] NAVARRETE S, SOLAR C, TAPIA R, et al. Pathophysiology of deep vein thrombosis [J]. *Clin Exp Med*, 2023, 23(3): 645–654.
- [ 15 ] BRILL A. Multiple facets of venous thrombosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3853.
- [ 16 ] YAO M, MA J, WU D, et al. Neutrophil extracellular traps mediate deep vein thrombosis: from mechanism to therapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1198952.
- [ 17 ] HUANG S L, XIN H Y, WANG X Y, et al. Recent advances on the molecular mechanism and clinical trials of venous thromboembolism [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 6167–6178.
- [ 18 ] 樊剑, 高雪峰, 王振雷, 等. 上海市多中心社区医院门诊患者深静脉血栓风险因素分析及认知水平评估 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2023, 25(12): 1289–1292.  
FAN J, GAO X F, WANG Z L, et al. Risk factors and awareness of deep vein thrombosis among outpatients in Shanghai community hospitals: a multi-center study [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2023, 25(12): 1289–1292.
- [ 19 ] LINDSTRÖM S, WANG L, SMITH E N, et al. Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism [J]. *Blood*, 2019, 134(19): 1645–1657.
- [ 20 ] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [ 21 ] RUVKUN G, REINHART B J, SLACK F J, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906.
- [ 22 ] 李京宇, 陈金铭, 张明一, 等. 犬新孢子虫 miRNAs 的鉴定与分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55(7): 3085–3093.  
LI J Y, CEHN J M, ZHANG M Y, et al. Identification and Analysis of miRNAs of *Neospora caninum* [J]. *Acta Vet Zootech Sin*, 2024, 55(7): 3085–3093.
- [ 23 ] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics; from cells to clinic [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(6): 613–626.
- [ 24 ] ANASTASIADOU E, JACOB L S, SLACK F J. Non-coding RNA networks in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(1): 5–18.
- [ 25 ] LU R, ZHU W, SUN H, et al. Study on the effect and mechanism of miR-185 on lower extremity deep venous thrombosis [J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(3): 330–337.
- [ 26 ] YU J, JIN Y, XU C, et al. Downregulation of miR-125a-5p promotes endothelial progenitor cell migration and angiogenesis and alleviates deep vein thrombosis in mice *via* upregulation of MCL-1 [J]. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(10): 1664–1678.
- [ 27 ] SUNDERLAND N, SKROBLIN P, BARWARI T, et al. MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: the clot thickens [J]. *Circ Res*, 2017, 120(2): 418–435.
- [ 28 ] LARIDAN E, MARTINOD K, DE MEYER S F. Neutrophil extracellular traps in arterial and venous thrombosis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2019, 45(1): 86–93.
- [ 29 ] ÁGUILA S, DE LOS REYES-GARCÍA A M, FERNÁNDEZ-PÉREZ M P, et al. MicroRNAs as new regulators of neutrophil extracellular trap formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2116.
- [ 30 ] CHEN L, HU L, LI Q, et al. Exosome-encapsulated miR-505 from ox-LDL-treated vascular endothelial cells aggravates atherosclerosis by inducing NET formation [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, 51(12): 1233–1241.
- [ 31 ] JIAO Y, LI W, WANG W, et al. Platelet-derived exosomes promote neutrophil extracellular trap formation during septic shock [J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 380.
- [ 32 ] YANG Z, WANG S, YIN K, et al. MiR-1696/GPx3 axis is involved in oxidative stress mediated neutrophil extracellular traps inhibition in chicken neutrophils [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(5): 3688–3699.
- [ 33 ] YIN K, CUI Y, QU Y, et al. Hydrogen sulfide upregulates miR-16-5p targeting PiK3R1 and RAF1 to inhibit neutrophil extracellular trap formation in chickens [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 194: 110412.
- [ 34 ] HAWEZ A, AL-HAIDARI A, MADHI R, et al. MiR-155 regulates PAD4-dependent formation of neutrophil extracellular traps [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2462.
- [ 35 ] ALEMAN M M, WALTON B L, BYRNES J R, et al. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(1): S38–S40.
- [ 36 ] FORT A, BOREL C, MIGLIAVACCA E, et al. Regulation of fibrinogen production by microRNAs [J]. *Blood*, 2010, 116(14): 2608–2615.

- [37] 宋娟娟, 刘柳, 周虎. 抗凝血酶的作用机制及其临床应用的研究进展 [J]. 血栓与止血学, 2023, 29(1): 47-51.  
SONG J J, LIU L, ZHOU H. Research progress on the mechanism of antithrombin and its clinical application [J]. Chin J Thromb Hemostasis, 2023, 29(1): 47-51.
- [38] EISENREICH A, LEPPERT U. The impact of microRNAs on the regulation of tissue factor biology [J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(3): 128-132.
- [39] SAHU A, JHA P K, PRABHAKAR A, et al. MicroRNA-145 impedes *Thrombus* formation *via* targeting tissue factor in venous thrombosis [J]. EBioMedicine, 2017, 26: 175-186.
- [40] NOURSE J, DANCKWARDT S. A novel rationale for targeting FXI: Insights from the hemostatic microRNA targetome for emerging anticoagulant strategies [J]. Pharmacol Ther, 2021, 218: 107676.
- [41] SALLOUM-ASFAR S, TERUEL-MONTOYA R, ARROYO A B, et al. Regulation of coagulation factor XI expression by microRNAs in the human liver [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111713.
- [42] MORROW G B, MUTCH N J. Past, present, and future perspectives of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) [J]. Semin Thromb Hemost, 2023, 49(3): 305-313.
- [43] KARNEWAR S, PULIPAKA S, KATTA S, et al. Mitochondria-targeted esculetin mitigates atherosclerosis in the setting of aging *via* the modulation of SIRT1-mediated vascular cell senescence and mitochondrial function in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. Atherosclerosis, 2022, 356: 28-40.
- [44] WU Y, LI Q, ZHANG R, et al. Circulating microRNAs: biomarkers of disease [J]. Clin Chim Acta, 2021, 516: 46-54.
- [45] XU L, JI C, MIAO X, et al. Combination of Circulating miR-125a-5p, miR-223-3p and D-dimer as a Novel Biomarker for Deep Vein Thrombosis [J]. Am J Med Sci, 2022, 364(5): 601-611.
- [46] YANG F, CHEN D, LIU Y, et al. Overexpression of miR-181c-5p attenuates human umbilical vascular endothelial cell injury in deep vein thrombosis by targeting FOS [J]. Int Heart J, 2023, 64(4): 759-767.
- [47] LI W D, LI X Q. Endothelial progenitor cells accelerate the resolution of deep vein thrombosis [J]. Vascul Pharmacol, 2016, 83: 10-16.
- [48] SUN L L, XIAO L, DU X L, et al. MiR-205 promotes endothelial progenitor cell angiogenesis and deep vein thrombosis recanalization and resolution by targeting PTEN to regulate Akt/autophagy pathway and MMP2 expression [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(12): 8493-8504.
- [49] ZHOU D M, SUN L L, ZHU J, et al. MiR-9 promotes angiogenesis of endothelial progenitor cell to facilitate thrombi recanalization *via* targeting TRPM7 through PI3K/Akt/autophagy pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4624-4632.
- [50] DU X, HONG L, SUN L, et al. MiR-21 induces endothelial progenitor cells proliferation and angiogenesis *via* targeting FASLG and is a potential prognostic marker in deep venous thrombosis [J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 270.
- [51] WANG W, ZHU X, DU X, et al. MiR-150 promotes angiogenesis and proliferation of endothelial progenitor cells in deep venous thrombosis by targeting SRCIN1 [J]. Microvasc Res, 2019, 123: 35-41.
- [52] MENG Q, WANG W, YU X, et al. Upregulation of microRNA-126 contributes to endothelial progenitor cell function in deep vein thrombosis *via* its target PIK3R2 [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(8): 1613-1623.
- [53] DING M, CHI G, LI F, et al. Up-regulated miR-204-5p promoted the migration, invasion, and angiogenesis of endothelial progenitor cells to enhance the thrombolysis of rats with deep venous thrombosis by targeting SPRED1 [J]. Exp Cell Res, 2022, 411(1): 112985.
- [54] LI Y, GE J, YIN Y, et al. Upregulated miR-206 aggravates deep vein thrombosis by regulating GJA1-mediated autophagy of endothelial progenitor cells [J]. Cardiovasc Ther, 2022, 2022: 9966306.
- [55] FENG Y, LEI B, ZHANG H, et al. MicroRNA-136-5p from endothelial progenitor cells-released extracellular vesicles mediates TXNIP to promote the dissolution of deep venous thrombosis [J]. Shock, 2022, 57(5): 714-721.
- [56] JIN J, WANG C, OUYANG Y, et al. Elevated miR-195-5p expression in deep vein thrombosis and mechanism of action in the regulation of vascular endothelial cell physiology [J]. Exp Ther Med, 2019, 18(6): 4617-4624.
- [57] SUN J, ZHANG Z, MA T, et al. Endothelial progenitor cell-derived exosomes, loaded with miR-126, promoted deep vein thrombosis resolution and recanalization [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 223.
- [58] DU X, HU N, YU H, et al. MiR-150 regulates endothelial progenitor cell differentiation *via* Akt and promotes *Thrombus* resolution [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 354.